

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044599**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.09.13

(21) Номер заявки
202090124

(22) Дата подачи заявки
2018.08.28

(51) Int. Cl. *A61K 39/39* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АДЕНОВИРУС, ВООРУЖЕННЫЙ БИСПЕЦИФИЧЕСКИМ АКТИВАТОРОМ Т-КЛЕТОК

(31) 1713765.4; PCT/EP2017/071674;

PCT/EP2017/071655

(32) 2017.08.28; 2017.08.29; 2017.08.29

(33) GB; EP; EP

(43) 2020.12.10

(86) PCT/EP2018/073160

(87) WO 2019/043020 2019.03.07

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АКАМИС БИО ЛИМИТЕД (GB)

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

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) YU FENG ET AL.: "Cancer Associated Fibroblasts-Targeted Oncolytic Virus Results in Enhanced Antitumor Activity in Mouse Model", MOLECULAR THERAPY, vol. 23, no. Suppl. 1, May 2015 (2015-05), page S246, XP002786686, 18TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-GENE-AND-CELL-THERAPY (ASGCT); NEW ORLEANS, LA, USA; MAY 13 -16, 2015, the whole document

CARLOS ALBERTO FAJARDO ET AL.: "Oncolytic Adenoviral Delivery of an EGFR-Targeting T-cell Engager Improves Antitumor Efficacy", CANCER RESEARCH, vol. 77, no. 8, 15 April 2017 (2017-04-15), pages 2052-2063, XP055388559, & 102ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-ASSOCIATION-FOR-CANCER-RESEARCH (AACR); ORLANDO, FL, USA; APRIL 02-06, 2011 ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1708 page 2060, column 1, line 11 - column 2, line 2
WO-A1-2015155370

(57) Аденовирус, содержащий последовательность формулы (I): 5'ITR-B₁-B_A-B₂-B_X-B_B-B_Y-B₃-3'ITR (I), отличающийся тем, что B_Y содержит трансгенную кассету, содержащую четыре трансгена, причем указанные гены кодируют FAP-биспецифический активатор Т-клеток, CXCL10, CXCL9 и ИФН-α. Настоящее изобретение также охватывает фармацевтическую композицию, содержащую указанный вирус, и применение указанного вируса или состава в лечении.

B1

044599

044599 B1

Настоящее изобретение относится к модифицированному аденовирусу, в частности, эндогенотуциреву (EnAd), вооруженному FAP-биспецифическому активатору Т-клеток, композиции, такой как фармацевтический состав, содержащий указанный аденовирус, применению указанного вируса и вирусных составов, в частности, в лечении, в частности, в лечении рака. Настоящее изобретение также охватывает способы получения указанного вируса и кодирующей его ДНК. Настоящее изобретение также охватывает новые последовательности, приведенные в перечне последовательностей, в сочетании с техническим описанием в настоящем документе, например, отличающиеся тем, что приведенный в пример вирус заменен, например, на альтернативный вариант кассеты или альтернативный вариант вируса, приведенных в перечне последовательностей.

Область техники

Рак до сих пор является значительным социальным бременем для общества, выражающимся в трудностях и страданиях пациентов и их близких, а также в высоких финансовых затратах на лечение, уход и поддержку пациентов.

Строма вокруг раковых клеток представляет собой физическую защиту, то есть может выполнять функцию захвата иммунных клеток, направляемых на борьбу с опухолью. Кроме того, строма экранирует гипоксическое микроокружение опухоли, перmissive и оптимизированное для роста опухоли. Согласно некоторым теориям клетки в строме являются источником энергии в опухоли.

Существенным компонентом опухолевой стромы являются фибробласты, модифицированные искажающим образом, так что они способствуют раку. Другими клетками, инфильтрующими строму, являются опухолеассоциированные макрофаги (TAM), представленные макрофагами типа 2 (M2), которые могут способствовать росту опухоли за счет секреции цитокинов и хемокинов, таких как ИЛ-10, которые подавляют иммунные ответы.

В частности, затруднительно нацеливание на опухолевую строму, поскольку клетки, составляющие ее окружение, являются "природными" иммунными или соединительнотканными клетками, которые встречаются по всему организму. Соответственно, нацеливание терапевтических агентов на указанные клетки может приводить к серьезным нецелевым эффектам.

Таким образом, существует потребность в улучшенном способе доставки биспецифического активатора Т-клеток непосредственно к опухолевым клеткам, где он может обеспечивать максимальный благоприятный терапевтический эффект, в частности, доставки к опухолевым клеткам, окруженным стромальными фибробластами.

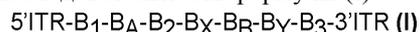
И в WO 2018/041838, и в WO 2018/041827, включенных в настоящий документ посредством ссылки, раскрыты определенные аденовирусы, кодирующие биспецифический активатор Т-клеток. Однако было бы полезно увеличить активность биспецифического активатора Т-клеток, закодированного в вирусе, путем включения активирующих цитокинов. Включение двух цитокинов, колокализованных с биспецифическим активатором Т-клеток, может быть достигнуто без особых трудностей. Однако при колокализации трех цитокинов с биспецифическим активатором Т-клеток природа указанных генов начинает влиять на экспрессию биспецифического активатора Т-клеток. Авторы настоящего изобретения получили вирус NG-615 с 4 трансгенами, показанный на фиг. 1. Однако экспрессия биспецифического активатора Т-клеток была снижена. Неожиданным образом, вирус NG-641, где изменены два цитокина (по сравнению с NG-615), обладает хорошей активностью, в том числе хорошей экспрессией биспецифического активатора Т-клеток. Соответственно, как оказалось, указанные четыре трансгена в совокупности совместимы с колокализацией в вирусе.

Настоящее изобретение относится к вирусу, содержащему указанные четыре трансгена, колокализованные между областями волоконного белка, L5 и E4.

Краткое описание изобретения

В следующих ниже пунктах представлено краткое описание настоящего изобретения.

1. Аденовирус, содержащий последовательность формулы (I):



где: B_1 представляет собой связь или содержит: E1A, E1B или E1A-E1B;

B_A содержит-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 представляет собой связь или содержит: E3;

V_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую: сайт рестрикции, один или более трансгенов; или и первое, и второе; B_B содержит L5;

V_Y содержит трансгенную кассету, содержащую четыре трансгена, причем указанные гены кодируют FAP-биспецифический активатор Т-клеток, CXCL10, CXCL9 и ИФН;

B_3 представляет собой связь или содержит: E4.

2. Аденовирус по пункту 1, отличающийся тем, что указанный кодируемый FAP-биспецифический активатор Т-клеток содержит направленную против CD3 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной, например, SEQ ID NO: 5.

3. Аденовирус по пункту 1 или 2, отличающийся тем, что указанный FAP-биспецифический актива-

тор Т-клеток содержит направленную против FAP последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной, например, SEQ ID NO: 9

4. Аденовирус по пункту 1, отличающийся тем, что указанный кодируемый FAP-биспецифический активатор Т-клеток содержит последовательность выбранного из SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из указанных последовательностей.

5. Аденовирус по любому из пунктов 1-4, отличающийся тем, что указанная трансгенная кассета кодирует CXCL10, представленный в SEQ ID NO: 100, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной, например, SEQ ID NO: 100.

6. Аденовирус по любому из пунктов 1-5, отличающийся тем, что указанная трансгенная кассета кодирует CXCL9, представленный в SEQ ID NO: 99, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной, например, SEQ ID NO: 99.

7. Аденовирус по любому из пунктов 1-6, отличающийся тем, что указанная трансгенная кассета кодирует ИФН- α (IFN α), представленный в SEQ ID NO: 98, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной, например, SEQ ID NO: 98.

8. Аденовирус по любому из пунктов 1-7, отличающийся тем, что указанные трансгены функционально связаны.

9. Аденовирус по любому из пунктов 1-8, отличающийся тем, что указанные трансгены разделены 3 разными высокоэффективными саморасщепляющимися пептидами.

10. Аденовирус по пункту 9, отличающийся тем, что указанные саморасщепляющиеся пептиды независимо выбраны из E2A, F2A, P2A и T2A.

11. Аденовирус по любому из пунктов 1-10, отличающийся следующим относительным порядком трансгенов от L5 к E4: FAP-биспецифический активатор Т-клеток, CXCL10, CXCL9 и ИФН- α , например, как показано для NG-641 на фиг. 1.

12. Аденовирус по любому из пунктов 1-11, отличающийся тем, что указанная трансгенная кассета содержит последовательность полинуклеотидов, представленную в SEQ ID NO: 95, или полинуклеотид, кодирующий такую же последовательность аминокислот, в частности, SEQ ID NO: 95.

13. Аденовирус по любому из пунктов 1-12, отличающийся тем, что указанный аденовирус содержит SEQ ID NO: 84.

14. Аденовирус по любому из пунктов 1-13, отличающийся тем, что указанный аденовирус является репликативно-компетентным.

15. Аденовирус по любому из пунктов 1-14, отличающийся тем, что указанный аденовирус является онколитическим.

16. Аденовирус по любому из пунктов 1-15, отличающийся тем, что указанный вирус содержит гексон и волоконный белок из Ad11.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая аденовирус по любому из пунктов 1-16 и вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.

18. Аденовирус по любому из пунктов 1-16, или фармацевтическая композиция по пункту 17, для применения в лечении, например, для применения в лечении рака.

19. Способ лечения пациента, включающий введение аденовируса по любому из пунктов 1-16 или фармацевтической композиции по пункту 17.

20. Применение аденовируса по любому из пунктов 1-16 или фармацевтической композиции по пункту 17 для получения медикамента для лечения рака.

Согласно одному варианту реализации один или более биспецифический активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением не содержат трансмембранного домена и таким образом не экспрессируются на поверхности раковых клеток, а вместо этого содержат сигнальную последовательность для облегчения высвобождения молекулы биспецифического активатора Т-клеток из раковой клетки, инфицированной вирусом.

Согласно одному варианту реализации указанная трансгенная кассета находится под контролем эндогенного промотора, например, основного позднего промотора.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что вооружение аденовируса молекулой биспецифического активатора Т-клеток обеспечивает преимущество, позволяя молекуле фрагмента биспецифического антитела эксплуатировать способность аденовируса селективно инфицировать раковые клетки, обеспечивая таким образом нацеленную доставку биспецифического активатора Т-клеток в опухолевые клетки.

Благоприятным образом, молекулы биспецифического активатора Т-клеток имеют небольшой размер и могут быть продуцированы в клетках млекопитающих. После однократной инфекции аденовирусами согласно настоящему описанию молекулы биспецифического активатора Т-клеток синтезируются опухолевыми клетками, секретируются и могут действовать локально, распространяясь за пределами непосредственной зоны влияния вируса. Это, соответственно, позволяет биспецифическому активатору Т-клеток распространяться за пределы непосредственного сайта инфекции, но в то же время ограничивает распространение вируса слишком далеко за пределы инфицированного сайта опухолевых клеток, это

минимизирует риск нежелательных нецелевых эффектов.

Согласно одному варианту реализации указанный аденовирус представляет собой EnAd. EnAd, как было показано, обладает усиленной онколитической активностью по сравнению с другими аденовирусными платформами, например, основанными на Ad5. Было также показано, что EnAd обладает высокой селективностью в отношении клеток карциномы из эпителия человека, таких как раковые клетки ободочной кишки, легких, мочевого пузыря и почек. Это делает EnAd идеальной основой для доставки молекул биспецифического активатора Т-клеток, поскольку Т-клетки могут быть активированы молекулой биспецифического активатора Т-клеток для атаки целевых клеток, в то время как EnAd одновременно инфицирует и лизирует раковые клетки. Это приводит к двунаправленной атаке на опухоль, оказывающей синергический онколитический эффект.

Согласно одному варианту реализации указанный направленный против CD3 компонент биспецифического активатора Т-клеток селективен в отношении антигена, выбранного из CD3ε, CD3γ и CD3δ, в частности, CD3ε.

FAP представляет собой антиген опухолевой стромы. Благоприятным образом, стромальные клетки (нетрансформированные клетки), экспрессирующие указанные антигены, не подвергаются процессу выбора по мутациям устойчивости на таком же уровне, как трансформированные клетки. Соответственно, нацеливание на указанные клетки для противораковой терапии осуществить проще, поскольку они не являются "подвижной мишенью". Кроме того, типы рецепторов, обнаруживаемых в стромальных клетках, часто одинаковы при разных типах рака. Таким образом, нацеливание на FAP, предположительно, будет эффективным при нескольких типах рака.

Благоприятным образом, на опухолеассоциированных фибробластах происходит стимулирующая регуляция FAP. Фибробласты представляют собой жизненно важный компонент солидных карцином, поддерживающий рост, инвазию и восстановление после вмешательств. Как правило, ими представлено 40-60% клеток в распространенных карциномах. Благоприятным образом, фибробласты представляют собой генетически стабильные клетки, которые с меньшей вероятностью будут избегать терапии, чем раковые клетки. Активированные фибробласты также относительно сходны в опухолях различных типов. Соответственно, путем активации Т-клеток для нацеливания на экспрессирующие FAP опухолеассоциированные фибробласты и их киллинга, аденовирусы согласно настоящему описанию могут помочь сократить спектр иммуносупрессивных путей, такие как опосредованные ИЛ-10, ТФР-β и IDO.

Согласно одному варианту реализации V_h не представляет собой связь.

Согласно одному варианту реализации указанный аденовирус является химерным. Согласно одному варианту реализации указанный аденовирус является онколитическим. Согласно одному варианту реализации указанный аденовирус является химерным и онколитическим. Согласно одному варианту реализации указанный аденовирус способен к репликации. Согласно одному варианту реализации указанный аденовирус является химерным, онколитическим и способен к репликации. Согласно одному варианту реализации указанный аденовирус является репликативно-компетентным. Согласно другому варианту реализации указанный аденовирус является химерным, онколитическим и репликативно-компетентным. Согласно одному варианту реализации указанный аденовирус является дефектным по репликации, т.е. представляет собой вектор.

Согласно одному варианту реализации V_h содержит трансген или трансгенную кассету, в частности, трансгенную кассету, кодирующую биспецифический активатор Т-клеток. Согласно одному варианту реализации указанный дополнительный трансген находится под контролем экзогенного промотора, такого как промотор CMV.I

Использование экзогенного промотора может быть благоприятным согласно некоторым вариантам реализации, поскольку он может выраженно и конститутивно экспрессировать антитело или фрагмент, который может, в частности, подходить для применения в некоторых ситуациях, например, при очень первазивном раке у пациента. Благоприятным образом, применение конститутивного экзогенного промотора приводит к непрерывной транскрипции трансгена, что может быть желательно в определенных ситуациях.

Согласно одному варианту реализации указанная трансгенная кассета содержит последовательность Козак, например, в начале кодирующей последовательности, в частности, на L5-конце трансгенной кассеты.

Согласно одному варианту реализации указанная трансгенная кассета дополнительно содержит последовательность полиаденилирования, например, на конце последовательности, в частности, на конце трансгенной кассеты с E4-областью.

Согласно одному варианту реализации указанная трансгенная кассета имеет структуру, показанную на фиг. 1, например, как вирус NG-641.

Согласно одному варианту реализации указанная молекула биспецифического активатора Т-клеток имеет короткое время полужизни, например, 48 часов или менее.

Согласно одному варианту реализации указанный аденовирус содержит только один биспецифический активатор Т-клеток.

Согласно другому варианту реализации указанный аденовирус содержит два биспецифических активатора Т-клеток.

Согласно одному варианту реализации указанный FAP-биспецифический активатор Т-клеток содержит домен VH, содержащий последовательность аминокислот согласно представленной в SEQ ID NO: 11, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 95% идентичную указанной.

Согласно одному варианту реализации указанный FAP-биспецифический активатор Т-клеток содержит домен VL, содержащий последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 10, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 95% идентичную указанной.

Согласно одному варианту реализации направленная против часть FAP-биспецифического активатора Т-клеток содержит домен VH, содержащий последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 6, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 95% идентичную указанной.

Согласно одному варианту реализации направленная против CD3 часть FAP-биспецифического активатора Т-клеток содержит домен VL, содержащий последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 7, или последовательность аминокислот, по меньшей мере на 95% идентичную указанной.

Согласно одному варианту реализации аденовирус в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 34 или 35, или полинуклеотид, кодирующий такую же последовательность аминокислот scFv, в частности, SEQ ID NO: 34.

Согласно одному варианту реализации аденовирус в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, или последовательность полинуклеотидов, кодирующую такую же последовательность аминокислот.

Согласно одному варианту реализации аденовирус в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 90, или полинуклеотид, кодирующий такую же последовательность аминокислот.

Согласно одному варианту реализации аденовирус в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 91 или полинуклеотид, кодирующий такую же последовательность аминокислот.

Согласно одному варианту реализации аденовирус в соответствии с настоящим изобретением содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92, или полинуклеотид, кодирующий такую же последовательность аминокислот.

Специалисту в данной области техники известно об избыточности кода ДНК, соответственно, настоящее изобретение охватывает EпAd или Ad11, кодирующий биспецифический активатор Т-клеток с аминокислотой согласно описанию в настоящем документе.

С-концевая аффинная His-метка (такая как декагистидиновая или гексагистидиновая метка) подходит для очищения биспецифического активатора Т-клеток или аденовируса. Однако она является необязательной и может быть исключена, например, из конечного продукта. Специалисту в данной области техники известно, что могут применяться другие аффинные метки, отличные от дека-His, и они, сходным образом, могут быть исключены без нарушения биологической функции биспецифического активатора Т-клеток или аденовируса.

Соответственно, согласно одному варианту реализации указанный биспецифический активатор Т-клеток содержит последовательность аминокислот согласно представленным в SEQ ID NO: 1 или 2, однако из него исключена аффинная His-метка на С-конце последовательности, такой как SEQ ID NO: 61 или 62.

Исключение аффинной декагистидиновой метки также распространяется на все другие последовательности согласно описанию в настоящем документе, содержащие указанную аффинную декагистидиновую метку, т.е. настоящее изобретение включает те же последовательности аминокислот или ДНК, где отсутствует С-концевая His-метка.

Согласно одному аспекту предложена композиция, содержащая аденовирус согласно описанию в настоящем документе, а также разбавитель или носитель.

Согласно одному аспекту предложен способ лечения пациента, включающий введение терапевтически эффективного количества аденовируса или композиции согласно описанию в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации указанный способ применяют для лечения рака, например, эпителиального рака, в частности, солидной опухоли.

Согласно одному варианту реализации предложен способ лечения, включающий введение вируса в соответствии с настоящим изобретением в комбинации с ингибитором контрольной точки (таким как ингибитор PD-1 или PDL1), в частности, отличающийся тем, что указанный ингибитор контрольной точки закодирован в вирусе.

Согласно одному варианту реализации предложен способ лечения, включающий введение вируса в соответствии с настоящим изобретением, который НЕ находится в комбинации с ингибитором контрольной точки (например, из перечисленных в настоящем документе, таких как ингибитор PD-1 или PDL1), в частности, отличающийся тем, что указанный ингибитор контрольной точки не закодирован в вирусе.

Биспецифические активаторы Т-клеток, кодируемые вирусом в соответствии с настоящим изобре-

тением, обладают способностью потенцировать цитотоксичность вируса.

Неожиданным образом, биспецифические активаторы Т-клеток, кодируемые вирусом в соответствии с настоящим изобретением, могут активировать CD4+ клетки и/или CD8+ клетки, например, даже клетки в супрессивном окружении опухоли, в том числе Т-клетки в жидком окружении опухоли, таком как асцит.

Благоприятным образом, биспецифические активаторы Т-клеток, кодируемые вирусом в соответствии с настоящим изобретением, могут активировать цитотоксический Т-клетки, например, даже Т-клетки в супрессивном окружении опухоли, в том числе Т-клетки в жидком окружении опухоли, таком как асцит.

Еще более неожиданным образом биспецифические активаторы Т-клеток, кодируемые вирусом в соответствии с настоящим изобретением, способны стимулировать (активировать) пролиферацию Т-клеток.

Вирусы, кодирующие биспецифический активатор Т-клеток в соответствии с настоящим изобретением, по-видимому, способны обходить, преодолевать или обращать иммуносупрессивное микроокружение опухоли.

Согласно одному варианту реализации активация Т-клеток приводит к стимулирующей регуляции маркера Т-клеток, например, CD25.

Подробное описание изобретения

Иммунная клетка согласно описанию в настоящем документе представляет собой клетку, играющую функциональную роль в иммунной системе, включая (но не ограничиваясь перечисленными) макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, НК-клетки, лимфоциты, такие как Т-лимфоциты (в частности, Т-клетки и НКТ-клетки).

Сайт связывания антигена в настоящем документе относится к части молекулы, которая содержит пару переменных областей, в частности, когнатную пару, которая специфически взаимодействует с целевым антигеном.

"Специфически" в настоящем документе относится к сайту связывания, распознающему только антиген, в отношении которого он специфичен, или сайту связывания, обладающему значимо более высокой аффинностью связывания антигена, в отношении которого он специфичен, по сравнению с аффинностью к антигенам, в отношении которых он неспецифичен, например, в 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз более высокой аффинностью связывания. Аффинность может быть измерена с применением таких методик, как ВІАсоге.

Молекула биспецифического антитела в настоящем документе относится к молекуле с двумя антигенсвязывающими доменами, которые могут связывать одинаковые или разные антигены. Биспецифический активатор Т-клеток представляет собой подкласс молекул биспецифических антител.

Биспецифический активатор Т-клеток в настоящем документе относится к биспецифическому активатору Т-клеток, в частности, содержащему направленный против CD3 связывающий домен и дополнительный связывающий домен, в указанном случае - направленный против FAP связывающий домен. Обычно связывающие домены находятся в форме scFv. Схематическое изображение биспецифического активатора Т-клеток приведено на фиг. 12.

Соответственно, биспецифический активатор Т-клеток в настоящем документе относится к классу искусственных биспецифических моноклональных антител, содержащих 2 scFv разных антител или последовательности аминокислот из 4 разных генов на единственно пептидной цепи размером приблизительно 55 кДа. Один из указанных scFv специфичен в отношении иммунной клетки, например, Т-клеточного антигена, такого как CD3-рецептор, экспрессируемый на поверхности Т-клеток. Другой scFv, на существующем уровне техники, как правило, связывается с опухолевой клеткой

посредством опухолеспецифической молекулы. Соответственно, биспецифические активаторы Т-клеток способны формировать связь между Т-клетками и опухолевыми клетками за счет их специфичности в отношении антигена на Т-клетке и антигена на опухолевой клетке. Это приводит к активации Т-клеток и запускает осуществление Т-клетками их цитотоксических эффектов на опухолевые клетки независимо от МНС I или костимулирующих молекул.

Согласно одному варианту реализации указанный активатор Т-клеток имеет структуру формата: VL1-линкер1-VH1-линкер2-VH2-линкер3-VL2, например, содержит линкеры, независимо выбранные из последовательностей линкеров согласно описанию в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации линкер биспецифического активатора Т-клеток имеет длину в диапазоне от 10 до 30 аминокислот, например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30, например, как линкер согласно описанию в настоящем документе.

Строма или стромальный антиген в настоящем документе относится к антигенной терапевтической мишени в строме, в том числе экспрессируемой в молекулярной структуре матрицы стромы, такой как молекулы соединительной ткани или молекулы, ассоциированные с указанной матрицей, или антигены, ассоциированные с клеточными компонентами стромы, например, экспрессируемой на фибробластами, опухолеассоциированными макрофагах, дендритных клетках, НК-клетках и/или Т-клетках, инфильтрирующих строму. Примеры стромальных антигенов включают, не ограничиваясь перечисленными, FAP,

ТФР- β , TREM1, IGFBP7, FSP-1, ассоциированный с фибробластами антиген, NG2, эндосиалин (CD248), рецептор тромбоцитарного фактора роста- α (рТФР- α), рецептор тромбоцитарного фактора роста- β (рТФР- β) и виментин. Обычно стромальные антигены не экспрессируются на раковых клетках, т.е. они экспрессируются только на стромальных клетках.

Нацеливание на фибробласты может быть реализовано путем применения антигена белка активации фибробластов (FAP), в частности, антитела, специфического в отношении FAP, которое не связывает CD26 (см. US 2012/0258119, включенный в настоящий документ посредством ссылки).

Изначально FAP был идентифицирован как сериновая протеаза на реактивных стромальных фибробластах. Последующее молекулярное клонирование позволило обнаружить, что FAP идентичен сепразе, мембраноассоциированной желатиназе размером 170 кДа, экспрессируемой линиями клеток меланомы. Полноразмерная кДНК кодировала трансмембранную протеазу типа Н размером 760 аминокислот (АК), высокомолекулярную дипептидилпептидазу IV (DPPIV) с 52% идентичностью аминокислот на протяжении всей последовательности и почти 70% идентичностью в каталитическом домене. В US 5587299, включенном в настоящий документ посредством ссылки, описаны молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие FAP, и их применение.

FAP известен как многофункциональный белок, осуществляющий свои биологические функции зависимым от клеток образом посредством комбинации протеазной активности и способности формировать комплексы с другими молекулами поверхности клеток. Избыточная экспрессия FAP в эпителиальных и фибробластных линиях клеток способствует злокачественному поведению, указывая на клиническую ситуацию, когда уровни клеточной экспрессии FAP коррелируют с худшим клиническим исходом.

Посредством паракринных сигнальных молекул раковые клетки активируют стромальные фибробласты и индуцируют экспрессию FAP, который, в свою очередь, влияет на пролиферацию, инвазию и миграцию раковых клеток. Недавние исследования продемонстрировали, что ТФР- β представляет собой доминирующий фактор, способствующий экспрессии белка FAP (Chen, H et al/ (2009) *Exp and Molec Pathology*, doi: 10.1016/j.yexmp. 2009.09.001). FAP интенсивно экспрессируется на реактивных стромальных фибробластах в 90% эпителиальных карцином человека, в том числе карцином молочной железы, легкого, ободочной и прямой кишки; и яичников (Garin-Chesa, P et al (1990) *PNAS USA* 87: 7236-7239). Недавно Chen с соавторами показали, что FAP α оказывает влияние на инвазию, пролиферацию и миграцию клеток рака яичников HO-8910PM (Chen, H et al. (2009) *Exp and Molec Pathology*, doi: 10.1016/j.yexmp. 2009.09.001).

Нацеливание на FAP может быть реализовано путем связывания указанного антигена и стерического блокирования его взаимодействия с биологически релевантными молекулами. Согласно альтернативному или дополнительному варианту происходит перекрестное связывание молекулы FAP с другой молекулой FAP или другой молекулой, например, с Т-клетками. Указанное перекрестное связывание повышает видимость клеток, несущих FAP, для иммунной системы, которая затем может быть активирована для их нейтрализации или уничтожения.

Аденовирус согласно настоящему описанию обладает способностью инфицировать опухолевые клетки, и, в частности, его выбирают для преимущественного инфицирования опухолевых клеток. Инфекция онколитическим вирусом приводит к смерти и лизису раковой клетки с высвобождением новых генерированных вирусных частиц. Включенные трансгены, например, биспецифический активатор Т-клеток и цитокин, синтезируются в клетках и активно секретируются указанными опухолевыми клетками перед их смертью. Также некоторые молекулы высвобождаются при лизисе клеток.

Молекулы антител, такие как биспецифический активатор Т-клеток, с коротким временем полужизни могут подходить, в частности, для применения согласно настоящему изобретению, поскольку это минимизирует нецелесообразные эффекты, так как организм быстро выводит указанные молекулы, если они становятся системно доступными.

Соответственно, аденовирус в соответствии с настоящим изобретением характеризуется по меньшей мере двумя или тремя механизмами атаки на опухоль, в том числе непрямыми механизмами, разрушающими строму опухоли.

Трансген в настоящем документе относится к гену, который был встроен в геномную последовательность, представляющему собой ген, неестественный для вируса (экзогенный) или в норме не обнаруживаемый в данном конкретном месте в указанном вирусе. Примеры трансгенов известны в данной области техники и описаны в настоящем документе. Трансген в настоящем документе также включает функциональный фрагмент гена, представляющий собой часть указанного гена, которая при ее inserции подходит для осуществления функции или большей части функции полноразмерного гена.

"Трансген" и "кодирующая последовательность" используются в настоящем документе взаимозаменяемо в контексте inserции в вирусный геном, если контекст не указывает на иное. Кодированная последовательность в настоящем документе означает, например, последовательность ДНК, кодирующую функциональные РНК, пептид, полипептид или белок. Как правило, кодирующая последовательность представляет собой кДНК для трансгена, которая кодирует функциональные РНК, пептид, полипептид или белок, представляющие интерес. Функциональные РНК, пептиды, полипептид и белки, представ-

ляющие интерес, описаны ниже.

Очевидным образом, геном вируса содержит кодирующие последовательности ДНК. Эндогенные (встречающиеся в природе) гены в геномной последовательности вируса не считаются трансгеном в контексте настоящего изобретения, если они не были модифицированы с применением рекомбинантных методик таким образом, чтобы располагаться в не являющемся естественным месте или в не являющейся естественной среде.

Согласно одному варианту реализации трансген в настоящем документе относится к сегменту ДНК, содержащему ген или последовательность кДНК, выделенный(ую) из одного организма и введенный(ую) в другой организм, т.е. вирус согласно настоящему описанию. Согласно одному варианту реализации указанный неприродный сегмент ДНК может сохранять способность к продуцированию функциональных РНК, пептида, полипептида или белка.

Соответственно, согласно одному варианту реализации инсертированный трансген кодирует человеческий или гуманизированный белок, полипептид или пептид.

"Функционально связанный" в настоящем документе относится к трансгенам, ассоциированным с необходимыми регуляторными элементами, позволяющими обеспечить функциональность указанных генов, т.е. позволяющими обеспечить экспрессию указанных генов с использованием клеточных механизмов после попадания вируса внутрь клетки.

Согласно одному или более вариантам реализации указанная кассета имеет структуру, представленную на одном или более из чертежей или в примерах.

Трансгенная кассета в настоящем документе относится к последовательности ДНК, кодирующей один или более трансгенов в форме одной или более кодирующих последовательностей, и один или более регуляторных элементов.

Трансгенная кассета может кодировать одну или более последовательностей моноцистронной и/или полицистронной мРНК.

Согласно одному варианту реализации указанные трансген или трансгенная кассета кодируют моноцистронную или полицистронную мРНК, и, например, указанная кассета подходит для инсерции в аденовирусный геном в месте, которое находится под контролем эндогенного промотора или экзогенного промотора, или их комбинации.

Моноцистронная мРНК в настоящем документе относится к молекуле мРНК, кодирующей одну функциональную РНК или один функциональный пептид, полипептид или белок.

Согласно одному варианту реализации указанная трансгенная кассета кодирует моноцистронную мРНК.

Согласно одному варианту реализации указанная трансгенная кассета в контексте кассеты, кодирующей моноцистронную мРНК, означает сегмент ДНК, необязательно содержащий экзогенный промотор (который представляет собой регуляторную последовательность, определяющую, где и когда активен указанный трансген) или сайт сплайсинга (который представляет собой регуляторную последовательность, определяющую, когда молекула мРНК будет расщеплена сплайсосомой), и кодирующую последовательность (т.е. трансген), обычно происходящую из кДНК белка, представляющего интерес; необязательно содержащий сигнальную поли(А)-последовательность и последовательность терминации.

Согласно одному варианту реализации указанная трансгенная кассета может кодировать одну или более последовательностей полицистронной мРНК.

Полицистронная мРНК в настоящем документе относится к молекуле мРНК, кодирующей две или более функциональных РНК, или два или более функциональных пептидов или белков, или их комбинацию. Согласно одному варианту реализации указанная трансгенная кассета кодирует полицистронную мРНК.

Согласно одному варианту реализации трансгенная кассета в контексте кассеты, кодирующей полицистронную мРНК, включает сегмент ДНК, необязательно содержащий экзогенный промотор (который представляет собой регуляторную последовательность, определяющую, где и когда активен указанный трансген) или сайт сплайсинга (который представляет собой регуляторную последовательность, определяющую, когда молекула мРНК будет расщеплена сплайсосомой), и две или более кодирующих последовательностей (т.е. трансгенов), обычно происходящих из кДНК белка или пептида, представляющего интерес, например, где каждая кодирующая последовательность отделена либо IRES, либо пептидом 2A. Указанная кассета может необязательно содержать, после последней кодирующей последовательности, подлежащей транскрипции, поли(А)-последовательность и последовательность терминации.

Согласно одному варианту реализации указанная трансгенная кассета кодирует моноцистронную мРНК, за которой следует полицистронная мРНК. Согласно другому варианту реализации указанная трансгенная кассета содержит полицистронную мРНК, за которой следует моноцистронная мРНК.

Согласно одному варианту реализации указанный аденовирус представляет собой аденовирус человека. "Аденовирус", "серотип" или "аденовирусный серотип" в настоящем документе относится к любому аденовирусу, который может принадлежать к любому из более чем 50 известных в настоящее время аденовирусных серотипов, которые классифицируются в подгруппы А-Ф, а также охватывает любые пока не идентифицированные или не классифицированные аденовирусные серотипы. См., например, источни-

ки: Strauss, "Adenovirus infections in humans," в издании: The Adenoviruses, Ginsberg, ea., Plenum Press, New York, NY, pp. 451-596 (1984), и Shenk, "Adenoviridae: The Viruses and Their Replication," в издании: Fields Virology, Vol.2, Fourth Edition, Knipe, 35ea., Lippincott Williams &Wilkins, pp. 2265-2267 (2001), согласно табл. 1.

Таблица 1

Подгруппа	Аденовирусный серотип
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

Согласно одному варианту реализации аденовирусы согласно настоящему описанию представляют собой вирусы подгруппы B, в частности, Ad11, в частности, Ad11p (штамм Slobitski) и их производные, такие как EnAd.

Аденовирусы распределяют по группам/серотипам на основании капсида, например гексона и/или волоконного белка.

Согласно одному варианту реализации аденовирус согласно настоящему описанию не представляет собой вирус группы A, C, D, E или F. Вирусы согласно настоящему описанию не содержат аденовирусный белок смерти.

Согласно одному варианту реализации аденовирус согласно настоящему описанию является химерным. Если указанный аденовирус является химерным, для определения серотипа используют характеристики внешнего капсида. "Химерный" в настоящем документе относится к вирусу, который содержит ДНК по меньшей мере двух разных вирусных серотипов, в том числе разных серотипов в составе одной группы.

Согласно одному варианту реализации указанный онколитический вирус содержит волоконный, гексоновый и пентоновый белки одного серотипа, например, Ad11, в частности, Ad11p, например, обнаруживаемые в положениях 30812-31789, 18254-21100 и 13682-15367 геномной последовательности последнего, где указанные положения нуклеотидов соответствуют Genbank ID 217307399 (номер доступа: GC689208).

Согласно одному варианту реализации указанный аденовирус представляет собой энаденотуцирев (также известный как EnAd и, ранее, как EnAd). Энаденотуцирев в настоящем документе относится к химерному аденовирусу с последовательностью SEQ ID NO: 28. Он представляет собой репликативно-компетентный онколитический химерный аденовирус, который обладает улучшенными терапевтическими свойствами по сравнению с аденовирусами дикого типа (см. WO 2005/118825). EnAd содержит химерную область E2B, которая содержит ДНК из Ad11p и Ad3, и делеции в E3/E4. Указанные структурные изменения в энаденотуциреве приводят к получению генома, который приблизительно на 3,5 т.п.о. меньше генома Ad11p, что обеспечивает дополнительное "пространство" для инсерции трансгенов. Почти вся область E3 и часть области E4 в EnAd делегированы. Соответственно, в его геноме имеется значительное пространство для размещения дополнительного генетического материала при сохранении жизнеспособности. Кроме того, поскольку EnAd представляет собой аденовирус подгруппы B, предсуществующий иммунитет к нему 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. WO 2008/080003, включенный посредством ссылки). Соответственно, согласно одному варианту реализации задействованный аденовирус представляет собой OvAd1 или OvAd2.

Предположительно, EnAd преимущественно инфицирует опухолевые клетки, быстро реплицируется в указанных клетках и вызывает лизис клеток. Это, в свою очередь, может приводить к воспалительным иммунным ответам, таким образом дополнительно стимулируя борьбу организма с раком. Предполагается, что эффективность EnAd отчасти связана с быстрой репликацией вируса *in vivo*.

Благоприятным образом, вооружение вируса ДНК, кодирующей определенные белки, такие как биспецифический активатор Т-клеток, которые могут быть экспрессированы в раковой клетке, может позволять более эффективно задействовать собственную защиту организма для борьбы с опухолевыми клетками, например, за счет повышения видимости указанных клеток для иммунной системы или за счет доставки терапевтического гена/белка преимущественно в целевые опухолевые клетки.

Важно, что экспрессия трансгенов не влияет нежелательным образом на репликацию или другие благоприятные свойства вируса. Соответственно, указанный ген или гены должны быть инсертированы в место, не нарушающее компетентность репликации и другие благоприятные свойства вируса. Кроме того, геном аденовирусов плотно упакован и, соответственно, может быть трудно найти подходящее место для инсерции трансгенов. Это также ограничивает размер трансгенов, которые могут быть размещены.

Онколитический аденовирус в настоящем документе означает аденовирус, который преимущественно убивает раковые клетки, а не нераковые клетки. Согласно одному варианту реализации указанный онколитический вирус является апоптотическим, т.е. он ускоряет запрограммированную смерть клеток.

Согласно одному варианту реализации указанный онколитический вирус является цитолитическим. Цитолитическая активность онколитических аденовирусов согласно настоящему описанию может быть определена в репрезентативных линиях опухолевых клеток и данные преобразованы в измерение мощности, например, для аденовируса, принадлежащего к подгруппе С, такого как Ad5, используемого в качестве стандарта (т.е. с присвоенной мощностью, равной 1). Подходящий способ определения цитолитической активности представлен MTS-анализом (см. пример 4, фиг. 2 из WO 2005/118825, включенного в настоящий документ посредством ссылки).

Согласно одному варианту реализации указанный онколитический вирус является некролитическим, т.е. он вызывает или ускоряет некроз клеток или иммуногенную клеточную смерть. Согласно одному варианту реализации некролитическая клеточная смерть является предпочтительной, поскольку она запускает, индуцирует иммунные ответы у пациентов (хозяина).

Если контекст не указывает на иное, аденовирус в настоящем документе относится к способному к репликации вирусу (такому как репликативно-компетентный вирус), а также дефектным по репликации вирусным векторам.

Способный к репликации в настоящем документе относится к репликативно-компетентному вирусу или вирусу, репликация которого зависит от фактора в раковых клетках, например, фактора стимулирующей регуляции, такого как p53 или аналогичного.

Согласно одному варианту реализации указанный вирус является репликативно-компетентным. Репликативно-компетентный в контексте настоящего описания относится к вирусу, обладающему всеми необходимыми механизмами для репликации в клетках *in vitro* и *in vivo*, т.е. без помощи пакующей линии клеток. Вирусный вектор, например, с делецией в области E1, способный к репликации в комплементарной пакующей линии клеток, не является репликативно-компетентным вирусом в указанном контексте.

Вирусные векторы являются дефектными по репликации и им необходима пакующая клетка для обеспечения комплементарного гена, позволяющего осуществить репликацию.

Аденовирусный геном (геном аденовируса) в настоящем документе означает последовательность ДНК, кодирующую структурные белки и элементы, относящиеся к функции/жизненному циклу аденовируса.

Все геномы аденовирусов человека, изученные к настоящему времени, имеют одинаковую общую организацию, т.е. гены, кодирующие специфические функции, локализованы в одном и том же положении в вирусном геноме (в настоящем документе они называются структурными элементами). Каждый конец вирусного генома содержит короткую последовательность, известную как инвертированный концевой повтор (или ITR), которая необходима для вирусной репликации. Вирусный геном содержит пять ранних единиц транскрипции (E1A, E1B, E2, E3 и E4), три задержанных ранних единиц (IX, IVa2 и поздний E2) и одну позднюю (основную позднюю) единицу, подвергающихся процессингу с образованием пяти семейств поздних мРНК (L1-L5). Белки, кодируемые ранними генами, в первую очередь вовлечены в репликацию и модуляцию ответа клетки-хозяина на инфекцию, тогда как поздние гены кодируют вирусные структурные белки. Обозначения ранних генов начинаются с символа E, а поздних генов - с символа L.

Геном аденовирусов плотно упакован, т.е. содержит незначительное количество некодирующих последовательностей, и, соответственно, может быть трудно найти подходящее место для инсерции трансогенов.

Согласно одному варианту реализации онколитический или частичный онколитический вирус в соответствии с настоящим изобретением может представлять собой результат делеции в области E4 и/или E3, например, частичной делеции области E4 или полной делеции области E3, или, как вариант, частичной делеции области E4 (например, E4orf4) и полной делеции области E3, например, как в примерах последовательностей, приведенных в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации указанный онколитический вирус представляет собой EnAd или его активное производное, сохраняющее существенно важные благоприятные свойства вируса. EnAd описан в WO 2005/118825 (включенном в настоящий документ посредством ссылки), а полная последовательность указанного вируса приведена в настоящем документе как SEQ ID NO: 28. Химерная область E2B раскрыта в настоящем документе как SEQ ID NO: 60.

Благоприятным образом, аденовирусы согласно настоящему описанию демонстрируют профили вирусной активности, например, репликации и/или инфективности, аналогичные EnAd, после инфицирования клеток различных линий рака толстой кишки линия *in vitro*.

Структурные элементы аденовирусов

Поскольку структура аденовирусов, в целом, сходна, описанные ниже элементы обсуждаются применительно к структурным элементам и в рамках общеиспользуемой номенклатуры для их обозначения, известных специалисту. При упоминании в настоящем документе элемента авторы имеют в виду после-

довательность ДНК, кодирующую указанный элемент, или последовательность ДНК, кодирующую такой же структурный белок элемента в аденовирусе. Последнее связано с избыточностью кода ДНК. Может быть необходимо учитывать предпочтительное использование кодонов у вирусов для получения оптимизированных результатов.

Любой структурный элемент из аденовируса, используемый в вирусах согласно настоящему описанию, может содержать естественную последовательность или состоять из естественной последовательности, или может обладать сходством на протяжении определенного отрезка, составляющим по меньшей мере 95%, например, 96, 97, 98, 99 или 100%. Исходная последовательность может быть модифицирована с исключением 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1% генетического материала. Специалисту в данной области техники известно, что при внесении изменений не должны быть повреждены рамки считывания вируса, что приводит к нарушению экспрессии структурных белков.

Согласно одному варианту реализации заданный элемент представляет собой полноразмерную последовательность, т.е. полноразмерный ген.

Согласно одному варианту реализации заданный элемент меньше полноразмерного и сохраняет такую же или соответствующую функцию, что и полноразмерная последовательность.

Согласно одному варианту реализации для заданного элемента, необязательного в конструкциях согласно настоящему описанию, последовательность ДНК может быть меньше полноразмерной и быть нефункциональной.

Структурные гены, кодирующие структурные или функциональные белки аденовируса, обычно соединены некодирующими областями ДНК. Соответственно, имеется некоторая гибкость в отношении того, где может быть "разрезана" геномная последовательность представляющего интерес структурного элемента (в частности, его некодирующих областей) для инсерции трансгена в вирусы согласно настоящему описанию. Соответственно, для целей настоящего изобретения элемент будет считаться упоминаемым структурным элементом при условии, что он соответствует назначению и не кодирует посторонний материал. Соответственно, по мере целесообразности ген будет ассоциирован с подходящими некодирующими областями, например, как в естественной структуре вируса.

Соответственно, согласно одному варианту реализации инсерция, например, ДНК, кодирующей сайт рестрикции и/или трансген, происходит в некодирующей области геномной вирусной ДНК, например, в интроне или межгенной последовательности. При этом некоторые некодирующие области аденовируса могут выполнять функцию, например, при альтернативном сплайсинге, регуляции транскрипции или регуляции трансляции, и это может быть необходимо учесть.

Идентифицированные в настоящем документе сайты, ассоциированные с областью L5 (например, между областью L5 и E4), подходят для размещения различных последовательностей ДНК, кодирующих комплексные объекты, такие как РНК-интерференция, цитокины, одноцепочечные или мультимерные белки, такие как антитела, например, биспецифический активатор Т-клеток.

Ген в настоящем документе относится к кодирующим последовательностям и, необязательно, любым некодирующим последовательностям, ассоциированным с ними, например, к интронам и ассоциированным экзонам. Согласно одному варианту реализации ген содержит только имеющие существенное значение структурные компоненты или состоит только из них, например, представляет собой кодирующую область.

Ниже приведено описание специфических структурных элементов аденовирусов.

Последовательности инвертированных концевых повторов (ITR) присутствуют во всех известных аденовирусах; они были названы так из-за их симметричности, и представляют собой точки начала репликации вирусной хромосомы. Другим свойством указанных последовательностей является их способность формировать шпильку.

5'ITR в настоящем документе относится к частичной или полной последовательности ITR на 5'-конце аденовируса, которая сохраняет функцию указанного ITR при встраивании в аденовирус в подходящем месте. Согласно одному варианту реализации 5'ITR содержит последовательность или состоит из последовательности, включающей приблизительно с 1 п.о. по 138 п.о. из SEQ ID NO: 28, или последовательности, на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности по всей длине, в частности, включающей последовательность приблизительно с 1 п.о. по 138 п.о. из SEQ ID NO: 28.

3'ITR в настоящем документе относится к частичной или полной последовательности ITR на 3'-конце аденовируса, которая сохраняет функцию указанного ITR при встраивании в аденовирус в подходящем месте. Согласно одному варианту реализации 3'ITR содержит последовательность или состоит из последовательности, включающей приблизительно с 32189 п.о. по 32326 п.о. из SEQ ID NO: 28, или последовательности, на 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной указанной последовательности по всей длине, в частности, включающей последовательность приблизительно с 32189 п.о. по 32326 п.о. из SEQ ID NO: 28.

V₁ в настоящем документе относится к последовательности ДНК, кодирующей: часть области или всю область E1A из аденовируса, часть области или всю область E1B аденовируса; и, независимо, часть области или всю область E1A и E1B аденовируса.

Если V₁ представляет собой связь, последовательности E1A и E1B исключают из вируса. Согласно

одному варианту реализации V_1 представляет собой связь и, соответственно, вирус представляет собой вектор.

Согласно одному варианту реализации V_1 дополнительно содержит трансген. В данной области техники известно, что в области E1 может быть размещен трансген, который может быть инсертирован разрушающим образом в область E1 (т.е. в "середину" последовательности), или область E1 может быть делетирована частично или полностью для обеспечения большего пространства для размещения генетического материала.

E1A в настоящем документе относится к последовательности ДНК, кодирующей часть области или всю область E1A аденовируса. Последнее здесь относится к полипептиду/ белку E1A. Указанная последовательность может быть мутирована таким образом, что белок, кодируемый геном E1A, содержит консервативные или неконсервативные изменения аминокислот, таким образом, что он обладает: такой же функцией, что и белок дикого типа (т.е. соответствующий немутированный белок); усиленной функцией по сравнению с белком дикого типа; пониженной функцией, например, отсутствием функции, по сравнению с белком дикого типа; или обладает новой функцией по сравнению с белком дикого типа; или характеризуется комбинацией перечисленного, по мере целесообразности.

E1B в настоящем документе относится к последовательности ДНК, кодирующей часть области или всю область E1B аденовируса (т.е. полипептид или белок), она может быть мутирована таким образом, что белок, кодируемый геном/областью E1B, содержит консервативные или неконсервативные изменения аминокислот, таким образом, что он обладает: такой же функцией, что и белок дикого типа (т.е. соответствующий немутированный белок); усиленной функцией по сравнению с белком дикого типа; пониженной функцией, например, отсутствием функции, по сравнению с белком дикого типа; или обладает новой функцией по сравнению с белком дикого типа; или характеризуется комбинацией перечисленного, по мере целесообразности.

Соответственно, V_1 может быть модифицированным или немодифицированным относительно области E1 дикого типа, такой как E1A и/или E1B дикого типа. Специалист в данной области техники может легко идентифицировать, присутствуют ли E1A и/или E1B, или (частично) делетированы или мутированы.

"Дикий тип" в настоящем документе относится к известному аденовирусу. Известный аденовирус представляет собой аденовирус, который был идентифицирован и назван, независимо от того, доступна ли последовательность.

Согласно одному варианту реализации V_1 имеет последовательность с 139 п.о. по 3932 п.о. из SEQ ID NO: 28.

V_A в настоящем документе относится к последовательности ДНК, кодирующей области E2B-L1-L2-L3-E2A-L4, включая любые некодирующие последовательности, по мере целесообразности. Обычно указанная последовательность не содержит трансген. Согласно одному варианту реализации указанная последовательность по существу аналогична или идентична непрерывной последовательности известного аденовируса, например, серотипа, представленного в табл. 1, в частности, вируса группы В, такого как Ad3, Ad7, Ad11, Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 или их комбинации, например, Ad3, Ad11 или их комбинации. Согласно одному варианту реализации E2B-L1-L2-L3-E2A-L4 относится к содержанию указанных элементов и других структурных элементов, ассоциированных с указанной областью, например, V_A обычно включают последовательность, кодирующую белок IV2a, например, следующим образом: IV2A IV2a-E2B-L1-L2-L3-E2A-L4.

Согласно одному варианту реализации область E2B является химерной, т.е. содержит последовательностей ДНК из двух или более разных аденовирусных серотипов, например, из Ad3 и Ad11, например, из Ad11p. Согласно одному варианту реализации область E2B имеет последовательность с 5068 п.о. по 10355 п.о. из SEQ ID NO: 28 или последовательность, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную указанной на протяжении всей длины.

Согласно одному варианту реализации E2B в компоненте V_A содержит последовательности, представленные в SEQ ID NO: 60 (которая соответствует SEQ ID NO: 3, раскрытой в WO 2005/118825).

Согласно одному варианту реализации V_A имеет последовательность с 3933 п.о. по 27184 п.о. из SEQ ID NO: 28.

E3 в настоящем документе относится к последовательности ДНК, кодирующей часть области или всю область E3 аденовируса (т.е. белок/полипептид), она может быть мутирована таким образом, что белок, кодируемый геном E3, содержит консервативные или неконсервативные изменения аминокислот, таким образом, что он обладает такой же функцией, что и белок дикого типа (соответствующий немутированный белок); усиленной функцией по сравнению с белком дикого типа; пониженной функцией, например, отсутствием функции, по сравнению с белком дикого типа, или обладает новой функцией по сравнению с белком дикого типа; или характеризуется комбинацией перечисленного, по мере целесообразности.

Согласно одному варианту реализации область E3 происходит из аденовирусного серотипа, приведенного в табл. 1, или их комбинации, в частности, серотипа группы В, например, Ad3, Ad7, Ad11 (в частности, Ad11p), Ad14, Ad16, Ad21, Ad34, Ad35, Ad51 или их комбинации, например, Ad3, Ad11 (в част-

ности, Ad11 p) или их комбинации.

Согласно одному варианту реализации область E3 частично делетирована, например, делетирована на 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5%.

Согласно одному варианту реализации B2 представляет собой связь, при этом ДНК, кодирующая область E3, отсутствует.

Согласно одному варианту реализации ДНК, кодирующая область E3, может быть заменена или прервана трансгеном. В настоящем документе "область E3, замененная трансгеном" включает частичную или полную замену трансгеном области E3.

Согласно одному варианту реализации область B₂ содержит последовательность с 27185 п.о. по 28165 п.о. из SEQ ID NO: 28.

Согласно одному варианту реализации B₂ состоит из последовательности с 27185 п.о. по 28165 п.о. из SEQ ID NO: 28.

B_x в настоящем документе относится к последовательности ДНК поблизости от 5'-конца гена L5 в B_v. Расположение поблизости или проксимальное расположение относительно 5'-конца гена L5 в настоящем документе относится к смежному (прилегающему) расположению относительно 5'-конца гена L5 или некодирующей области, заведомо с ним ассоциированной, т.е. к примыканию или прилеганию к 5'-концу гена L5 или некодирующей области, заведомо с ним ассоциированной. Как вариант, расположение поблизости или проксимальное расположение может относиться к расположению недалеко от гена L5, таким образом, чтобы между областью B_x и 5'-концом гена L5 не было кодирующих последовательностей.

Соответственно, согласно одному варианту реализации B_x присоединен непосредственно к основанию L5, которое соответствует, например, началу кодирующей последовательности гена L5.

Соответственно, согласно одному варианту реализации B_x присоединен непосредственно к основанию L5, которое соответствует, например, началу некодирующей последовательности, или присоединен непосредственно к некодирующей области, естественным образом ассоциированной с L5. Некодирующая область, естественным образом ассоциированная с L5, в настоящем документе относится к части всех некодирующих областей, представляющей собой часть гена L5 или прилегающей к ней, но не являющейся частью другого гена.

Согласно одному варианту реализации B_x содержит последовательность из SEQ ID NO: 29. Указанная последовательность представляет собой искусственную некодирующую последовательность, куда может быть инсертирована последовательность ДНК, например, содержащая трансген (или трансгенную кассету), сайт рестрикции или комбинацию перечисленного. Указанная последовательность является предпочтительной, поскольку действует как буфер, допускающий некоторую гибкость в отношении точного места расположения трансгена, наряду с минимизацией разрушительных эффектов на стабильность и жизнеспособность вируса.

Инсерционный фрагмент или фрагменты могут находиться где угодно в пределах SEQ ID NO: 29, начиная с 5'-конца, 3'-конца или в любой точке между 1 п.о. и 201 п.о. Согласно одному варианту реализации B_x содержит SEQ ID NO: 29 с последовательностью ДНК, инсертированной между 27 п.о. и 28 п.о., или в месте, соответствующем положениям между 28192 п.о. и 28193 п.о. из SEQ ID NO: 28.

Согласно одному варианту реализации указанный инсерционный фрагмент представлен инсерционным фрагментом с сайтом рестрикции. Согласно одному варианту реализации указанный инсерционный фрагмент с сайтом рестрикции содержит один или два сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации указанный сайт рестрикции представляет собой инсерционный фрагмент с сайтами рестрикции размером 19 п.о., содержащий 2 сайта рестрикции. Согласно одному варианту реализации указанный инсерционный фрагмент с сайтом рестрикции представляет собой инсерционный фрагмент с сайтом рестрикции размером 9 п.о., содержащий 1 сайт рестрикции. Согласно одному варианту реализации указанный инсерционный фрагмент с сайтом рестрикции содержит один или два сайта рестрикции и по меньшей мере один трансген, например, один или два трансгена. Согласно одному варианту реализации указанный сайт рестрикции представляет собой инсерционный фрагмент с сайтом рестрикции размером 19 п.о., содержащий 2 сайта рестрикции и по меньшей мере один трансген, например, один или два трансгена. Согласно одному варианту реализации указанный инсерционный фрагмент с сайтом рестрикции представляет собой инсерционный фрагмент с сайтом рестрикции размером 9 п.о., содержащий 1 сайт рестрикции и по меньшей мере один трансген, например, один, два или три трансгена, например, один или два. Согласно одному варианту реализации два сайта рестрикции размещены внутри одного или более, например, двух трансгенов (например, в трансгенной кассете). Согласно одному варианту реализации, если B_x содержит два сайта рестрикции, указанные сайты рестрикции отличаются друг от друга. Согласно одному варианту реализации указанные один или более сайтов рестрикции в B_x представляют собой не встречающиеся в природе в конкретном аденовирусном геноме, в который они были инсертированы. Согласно одному варианту реализации указанные один или более сайтов рестрикции в B_x отличаются от других сайтов рестрикции, локализованных где-либо в аденовирусном геноме, например, отличаются от встречающихся в природе сайтов рестрикции и/или сайтов рестрикции, введенных в другие части указанного генома, например, сайта рестрикции, введенного в B_y. Соответственно, согласно

одному варианту реализации указанный сайт или указанные сайты рестрикции позволяют специфическим образом разрезать ДНК на участке.

Последовательность ДНК в отношении V_{γ} в настоящем документе относится к последовательности ДНК поблизости от 3'-конца гена $L5$ V_B . Расположение поблизости или проксимальное расположение относительно 3'-конца гена $L5$ в настоящем документе относится к: смежному (прилегающему) расположению относительно 3'-конца гена $L5$ или некодирующей области, заведомо с ним ассоциированной, т.е. т.е. к примыканию или прилеганию к 3'-концу гена $L5$ или некодирующей области, заведомо с ним ассоциированной (т.е. полной некодирующей последовательности, эндогенной для $L5$, или ее части). Как вариант, расположение поблизости или проксимальное расположение может относиться к расположению недалеко от гена $L5$, таким образом, чтобы между областью V_{γ} и 3'-концом гена $L5$ не было кодирующих последовательностей кодирующих последовательностей.

Соответственно, согласно одному варианту реализации V_{γ} присоединен непосредственно к основанию $L5$, которое соответствует "концу" кодирующей последовательности.

Соответственно, согласно одному варианту реализации V_{γ} присоединен непосредственно к основанию $L5$, которое соответствует "концу" некодирующей последовательности, или присоединен непосредственно к некодирующей области, естественным образом ассоциированной с $L5$.

"Заведомо" и "естественным образом" используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Согласно одному варианту реализации V_{γ} содержит последовательность из SEQ ID NO: 30. Указанная последовательность представляет собой некодирующую последовательность, куда может быть инсертирована последовательность ДНК, например, содержащая трансген (или трансгенную кассету), сайт рестрикции или комбинацию перечисленного. Указанная последовательность является предпочтительной, поскольку действует как буфер, допускающий некоторую гибкость в отношении точного места расположения трансгена, наряду с минимизацией разрушительных эффектов на стабильность и жизнеспособность вируса.

Инсерционный фрагмент или фрагменты могут находиться где угодно в пределах SEQ ID NO: 30, начиная с 5'-конца, 3'-конца или в любой точке между между 1 п.о. и 35 п.о., 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.

$E4$ в настоящем документе относится к последовательности ДНК, кодирующей часть области или всю область $E4$ аденовируса (т.е. область полипептида/белка), которая может быть мутирована таким образом, что белок, кодируемый геном $E4$, содержит консервативные или неконсервативные изменения аминокислот, и обладает такой же функцией, что и белок дикого типа (соответствующий немутированный белок); усиленной функцией по сравнению с белком дикого типа; пониженной функцией, например, отсутствием функции, по сравнению с белком дикого типа; или обладает новой функцией по сравнению с белком дикого типа; или характеризуется комбинацией перечисленного, по мере целесообразности. Согласно одному варианту реализации в области $E4$ делетирована $E4orf4$.

Согласно одному варианту реализации область $E4$ частично делетирована, например, делетирована на 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 или 5%. Согласно одному варианту реализации область $E4$ имеет последовательность с 32188 п.о. по 29380 п.о. из SEQ ID NO: 28.

Согласно одному варианту реализации V_3 представляет собой связь, т.е. отличается тем, что $E4$ отсутствует.

Согласно одному варианту реализации V_3 имеет последовательность, включающую с 32188 п.о. по 29380 п.о. из SEQ ID NO: 28.

В настоящем документе численные диапазоны включают конечные точки.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что элементы формул в настоящем документе, например, формулы (I), являются непрерывными и могут включать некодирующие последовательности ДНК, а также гены и кодирующие последовательности ДНК (структурные признаки), упоминаемые в настоящем документе. Согласно одному или более вариантам реализации формулы согласно настоящему описанию предназначены для описания встречающейся в природе последовательности в аденовирусном геноме. В указанном контексте, специалисту в данной области техники ясно, что формула относится к основным элементам, характеризующим соответствующий раздел генома, и не предназначена для исчерпывающего описания геномного отрезка ДНК.

Каждый из $E1A$, $E1B$, $E3$ и $E4$ в настоящем документе независимо относятся к формам дикого типа и их эквивалентам, мутированным или частично делетированным формам каждой области согласно описанию в настоящем документе, в частности, последовательности дикого типа из известного аденовируса.

"Инсерционный фрагмент" в настоящем документе относится к последовательности ДНК, которая включена либо на 5'-конце, либо на 3'-конце, либо в заданном референсном сегменте последовательности ДНК таким образом, что он прерывает референсную последовательность. Последняя представляет собой референсную последовательность, используемую в качестве референсной точки, относительно которой локализован инсерционный фрагмент. В контексте настоящего описания инсерционные фрагменты обычно располагаются в SEQ ID NO: 29 или в SEQ ID NO: 30. Инсерционный фрагмент может представ-

лять собой инсерционный фрагмент с сайтом рестрикции, трансгенную кассету или и первое, и второе. Если последовательность прерывается, указанный вирус все равно содержит исходную последовательность, однако обычно она представлена двумя фрагментами, между которыми расположен инсерционный фрагмент.

Согласно одному варианту реализации указанный трансген или трансгенная кассета не содержит инсертируемый без смещения транспозон, такой как транспозон TN7 или его часть. Транспозон Tn7 в настоящем документе относится к инсертируемому без смещения транспозону согласно описанию в WO 2006/060314.

Согласно одному варианту реализации один или более сайтов рестрикции в V_X и V_Y независимо выбраны из сайта рестрикции, специфического для фермента, описанного в настоящем документе, например, NotI, FseI, AsiSI, SgfI и SbfI, например, все инсертированные сайты рестрикции являются разными, например, сайты, специфические для NotI, и сайты, специфические для FseI, локализованы в V_X , а сайты SgfI и SbfI локализованы в V_Y .

Как описано выше, согласно одному варианту реализации область V_X и/или V_Y не содержит сайт рестрикции. Благоприятным образом, вирусы и конструкции согласно настоящему описанию могут быть получены без сайтов рестрикции, например, с применением синтетических методик. Указанные методики обеспечивают значительную гибкость при создании вирусов и конструкций. Кроме того, авторы настоящего изобретения установили, что свойства указанных вирусов и конструкций не ослабляются при получении с применением синтетических методик.

Другие регуляторные последовательности.

"Регулятор генной экспрессии" (или регулятор/регуляторный элемент) в настоящем документе относится к генетическому признаку, такому как промотор, энхансер или последовательность акцептора сплайсинга, который играет роль в генной экспрессии, как правило, путем инициации или усиления транскрипции или трансляции.

"Последовательность акцептора сплайсинга", "акцептор сплайсинга" или "сайт сплайсинга" в настоящем документе относится к регуляторной последовательности, определяющей, когда молекулу мРНК распознают малые ядерные рибонуклеопротеины комплекса сплайсосомы. После сборки сплайсосома катализирует сплайсинг между акцепторным сайтом сплайсинга молекулы мРНК и донорным 5'-сайтом сплайсинга с получением зрелой молекулы мРНК, которая может быть транслирована для получения одного полипептида или белка.

Согласно настоящему изобретению могут применяться последовательности акцепторов сплайсинга разного размера, которые могут быть описаны как короткие акцепторы сплайсинга (малые), акцепторы сплайсинга (средние) и разветвленные акцепторы сплайсинга (большие).

SSA в настоящем документе означает короткий акцептор сплайсинга, как правило, содержащий только сайт сплайсинга, например, 4 пары оснований. SA в настоящем документе означает акцептор сплайсинга, как правило, содержащий короткий акцептор сплайсинга и полипиримидиновый тракт, например, длиной 16 п.о. bSA в настоящем документе означает разветвленный акцептор сплайсинга, как правило, содержащий короткий акцептор сплайсинга, полипиримидиновый тракт и точку ветвления, например, 26 пар оснований.

Согласно одному варианту реализации акцепторы сплайсинга SA и bSA, используемые в конструкциях согласно настоящему описанию, показаны в SEQ ID NO: 45 и 46, соответственно. Согласно одному варианту реализации SSA используют в кассете в соответствии с настоящим изобретением и он имеет последовательность нуклеотидов CAGG.

Согласно одному варианту реализации указанный SA используют в кассете. Согласно одному варианту реализации указанный bSA используют в кассете.

Согласно одному варианту реализации указанному сайту сплайсинга непосредственно предшествует (т.е. расположена в направлении от 5' к 3') консенсусная последовательность Козак. Согласно одному варианту реализации указанный сайт сплайсинга и указанная последовательность Козак разделяет до 100 пар оснований или менее. Согласно одному варианту реализации указанная последовательность Козак имеет последовательность нуклеотидов из SEQ ID NO: 47.

Как правило, если кодирующая последовательность находится под контролем эндогенного или экзогенного промотора (например, эндогенного промотора), ей непосредственно предшествует последовательность Козак. На начало кодирующей области указывает иницирующий кодон (AUG), например, в контексте последовательности (gcc)gccRccAUGg [SEQ ID NO: 48] на начало "старта" кодирующих последовательностей указывают основания, выделенные жирным шрифтом. Строчными буквами обозначены обычные основания в указанном положении (которые, тем не менее, могут варьировать), а заглавными буквами обозначены высококонсервативные основания, т.е. последовательность "AUGG" является постоянной или изменяется редко, если вообще изменяется; "R" показывает, что в указанном положении обычно наблюдают пурин (аденин или гуанин), а последовательность в скобках (gcc) имеет неопределенное значение. Соответственно, согласно одному варианту реализации иницирующий кодон AUG включен в последовательность Козак.

Последовательность участка внутренней посадки рибосомы ДНК в настоящем документе относится

к последовательности ДНК, кодирующей последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES). IRES в настоящем документе означает последовательность нуклеотидов, которая позволяет обеспечить инициацию трансляции последовательности матричной РНК (мРНК), в том числе инициацию, начинающуюся в пределах указанной последовательности мРНК. Это, в частности, полезно в том случае, когда указанная кассета кодирует полицистронную мРНК. Применение IRES приводит к получению полицистронной мРНК, которая транслируется в несколько индивидуальных белков или пептидов. Согласно одному варианту реализации указанная последовательность участка внутренней посадки рибосомы ДНК имеет последовательность нуклеотидов из SEQ ID NO: 49. Согласно одному варианту реализации конкретная IRES используется в геноме только один раз. Это может обеспечивать преимущества в отношении стабильности генома.

"Высокоэффективно саморасщепляющийся пептид 2А" или "пептид 2А" в настоящем документе относится к пептиду, который эффективно расщепляется после трансляции. Подходящие пептиды 2А включают P2A, F2A, E2A и T2A. Авторы настоящего изобретения отмечают, что в том случае, когда специфическая последовательность ДНК, кодирующая заданный пептид 2А, использована один раз, та же специфическая последовательность ДНК может больше не использоваться. Однако избыточность кода ДНК может быть использована для получения последовательности ДНК, транслируемой в тот же пептид 2А. Применение пептидов 2А, в частности, полезно, если указанная кассета кодирует полицистронную мРНК. Применение пептидов 2А приводит к трансляции одной полипептидной цепи, которая подвергается модификации после трансляции с получением нескольких индивидуальных белков или пептидов.

Согласно одному варианту реализации используемый кодируемый пептид P2A имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 50. Согласно одному варианту реализации используемый кодируемый пептид F2A имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 51. Согласно одному варианту реализации используемый кодируемый пептид E2A имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 52. Согласно одному варианту реализации используемый кодируемый пептид T2A имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 53.

Согласно одному варианту реализации мРНК или каждая мРНК, кодируемая трансгеном (трансгенами) содержат последовательность сигнала полиаденилирования, например, как правило, на конце последовательности мРНК, например, представленной в SEQ ID NO: 54. Соответственно, один вариант реализации указанного трансгена или трансгенной кассеты включает по меньшей мере одну последовательность, кодирующую последовательность сигнала полиаденилирования.

"Поли(А)", "сигнал полиаденилирования" или "последовательность полиаденилирования" в настоящем документе означает последовательность ДНК, обычно содержащую сайт ААТААА, который после транскрипции может быть распознан мультибелковый комплекс, который расщепляет и поли(А)денилирует растущую молекулу мРНК.

Согласно одному варианту реализации указанная последовательность полиаденилирования имеет последовательность нуклеотидов из SEQ ID NO: 54.

Согласно одному варианту реализации указанная конструкция не содержит последовательности полиаденилирования. Согласно одному варианту реализации регулятор генной экспрессии представляет собой последовательность акцептора сплайсинга.

Благоприятным образом аденовирусы согласно настоящему описанию экспрессируют и высвобождают формы антител (таких как биспецифический активатор Т-клеток) и другие белки, такие как цитокины, кодируемые содержащимся в них трансгеном, в культуральный супернатант *in vitro* или в строму опухолевой ткани *in vivo*. Лидерные последовательности могут помогать кодируемым белкам/полипептиду или пептиду выходить из раковой клетки. Соответственно, согласно одному варианту реализации указанный кодируемый "белок" содержит лидерную последовательность. Лидерная последовательность в настоящем документе относится к последовательности полинуклеотидов, локализованной между последовательностью промотора и кодирующей областью, которая может регулировать генную экспрессию на уровне транскрипции или трансляции.

Согласно одному варианту реализации аденовирус в соответствии с настоящим изобретением содержит трансген, который представляет собой репортерный ген, кодирующий, например, агент для визуализации, включая биолюминесцентные, флуоресцентные агенты для визуализации (в том числе активируемые флуоресцентные агенты для визуализации), такие как люцифераза, GFP или eGFP, или красный флуоресцентный белок.

Репортерный ген или репортерная последовательность в настоящем документе означает ген или последовательность ДНК, который(ая) продуцирует продукт, который легко детектировать в эукариотических клетках и может быть использован в качестве маркера для определения активности другого гена, с которым его ДНК была тесно связана или скомбинирована. Репортерные гены придают экспрессирующим их клеткам или организмам характеристики, которые могут быть легко идентифицированы и измерены, или представляют собой селективируемые маркеры. Репортерные гены часто используют в качестве индикатора того, были ли определен ген принят или экспрессирован популяцией клеток или орга-

низмов. Примеры распространенных репортерных генов включают, не ограничиваясь перечисленными, LacZ, люциферазу, GFP, eGFP, неомицинофосфотрансферазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, натрий-йодидный симпортер (NIS), нитроредуктазу (например, NfsA, NfsB), внутриклеточные металлопротеины, HSV1-tk или рецептор эстрогена.

Согласно одному варианту реализации указанный генетический материал (в частности, трансген) не кодирует или не экспрессирует репортерный ген, такой как агент для визуализации, люцифераза, GFP или eGFP.

Вирусы в соответствии с настоящим изобретением могут быть исследованы на предмет предпочтения ими специфического типа опухолей путем изучения их литического потенциала на панели опухолевых клеток, например, линий клеток опухолей ободочной кишки, включая HT-29, DLD-1, LS174T, LS1034, SW403, HCT116, SW48 и Colo320DM. Любые доступные линии клеток опухолей ободочной кишки в равной мере подходят для такой оценки.

Линии клеток предстательной железы включают клетки DU145 и PC-3. Линии клеток поджелудочной железы включают клетки Panc-1. Линии опухолевых клеток молочной железы включают линию клеток MDA231, а линии клеток яичников включают линию клеток OVCAR-3. Линии гемопозитических клеток включают, не ограничиваясь перечисленными, В-лимфоидные клетки Raji и Daudi, эритробластные клетки K562, миелоидные клетки U937 и Т-лимфоидные клетки HSB2. Другие доступные линии опухолевых клеток подходят в той же мере.

Настоящим изобретением также охвачены новые последовательности согласно описанию в настоящем документе. Согласно одному варианту реализации указанный вирус представлен любой из последовательностей согласно описанию в настоящем документе.

Составы.

Настоящим изобретением также охвачен фармацевтический состав с вирусом согласно описанию в настоящем документе.

Согласно одному варианту реализации предложен жидкий парентеральный состав, например, для инфузии или инъекции, со способным к репликации онколитическим вирусом в соответствии с настоящим изобретением, отличающийся тем, что указанный состав обеспечивает дозу в диапазоне от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц на объем дозы.

Парентеральный состав означает состав, разработанный для доставки не через ЖКТ. Типичные маршруты парентеральной доставки включают инъекцию, имплантацию или инфузию. Согласно одному варианту реализации указанный состав предложен в форме для болюсной доставки.

Согласно одному варианту реализации указанный парентеральный состав представлен в форме инъекции. Инъекция включает внутривенную, подкожную, внутриопухолевую или внутримышечную инъекцию. Инъекция в настоящем документе означает введение жидкости в организм посредством шприца. Согласно одному варианту реализации способ согласно настоящему описанию не включает внутриопухолевую инъекцию.

Согласно одному варианту реализации указанный парентеральный состав представлен в форме инфузии.

Инфузия в настоящем документе означает введение жидкостей с меньшей скоростью путем капельного введения, с помощью инфузионной помпы, шприцевого насоса или эквивалентного устройства. Согласно одному варианту реализации инфузию проводят на протяжении периода в диапазоне от 1,5 минут до 120 минут, например, 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 минут.

Согласно одному варианту реализации объем одной дозы указанного состава составляет менее 100 мл, например, 30 мл, например, вводимых с помощью шприцевого насоса. Согласно одному варианту реализации объем одной дозы указанного состава составляет менее 10 мл, например, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мл. Согласно одному варианту реализации объем одной дозы указанного состава составляет менее 1 мл, например, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2 или 0,1 мл.

Согласно одному варианту реализации инъекцию проводят медленно, например, на протяжении периода от 1,5 до 30 минут.

Согласно одному варианту реализации указанный состав предназначен для внутривенного (в/в) введения. Указанный маршрут, в частности, эффективен для доставки онколитического вируса, поскольку позволяет обеспечить быстрый доступ к большинству органов и тканей, и, конкретно, подходит для лечения метастазов, например, распространенные метастазы, в частности, локализованные в высокоvascularизованных областях, таких как печень и легкие.

Терапевтические составы, как правило, стерильны и стабильны в условиях получения и хранения. Указанная композиция может быть введена в состав раствора, микроэмульсии, липосомы или в другой парентеральный состав, подходящий для введения человеку, и могут быть введены в состав для предварительно наполняемого устройства, такого как шприц или флакон, в частности, содержащий дозу для однократного приема.

Указанный состав обычно содержит фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, на-

пример, нетоксичный изотонический носитель, совместимый с указанным вирусом, в котором указанный вирус стабилен на протяжении требуемого периода времени.

Указанный носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.п.), и подходящие смеси перечисленного. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем применения диспергирующего агента или поверхностно-активного вещества, такого как лецитин или неионогенное поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 80 или 40. В дисперсиях поддержанию требуемого размера частиц может помогать наличие поверхностно-активного вещества. Примеры изотонических агентов включают сахара, полиатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия, в композиции.

Согласно одному варианту реализации используемые парентеральные составы могут содержать что-либо одно или более из следующего: буфер, например, 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота, фосфатный буфер и/или Tris-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 Brij, PS-80, PS-40 или аналогичные ПАВ. Указанный состав может также содержать консервант, такой как ЭДТК или этанол, или комбинацию ЭДТК и этанола, которые, предположительно, предотвратят возможное разложение одним или более путями.

Согласно одному варианту реализации указанный состав содержит очищенный онколитический вирус в соответствии с настоящим изобретением, 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. Согласно одному варианту реализации концентрация вируса в составе находится в диапазоне от 2×10^8 до 2×10^{14} в.ч./мл, например, 2×10^{12} в.ч./мл.

Согласно одному варианту реализации указанный парентеральный состав содержит глицерин.

Согласно одному варианту реализации указанный состав содержит онколитический аденовирус согласно описанию в настоящем документе, HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфоновую кислоту), глицерин и буфер.

Согласно одному варианту реализации указанный парентеральный состав состоит из вируса согласно настоящему описанию, HEPES, например, 5 мМ, глицерин, например, 5-20% (по объему), соляную кислоту, например, для доведения значения pH до диапазона 7-8; и воды для инъекций.

Согласно одному варианту реализации 0,7 мл вируса согласно настоящему изобретению в концентрации 2×10^{12} в.ч./мл вводят в состав в 5 мМ HEPES, 20% глицерина с итоговым значением pH 7,8.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей приведено в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

Согласно одному варианту реализации указанный состав представлен составом для местного введения, в том числе для ингаляции.

Подходящие вдыхаемые составы включают вдыхаемые порошки, дозированные аэрозоли, содержащие газы-пропелленты, или вдыхаемые растворы, не содержащие газы-пропелленты. Вдыхаемые порошки в соответствии с настоящим изобретением обычно содержат вирус согласно описанию в настоящем документе с физиологически приемлемым вспомогательным веществом.

Указанные вдыхаемые порошки могут включать моносахариды (например, глюкозу или арабинозу), дисахариды (например, лактозу, сахарозу, мальтозу), олиго- и полисахариды (например, декстраны), полиатомные спирты (например, сорбит, маннит, ксилит), соли (например, хлорид натрия, карбонат кальция) или смеси перечисленного. В подходящих случаях используют моно- или дисахариды, применяют лактозу или глюкозу, в частности, но не исключительно, в форме их гидратов.

Размер частиц для отложения в легких должен быть меньше 10 мкм, например, 1-9 мкм, например, от 0,1 до 5 мкм, в частности, от 1 до 5 мкм. Размер частиц, несущих вирус, имеет первостепенное значение и, соответственно, согласно одному варианту реализации указанный вирус в соответствии с настоящим изобретением может быть адсорбирован или абсорбирован на частице, такой как частица лактозы заданного размера.

Газы-пропелленты, которые могут применяться для получения вдыхаемых аэрозолей, известны в данной области техники. Подходящие газы-пропелленты выбирают из углеводородов, таких как n-пропан, n-бутан или изобутан, и галогенуглеводороды, такие как хлорированные и/или фторированные производные метана, этана, пропана, бутана, циклопропана или циклобутана. Вышеупомянутые газы-пропелленты могут применяться сами по себе или в виде смесей перечисленного.

В частности, подходящими газами-пропеллентами являются галогенированные алкановые производные, выбранные из TG 11, TG 12, TG 134a и TG227. Особенно подходящими из вышеперечисленных галогенированных углеводородов являются TG134a (1,1,1,2-тетрафторэтан) и TG227 (1,1,1,2,3,3,3-гептафторпропан), а также их смеси.

Содержащие газ-пропеллент вдыхаемые аэрозоли могут также содержать другие ингредиенты, такие как сорастворители, стабилизаторы, поверхностно-активные агенты (поверхностно-активные вещества), антиоксиданты, смазывающие вещества и средства для коррекции pH. Все указанные ингредиенты

известны в данной области техники.

Содержащие газ-пропеллент вдыхаемые аэрозоли в соответствии с настоящим изобретением могут содержать до 5% по массе активного вещества. Аэрозоли в соответствии с настоящим изобретением 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.

Как вариант, местное введение в легкое может также быть осуществлено путем введения жидкого раствора или суспензионного состава, например, с применением устройства, такого как небулайзер, например, небулайзера, соединенного с компрессором (например, небулайзера Pari LC-Jet Plus(R), соединенного с компрессором Pari Master(R), производимого Pari Respiratory Equipment, Inc., Ричмонд, Вирджиния).

Вирус согласно настоящему изобретению может быть доставлен в диспергированном в растворителе виде, например, в форме раствора или суспензии, например, уже описанном выше для парентеральных составов. Он может быть суспензирован в подходящем физиологическом растворе, например, солевом растворе или другом фармакологически приемлемом растворителе или забуференном растворе. Буферные растворы, известные в данной области техники, могут содержать от 0,05 мг до 0,15 мг динатрия эдетата, от 8,0 мг до 9,0 мг NaCl, от 0,15 мг до 0,25 мг полисорбата, от 0,25 мг до 0,30 мг безводной лимонной кислоты и от 0,45 мг до 0,55 мг цитрата натрия на 1 мл воды для достижения значения pH, равного приблизительно 4,0-5,0.

Терапевтические составы в суспензиях или растворах могут также 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), ЭДТК, хлорид натрия, липосомы, маннит, сорбит и глицерин. Растворы или суспензии могут быть инкапсулированы в липосомах или биоразлагаемых микросферах. Указанный состав обычно представлен в стерильной по существу форме, полученной с применением способов стерильного производства.

Указанные способы могут включать получение и стерилизацию путем фильтрации забуференного растворителя/раствора, используемого для получения состава, асептического получения суспензии указанного антигена в стерильном забуференном растворе растворителя и распределение состава в стерильные сосуды с применением способов, известных специалистам в данной области техники.

Небулизируемый состав в соответствии с настоящим изобретением может быть представлен, например, в виде единиц однократной дозы (например, в герметизированных пластиковых контейнерах или флаконах), упакованных в фольгированные конверты. Каждый флакон содержит единицу дозы в объеме растворителя/буферного раствора, например, 2 мл.

Лечение.

Согласно дополнительному аспекту настоящее изобретение охватывает вирус или состав с вирусом согласно описанию в настоящем документе для применения в лечении, в частности, для лечения рака.

Согласно одному варианту реализации указанный способ лечения предназначен для применения в лечении опухоли, в частности, солидной опухоли.

"Опухоль" в настоящем документе относится к аномальной массе ткани, возникшей в результате избыточного деления клеток, которое является неконтролируемым и прогрессирующим, и также называется новообразованием. Опухоли могут быть доброкачественными (не раковыми) или злокачественными. "Опухоль" охватывает все формы рака и метастазов.

Согласно одному варианту реализации указанная опухоль представляет собой солидную опухоль. Салидная опухоль может быть локализованной или метастазирующей.

Согласно одному варианту реализации указанная опухоль имеет эпителиальное происхождение.

Согласно одному варианту реализации указанная опухоль представляет собой злокачественное новообразование, такое как рак ободочной и прямой кишки, гепатома, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичников, рак щитовидной железы, рак почек, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи или рак легкого.

Согласно одному варианту реализации указанная опухоль представляет собой злокачественное новообразование ободочной и прямой кишки.

Злокачественное новообразование в настоящем документе означает раковые клетки.

Согласно одному варианту реализации указанный онколитический аденовирус используют для лечения или предотвращения метастазирования.

Согласно одному варианту реализации указанный способ или состав в настоящем документе используют для лечения лекарственно-устойчивого рака.

Согласно одному варианту реализации указанный вирус вводят в комбинации с проведением дополнительного лечения или терапии рака.

Согласно одному варианту реализации предложен вирус или состав в соответствии с настоящим изобретением для применения при получении медикамента для лечения рака, например, рака, описанного выше.

Согласно дополнительному аспекту предложен способ лечения рака, включающий введение терапевтически эффективного количества вируса или состава в соответствии с настоящим изобретением нуждающемуся в этом пациенту, например, пациенту-человеку.

Согласно одному варианту реализации указанный онколитический вирус или состав в настоящем документе вводят в комбинации с другой терапией.

"В комбинации" в настоящем документе охватывает введение указанного онколитического вируса до, одновременно и/или после проведения лечения или терапии рака.

Терапия рака включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию, нацеленную терапию и/или химиотерапию.

Лечение рака в настоящем документе относится к лечению терапевтическим соединением или биологическим агентом, например, антителом, предназначенным для лечения рака и/или поддерживающей терапии при раке.

Согласно одному варианту реализации лечение рака выбрано из любой другой противораковой терапии, включая химиотерапевтический агент, нацеленный противораковый агент, радиационную терапию, терапию радиоактивными изотопами или любую комбинацию перечисленного.

Согласно одному варианту реализации вирус согласно настоящему описанию, такой как онколитический аденовирус, может применяться в качестве предварительного лечения перед такой терапией, как хирургическое вмешательство (неoadьювантная терапия), для уменьшения опухоли, для лечения метастазирования и/или предотвращения метастазирования или дальнейшего метастазирования. Указанный онколитический аденовирус может применяться после терапии, такой как хирургическое вмешательство (адьювантная терапия), для лечения метастазирования и/или предотвращения метастазирования или дальнейшего метастазирования.

"Одновременно" в настоящем документе относится к проведению дополнительного лечения рака в то же самое время или приблизительно в то же время, что и введение состава с онколитическим аденовирусом. Указанное лечение может входить в тот же состав или быть введено в виде отдельного состава.

Согласно одному варианту реализации указанный вирус вводят в комбинации с введением химиотерапевтического агента.

Химиотерапевтический агент в настоящем документе относится к специфическим антинеопластическим химическим агентам или лекарственным средствам, которые селективно действуют разрушительным образом на злокачественные клетки и ткани, таким как алкилирующие агенты, антиметаболиты, антрациклины, растительные алкалоиды, ингибиторы топоизомеразы и другие противоопухолевые агенты. Другие примеры химиотерапии включают доксорубин, 5-фторурацил (5-FU), паклитаксел, капецитабин, иринотекан и платины, такие как цисплатин и оксалиплатин. Предпочтительная доза может быть выбрана лечащим врачом на основании природы рака, лечение которого проводят.

Согласно одному варианту реализации указанный терапевтический агент представляет собой ганцикловир, который может помогать контролировать иммунные ответы и/или васкуляризацию опухоли.

Согласно одному варианту реализации один или более видов терапии, применяемых в способе согласно настоящему изобретению, являются метрономными, то есть представляют собой непрерывно или часто проводимое лечение низкими дозами противораковых лекарственных средств, часто принимаемых одновременно с другими способами терапии.

Онколитические аденовирусы подгруппы В, в частности, Ad11 и происходящие из него вирусы, такие как EnAd, могут обладать, в частности, синергическими характеристиками при применении с химиотерапевтическими средствами, поскольку, по-видимому, механизм их действия в значительной степени независим от апоптоза, и они обеспечивают киллинг раковых клеток в основном за счет некролитического механизма.

Кроме того, иммуносупрессия, которая происходит при химиотерапии, может позволять онколитическому вирусу функционировать с большей эффективностью.

Терапевтическая доза в настоящем документе относится к количеству вируса, такого как онколитический аденовирус, которое подходит для достижения предполагаемого терапевтического эффекта при применении в подходящей схеме лечения, например, облегчает симптомы или состояние при заболевании. Доза может считаться терапевтической дозой при лечении рака или метастазов, если число вирусных частиц может быть достаточным для обеспечения следующего: рост опухоли или метастатический рост замедляется или останавливается, или обнаруживается уменьшение опухоли или метастазирования, и/или увеличивается продолжительность жизни пациента. Подходящие терапевтические дозы обычно подбирают исходя из баланса терапевтического эффекта и допустимой токсичности, например, так, чтобы побочные эффекты и токсичность были допустимыми с учетом преимущества, достигаемого при применении указанной терапии.

Согласно одному варианту реализации вирус или терапевтическую конструкцию в соответствии с настоящим изобретением (в том числе содержащий его или ее состав) вводят еженедельно, например, в течение 1 недели дозу вводят на 1, 3, 5 день, после чего вводят по одной дозе каждую следующую неделю.

Согласно одному варианту реализации вирус или терапевтическую конструкцию в соответствии с

настоящим изобретением (в том числе содержащий его или ее состав) вводят каждые две недели или каждые три недели, например, в течение 1 недели на 1, 3, 5 день, и также вводят на соответствующие 1, 3, 5 дни на 2 или 3 неделе. Указанный режим дозирования может быть повторен столько раз, сколько требуется.

Согласно одному варианту реализации вирус или терапевтическую конструкцию в соответствии с настоящим изобретением (в том числе содержащий его или ее состав) вводят ежемесячно.

Согласно одному варианту реализации вирусы и конструкции согласно настоящему описанию получают с применением рекомбинантных методов. Специалисту в данной области техники будет понятно, что геном вооруженного аденовируса может быть получен другим техническим способом, в том числе путем полного синтеза генома или плазмиды, содержащей часть указанного генома или весь геном. Специалисту в данной области техники будет понятно, что в случае синтеза генома область инсерции может не содержать нуклеотидов сайта рестрикции, поскольку последние представляют собой артефакты инсерции генов с применением способов клонирования.

Предложенным изобретением также охвачен аденовирус формулы (I) или ее подформулы, который получен или может быть получен путем инсерции трансгена или трансгенной кассеты.

"Является/представляет собой" в настоящем документе означает "содержащий".

В контексте указанного описания термин "содержащий" должен быть истолкован как "включающий".

Подразумевается, что варианты реализации настоящего изобретения, включающие определенные признаки/элементы, также распространяются на альтернативные варианты реализации, "состоящие" или "состоящие по существу" из релевантных элементов/признаков.

В технически соответствующих случаях варианты реализации настоящего изобретения могут быть скомбинированы.

Технические источники, такие как патенты и заявки, включены в настоящий документ посредством ссылки.

Любые варианты реализации, конкретным и явным образом изложенные в настоящем документе, могут составлять основу заявления об отказе, по отдельности или в комбинации с одним или более дополнительных вариантов реализации.

Настоящее изобретение испрашивает приоритет по GB 1713765.4, WO 2018/041838 и WO 2018/041827, включенным в настоящий документ посредством ссылки. Указанные документы могут применяться для исправления ошибок в настоящем описании, в частности, ошибки в перечне последовательностей.

Настоящее изобретение дополнительно описано, исключительно в иллюстративных целях, в приведенных ниже примерах со ссылками на сопровождающие чертежи, где:

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Схематическое изображение трансгенных кассет NG-615, NG-640 и NG-641.

Фиг. 2. Репликация вирусного генома в линиях клеток карциномы легких, молочной железы и мочевого пузыря.

Линии клеток A549 (A), MDA-MB-453 (B) и RT4 (C) обрабатывали вирусными частицами NG-617, NG-615, NG-640, NG-641 или энаденотуцирева на протяжении периода до 7 дней. Количество вирусного генома, детектированное с применением кПЦР, оценивали на 2, 3, 4 и 7 дни после обработки.

Фиг. 3. Опосредованный вирусом онколизис клеток карциномы легкого.

Клетки A549 обрабатывали вирусными частицами NG-617, NG-615, NG-640, NG-641 или энаденотуцирева на протяжении периода до 4 дней. Жизнеспособность клеток по всему объему культуры оценивали с использованием системы xCelligence (A). Для каждой обработки вирусами определяли момент времени, когда наблюдался 50% киллинг (KT50) (B).

Фиг. 4. Трансгенная экспрессия NG-615 в клетках карциномы легкого и мочевого пузыря. A549 (панели слева) и RT4 клетки (панели справа) обрабатывали NG-615 или энаденотуцирева вирусными частицами или оставляли неинфицированными на протяжении периода до 7 дней. Оценивали секрецию лиганда Flt3 (A), MIP1 α (B) и ИФН- α (C) в клеточных супернатантах с применением ИФА ELISA. Трансгенная экспрессия не была детектирована в обработанных энаденотуциревом или необработанных контрольных клетках (данные не показаны).

Фиг. 5. Трансгенная экспрессия NG-641 в клетках карциномы легкого и мочевого пузыря. Клетки A549 (панели слева) и RT4 (панели справа) обрабатывали вирусными частицами NG-641 или энаденотуцирева или оставляли неинфицированными на протяжении периода до 7 дней. В клеточных супернатантах оценивали секрецию CXCL9 (A), CXCL10 (B) или ИФН- α (C) с применением ИФА ELISA. Трансгенная экспрессия не была детектирована в обработанных энаденотуциревом или необработанных контрольных клетках (данные не показаны).

Фиг. 6. Экспрессия функциональных трансгенов в клетках карциномы легкого.

Клетки A549 обрабатывали вирусными частицами NG-615, NG-641 или энаденотуцирева на протяжении периода до 4 дней. На 4 день после обработки оценивали уровень функциональных продуцируе-

мых трансгенов ИФН- α (А) или МІР1 α (В) с применением клеточных репортерных анализов.

Фиг. 7. Экспрессия функциональных FAP-биспецифических активаторов Т-клеток в клетках карциномы легкого. Клетки А549 обрабатывали вирусными частицами NG-615, NG-641 или энаденотуцирева на протяжении периода до 4 дней. На 2 (А), 3 (В) и 4 (С) дни после обработки оценивали уровень экспрессии функциональных FAP-биспецифический активатор Т-клеток в клеточных супернатантах путем измерения активации Т-клеток линии Jurkat, при культивировании совместно с клетками экспрессирующей FAP линии фибробластов, MRC-5.

Фиг. 8А. Кодированный трансгеном ИФН- α в супернатанте от инфицированных NG-641 клеток А549 индуцирует продуцирование SEAP репортерными клетками Jurkat Dual. Репортерные клетки Jurkat-Dual обрабатывали супернатантом от раковых клеток линии А549, либо неинфицированных (UIC), либо инфицированных энаденотуциревом (EnAd) или NG-641, и измеряли уровень репортера - секретированной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP).

Фиг. 8В. Кодированный трансгеном CXCL9/10 в супернатанте от инфицированных NG-641 клеток А549 активирует путь GPCR в клетках для аррестинового анализа PathHunter β -Arrestin. Клетки PathHunter β -Arrestin обрабатывали супернатантом от раковых клеток линии А549, либо неинфицированных (UIC), либо инфицированных энаденотуциревом (EnAd) или NG-641, и детектировали CXCL9/10-специфическую индукцию пути сопряженных с G-белками рецепторов (GPCR) с использованием люминесценции.

Фиг. 9. Кодированный трансгеном CXCL9/10 в супернатанте от инфицированных NG-641 клеток А549 индуцирует понижающую регуляцию CXCR3 на поверхности активированных Т-клеток.

Активированные антителом против CD3/CD28 Т-клетки человека обрабатывали супернатантом от раковых клеток линии А549, либо неинфицированных (UIC), либо инфицированных энаденотуциревом (EnAd) или NG-641, и измеряли индуцированную трансгеном CXCL9/10 понижающую регуляцию CXCR3 с применением проточной цитометрии.

Фиг. 10. Активация эндогенных инфильтрирующих опухоль Т-клеток в *ex vivo* культурах образцов первичных опухолей человека, инокулированных EnAd, NG-615, NG-617, NG-640 или NG-641, антителом против CD3/28 или неинфицированных (UIC)

Уровни трансгенных вирусных продуктов ИФН- α и Flt3L показаны на А), а уровни ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-17А, гранзима В и ИЛ-13 показаны на В).

Фиг. 11. Активация экспрессии поверхностного маркера и внутриклеточных цитокинов в эндогенных инфильтрирующих опухоль Т-клетках в *ex vivo* культурах образца первичной опухоли НМРЛ, обработанных EnAd, NG-617, NG-640 или NG-641, или неинфицированных (UIC). Уровни CD4 и CD8 Т-клеток, экспрессирующих CD25, CD69 и CD107a, показаны на А и В, соответственно. Уровни внутриклеточных ИФН- γ и ФНО- α экспрессируемых CD4 и CD8 Т-клетками, показаны на С и D, соответственно.

Фиг. 12. Схематическое изображение антитела биспецифического активатора Т-клеток согласно настоящему описанию, содержащего или не содержащего необязательную декагистидиновую аффинную метку. Ig SP: сигнальный пептид; 10His: декагистидиновая аффинная метка; L: GS-линкер; V_L: переменный домен легкой цепи; V_H переменный домен тяжелой цепи.

Фиг. 13 (А) - дот-блот, отражающий количественное определение рекомбинантных биспецифических активаторов Т-клеток. (В) - график, отражающий результаты ИФА ELISA на FAP.

Фиг. 14 - график, отражающий уровни экспрессии CD69 (А) и CD25 (В) для культивированных совместно Т-клеток, отдельно или с клетками NHDF, в присутствии FAP биспецифического активатора Т-клеток и контрольного биспецифического активатора Т-клеток, измеренные с применением проточной цитометрии. (С) - график, отражающий уровни экспрессии ИФН- γ для культивированных совместно Т-клеток, отдельно или с клетками NHDF, в присутствии FAP биспецифического активатора Т-клеток и контрольного биспецифического активатора Т-клеток, измеренные с применением внутриклеточного окрашивания на цитокины

Фиг. 15 (А) - график, отражающий результаты ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток NHDF, которые культивировали совместно с Т-клетками и FAP биспецифическим активатором Т-клеток или контрольным биспецифическим активатором Т-клеток. (В) - график, отражающий результаты ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток ВТC100, которые культивировали совместно с Т-клетками и FAP биспецифическим активатором Т-клеток/биспецифическим активатором Т-клеток или контрольным биспецифическим активатором Т-клеток. (С) - изображения клеток NHDF после совместного культивирования с Т-клетками и FAP биспецифическим активатором Т-клеток или контрольным биспецифическим активатором Т-клеток.

Фиг. 16 представляет собой график, отражающий % клеток, экспрессирующих ЕрСАМ и FAP, во множестве клеток и нескольких линиях клеток.

Фиг. 17 (А) - график, отражающий дозозависимость в NHDF для FAP биспецифического активатора Т-клеток при возрастании концентрации биспецифического активатора Т-клеток. График (В) и (С), отражающий результаты ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток DLD, которые культивиру-

вали совместно с Т-клетками и ЕрСАМ биспецифическим активатором Т-клеток или контрольным биспецифическим активатором Т-клеток.

Фиг. 18 (А) - график, отражающий экспрессию FAP в клетках СНО, определенную с применением FAP-антитела или изотипического контрольного антитела и проанализированную с применением проточной цитометрии. (В) - график, отражающий результаты ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток СНО или СНО-FAP, которые культивировали совместно с Т-клетками и FAP биспецифическим активатором Т-клеток или контрольным биспецифическим активатором Т-клеток.

Фиг. 19 - график, отражающий активацию Т-клеток (на основе уровней экспрессии CD69 и CD25) клетками СНО или СНО-FAP, проанализированную с применением проточной цитометрии.

Фиг. 20 (А) - график, отражающий способность FAP биспецифического активатором Т-клеток активировать CD4+ или CD8+ Т-клетки (на основе уровней экспрессии CD69 и CD25), проанализированную с применением проточной цитометрии. (В) - график, отражающий результаты ЛДГ-анализа, показывающего цитотоксичность клеток NHDF, которые культивировали совместно с CD4+ или CD8+ Т-клетками и FAP биспецифическим активатором Т-клеток или контрольным биспецифическим активатором Т-клеток.

Фиг. 21 (А) - график, отражающий число CD3+ Т-клеток из асцита, культивированных с контрольным биспецифическим активатором Т-клеток или FAP биспецифическим активатором Т-клеток. (В) - график, отражающий уровни экспрессии CD25 Т-клетками из асцита, культивированных с контрольным биспецифическим активатором Т-клеток или FAP биспецифическим активатором Т-клеток. (С) - график, отражающий число FAP+ клеток из асцита, культивированных с контрольным биспецифическим активатором Т-клеток или FAP биспецифическим активатором Т-клеток. (С) график, отражающий число FAP+ клеток из асцита, культивированных с контрольным биспецифическим активатором Т-клеток или FAP биспецифическим активатором Т-клеток.

Фиг. 22 (А) - график, отражающий количественное определение числа детектированных вирусных геномов на клетку для NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd. (В) - графики, отражающие онколитическую активность NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 или EnAd, оцениваемую по инфекции клеток A549.

Фиг. 23 - графики, отражающие активацию Т-клеток (на основе уровней экспрессии CD69 и CD25) NG-601, NG-602, NG-605 и NG-606 при культивировании совместно с СНО-FAP, проанализированную с применением проточной цитометрии.

Фиг. 24 - графики, отражающие результаты экспериментов по определению количества FAP биспецифического активатором Т-клеток, продуцированного NG-605 и NG-606.

Фиг. 25 - микроскопические изображения клеток Ad293, инфицированных NG-607, NG-608, NG-609 и NG-610.

Фиг. 26 (А) - график, отражающий способность NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd к киллингу клеток NHDF, проанализированную с применением XCELLigence. (В) - график, отражающий способность NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd к киллингу клеток NHDF, проанализированную с применением ЛДГ-анализа.

Фиг. 27 - графики, отражающие активацию Т-клеток (на основе уровней экспрессии CD69 и CD25) NG-603, NG-604, NG-605, NG-606, при культивировании совместно с клетками NHDF, SKOV и Т-клетками, проанализированную с применением проточной цитометрии.

Фиг. 28 (А) - график, отражающий активацию Т-клеток (на основе уровней экспрессии CD69 и CD25) NG-603, NG-604, NG-605, NG-606, при культивировании совместно с клетками NHDF и SKOV или со SKOV по отдельности, проанализированную с применением проточной цитометрии. (В) - график, отражающий цитотоксичность клеток NHDF, инфицированных NG-605 и NG-606, проанализированную с применением ЛДГ-анализа.

Фиг. 29 - стоп-кадры из ускоренной видеосъемки лизиса клеток NHDF рекомбинантным FAP биспецифическим активатором Т-клеток, EnAd, NG-603 или NG-605.

Фиг. 30 - стоп-кадры из ускоренной видеосъемки лизиса клеток NHDF NG-607, NG-608, NG-609 или NG-610.

Фиг. 31 - график, отражающий цитотоксичность клеток DLD, инфицированных EnAd, NG-601, NG-602, NG-603 и NG-604 в присутствии Т-клеток или в отсутствие Т-клеток, проанализированную с применением ЛДГ-анализа.

Фиг. 32 (А) - график, отражающий уровни экспрессии CD25 на CD3+ Т-клетках в образцах асцита, инфицированных вирусами согласно настоящему описанию. (В) график, отражающий число FAP+ клеток в образцах асцита, инфицированных вирусами согласно настоящему описанию.

Фиг. 33 - график, отражающий число CD3+ Т-клеток в образцах асцита, полученных от пациента с раком и инфицированных вирусами согласно настоящему описанию.

Фиг. 34 - график, отражающий уровни экспрессии CD25 на CD3+ Т-клетках в образцах асцита, полученных от пациента с раком и инфицированных вирусами согласно настоящему описанию.

Фиг. 35 - график, отражающий число FAP+ клеток в образцах асцита, полученных от пациента с ра-

ком и инфицированных вирусами согласно настоящему описанию.

Фиг. 36 - сравнение активации продуцирования цитокинов Т-клетками рекомбинантным белком FAP биспецифическим активатором Т-клеток в присутствии фибробластов человека и при поликлональной активации покрытыми антителами против CD3/CD28 микрогранулами. (А) уровни ИФН- γ , измеренные с применением ИФА ELISA. (В) Уровни цитокинов, измеренные с применением анализа на цитокины на чипах с микрогранулами.

Фиг. 37 - нацеленный на FAP биспецифический активатор Т-клеток индуцирует дегрануляцию Т-клеток и специфическую цитотоксичность FAP⁺ клеток. (А) - дегрануляция Т-клеток в культуре с клетками NHDF (5:1) и (В) содержащими биспецифический активатор Т-клеток супернатантами. Дегрануляцию оценивали по экстернализации CD107a после 6-часового культивирования с CD107a-специфическим антителом и измеряли с применением проточной цитометрии. Гранулы с антителами к CD3/CD28 Dynabeads использовали в качестве положительного контроля. (С) - цитотоксичность клеток NHDF через 24 часа совместного культивирования с Т-клетками (1:5) и 10-кратными серийными разведениями содержащих биспецифический активатор Т-клеток супернатантов. Цитотоксичность оценивали по высвобождению ЛДГ в культуральные супернатанты. (D) - лизис NHDF при высвобождении ЛДГ (слева) и индукцию CD25 на Т-клетках (справа) оценивали через 24 часа совместного культивирования с происходящими из МКПК Т-клетками (1:5) от шести здоровых доноров и содержащими биспецифический активатор Т-клеток супернатантами.

Фиг. 38 - EnAd, экспрессирующий FAP биспецифический активатор Т-клеток, обеспечивает селективный киллинг FAP⁺ фибробластов и снижает уровень ТФР- β в образцах перитонеального асцита (А, В) Число FAP⁺ фибробластов (А) и опухолевых клеток EpCAM⁺ (В) через 72 часа культивирования с происходящими из МКПК Т-клетками и EnAd или рекомбинантными вирусами. Асцитные клетки сначала выделяли из асцита от трех пациентов с и размножали *ex vivo*. Число клеток измеряли через 72 часа после инфицирования с применением проточной цитометрии. (С) - индукция активации маркера CD25 на происходящих из МКПК CD3 клетках с (А) измеряли через 72 часа после инфицирования. (D) - уровни ТФР- β измеряли с применением ИФА ELISA, используя супернатанты, собранные на этапе (А).

Фиг. 39 - активация эндогенных опухолеассоциированных Т-клеток и ассоциированный киллинг FAP⁺ клеток в образцах биопсии злокачественного асцита от пациента белком FAP биспецифический активатор Т-клеток и вирусами EnAd-FAP биспецифический активатор Т-клеток. (А) - активация Т-клеток, измеренная по экспрессии CD25. (В) - остаточное число FAP⁺ клеток, измеренное с применением проточной цитометрии.

Фиг. 40 - эффект PD-L1-блокирующих антител на опосредованную биспецифическим активатором Т-клеток активацию Т-клеток в образце от пациента (А) экспрессию PD1 эндогенными Т-клетками и PD-L1 на FAP⁺ клетках после их изначального выделения из перитонеального асцита оценивали с применением проточной цитометрии. (В) - общую неочищенную популяцию клеток из перитонеального асцита инкубировали в 50% жидкости из того же экссудата в присутствии свободного биспецифического активатора Т-клеток, EnAd или рекомбинантного вируса, в присутствии или в отсутствие направленного против PD-L1 блокирующего антитела. Через 2 дня собирали общую популяцию клеток и количественно определяли число CD25⁺ Т-клеток с применением проточной цитометрии. (С) - количество интерферона гамма в культуральных супернатантах с (В, D) измеряли с применением ИФА ELISA. (D) - число остаточных FAP⁺ клеток в (В) измеряли с применением проточной цитометрии.

Фиг. 41 - EnAd, экспрессирующие биспецифический активатор Т-клеток, активируют и перенаправляют Т-клетки из образцов биопсии от пациентов для лизиса фибробластов NHDF. (А) - экспрессия PD-1 эндогенными Т-клетками после выделения из образцов от здоровых доноров или из биоптатов злокачественного ракового экссудата, экспрессия PD-1 измеряли с применением проточной цитометрии. (В) Доля CD3⁺ клеток в неочищенной популяции клеток МКПК и образцах биопсии рака, измеренная с применением проточной цитометрии. (С) - уровни интерферона гамма, измеренные с применением ИФА ELISA в культуральных супернатантах, собранных из (В) через 120 часов после обработки. (D) - жизнеспособность фибробластов NHDF отслеживали в реальном времени на протяжении 130 часов с применением анализа цитотоксичности xCELLigence в совместной культуре с МКПК или общей популяцией клеток раковых биоптатов (1:5) и содержащего биспецифический активатор Т-клеток супернатанта.

Фиг. 42 - эффект образцов иммуносупрессивной асцитной жидкости на опосредованную покрытыми антителами FAP биспецифический активатор Т-клеток и против CD3/CD28 гранулами активацию Т-клеток МКПК. (А) - Т-клетки МКПК, активированные покрытыми антителами против CD3/Cd28 гранулами Dynabeads. (В) - Т-клетки МКПК, активированные контрольными биспецифический активатор Т-клеток или FAP биспецифический активатор Т-клеток в присутствии клеток NHDF. NS: нормальная сыrovоротка, А: перитонеальный асцит.

Фиг. 43 - экспрессирующий FAP биспецифический активатор Т-клеток EnAd поляризует CD11b⁺ макрофаги в асците пациентов в направлении более воспалительного фенотипа (А) общую неочищенную популяцию клеток из образца асцита инкубировали в 50% асцитной жидкости в присутствии свободного биспецифического активатора Т-клеток или экспрессирующего биспецифический активатор Т-клеток вируса. Обработку интерферона гамма использовали в качестве положительного контроля. Через 3 дня

собирали общую популяцию клеток и измеряли индукцию активации маркера CD25 на CD3⁺ клетках с применением проточной цитометрии. (B) - уровни интерферона гамма в культуральных супернатантах от (A) измеряли с применением ИФА ELISA. (C) Через 3 дня уровни экспрессии CD68, CD86, CD206 и CD163 на CD11b⁺ клетках с (A) измеряли с применением проточной цитометрии. Приведены репрезентативные проточно-цитометрические спектры на основе трех повторностей наряду с полным набором данных.

Фиг. 44 - характеристика архитектуры и клеточного состава солидной опухоли предстательной железы. Показаны уровни ИФН- γ в среде культуры тканевых срезов, измеренные с применением ИФА ELISA. Собирали супернатанты культур срезов злокачественной и доброкачественной ткани в указанный момент времени; и уровни ИЛ-2 в среде культуры злокачественной и доброкачественной ткани, измеренные с применением ИФА ELISA.

Фиг. 45 - схематическое изображение трансгенной кассеты.

Фиг. 46 - график, отражающий детектированное число вирусных геномов на клетку в обработанных NG-611, NG-612 и NG-617 опухолевых клетках.

Фиг. 47 показан процент Т-клеток, экспрессирующих CD69 (a), CD25 (b) HLA-DR (c), CD40L (d) или CD107a поверхности клеток (e) после совместного культивирования с экспрессирующими ErCam клетками SKOV и собранными супернатантами от клеток A549 через 24 ч, 48 ч или 72 часа после обработки вирусными частицами NG-611 по сравнению с обработанными NG-612, энаденотуциревом или необработанными контрольными супернатантами.

Фиг. 48 - процент Т-клеток, экспрессирующих CD69 (a), CD25 (b) HLA-DR (c), CD40L (d) или CD107a поверхности клеток (e) после совместного культивирования с экспрессирующими FAP клетками MRC-5 и собранными супернатантами от клеток A549 через 24 ч, 48 ч или 72 часа после обработки вирусными частицами NG-612 по сравнению с обработанными NG-611, энаденотуциревом или необработанными контрольными супернатантами.

Фиг. 49 - процент клеток MRC-5, которые экспрессируют ErCAM и FAP.

Фиг. 50 - экспрессия ИФН- γ в супернатантах совместных культур Т-клеток с клетками SKOV (A) или клетками MRC-5 (B), инкубированных с собранными супернатантами от клеток A549 через 24 ч, 48 ч или 72 часа после обработки вирусными частицами NG-611, NG-612 или энаденотуциревом, или с необработанными контрольными супернатантами.

Фиг. 51 - противоопухолевая эффективность и иммунная активация экспрессирующими биспецифический активатор Т-клеток вирусами *in vivo*. (a) объем опухолей у мышей, получавших лечение солевым раствором, энаденотуциревом или NG-611. (b) отношение CD8 и CD4 Т-клеток в обработанных NG-611 опухолях по сравнению с обработанными энаденотуциревом или необработанными контролями.

Фиг. 52 - график, отражающий число детектированных вирусных геномов на клетку в обработанных NG-612 и NG-615 опухолевых клетках

Фиг. 53 - экспрессия ИФН- α , MIP1 α и Flt3 L в клеточном супернатанте от обработанных NG-615 и супернатанте от обработанных энаденотуциревом и необработанных контрольных опухолевых клеток.

Фиг. 54 - число Т-клеток, экспрессирующих CD69 (a), CD25 (b) HLA-DR (c), CD40L (d) или CD107a поверхности клеток (e) после совместного культивирования с экспрессирующими FAP клетками MRC-5 и собранными супернатантами от клеток A549 через 24 ч, 48 ч или 72 часа после обработки вирусными частицами NG-615 по сравнению с обработанными NG-612, энаденотуциревом, или необработанными контрольными супернатантами.

Фиг. 55 - экспрессия ИФН- γ в супернатантах совместных культур Т-клеток с клетками MRC-5, инкубированными с собранными супернатантами от клеток A549 через 24 ч, 48 ч или 72 часа после обработки вирусными частицами NG-612, NG-615 или энаденотуцирева, или с необработанными контрольными супернатантами.

Последовательности

- SEQ ID NO: 1** Кодирующая последовательность ДНК биспецифического активатора Т-клеток против FAP с N-концевой сигнальной последовательностью и С-концевой аффинной декагистидиновой меткой
- SEQ ID NO: 2** Последовательность аминокислот биспецифического активатора Т-клеток против FAP с N-концевой сигнальной последовательностью и С-концевой аффинной декагистидиновой меткой
- SEQ ID NO: 3:** Кодирующая контрольный (против FNA) биспецифический активатор Т-клеток последовательность ДНК с N-концевой сигнальной последовательностью и С-концевой аффинной декагистидиновой меткой
- SEQ ID NO: 4:** Последовательность аминокислот контрольного (против FNA) биспецифического активатора Т-клеток с N-концевой сигнальной

- последовательностью и С-концевой аффинной декагистидиновой меткой
- SEQ ID NO: 5: Последовательность аминокислот ScFv антитела против CD3
- SEQ ID NO: 6: VH антитела против CD3
- SEQ ID NO: 7: VL антитела против CD3
- SEQ ID NO: 8: Последовательность линкера ScFv антитела против CD3
- SEQ ID NO: 9: ScFv антитела против FAP
- SEQ ID NO: 10: Домен VL антитела против FAP
- SEQ ID NO: 11: Домен VH антитела против FAP
- SEQ ID NO: 12: последовательность линкера антитела против FAP и антитела против EpCAM
- SEQ ID NO: 13: Лидерная последовательность биспецифического активатора Т-клеток
- SEQ ID NO: 14: Контрольный биспецифический активатор Т-клеток (против FHA)
- SEQ ID NO: 15: Контрольный (против FHA) ScFv
- SEQ ID NO: 16: Контрольный (против FHA) VL
- SEQ ID NO: 17: Контрольный (против FHA) VH
- SEQ ID NO: 18: Последовательность линкера контрольного (против FHA) ScFv
- SEQ ID NO: 19: Последовательность декагистидиновой метки
- SEQ ID NO: 20: FAP биспецифический активатор Т-клеток-P2A-RFP (*КУРСИВ* = лидерная последовательность, **ЖИРНОЕ НАЧЕРТАНИЕ** = сайт расщепления фурина, ПОДЧЕРКИВАНИЕ = P2A последовательность, строчные буквы = RFP)
- SEQ ID NO: 21: Контрольный биспецифический активатор Т-клеток-P2A-RFP (против FHA) (*КУРСИВ* = лидерная последовательность, **ЖИРНОЕ НАЧЕРТАНИЕ** = сайт расщепления фурина, ПОДЧЕРКИВАНИЕ = P2A последовательность, строчные буквы = RFP)
- SEQ ID NO: 22: Кодированная последовательность ДНК FAP человека
- SEQ ID NO: 23: Последовательность аминокислот FAP человека
- SEQ ID NO: 24: Последовательность промотора CMV
- SEQ ID NO: 25: Последовательность полиаденилирования поздней области SV40
- SEQ ID NO: 26: NG-605 (EnAd-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток)
- SEQ ID NO: 27: NG-606 (EnAd-SA-FAP биспецифический активатор Т-клеток)
- SEQ ID NO: 28: геном EnAd
- SEQ ID NO: 29: Последовательность ДНК В_χ, соответствующая и включающая п.о. 28166–28366 генома EnAd
- SEQ ID NO: 30: Последовательность ДНК В_γ, соответствующая и включающая п.о. 29345–29379 генома EnAd

SEQ ID NO: 31	HIS-метка
SEQ ID NO: 32	Последовательность акцептора сплайсинга.
SEQ ID NO: 33	Последовательность полиаденилирования SV40
SEQ ID NO: 34	последовательность нуклеиновых кислот FAP биспецифического активатора Т-клеток (ОКТЗ)
SEQ ID NO: 35	последовательность нуклеиновых кислот FAP биспецифического активатора Т-клеток (aCD3)
SEQ ID NO: 36	Трансгенная кассета NG-611
SEQ ID NO: 37	Трансгенная кассета NG-612
SEQ ID NO: 38	Трансгенная кассета NG-613
SEQ ID NO: 39	Инсерционный фрагмент с сайтом рестрикции (B _X)
SEQ ID NO: 40	Инсерционный фрагмент с сайтом рестрикции (B _Y)
SEQ ID NO: 41	Последовательность промотора CMV
SEQ ID NO: 42	Последовательность промотора PGK
SEQ ID NO: 43	Последовательность промотора СВА
SEQ ID NO: 44	Короткая последовательность ДНК акцептора сплайсинга (SSA)
SEQ ID NO: 45	Последовательность ДНК акцептора сплайсинга (SA)
SEQ ID NO: 46	Последовательность ДНК разветвленного акцептора сплайсинга (bSA)
SEQ ID NO: 47	последовательность Козак (нулевая последовательность)
SEQ ID NO: 48	Пример стартового кодона
SEQ ID NO: 49	Последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES)
SEQ ID NO: 50	Пептид P2A
SEQ ID NO: 51	пептид F2A
SEQ ID NO: 52	пептид E2A
SEQ ID NO: 53	пептид T2A
SEQ ID NO: 54	последовательность полиаденилирования (поли(A))
SEQ ID NO: 55	Лидерная последовательность
SEQ ID NO: 56	Лидерная последовательность
SEQ ID NO: 57	Последовательность аминокислот ИФН-γ
SEQ ID NO: 58	Последовательность аминокислот ИФН-α
SEQ ID NO: 59	Последовательность аминокислот ФНО-α
SEQ ID NO: 60	Последовательность ДНК, соответствующая области E2B генома EnAd (п.о. 10355–5068)

- SEQ ID NO: 61:** Кодирующая последовательность ДНК биспецифического активатора Т-клеток против FAP с N-концевой сигнальной последовательностью без С-концевой аффинной декагистидиновой метки
- SEQ ID NO: 62:** Последовательность аминокислот биспецифического активатора Т-клеток против FAP с N-концевой сигнальной последовательностью без С-концевой аффинной декагистидиновой метки
- SEQ ID NO: 63:** Кодирующая последовательность ДНК контрольного (против FNA) биспецифического активатора Т-клеток с N-концевой сигнальной последовательностью без С-концевой аффинной декагистидиновой метки
- SEQ ID NO: 64:** Последовательность аминокислот контрольного (против FNA) биспецифического активатора Т-клеток с N-концевой сигнальной последовательностью без С-концевой аффинной декагистидиновой метки
- SEQ ID NO: 65:** Контрольный биспецифический активатор Т-клеток (против FNA) без С-концевой аффинной декагистидиновой метки
- SEQ ID NO: 66:** NG-605 (EnAd-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток) без аффинной декагистидиновой метки
- SEQ ID NO: 67:** NG-606 (EnAd-SA-FAP биспецифический активатор Т-клеток) без аффинной декагистидиновой метки
- SEQ ID NO: 68:** Последовательность нуклеиновых кислот (ОКТ3)FAP биспецифический активатор Т-клеток
- SEQ ID NO: 69:** Последовательность нуклеиновых кислот (aCD3)FAP биспецифический активатор Т-клеток
- SEQ ID NO: 70:** Трансгенная кассета NG-611
- SEQ ID NO: 71:** Трансгенная кассета NG-612
- SEQ ID NO: 72:** Трансгенная кассета NG-613
- SEQ ID NO: 73:** Трансгенная кассета NG-614
- SEQ ID NO: 74:** Трансгенная кассета NG-617
- SEQ ID NO: 75:** Последовательность аминокислот (ОКТ3)FAP биспецифический активатор Т-клеток
- SEQ ID NO: 76:** Последовательность аминокислот (aCD3)FAP биспецифический активатор Т-клеток
- SEQ ID NO: 77:** Геном NG-611
- SEQ ID NO: 78:** Геном NG-612
- SEQ ID NO: 79:** Геном NG-613
- SEQ ID NO: 80:** Геном NG-614
- SEQ ID NO: 81:** Геном NG-617

SEQ ID NO: 82:	Геном NG-615
SEQ ID NO: 83:	Геном NG-640
SEQ ID NO: 84:	Геном NG-641
SEQ ID NO: 85:	Нулевая последовательность
SEQ ID NO: 86:	Последовательность нуклеиновых кислот Flt3L
SEQ ID NO: 87:	Нулевая последовательность
SEQ ID NO: 88:	Последовательность нуклеиновых кислот MIP1 α
SEQ ID NO: 89:	Последовательность гибкого линкера
SEQ ID NO: 90:	Последовательность нуклеиновых кислот ИФН- α
SEQ ID NO: 91:	Последовательность нуклеиновых кислот CXCL10
SEQ ID NO: 92:	Последовательность нуклеиновых кислот CXCL9
SEQ ID NO: 93:	Трансгенная кассета NG-615
SEQ ID NO: 94:	Трансгенная кассета NG-640
SEQ ID NO: 95:	Трансгенная кассета NG-641
SEQ ID NO: 96:	Последовательность аминокислот FLT3L
SEQ ID NO: 97:	Последовательность аминокислот MIP1 α
SEQ ID NO: 98:	Последовательность аминокислот ИФН- α
SEQ ID NO: 99:	Последовательность аминокислот CXCL9
SEQ ID NO: 100:	Последовательность аминокислот CXCL10
SEQ ID NO: 101:	Геном NG-618
SEQ ID NO: 102:	Последовательность нуклеиновых кислот NG-618 FAP биспецифический активатор Т-клеток
SEQ ID NO: 103:	Трансгенная кассета NG-618
SEQ ID NO: 104–277	последовательности линкеров
SEQ ID NO: 278	Геном NG-616
SEQ ID NO: 279–281	праймеры

Примеры

Пример 1.

Разрабатывали рекомбинантные биспецифические активаторы Т-клеток и получали белки согласно описанию в настоящем примере.

1.1. Конструирование биспецифического активатора Т-клеток.

Биспецифические активаторы Т-клеток получают путем соединения двух одноцепочечных фрагментов антител (ScFv) с разной специфичностью гибким Clu_4Ser -линкером. ScFv получают путем соединения доменов V_H и V_L исходных моноклональных антител линкером. Дизайн каждого биспецифического активатора Т-клеток включал N-концевую сигнальную последовательность для секреции у млекопитающих и C-концевую декагистидиновую аффинную метку для детекции и очищения. Биспецифические активаторы Т-клеток конструировали с применением стандартных методик клонирования ДНК и встраивали в векторы для экспрессии белков (фиг. 1).

Направленный против FAP биспецифический активатор Т-клеток получали *de novo* с использованием направленного против FAP ScFv из патента WO 2010037835A2 и направленного против CD3 ScFv из патента WO 2005040220 (приведенная в нем SEQ ID 63) с добавлением сигнальной последовательности и аффинной метки. Для контрольного биспецифического активатора Т-клеток использовали направленный против FHA (филаментозный гемагглютинин *Bordetella pertussis*) ScFv из работы Hussein с соавторами, 2007 (Hussein AH et al (2007) "Construction and characterization of single-chain variable fragment antibodies directed against the *Bordetella pertussis* surface adhesins filamentous hemagglutinin and pertactin". *Infect Immunology* 75, 5476-5482) и направленный против CD3 ScFv из патента WO 2005040220 (приведенная в нем SEQ ID NO: 63) с добавлением сигнальной последовательности и аффинной метки.

1.2. Получение рекомбинантного биспецифического активатора Т-клеток.

Рекомбинантные белки биспецифического активатора Т-клеток получали путем клонирования соответствующих последовательностей в вектор pSF-CMV с применением промотора CMV (SEQ ID NO: 24) для управления экспрессией белка (фиг. 1). Концентрацию плазмидной ДНК для плазмид, pSF-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток и pSF-CMV-Контрольного биспецифического активатора Т-клеток (Табл. 2) измеряли с помощью NanoDrop. Пустой pSF-CMV вектор включен в качестве отрица-

тельного контроля. По 54,7 мкг каждого компонента разводили 4 мл OptiMEM. 109,2 мкг ПЭИ (линейный, MW 25000, Polysciences, США) разводили в 4 мл среды OptiMEM и смешивали с 4 мл разведенной ДНК с получением комплексов ДНК-ПЭИ (отношение ДНК:ПЭИ = 1:2 (по массе)). После инкубации при комнатной температуре в течение 20 минут смесь с комплексами доводили до объема 18 мл средой OptiMEM и указанную смесь

для трансфекции добавляли во флакон T175, содержащую клетки Ad293 с 90% конfluence. После инкубации клеток указанной смесью для трансфекции в течение 4 часов при 37°C, 5% CO₂, в клетки добавляли 30 мл клеточной среды (DMEM с высоким содержанием глюкозы и добавлением глутаминна, без фенолового красного) и флаконы инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 48 часов. В другом флаконе клетки трансфицировали параллельно рSF-CMV-GFP для обеспечения эффективной трансфекции. Для сбора секретированного белка собирали супернатант от трансфицированных клеток и центрифугировали при 350d и 4°C в течение 5 минут для удаления компонентов клеток (Allegra X-15R, Beckman Coulter). Супернатанты переносили на центрифужные фильтры Amicon Ultra-15 с номинальным отсечением по молекулярной массе 10кДа (Millipore). После центрифугирования на 4750 об/мин при 4°C объем ретентата доводили проточной фракцией до 50-кратной концентрации. Аликвоты концентрированного белка хранили при -80°C.

Таблица 2

ID плазмиды	[Плазида ДНК] нг/мл
рSF-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток	6700
рSF-CMV-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток	5300
рSF-Lenti-FAP	659,6

Префикс "р" в названиях конструкций показывает, что конструкция представляет собой плазмиду.

1.3. Получение вирусов, экспрессирующих FAP-биспецифический активатор Т-клеток в комбинации с иммуномодулирующими белками.

Получали три вируса (NG-640, NG-641 и NG-615), кодирующие нацеленную на FAP молекулу биспецифического активатора Т-клеток и 2 или 3 иммуномодулирующих белка (табл. 1). NG-640 кодирует три трансгенных белка, молекулу FAP-биспецифический активатор Т-клеток и хемокины CXCL9 и CXCL10. И NG-641, и NG-615 кодируют четыре трансгенных белка. NG-641 кодирует FAP-биспецифический активатор Т-клеток, хемокины CXCL9 и CXCL10 и цитокин ИФН-α, а NG-615 кодирует FAP-биспецифический активатор Т-клеток, хемокин MIP1α и цитокины лиганд Flt3 и ИФН-α. Также получали вирус, кодирующий только молекулу FAP-биспецифический активатор Т-клеток (NG-617)

Таблица 1

ID вируса	Трансгенная кассета
NG-615 (SEQ ID NO: 1)	SSA ¹ -FAPбиспецифический активатор Т-клеток ² -E2A ³ -Flt3L ⁴ -P2A ⁵ -MIP1α ⁶ -T2A ⁷ -IFNα ⁸ -PA ⁹
NG-640 (SEQ ID NO: 2)	SSA ¹ -FAPбиспецифический активатор Т-клеток ² -P2A ⁵ -CXCL10 ¹⁰ -T2A ⁷ -CXCL9 ¹¹ -PA ⁹
NG-641 (SEQ ID NO: 3)	SSA ¹ -FAPбиспецифический активатор Т-клеток ² -P2A ⁵ -CXCL10 ¹⁰ -T2A ⁷ -CXCL9 ¹¹ -E2A ³ -IFNα ⁸ -PA ⁹
NG-617 (SEQ ID NO: 4)	SSA ¹ -FAPбиспецифический активатор Т-клеток ² -PA ⁹

В каждой трансгенной кассете кДНК, кодирующая биспецифический активатор Т-клеток и другие иммуномодулирующие белки, была фланкирована на 5'-конце короткой последовательностью акцептора сплайсинга (SSA, CAGG) и на 3'-конце - поздней последовательностью поли(А) SV40 (PA, SEQ ID NO: 25). Последовательности кДНК для каждого трансгена разделяли с применением последовательностей высокоэффективного саморасщепляющегося пептида 2А (P2A, T2A, E2A, SEQ ID NO: 50, 53 и 52).

Получение вируса.

Плазмиду рEpAd2.4 использовали для получения плазмид рNG-615, рNG-640 и рNG-641 путем прямой инсерции синтезированных трансгенных кассет (SEQ ID NO: 93, 94 и 95, соответственно). NG-615 содержит четыре трансгена, кодирующих нацеленный на FAP биспецифический активатор Т-клеток (SEQ ID NO: 102), Flt3L (SEQ ID NO: 86), MIP1α (SEQ ID NO: 88) и ИФН-α (SEQ ID NO: 90). NG-640 и NG-641 кодируют нацеленный на FAP биспецифический активатор Т-клеток (SEQ ID NO: 102), CXCL9 (SEQ ID NO: 92) и CXCL10 (SEQ ID NO: 91). NG-641 также содержит четвертый трансген, кодирующий ИФН-α (SEQ ID NO: 90). Схематические изображения указанных трансгенных кассет приведены на фиг.

1. Конструирование плазмидной ДНК подтверждали путем рестрикционного анализа и секвенирования ДНК.

Плазмиды pNG-615, pNG-640 и pNG-641 линеаризовали путем рестрикционного расщепления ферментом AscI для получения вирусных геномов. Вирусы амплифицировали и очищали в соответствии со способами, приведенными ниже. Расщепленную ДНК очищали путем экстракции фенолом-хлороформом и осаждали в течение 16 часов, -20°C в 300 мл $>95\%$ этанола молекулярно-биологического качества и 10 мл 3М ацетата натрия. Осажденную ДНК пеллетировали путем центрифугирования на 14000 об/мин в течение 5 минут и промывали в 500 мл 70% этанола, после чего повторно центрифугировали на 14000 об/мин в течение 5 минут. Чистую пеллетированную ДНК высушивали на воздухе, ресуспендировали в 500 мл OptiMEM, содержащей 15 мл реагента для трансфекции липофектамина, и инкубировали на протяжении 30 минут при комнатной температуре. Затем смесь для трансфекции по каплям добавляли во флакон T-25, содержащий клетки 293, культивированные до 70% конfluence. После инкубации клеток со смесью для трансфекции в течение 2 часов при 37°C , 5% CO_2 , 4 мл клеточной среды (DMEM с высоким содержанием глюкозы и глутамином, с добавлением 2% ФБС) добавляли в клетки и флаконы инкубировали при 37°C , 5% CO_2 . Мониторинг трансфицированных клеток 293 проводили каждые 24 часа и добавляли дополнительную среду каждые 48-72 часа. Продуцирование вируса отслеживали по наблюдаемому значимому цитопатическому эффекту (CPE) в монослое клеток. После обнаружения наблюдаемой интенсивной CPE собирали вирус из клеток 293, проводя три цикла замораживания-оттаивания. Собранные вирусы использовали для повторного инфицирования клеток 293 для амплификации стокового вирусного материала. Продуцирование жизнеспособного вируса в ходе амплификации подтверждали на основании наблюдаемой значимой CPE в монослое клеток. После обнаружения наблюдаемой CPE собирали вирус из клеток 293, проводя три цикла замораживания-оттаивания. Амплифицированный вирусный стоковый материал использовали для дальнейшей амплификации, после чего вирусы очищали путем двойного разделения в хлориде цезия с получением очищенного вирусного стокового материала.

Пример 2. Анализ репликации и онколитической активности вируса.

Репликация вируса.

Линии клеток карциномы легкого (A549), молочной железы (MDA-MB-453) или мочевого пузыря (RT4), инокулированные в течение 72 ч 1 ч/кл NG-615, NG-640, NG-641, NG-617, энаденотуцирева (EnAd) или неинфицированные, использовали для количественного определения вирусной ДНК с применением кПЦР. Клеточные супернатанты собирали и осветляли путем центрифугирования в течение 5 минут на 1200 об/мин. 50 мкл супернатанта использовали для анализа ДНК.

ДНК экстрагировали из образца супернатанта с применением набора Qiagen DNeasy в соответствии с протоколом производителя. Также строили стандартную кривую с использованием вирусных частиц EnAd ($2,5 \times 10^2$ - $2,5 \times 10^8$ в.ч.) и проводили экстракцию с применением набора DNeasy. Каждый экстрагированный образец или стандарт анализировали с применением кПЦР, используя специфический для вирусных генов праймер/зонд, настроенный на ранний ген E3. Количественное определение числа детектированных вирусных геномов на клетку продемонстрировало вирусную репликацию в A549, MDA-MB-453 и RT4 для всех протестированных вирусов (NG-617, NG-615, NG-640 и NG-641) (фиг. 2). Вирусная репликация была аналогичной для всех вирусов и была эквивалентна наблюдаемой для исходного вируса EnAd. В неинфицированных клетках не были детектированы вирусные геномы.

Онколитическая активность.

Мониторинг клеток карциномы легкого (A549), инокулированных 100 ч/кл NG-615, NG-640, NG-641, NG-617, EnAd или неинфицированных, проводили с помощью анализатора xCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA). Пролиферацию клеток отслеживали каждые 60 минут на протяжении периода до 96 часов. Онколизис клеток оценивали, вычисляя время 50% киллинга (KT50), представляющее собой точку времени, в которой достигается 50% лизис (фиг. 3). Эти данные демонстрируют эквивалентное KT50 для всех протестированных вирусов, включая исходный вирус EnAd. В необработанных клетках не наблюдался онколитический эффект.

В совокупности эти данные показывают, что включение биспецифического активатора T-клеток и двух или трех иммуномодулирующих трансгенов значимо не влияет на репликативную или онколитическую активность вируса EnAd.

Пример 3. Анализ опосредованной вирусом трансгенной экспрессии. Детекция рекомбинантного биспецифического активатора T-клеток.

Для детекции биспецифического активатора T-клеток C-концевая декагистициновая аффинная метка может быть зондирована направленным против His антителом с применением методики вестерн-блоттинга. Объем образцов белков доводили буфером для лизиса до итогового объема 15 мкл, в том числе 2,5 мкл 6x ДСН-буфером для образцов Лэммли, который содержит р-меркаптоэтанол и ДСН. Образцы инкубировали на протяжении 5 минут при 95°C для денатурации белков и загружали в 15-луночные наборы готовых 10% полиакриламидных гелей (готовые гели Mini-PROTEAN TGX, BioRad, Великобритания). Прогонку через гели проводили при 180 В в течение 45 минут в 1x подвижном буфере в системе

Mini-PROTEAN Tetra (BioRad, Великобритания). Белки с ДСН-гелей переносили на нитроцеллюлозные мембраны методом влажного электроблоттинга при 300 мА и 4°C в течение 90 минут в 1× буфере для переноса в системе Mini Trans-Blot Cell (BioRad, Великобритания). Перенос выполняли в присутствии пакета со льдом для ограничения температуры. Затем нитроцеллюлозную мембрану блокировали 5% молоком в ФСБ-Т на качалке в течение 1 часа при комнатной температуре, и зондировали антителом против His (С-конц.) (антитело мыши а-6хHis, клон 3D5, Invitrogen, Великобритания, #46-0693), разведенным до 1:5000 в ФСБ/5% молоке. После инкубации на качалке в течение ночи при 4°C мембрану промывали и зондировали HRP-меченым поликлональным вторичным а-антителом против Ig мыши (1:10 000 в ФСБ/5% молока, Dako, #P0161) в течение 1 часа при комнатной температуре. Для визуализации использовали субстрат SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher Scientific, Великобритания), следуя инструкциям производителя, приводили в контакт с рентгенографической пленкой и проявляли в проявочном автомате. Полученные результаты продемонстрировали экспрессию и секрецию белка биспецифического активатора Т-клеток клетками Ad293, трансфицированными экспрессионными плазмидами биспецифического активатора Т-клеток, однако не исходным вектором.

Количественное определение рекомбинантного биспецифического активатора Т-клеток.

Для измерения количества рекомбинантного белка биспецифического активатора Т-клеток использовали методику дот-блоттинга для сравнения сигнала биспецифического активатора Т-клеток с сигналом, His-меченого (10His на С-конце) белка-стандарта (10 х His-меченый катепсин D человека, Biolegend, #556704). Готовили двукратные серийные разведения образцов биспецифического активатора Т-клеток и белка-стандарта, наносили по 1,5 мкл каждого разведения непосредственно на нитроцеллюлозную мембрану и высушивали на воздухе в течение 20 минут. Затем осуществляли протокол блокирования и окрашивания, описанные выше для вестерн-блоттинга. Молярную концентрацию белка-стандарта доводили до соответствующей концентрации биспецифического активатора Т-клеток 250 мкг/мл. Полученные результаты (фиг. 13А) продемонстрировали экспрессию и секрецию белка биспецифического активатора Т-клеток клетками Ad293, трансфицированными экспрессионными плазмидами с биспецифическим активатором Т-клеток.

ИФА ELISA на связывание FAP.

FAP-связывающую активность FAP биспецифического активатора Т-клеток и контрольного (направленного против FNA) биспецифического активатора Т-клеток (SEQ ID NO: 2 и 4), секретированных клетками, трансфицированными рSF-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток или рSF-CMV-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток, оценивали с применением твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Супернатанты с пустым вектором рSF-CMV включали в качестве отрицательного контроля. Планшеты для ELISA (96-луночные микропланшеты Nunc Immuno MaxiSorp) подготавливали, покрывая в течение ночи при 4°C белком FAP человека /сепразой (100 нг/луноку, Sino Biological Inc, 10464-N07H-10) в буфере ФСБ. Планшеты промывали между всеми последующими этапами связывания ФСБ с 0,05% Tween 20. Планшеты блокировали в течение 1 часа при комнатной температуре 5% БСА в ФСБ с 0,05% Tween 20. Аликвоты белка биспецифического активатора Т-клеток, или белок, собранный из трансфицированных с пустым вектором рSF-CMV лунок, разводили 10-кратно в ФСБ/5% БСА/0,05% Tween 20. Все образцы добавляли в покрытые FAP планшеты и инкубировали на протяжении 2 ч при комнатной температуре. Антитело для детекции против His (С-конц.) (АТ мыши против 6хHis, клон 3D5, Invitrogen, Великобритания, #46-0693) разводили 1:1000 и проводили обработку им в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем проводили обработку HRP-конъюгированным антителом против Fc мыши (1:1000 в ФСБ/5% молока, Dako) в течение 1 часа при комнатной температуре перед детекцией HRP с применением раствора субстрата HRP 3.3.5.5'-тетраметилэтилендиамина (ТМВ, Thermo-Fisher). Использовали стоп-раствор для остановки реакции и измеряли развившийся цвет при 450 нм на планшет-ридере. Строили график поглощения при 450 нм для супернатантов с FAP биспецифическим активатором Т-клеток, контрольным биспецифическим активатором Т-клеток и пустым вектором, демонстрирующий специфическое связывание FAP биспецифическим активатором Т-клеток с белком FAP. Полученные результаты (фиг. 13В) демонстрируют специфическое связывание FAP биспецифическим активатором Т-клеток, но не контрольного биспецифического активатора Т-клеток с рекомбинантным белком FAP.

Оценка трансгенной экспрессии с применением ИФА ELISA.

Экспрессию трансгенов хемокинов или цитокинов, ИФН-α, MIP1α, FLT3L, CXCL10 и CXCL9 оценивали с применением ИФА ELISA. Линии клеток карциномы A549 и RT4 инокулировали 1 ч/кл NG-615, NG-640, NG-641, NG-617, EnAd или оставляли неинфицированными на протяжении периода до 7 дней. Через 4 дня и 7 дней после инокуляции клеточные супернатанты осветляли и оценивали трансгенную экспрессию с применением ИФА ELISA.

ИФА ELISA на ИФН-α проводили с использованием набора для анализа на ИФН-альфа человека Verikine (PBL Assay Science), ИФА ELISA на MIP1α проводили с использованием набора для ИФА-анализа ELISA на CCL3 человека Quantikine (R&D Systems), ИФА ELISA на Flt3L проводили с применением набора для ИФА ELISA на Flt3L человека (Abcam), ИФА ELISA на CXCL9 проводили с

применением набора для ИФА ELISA на CXCL9 человека (Abcam); и ИФА ELISA на CXCL10 проводили с применением набора для ИФА ELISA на CXCL10 человека (Abcam). Все анализы проводили в соответствии протоколом производителя.

Концентрации секретируемых ИФН- α , MIP α , Flt3L, CXCL9 и CXCL10 определяли путем интерполяции по стандартным кривым. Экспрессия ИФН- α , MIP α и Flt3L может быть детектирована в клеточном супернатанте от обработанных NG-615 клеток, ИФН- α , CXCL9 и CXCL10 могут быть детектированы в супернатантах от обработанных NG-641 клеток и CXCL9 и CXCL10 могут быть детектированы в супернатантах от обработанных NG-640 клеток (фиг. 4 и 5). Трансгенная экспрессия хемокинов или цитокинов не была детектирована в обработанных EnAd или необработанных контрольных клетках.

Оценка трансгенной экспрессии с применением клеточного репортерного анализа.

Экспрессию функциональных трансгенов FAP-биспецифический активатор Т-клеток и ИФН- α оценивали в анализах с применением линии репортерных клеток Jurkat-Dual (Invivogen). Указанные клетки представляют собой клетки линии иммортализованных Т-лимфоцитов человека (Jurkat), трансформированные путем стабильной интеграции двух индуцируемых репортерных конструкций. Одна из указанных индуцируемых репортерных конструкций позволяет исследовать активацию ИФН-пути регуляторных факторов интерферонов (IRF) на основании секреции и активности секретируемый эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), а вторая представляет собой чувствительный к NF- κ B секретируемый люциферазный репортер, активируемый путем сигнализации через Т-клеточный рецептор. Активность SEAP пропорциональна уровню ИФН, присутствующему в супернатанте, и может быть измерена путем детекции индуцированного SEAP разложения субстрата Quanti-Blue™. Экспрессию функциональных MIP α оценивали с использованием репортерной линии клеток CCR5 (CHO-K1 CCR5 β -Arrestin, Invivogen). Линии клеток карциномы A549 инокулировали 1 ч/кл NG-615, NG-640, NG-641, NG-617, EnAd или оставляли неинфицированными. Через 2, 3 или 4 дня после инокуляции клеточные супернатанты собирали и осветляли для анализа. Для оценки функции ИФН- α 20 мкл каждого супернатанта, разведенного 1:10, 1:50 или 1:250 в культуральной среде, добавляли к клеткам Jurkat Dual (2×10^5 клеток/лунку) и инкубировали на протяжении 16-20 часов. Затем супернатанты собирали из планшетов и обрабатывали 200 мкл реагента Quanti-Blue™ в течение 1 часа. Планшеты анализировали с использованием ридера для микропланшетов, измеряя поглощение (Abs) при 640 нм. Ответы, демонстрирующие присутствие функционального ИФН- α , могут быть детектированы в супернатантах от обработанных NG-615 и NG-641 клеток карциномы, но не от обработанных NG-640, NG-617, EnAd или неинфицированных контролях (фиг. 6A). Детектированный уровень функционального ИФН- α был аналогичен в обработанных NG-615 и NG-641 супернатантах.

Для оценки функции MIP α репортерные клетки CCR5 высевали (5×10^3 клеток/лунку) и инкубировали на протяжении 20-24 часа. Затем в каждую лунку добавляли по 5 мкл супернатанта от обработанных опухолевых клеток и инкубировали на протяжении 90 минут. Затем детектировали люциферазную репортерную активность с применением раствора для детекции и количественного определения на люминесцентном планшет-ридере. Ответы, демонстрирующие присутствие функциональных MIP α , детектировали в супернатантах от обработанных NG-615 клеток карциномы и супернатантах от клеток, обработанных положительным контрольным вирусом, по имеющимся данным экспрессирующего MIP α , NG-347 (фиг. 6B).

Для оценки функции FAP-биспецифический активатор Т-клеток фибробласты легких MRC-5 (которые экспрессируют FAP на клеточной мембране) высевали (2×10^4 клеток/лунку) и инкубировали на протяжении 4 часов, чтобы позволить клеткам прикрепиться к планшетам. Затем в лунки добавляли клетки Jurkat-Dual (2×10^5 клеток/лунку) наряду с 20 мкл супернатанта от обработанных опухолевых клеток. Планшеты инкубировали на протяжении 16-20 часов. Затем собирали супернатанты и обрабатывали 50 мкл реагента Quanti-Luc до непосредственного считывания планшетов на планшет-ридере для детекции активности люциферазы. Ответы, демонстрирующие присутствие функциональных FAP-биспецифический активатор Т-клеток, детектировали в супернатантах от обработанных NG-617, NG-615, NG-640 и NG-641 клеток карциномы, но не от обработанных EnAd или необработанных контрольных супернатантов (фиг. 7). Неожиданным образом, учитывая аналогичные уровни ИФН- α продуцируемые NG-615 и NG-641, супернатанты от обработанных NG-615 клеток отличались значимо более низкими уровнями экспрессии функциональных FAP-биспецифических активаторов Т-клеток по сравнению со всеми другими протестированными экспрессирующими биспецифический активатор Т-клеток вирусами, в том числе другим вирусом, содержащим 4 трансгена, NG-641.

Пример 2.

Функциональную активность рекомбинантных белков биспецифического активатора Т-клеток оценивали в нескольких разных анализах перед конструированием несущих трансген биспецифического активатора Т-клеток вирусов EnAd.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови человека (МКПК).

МКПК человека выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности либо из свежих образцов крови человека от здоровых доноров, либо из лейкоцитарных конусов из цельной крови, которые

получали от NHS Blood and Transplant, Великобритания, Оксфорд. Во всех случаях образцы разводили 1:2 в ФСБ и 25 мл указанной смеси наносили на 13 мл фиколла (1,079 г/мл, Ficoll-Paque Plus, GE Healthcare) в пробирке Falcon объемом 50 мл. Образцы центрифугировали (AllegraX-15R, Beckman Coulter) на 1600 об/мин в течение 30 минут при 22°C с минимальным отрицательным ускорением для сохранения разделения фаз. После центрифугирования можно было наблюдать 4 слоя, включавшие слой плазмы сверху, за которым следует промежуточный слой, содержащий МКПК, слой фиколла и слой эритроцитов и гранулоцитов на дне. МКПК собирали с помощью пипетки Пастера и дважды промывали ФСБ (1200 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре) и ресуспендировали в среде RPMI с добавлением 10% ФБС.

Выделение CD3-положительных Т-клеток.

CD3-положительные (CD3⁺) Т-клетки экстрагировали из МКПК путем истощения по клеткам без CD3 с применением набора для выделения Т-клеток Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, #130-096-535) в соответствии с протоколом производителя.

Обработка образцов первичного асцита.

Образцы первичного асцита человека получали из онкологического отделения больницы Черчилля (больницы Оксфордского университета) от пациентов с рядом показаний, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, раком яичников, раком поджелудочной железы, молочной железы и желудка. После получения клеточные и жидкие фракции разделяли, аликвоты жидкостей замораживали при -20°C для хранения и дальнейшего анализа. Клеточную фракцию обрабатывали буфером для лизиса эритроцитов (Roche, #11814389001) для удаления эритроцитов, следуя инструкциям производителя. Типы клеток, присутствующие в каждом образце, определяли путем окрашивания на EpCAM, EGFR, FAP, CD45, CD11b, CD56, CD3, CD4, CD8, PD1 и CTLA4, и анализировали с применением проточной цитометрии. Затем клетки использовали в свежем виде для экспериментов с активацией Т-клеток и лизисом целевых клеток *ex vivo*. В некоторых случаях клетки пересеивали в DMEM с добавлением 10% ФБС для использования в экспериментах позднее.

Поддержание линий клеток.

Все линии клеток поддерживали на среде DMEM (Sigma-Aldrich, Великобритания) или RPMI (Sigma-Aldrich, Великобритания) согласно таблице 3, с добавлением 10% (по объему) фетальной бычьей сыворотки (ФБС, Gibco™) и 1% (по объему) пенициллина/стрептомицина (10 мг/мл, Sigma-Aldrich, Великобритания), в инкубаторе с увлажнением (MCO-17AIC, Sanyo) при 37°C и 5% CO₂, если не указано иное. Клетки разделяли каждые 2-3 дня до достижения конfluenceности путем ферментативного разъединения трипсином/ЭДТК (0,05% трипсина, 0,02% ЭДТК, Sigma-Aldrich, Великобритания). В ходе указанного процесса культуральную среду аспирировали и клетки промывали 15 мл ФСБ, а затем клетки обрабатывали 2 мл трипсина/ЭДТК в течение 2-10 минут при 37°C. Трипсин нейтрализовали 10 мл DMEM, содержащей 10% ФБС, и часть клеток переносили в новые флаконы, содержащие свежую среду. Для рутинного культивирования клеток в среду добавляли 10% ФБС, для инфицирования и трансфекции вирусными плазмидами добавляли 2% ФБС, а для трансфекции плазмидами с рекомбинантным биспецифическим активатором Т-клеток не добавляли ФБС.

Таблица 3

Линия клеток	Происхождение клеток	Среда для культивирования	Источник
Происходящие из асцита линии клеток	Первичный асцит человека	DMEM	NHS Blood & Transplant Великобритания
BTC100	Ассоциированные с первичным раком легкого фибробласты (CAF) человека	DMEM	Оксфордский университет
CHO-K1	Яичник китайского хомячка, адгезивные	RPMI	ATCC
Стабильные линии клеток CHO-K1	Яичник китайского хомячка, адгезивные	RPMI	-
DLD1	Аденокарцинома ободочной и прямой кишки человека	RPMI	ATCC
HEK 293A	Эмбриональная почка человека, адгезивные клетки	DMEM	ATCC
HEK 293A стабильный линий клеток	Эмбриональная почка человека, адгезивные клетки	DMEM	-
HEK 293T	Эмбриональная почка человека, адгезивные клетки	DMEM	ATCC

MCF-7	Клетки молочной железы человека, груди, адгезивные	DMEM	ATCC
Нормальные дермальные фибробласты человека дермальные (NHDF)	Нормальные взрослые первичные дермальные фибробласты человека	DMEM	ATCC
SKOV3	Аденокарцинома яичников человека	DMEM	ATCC

Статистика.

При сравнении двух состояний статистические анализы проводили с использованием t-критерия. Во всех других случаях статистические анализы проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA.

Характеризация активации Т-клеток человека рекомбинантным FAP биспецифическим активатором Т-клеток.

Сравнивали способность FAP биспецифического активатора Т-клеток индуцировать активацию Т-клеток в присутствии или в отсутствие нормальных дермальных фибробластов человека (NHDF). CD3⁺ Т-клетки человека (70 000 клеток на лунку в 96-луночных планшетах с U-образным дном) культивировали совместно, отдельно или с клетками NHDF (10:1 Т:NHDF), в среде по отдельности или с 300 нг/мл FAP или контрольного биспецифического активатора Т-клеток. Клетки культивировали совместно в течение 24 часов при 37°C, а затем собирали с применением не содержащего ферментов буфера для разъединения клеток (Thermo, #13151014). Затем анализировали уровни экспрессии CD69 (фиг. 14А) и CD25 (фиг. 14В) на CD45⁺ Т-клетках с применением окрашивания антителами и проточной цитометрии, и представляли в виде значений среднего геометрического интенсивности флуоресценции (gMFI). Иммуобилизованное на планшетах антитело против CD3 (7,5 мкг/мл) использовали в качестве положительного контроля для активации Т-клеток. FAP биспецифический активатор Т-клеток селективно индуцировал экспрессию маркеров активации CD69 и CD25 на Т-клетках, что указывает на его способность активировать Т-клетки.

Во втором аналогичном эксперименте Т-клетки оценивали с применением внутриклеточного окрашивания на цитокины через 6 часов после совместного культивирования с клетками NHDF (200 000 CD3⁺ клеток плюс 40 000 NHDF в лунках 96-луночного планшета) и 300 нг/мл FAP или контрольного биспецифического активатора Т-клеток. Проводили внутриклеточное окрашивание CD45⁺ Т-клеток для определения экспрессии ИФН- γ брефелдином А, добавленным в культуральную среду за 5 часов до сбора. В качестве положительного контроля Т-клетки стимулировали растворимым PMA (10 нг/мл) и иономицином (1 мкг/мл). Результаты, представленные на фиг. 14С, показывают, что FAP биспецифический активатор Т-клеток в присутствии NHDF обеспечивал значимо большее число экспрессирующих ИФН- γ Т-клеток по сравнению с контрольным биспецифическим активатором Т-клеток.

Пример 4.

Для дополнительной оценки функциональности ИФН- α , полученного из трансгена в NG-641, клетки Jurkat-DualTM обрабатывали супернатантами от опухолевых клеток A549, либо неинфицированных, либо инфицированных 10 частицами на клетку (ч/кл) энаденотуцирева (EnAd) или NG-641 в течение 3 дней. Чтобы продемонстрировать, что секреция SEAP была ИФН- α -специфической, ИФН- α блокировали путем инкубирования ИФН- α -специфических антител с супернатантами A549 в течение 30 минут перед обработкой репортерной линии клеток Jurkat-Dual - изотипическое контрольное антитело включали в качестве отрицательного контроля. Данные показывают (фиг. 8А), что активность супернатанта от обработанных NG-641 опухолевых клеток в анализе с репортерами Jurkat Dual ингибирует антитело против ИФН- α , но не изотипическое контрольное антитело, и, соответственно, она опосредована ИФН- α . Другую систему репортерного анализа использовали для оценки функциональности трансгенов CXCL9 и CXCL10 хемокинов в NG-641. В указанном анализе использовали линию репортерных клеток PathHunter β -Arrestin, экспрессирующую CXCR3, рецептор для обоих хемокинов (Eurofins). Активация GPCR после связывания CXCL9/10 с CXCR3, экспрессируемым указанными клетками, приводит к рекрутингу р-аррестина к рецептору, который измеряют с применением анализа усиления сигнала, основанного на технологии комплементации фрагментов фермента (EFC). Репортерные клетки PathHunter β -Arrestin CXCR3 обрабатывали супернатантами от опухолевых клеток A549, неинфицированных или инфицированных 10 частицами на клетку (ч/кл) EnAd или NG-641 в течение 3 дней. Концентрация CXCL9/10 в супернатанте пропорциональна люминесценции в анализе. Чтобы продемонстрировать, что активация GPCR была CXCL9/10-специфической, CXCL9 и CXCL10 блокировали путем инкубирования CXCL9/10-специфических антител с супернатантами A549 в течение 30 минут перед обработкой клеток PathHunter β -Arrestin. Данные, приведенные на фиг. 8В, указывают на повышенную активность репортерных CXCR3 клеток в присутствии супернатантов от обработанных NG-641 опухолевых клеток по сравнению с EnAd или неинфицированными контролями, и на блокирование указанного повышения антителами к CXCL9/10.

В качестве альтернативной меры функциональности хемокинов использовали анализ на основе спо-

способности хемокинов к понижающей регуляции экспрессии на поверхности клеток их специфических рецепторов, оценивая уровни рецептора CXCR3 на активированные антителами против CD3/CD28 Т-клетки человека. Опухолевые клетки A549 либо оставляли неинфицированными либо инфицировали 1 вирусной частицей на клетку (ч/кл) энадентоцирера (EnAd) или NG-641 в течение 7 дней, и собирали супернатанты. Затем активированные Т-клетки обрабатывали супернатантами в течение 30 минут и измеряли уровни CXCR3 с применением проточной цитометрии; данные представляли в виде графика средней интенсивности флуоресценции (MFI). Чтобы продемонстрировать, что понижающая регуляция CXCR3 поверхности клеток была CXCL9/10-специфической, CXCL9 и CXCL10 блокировали путем инокулирования CXCL9/10-специфических антител с супернатантами от опухолевых клеток A549 в течение 30 минут до обработки активированных Т-клеток. Данные, представленные на фиг. 9, указывают на селективную понижающую регуляцию экспрессии CXCR3 как на CD4, так и на CD8 Т-клетках, индуцированных супернатантами от инфицированных NG-641 опухолевых клеток A549, и указанный эффект устраняла предварительная обработка антителами против CXCL9/10.

Пример 5. Функциональная активность экспрессирующих FAP-биспецифического активатора Т-клеток вирусов в культурах опухолевых клеток человека *ex vivo*.

Образцы свежеезвлеченных при запланированных хирургических операциях опухолей человека, предоставленные биобанком после полного одобрения этическим комитетом, сначала измельчали ножницами и скальпелем, после чего получали суспензии отдельных клеток с использованием диссоциатор тканей GentleMACs (Miltenyi Biotec). Указанные составы с неотделенными клетками, как было обнаружено, содержат опухолевые клетки, фибробласты и различные иммунные клетки, в том числе Т-клетки, и их использовали для оценки способности вирусов инфицировать первичные опухолевые клетки, продуцировать кодируемые ими трансгены и активировать инфильтрирующие опухоль Т-клетки, также присутствующие в указанных культурах. Клетки ресуспендировали в культуральной среде, состоящей из питательной среды Хэма F-12, GlutaMAX™ Supplement (Gibco), 1× инсулина-трансферрина-селена-этанолamina (ITS-X) (Gibco), 2,5 мг/мл амфотерицина В (Gibco™), 100 ед/мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина, пирувата натрия и 10% ФБС, и высевали в плотностью ~1×10⁶ клеток/мл либо в 96-луночные планшеты (итоговый объем 0,25 мл), либо в 24-луночные планшеты (итоговый объем 0,5 мл). Их инокулировали EnAd, NG-615, NG-617, NG-640 или NG-641 в количестве 1000 ч/кл, или оставляли необработанными (UIC). В качестве положительного контроля активации Т-клеток некоторые лунки также стимулировали антителами против CD3 и против CD28, каждое в концентрации 2 мкг/мл. Клетки культивировали в лунках в двух повторностях в течение 72 ч, затем собирали супернатанты и измеряли уровни различных продуцированных цитокинов с использованием мультицитокинных наборов с флуоресцентными гранулами (LEGENDplex™) и проточного цитометра. Тестировали три образца немелкоклеточной карциномы легкого (НМРЛ) (T016, T017, T024), один образец почечноклеточного рака (RCC) и один образец метастазов в печень рака ободочной и прямой кишки (CRC). Сообразно с данными для трансгенной экспрессии на фиг. 4-6, ИФН-α селективно продуцировался в культурах, обработанных NG-615 и NG-641 (фиг. 10A). Лиганд Flt3 (FLT3L) было легко детектировать после обработки NG-615, но при обработке другими вирусами были детектированы только очень низкие уровни, при этом указанные уровни были аналогичны уровням, индуцируемым посредством активации Т-клеток антителом против CD3/28, что показывает, что Flt3L в культурах NG-615 представлял собой трансгенный продукт. Результаты для других цитокинов показали, что, как и в исследовании с инокуляцией линии опухолевых клеток, описанном в примере 3 (фиг. 7), инокуляция NG-615 приводит к значительно более низким уровням активации Т-клеток по сравнению с другими кодирующими FAP-биспецифического активатора Т-клеток вирусами NG-617, NG-640 и другим несущим 4 трансгена вирусом NG-641, как показано для ИФН-γ, ФНО-α, ИЛ-17, гранзима В и ИЛ-13 на фиг. 10B.

Активацию эндогенных опухолевых Т-клеток в культуре клеток вырезанной опухоли НМРЛ также измеряли с применением проточной цитометрии, оценивая уровни маркеров активации Т-клеток CD25, CD69 и CD107a, а также экспрессию внутриклеточных цитокинов (ИФН-γ и ФНО-α) и CD4, и CD8 Т-клетками через 3 дня культивирования. Как показано на фиг. 11A-D, EnAd оказывал незначительный эффект как на маркеры активации, так и на экспрессию цитокинов, тогда как обработка любым из NG-617, NG-640 и NG-641 приводила к стимулирующей регуляции всех указанных показателей активации Т-клеток. Аналогичные уровни активации, наблюдаемые для несущих FAP-биспецифического активатора Т-клеток вирусов, согласуется с данными для цитокинов, приведенными выше (фиг. 10B)

Пример 6.

В указанном примере оценивали способность активированных рекомбинантным FAP биспецифическим активатором Т-клеток Т-клеток индуцировать смерть целевых клеток-фибробластов.

FAP биспецифический активатор Т-клеток индуцирует опосредованный Т-клетками лизис FAP-положительных линий клеток и первичных клеток.

NHDF (7000 клеток) культивировали совместно с 70 000 Т-клетками в лунках 96-луночного планшета с U-образным дном в присутствии только среды или 300 нг/мл контрольного биспецифического активатора Т-клеток или FAP биспецифического активатора Т-клеток. Через 24 часа совместного куль-

тивирования собирали супернатанты и определяли цитотоксичность путем ЛДГ-анализа, следуя инструкциями производителя. Результаты на фиг. 15А показывают, что FAP биспецифический активатор Т-клеток значительно повышал лизис клеток NHDF.

В аналогичном эксперименте 7000 первичных фибробластов легких (BTC100) культивировали совместно с 70 000 CD3⁺ Т-клеток в присутствии или в отсутствие 300 нг/мл контрольного биспецифического активатора Т-клеток или FAP биспецифического активатора Т-клеток. Через 24 часа совместного культивирования собирали супернатанты и определяли цитотоксичность путем ЛДГ-анализа. Результаты на фиг. 15В и С показывают, что FAP биспецифический активатор Т-клеток значительно повышал лизис

первичных ассоциированных с раком человека фибробластов (CAF). Экспрессия FAP указанными клетками и другими линиями клеток от пациентов показана на фиг. 16. Зависимость "доза-ответ" для опосредованного FAP биспецифический активатор Т-клеток лизиса клеток оценивали путем совместного культивирования 8000 клеток NHDF с 40 000 Т-клеток для концентраций биспецифического активатора Т-клеток в диапазоне от 2×10^3 до 2×10^2 нг/мл. После совместного культивирования в течение 24 часов при 37°C проводили ЛДГ-анализ на супернатантах для определения цитотоксичности целевых клеток. Строили эмпирические кривые зависимости "доза-ответ" с использованием четырехпараметрической нелинейной модели подгонки, интегрированной в GraphPad Prism, с получением значения EC₅₀ для FAP биспецифического активатора Т-клеток, равного 3,2 нг/мл. Результаты (фиг. 17А) показывают дозозависимую взаимосвязь концентрации FAP биспецифического активатора Т-клеток и цитотоксичности по оценке с применением ЛДГ-анализа (обозначение: AbS₄₉₀).

Пример 7.

Получали стабильные экспрессирующие FAP линии клеток CHO и Ad293 для демонстрации специфичности в отношении антигена FAP белка FAP биспецифического активатора Т-клеток путем сравнения с исходными нетрансфицированными клетками. Получение экспрессирующих FAP стабильно трансфицированных линий клеток Последовательность белка гена FAP получали из базы данных NCBI (SEQ ID 23), обратно-транскрибировали с получением кодирующей последовательности ДНК, которую синтезировали в Oxford Genetics Ltd (Оксфорд, Великобритания). Ген FAP клонировали в вектор pSF-Lenti с применением стандартных методик клонирования, получая вектор pSF-Lenti-FAP. Клетки HEK293Т трансфицировали указанным лентивирусным экспрессионным FAP-вектором наряду с pSF-CMV-HIV-Gag-Pol, pSF-CMV-VSV-G, pSF-CMV-HIV-Rev. В качестве реагента для трансфекции применяли липофектамин 2000, добавляли его к векторной ДНК в соотношении ДНК:липофектамин 1:2 и инкубировали с клетками при 37°C. Супернатант, содержащий лентивирус, собирали через 48 часов и смешивали с полибреном (конечная концентрация 8 мкг/мл). Смесь лентивируса/полибрена добавляли к высеянными клеткам Ad293 или CHO и инкубировали при 37°C. На 4 день супернатант заменяли на среду, содержащую пуромидин (2 мкг/мл для Ad293 и 7,5 мкг/мл для CHO). Затем стабильные варианты подвергали клональной селекции, определяли экспрессию FAP исходными линиями клеток или стабильно трансфицированным вариантом путем окрашивания антителом к FAP или изотипическим контрольным антителом, и анализировали с применением проточной цитометрии (фиг. 18А).

Опосредованный FAP биспецифическим активатором Т-клеток лизис целевых клеток является специфическим для экспрессирующих FAP клеток.

Клетки CHO или CHO-FAP (7000 клеток) культивировали совместно, отдельно или с Т-клетками человека (70 000), в присутствии только среды или 2 мкг/мл контрольного биспецифического активатора Т-клеток или FAP биспецифического активатора Т-клеток в лунках 96-луночного планшета с U-образным дном. Через 24 часа инкубации собирали супернатанты и измеряли цитотоксичность целевых клеток с применением ЛДГ-анализа цитотоксичности согласно описанию в примере 4 (фиг. 18В). Также определяли активацию Т-клеток путем анализа уровней экспрессии CD69 и CD25 с применением проточной цитометрии (фиг. 19). Цитотоксичность наблюдалась только при культивировании CHO-FAP клеток с Т-клетками и FAP биспецифическим активатором Т-клеток. Это показывает, что опосредованная FAP биспецифическим активатором Т-клеток активация Т-клеток и лизис целевых клеток являются высокоспецифическими и ограничены экспрессирующими FAP клетками, и не затрагивают отрицательную по FAP исходную линию клеток.

Пример 8.

В дополнительном эксперименте оценивали способность рекомбинантного белка FAP биспецифического активатора Т-клеток к активации CD4 или CD8 Т-клеток и способность каждой из указанных подгрупп Т-клеток к лизису клеток NHDF. CD3⁺ Т-клетки (35 000) культивировали совместно с 7000 клетками NHDF в присутствии 300 нг/мл контрольного биспецифического активатора Т-клеток или FAP биспецифического активатора Т-клеток в лунках 96-луночного планшета с U-образным дном, и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. Клетки собирали и окрашивали антителами к CD4 или CD8, и CD69 и CD25, и анализировали с применением проточной цитометрии. Результаты (фиг. 20А) продемонстрировали, что FAP биспецифический активатор Т-клеток индуцировал повышение уровней маркеров активации CD69 и CD25 и на CD4⁺, и на CD8⁺ Т-клетках. В аналогичном эксперименте оценивали способность каждой подгруппы Т-клеток (CD4 и CD8) к киллингу целевых клеток. CD4⁺ Т-клетки экстрагиро-

вали из очищенных от CD3 клеток с применением положительного отбора, используя набор для выделения CD4 Т-клеток (Miltenyi Biotec, #130-045-101) в соответствии с протоколом производителя, с CD8-клетками в невыделенной проточной фракции. В лунках 96-луночного планшета с U-образным дном культивировали 7000 NHDF совместно с 35 000 CD4⁺ или CD8⁺ Т-клеток и 300 нг/мл контрольного биспецифического активатора Т-клеток или FAP биспецифического активатора Т-клеток, и инкубировали при 37°C. Через 24 часа собирали супернатанты и измеряли цитотоксичность целевых клеток с применением ЛДГ-анализа цитотоксичности. Результаты (фиг. 20B) показывают, что FAP биспецифический активатор Т-клеток индуцировал киллинг клеток NHDF с CD4⁺, и CD8⁺ Т-клетками.

Пример 9.

Характеризация опосредованной FAP биспецифическим активатором Т-клеток активации аутологичных опухолеассоциированных лимфоцитов из первичного злокачественного асцита.

Для оценки активности белков биспецифического активатора Т-клеток с использованием клеток от пациентов с раком получали для тестирования образцы жидкостей первичного злокачественного асцита, содержащие и CD3⁺ Т-клетки, и FAP⁺ клетки. Неочищенные асцитные клетки (соответственно, без изменений с момента получения) высевали с плотностью 250 000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с U-образным дном либо в 100% асцитной жидкости, либо в среде с добавлением 1% сыворотки человека в присутствии 500 нг/мл контрольного биспецифического активатора Т-клеток или FAP биспецифического активатора Т-клеток. Необработанные лунки служили для отрицательного контроля. После инкубации при 37°C на протяжении 5 дней собирали общую популяцию клеток и определяли число CD3⁺ Т-клеток (фиг. 21A) и уровни экспрессии CD25 на CD3⁺ Т-клетках (фиг. 21B). Общее число клеток на лунку определяли с применением гранул для точного подсчета. Результаты показывают, что FAP биспецифический активатор Т-клеток обеспечивал значимое повышение активации опухолеассоциированных Т-клеток от пациентов с раком.

В качестве продолжения описанного выше эксперимента собирали содержимое лунок-репликаторов и определяли число FAP⁺ клеток с применением проточной цитометрии (фиг. 21C). Общее число клеток на лунку определяли с применением гранул для точного подсчета. Результаты показывают, что FAP биспецифический активатор Т-клеток обеспечивал значимое снижение числа аутологичных экспрессирующих FAP клеток в образце асцита.

Пример 10.

Рекомбинантный экспрессирующий биспецифический активатор Т-клеток EnAd вирусы конструировали, продуцировали и очищали с применением способов, описанных ниже.

Получение экспрессирующего биспецифический активатор Т-клеток энаденотуцирева.

EnAd представляет собой репликативно-компетентный химерный аденовирус группы В, который содержит частые негомологичные нуклеотидные замены из Ad3 в Ad11p в области E2B, почти полную делецию E3 и меньшую делецию E4, картированную на E4orf4 (Kuhn et al, Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer, PLoS One, 2008 Jun 18; 3(6): e2409).

Плазмиду pEnAd2.4 использовали для получения плазмид ppEnAd2.4-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток, pEnAd2.4-SA-FAP биспецифический активатор Т-клеток, pEnAd2.4-CMV-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток, pEnAd2.4-SA-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток (табл. 4) путем прямой инсерции кассеты, кодирующей FAP биспецифический активатор Т-клеток (SEQ ID NO: 1) или контрольный биспецифический активатор Т-клеток (SEQ ID NO: 3). Указанная трансгенная кассета содержала короткую 5'-последовательность акцептора сплайсинга CAGG или экзогенный промотор CMV (SEQ ID NO: 24), EρCAM, последовательность κДНК FAP биспецифического активатора Т-клеток или контрольного биспецифического активатора Т-клеток и 3'-последовательность полиаденилирования (SEQ ID NO: 25). Конструирование плазмиды подтверждают путем секвенирования ДНК. Экзогенный промотор CMV конститутивно активен и, соответственно, приводит к ранней экспрессии трансгенов. Последовательность акцептора сплайсинга управляет экспрессией под контролем вирусного основного позднего промотора и приводит к поздней трансгенной экспрессии после инициации вирусного генома репликация.

Таблица 4

ID плазмиды	[плазида ДНК] нг/мл
pEnAd2.4-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток	1322,8
pEnAd2.4-SA-FAP биспецифический активатор Т-клеток	3918,3
pEnAd2.4-CMV-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток	189,1
pEnAd2.4-SA-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток	236,2
pEnAd2.4-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток -RFP	1599
pEnAd2.4-SA-FAP биспецифический активатор Т-клеток -RFP	1872
pEnAd2.4-CMV-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток -RFP	1294
pEnAd2.4-SA-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток -RFP	2082

Получение и характеристика вируса.

Плазмиды EnAd2.4-CMV-ЕрСAМ биспецифический активатор Т-клеток, pEnAd2.4-SA-ЕрСAМ биспецифический активатор Т-клеток, pEnAd2.4-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток, pEnAd2.4-SA-FAP биспецифический активатор Т-клеток, pEnAd2.4-CMV-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток, pEnAd2.4-SA-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток линейризовали путем рестриционного расщепления ферментом AscI для получения линейного вирусного генома. Расщепленную ДНК очищали экстракцией изопропанолом и осаждали в течение 16 часов при -20°C, в 300 мл >95% этанола молекулярно-биологического качества и 10 мл 3М ацетата натрия. Осажденную ДНК пеллетировали путем центрифугирования на 14000 об/мин в течение 5 минут и промывали в 500 мл 70% этанола, после чего повторно центрифугировали на 14000 об/мин в течение 5 минут. Чистую пеллетированную ДНК высушивали на воздухе и ресуспендировали в 100 мкл воды. 6,25 мкг ДНК смешивали с 15,6 мкл реагента для трансфекции липофектамина в OptiMEM и инкубировали на протяжении 20 минут при КТ. Затем указанную смесь для трансфекции добавляли во флакон Т-25, содержащий клетки Ad293, культивированные до 80% конfluenceности. После инкубации клеток со смесью для трансфекции в течение 4 часов при 37°C в 5% CO₂ 4 мл клеточной среды (DMEM с высоким содержанием глюкозы и глутамином, с добавлением 10% ФБС) добавляли в клетки и флаконы инкубировали при 37°C, 5% CO₂. Мониторинг трансфицированных клеток Ad293 проводили каждые 24 часа и добавляли дополнительную среду каждые 48-72 часа. Продукцию вируса отслеживали по наблюдаемому значимому цитопатическому эффекту (CPE) в монослое клеток. После обнаружения наблюдаемой интенсивной CPE вирус собирали из клеток Ad293, проводя три цикла замораживания-оттаивания. Отбирали одиночные клоны вируса путем серийных разведений собранного лизата и повторного инфицирования клеток Ad293, и собирали содержимое лунок, содержащих одиночные бляшки. После достижения инфекцией полного CPE выполняли серийное инфицирование клеток Ad293 для амплификации стокового вирусного материала. Продукцию жизнеспособного вируса в ходе амплификации подтверждали на основании наблюдаемой значимой CPE в монослое клеток.

Очищение вируса.

После амплификации активного вирусного стокового материала вирусы очищали путем двойного центрифугирования (разделения) в градиенте плотности хлорида цезия с получением вирусного стокового материала NG-603, NG-604, NG-605 и NG-606. Указанный стоковый материал титровали с использованием анализа Micro BCA Assay (Life Technologies), следуя инструкциями производителя (табл. 5).

Таблица 5

ID EnAd	NG ID NO:	SEQ ID Вирусного Генома	в.ч./мл	TCID50/мл
EnAd-CMV-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток	NG-603		$1,42607 \times 10^{12}$	$5,01 \times 10^{10}$
EnAd-SA-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток	NG-604		$3,31073 \times 10^{12}$	$2,00 \times 10^{11}$
EnAd-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток	NG-605	SEQ ID NO: 26	$1,64653 \times 10^{12}$	$1,58 \times 10^{11}$
EnAd-SA-FAP биспецифический активатор Т-клеток	NG-606	SEQ ID NO: 27	$1,28148 \times 10^{12}$	$3,98 \times 10^{10}$
EnAd-CMV-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток -P2A-RFP	NG-607		$5,963 \times 10^{12}$	$1,26 \times 10^9$
EnAd-SA-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток -P2A-RFP	NG-608		$1,51848 \times 10^{12}$	$6,31 \times 10^9$
EnAd-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток -P2A-RFP	NG-609		$1,57517 \times 10^{12}$	$7,94 \times 10^9$
EnAd-SA-FAP биспецифический активатор Т-клеток -P2A-RFP	NG-610		$7,74881 \times 10^{11}$	$5,01 \times 10^{10}$

Пример 11.

Активность вирусов NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605 и NG-606 характеризовали с применением способов, описанных ниже.

Характеризация активности кодирующего биспецифический активатор Т-клеток EnAd по сравнению с EnAd в линиях клеток карциномы.

Способность NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 или EnAd к репликации анализировали путем инфицирования клеток карциномы легкого A549 и оценивали с применением кПЦР. Клетки A549 высевали в лунки 24-луночного планшета с плотностью 2×10^5 клеток/лунку. Планшеты инкубировали на протяжении 18 ч, 37°C, 5% CO₂, после чего клетки инфицировали 100 вирусными частицами на клетку (ч/кл) либо оставляли неинфицированными. Содержимое лунок собирали через 24, 48 или 72 ч после инфицирования и ДНК очищали с применением мининабора для очищения геномной ДНК Pure-Link (Invitrogen) в соответствии с протоколом производителя. Тотальные вирусные геномы количественно определяли с применением кПЦР для каждого экстрагированного образца или стандарта с использованием специфического для гена гексона EnAd набора праймеров/зондов, добавляемого в реакционную смесь, подробно описанную в табл. 6. кПЦР проводили согласно программе из табл. 7.

Таблица 6

Реагент	Объем/лунку (мл)
Смесь 2× qPCRBIO Probe Mix (PCRBiosystems)	10
Прямой праймер EnAd	0,08
Обратный праймер EnAd	0,08
Зонд EnAd	0,8
NFW	4,04
Образец	5
Объем лунки	20

Таблица 7

Число циклов	Температура (°C)	Продолжительность (секунды)
1	95	120
40	95 60–65	5 20–30

Количественное определение числа детектированных вирусных геномов на клетку продемонстрировало, что репликация всех вирусов NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd была сопоставимой в линии клеток A549 (фиг. 22A). Онколитическую активность NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 или EnAd оценивали путем инфицирования A549 (фиг. 22B). Клетки A549 высевали в 96-луночный планшет с плотностью $1,5 \times 10^4$ клеток/лунку. Планшеты инкубировали на протяжении 18 ч, 37°C, 5% CO₂, после чего клетки инфицировали возрастающими количествами вирусных

частиц на клетку (5-кратные серийные разведения, от $4,1 \times 10^{-7}$ до 5000 вирусных частиц на клетку) или оставляли неинфицированными. Цитотоксичность A549 измеряли на 5 день, выполняя анализ пролиферации клеток CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, #G3582). Строили эмпирические кривые зависимости "доза-ответ" с использованием четырехпараметрической нелинейной модели подгонки, интегрированной в GraphPad Prism. Значения IC50, полученные для каждого вируса, продемонстрировали, что онколитическая активность NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd была сопоставимой у всех вирусов.

Подтверждение трансгенной экспрессии функциональных биспецифических активаторов Т-клеток с NG-603, NG-604, NG-605, NG-606.

Для определения того, продуцировали ли вирусы NG-601, NG-602, NG-605, NG-606 функциональные биспецифические активаторы Т-клеток, выполняли анализы активации Т-клеток с использованием линий клеток CHO, CHO-ЕрСАМ и CHO-FAP в качестве целевых клеток. 10 000 целевых клеток культивировали совместно с 50 000 CD3⁺ Т-клеток в лунках 96-луночного планшета с U-образным дном с вирусными супернатантами Ad293, 100-кратно разведенными в культуральной среде, и инкубировали на протяжении 24 ч, 37°C, 5% CO₂. Собирали Т-клетки, окрашивали антителами, специфическими в отношении CD25 и CD69, и анализировали с применением проточной цитометрии. Результаты (Фиг. 23А и 23В) указывают на то, что вирусы NG-601 и NG-602 экспрессировали функциональный трансген биспецифического активатора Т-клеток, который активировал Т-клетки при культивировании совместно с клетками CHO-ЕрСАМ, а NG-605 и NG-606 экспрессировали функциональный трансген биспецифического активатора Т-клеток, который активировал Т-клетки при культивировании совместно с клетками CHO-FAP, однако не при культивировании совместно с клетками CHO.

Количественное определение экспрессии биспецифического активатора Т-клеток в линии клеток карциномы толстой кишки.

Оценивали величину экспрессии биспецифического активатора Т-клеток при инфекции NG-601, NG-602, NG-605, NG-606 клетками линии карциномы толстой кишки человека DLD. Клетки DLD высевали в 6-луночные культуральные планшеты с плотностью, составляющей $1,2 \times 10^6$ клеток на лунку. Через 18 ч после высевания клетки DLD инфицировали EnAd, NG-601, NG-602, NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 в количестве 100 ч/кл. Клетки культивировали в течение 72 ч, после чего собирали супернатанты из лунок и центрифугировали в течение 5 минут, 1200 об/мин для удаления клеточного дебриса. Затем осветленные супернатанты использовали для анализа киллинга со сравнением цитотоксичности с данными стандартной кривой, полученной для рекомбинантный биспецифический активатор Т-клеток в известной концентрации, что позволяет определить количество биспецифического активатора Т-клеток в вирусных супернатантах. Для определения количества FAP биспецифического активатора Т-клеток, продуцированного с NG-605 и NG-606, проводили анализ цитотоксичности, в котором 8000 NHDF культивировали совместно с 40 000 CD3⁺ Т-клеток и вирусными супернатантами от DLD, разведенными 1×10^3 , 1×10^4 и 1×10^5 . Строили стандартную кривую, инкубируя NHDF и CD3⁺ Т-клетки с FAP биспецифическим активатором Т-клеток или контрольным биспецифическим активатором Т-клеток в 10-кратных серийных разведениях в концентрации от 3333 до $3,33 \times 10^{-4}$ нг/мл. Супернатанты собирали через 24 часа после обработки и измеряли цитотоксичность с применением ЛДГ-анализа. Количество экспрессированного биспецифического активатора Т-клеток определяли путем сравнения цитотоксичности вирусных супернатантов с данными стандартной кривой для рекомбинантного биспецифического активатора Т-клеток. Результаты (фиг. 24) указывают на то, что вирусы NG-605 и NG-606 продуцировали 9,8 и 49,2 мкг FAP биспецифический активатор Т-клеток на 1 млн клеток DLD, соответственно.

Пример 12.

Наряду с кодирующим FAP биспецифический активатор Т-клеток или контрольным биспецифическим активатором Т-клеток NG-607, NG-608, NG-609, NG-610 вирусы также несут трансген красного флуоресцентного белка (RFP) для визуализации инфицированных клеток с применением методов флуоресцентной микроскопии (SEQ ID NO: 20 и 21, табл. 4). Функциональную активность указанных вирусов характеризовали с применением описанных ниже способов.

Подтверждение трансгенной экспрессии с NG-607, NG-608, NG-609, NG-610.

Способность вирусов NG-607, NG-608, NG-609 и NG-610 продуцировать трансген биспецифического активатора Т-клеток оценивали путем инфицирования клеток Ad293. Клетки Ad293 высевали в 6-луночный планшет с плотностью 1×10^6 клеток/лунку. Планшеты инкубировали на протяжении 24 часов при 37°C, с 5% CO₂, после чего клетки инфицировали вирусами в количестве 100 ч/кл или оставляли неинфицированными. Через 48 часов после инфицирования бляшки облучали флуоресцентной ртутной лампой и фотографировали (фиг. 18). Результаты предполагают, что вирусы NG-607, NG-608, NG-609 и NG-610 экспрессируют трансген RFP.

Пример 13.

В следующей серии экспериментов оценивали способность EnAd и несущих FAP биспецифический активатор Т-клеток или контрольный биспецифический активатор Т-клеток вирусов NG-603, NG-604, NG-605, NG-606, NG-607, NG-608, NG-609, NG-610 к киллингу целевых клеток, в том числе опухолевых

клеток и фибробластов. В первом исследовании способность EnAd к киллингу клеток DLD оценивали с применением технологии xCELLigence. Клетки DLD высевали в 48-луночный планшет E-plate с плотностью $1,2 \times 10^4$ клеток/лунку и инкубировали на протяжении 18 ч при 37°C в 5% CO_2 , после чего клетки инфицировали 100 EnAd ч/кл или оставляли неинфицированными. XCELLigence использовали для измерения цитотоксичности целевых клеток каждые 15 минут на протяжении 8-дневного периода инкубации.

В аналогичном эксперименте оценивали способность NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd к киллингу клеток NHDF в совместной культуре с опухолевыми клетками SKOV и CD3^+ Т-клетками с применением xCELLigence. Клетки NHDF и клетки SKOV высевали в 48-луночный планшет E-plate с плотностью 4×10^3 и 1×10^3 клеток/лунку, соответственно. Планшеты инкубировали на протяжении 18 ч, 37°C , 5% CO_2 , после чего клетки инфицировали 100 ч/кл EnAd, NG-603, NG-604, NG-605 или NG-606 или оставляли неинфицированными. Через 2 часа инкубации по 37 500 CD3^+ Т-клеток добавляли в каждую лунку. xCELLigence использовали для измерения цитотоксичности целевых клеток каждые 15 минут. Результаты (фиг. 26А) демонстрируют, что экспрессирующие FAP биспецифический активатор Т-клеток вирусы NG-605 и NG-606, но не EnAd или контрольные экспрессирующие биспецифический активатор Т-клеток вирусы NG-603 и NG-604, были способны индуцировать лизис клеток NHDF, при этом кинетика зависит от промотора, используемого для экспрессии биспецифического активатора Т-клеток (более быстрая при использовании промотора CMV).

В аналогичном эксперименте оценивали способность NG-603, NG-604, NG-605, NG-606 и EnAd к киллингу клеток NHDF, в совместной культуре с клетками SKOV и CD3^+ Т-клетками, с применением ЛДГ-анализа цитотоксичности. Клетки NHDF и клетки SKOV высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном с плотностью 8×10^3 и 2×10^3 клеток/лунку, соответственно, и либо инфицировали 100 ч/кл EnAd, NG-603, NG-604, NG-605 или NG-606, либо оставляли неинфицированными. Через 2 часа инкубации по 75 000 CD3^+ Т-клеток добавляли в каждую лунку и инкубировали планшеты при 37°C с 5% CO_2 . Супернатанты собирали через 0, 24, 48 и 96 часов после обработки и измеряли цитотоксичность с применением ЛДГ-анализа цитотоксичности. Результаты (фиг. 26В) демонстрируют, что экспрессирующие FAP биспецифический активатор Т-клеток вирусы NG-605 и NG-606, но не EnAd или контрольные экспрессирующие биспецифический активатор Т-клеток вирусы NG-603 и NG-604, были способны индуцировать лизис клеток NHDF, при этом кинетика зависит от промотора, используемого для экспрессии биспецифического активатора Т-клеток.

В качестве продолжения описанного выше эксперимента с ЛДГ клетки также собирали через 0, 24, 48 и 96 часов после обработки, окрашивали антителами к CD45, CD69 и CD25 и анализировали с применением проточной цитометрии. Результаты (фиг. 27) демонстрируют, что экспрессирующие FAP биспецифический активатор Т-клеток вирусы NG-605 и NG-606, но не EnAd или контрольные экспрессирующие биспецифический активатор Т-клеток вирусы NG-603 и NG-604, были способны индуцировать активацию Т-клеток, при этом кинетика зависит от промотора, используемого для экспрессии биспецифического активатора Т-клеток.

В аналогичном эксперименте оценивали зависимость от FAP способности индуцировать опосредованную FAP биспецифическим активатором Т-клеток активацию Т-клеток. В 96-луночном планшете с U-образным дном клетки SKOV высевали с плотностью 2×10^3 клеток/лунку по отдельности или в комбинации с клетки NHDF с плотностью 8×10^3 клеток/лунку. Вирусные частицы добавляли в каждую лунку в количестве 100 ч/кл, и инкубировали планшеты при 37°C в 5% CO_2 . Через два часа добавляли 75 000 CD3^+ Т-клетки и дополнительно инкубировали планшеты. Через 96 часов после инфицирования клетки собирали и окрашивали на CD45 и CD25, и анализировали с применением проточной цитометрии (Фиг. 28А). Результаты демонстрируют, что экспрессирующие FAP биспецифический активатор Т-клеток вирусы NG-605 и NG-606 индуцировали активацию Т-клеток только в присутствии положительных по FAP клеток NHDF. В аналогичном эксперименте дополнительно исследовали специфичность управляемой промотором (CMV или вируса MLP/SA) экспрессии биспецифического активатора Т-клеток в NG-605 и NG-606. Клетки NHDF высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном с плотностью 4×10^3 клеток/лунку. В каждую лунку добавляли по 100 вирусных частиц, и планшеты инкубировали при 37°C с 5% CO_2 . Через два часа добавляли по 40 000 CD3 клеток и дополнительно инкубировали планшеты. Через 72 часа после инфицирования супернатанты собирали и измеряли цитотоксичность с применением ЛДГ-анализа цитотоксичности. Результаты (фиг. 28В) демонстрируют, что управляемый промотором CMV вирус NG-605, но не управляемый промотором SA NG-606, был способен опосредовать киллинг клеток NHDF при инфекции клеток NHDF по отдельности. Результаты показывают, что и NG-605, и NG-606 были способны индуцировать активацию Т-клеток и лизис целевых клеток, хотя профиль кинетики незначительно различался в зависимости от используемого промотора.

Проводили замедленную покадровую съемку для наблюдения вирусного или опосредованного Т-клетками лизиса целевых клеток рекомбинантным FAP биспецифическим активатором Т-клеток, EnAd, NG-603 или NG-605. Клетки NHDF окрашивали красителем CellTracker Orange CMTR (Life Tech, #C2927), а CD3^+ Т-клетки окрашивали набором CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (Life Tech, #C34557), следуя протоколам производителей. Окрашенные NHDF высевали в 24-луночный планшет с плотностью

$7,5 \times 10^3$ клеток/лунку в совместной культуре с $1,35 \times 10^4$ DLD или опухолевых клеток SKOV. Планшеты инкубировали на протяжении 18 ч, 37°C , 5% CO_2 . Затем клетки обрабатывали 300 нг/мл FAP биспецифический активатор Т-клеток или инфицировали 100 ч/кл EnAd, NG-603 и NG-605; или оставляли необработанными. Через два часа инкубации по 100 000 окрашенных CD3^+ Т-клеток добавляли в соответствующие лунки вместе с 1,5 мкМ реагентом CellEvent Caspase 3-7 (Life Tech, #C10423). Видеоролики получали с помощью инвертированного микроскопа Nikon TE 2000-E Eclipse с захватом изображений каждые 15 минут в течение 96 часов. Кадры из видеороликов приведены на фиг. 29. Результаты показывают, что рекомбинантный FAP биспецифический активатор Т-клеток и NG-605, но не EnAd или NG-603, были способны индуцировать быстрый лизис клеток NHDF.

В аналогичном эксперименте клетки NHDF окрашивали красителем CellTracker Green CMFDA (Life Tech, #C2925), а CD3^+ Т-клетки окрашивали набором CellTrace Violet Cell Proliferation Kit (Life Tech, #C34557), следуя протоколам производителей. Окрашенные NHDF высевали в 24-луночный планшет с плотностью $7,5 \times 10^3$ клеток/лунку в совместной культуре с $1,35 \times 10^4$ опухолевых клеток DLD или SKOV. Планшеты инкубировали на протяжении 18 ч при 37°C с 5% CO_2 . Затем клетки инфицировали 100 ч/кл NG-607, NG-608, NG-609 или NG-610, или оставляли неинфицированными. Через два часа инкубации 100 000 окрашенных CD3^+ Т-клеток добавляли в соответствующие лунки. Видеоролики получали с помощью инвертированного микроскопа Nikon TE 2000-E Eclipse с захватом изображений каждые 15 минут в течение 96 часов. Кадры из видеороликов приведены на фиг. 30. Результаты показывают, что все вирусы обеспечивают инфекцию в опухолевых клетках (RFP, красная флуоресценция, положительные), однако только NG-609 и NG-610 были способны индуцировать быстрый лизис клеток NHDF при совместном культивировании.

Пример 14.

В указанном примере оценивали активацию аутологичных опухолеассоциированных лимфоцитов из FAP^+ первичного злокачественного асцита от пациентов с раком вирусами EnAd, NG-603, NG-604, NG-605 и NG-606. Образцы от пациентов считали подходящими для дальнейшего анализа, если они содержали CD3^+ Т-клетки и FAP^+ клетки. В первом эксперименте неочищенные (соответственно, без изменений с момента получения) асцитные клетки от пациента высевали с плотностью 250 000 клеток на лунку 96-луночного планшета с U-образным дном в 100% асцитной жидкости. Клетки инфицировали вирусами в количестве 100 ч/кл, необработанные лунки служили в качестве отрицательного контроля. EnAd-CMV-GFP и EnAd-SA-GFP также включали в эксперимент в качестве репортерных для определения инфекции и экспрессии вирусных генов на поздних стадиях, соответственно, с микрофотографиями. После инкубации при 37°C в течение 5 дней собирали общую популяцию клеток и определяли уровень экспрессии CD25 на CD3^+ Т-клетках (фиг. 32A). Общее число клеток на лунку определяли с применением гранул для точного подсчета. Результаты демонстрируют, что вирусы FAP биспецифический активатор Т-клеток NG-605 и NG-606 обеспечивали значимое повышение активации Т-клеток из опухолеассоциированных лимфоцитов. В качестве продолжения описанного выше эксперимента собирали содержимое лунок-репликатов и определяли число эндогенных FAP^+ клеток с применением проточной цитометрии. Общее число клеток на лунку определяли с применением гранул для точного подсчета. Результаты (фиг. 40B) показывают, что NG-605 и NG-606 обеспечивали значимое снижение числа аутологичных экспрессирующих FAP клеток в образцах асцита, что предполагает, что некоторые FAP^+ клетки подверглись киллингу активированными Т-клетками.

Во втором эксперименте неочищенные (соответственно, без изменений с момента получения) асцитные клетки от пациента с раком высевали с плотностью 250 000 клеток на лунку 96-луночного планшета с U-образным дном либо в 100% асцитной жидкости, либо в среде с добавлением 1% сыворотки человека. Клетки инфицировали вирусами в количестве 100 ч/кл, необработанные лунки служили в качестве отрицательного контроля. Также включали EnAd-CMV-GFP и EnAd-SA-GFP в качестве репортерных для определения инфекции и экспрессии вирусных генов на поздних стадиях, соответственно, с микрофотографиями. После инкубации при 37°C в течение 5 дней собирали общую популяцию клеток и определяли число CD3^+ Т-клеток (фиг. 33) и уровень экспрессии CD25 на CD3^+ Т-клетках (фиг. 34). Общее число клеток на лунку определяли с применением гранул для точного подсчета. Результаты демонстрируют, что для указанного пациента рекомбинантный FAP биспецифический активатор Т-клеток и NG-605, но не NG-606, обеспечивали значимое повышение активации Т-клеток из опухолеассоциированных лимфоцитов в среде. Ни один из вирусов не приводил к активации в асцитной жидкости. В качестве продолжения описанного выше эксперимента собирали содержимое лунок-репликатов и определяли число FAP^+ клеток с применением проточной цитометрии (Фиг. 35). Общее число клеток на лунку определяли с применением гранул для точного подсчета. Результаты демонстрируют, что рекомбинантный FAP биспецифический активатор Т-клеток и NG-605, но не NG-606, обеспечивали значимое снижение числа аутологичных экспрессирующих FAP клеток в среде. Ни один из вирусов не приводил к снижению уровня FAP^+ клеток в асцитной жидкости.

Пример 15.

Обсуждение.

Онколитические вирусы представляют собой интересную новую стратегию для комбинирования нескольких терапевтических методов в составе одного нацеленного самоамплифицирующегося агента (Keller & Bell, 2016; Seymour & Fisher, 2016). Поскольку они селективно реплицируются в раковых клетках и распространяются от клетки к клетке, некоторые онколитические вирусы, предположительно, опосредуют клеточную смерть через неапоптотические пути смерти (Ingemarsdotter et al., 2010; Li et al., 2013) в качестве части процесса, позволяющего вирусным частицам выходить из умирающих клеток. EnAd, в частности, убивает клетки за счет провоспалительного процесса, известного как онкоз или ишемическая клеточная смерть (Dyer, 2017). Указанный неапоптотический механизм смерти вызывает высвобождение нескольких провоспалительных клеточных компонентов, таких как АТФ, HMGB1, и воздействие кальретикулина (известны как ассоциированные с повреждениями молекулярные паттерны, DAMP) (Weerasinghe & Buja, 2012), и, предположительно, является основополагающим для способности вируса содействовать эффективному противораковому иммунному ответу. При этом наряду с последствиями прямого лизиса вирусы предполагают возможность кодирования и экспрессии других противораковых биологических средств, устраняя проблемы с доставкой и гарантируя достижение максимальной концентрации биологического средства в микроокружении опухоли. Иммуногенно кодирует ГМ-КСФ, однако потенциальные возможности вооружения вирусов практически безграничны и обеспечивают множество захватывающих возможностей для разработки мультимодальных терапевтических стратегий, с суммируемыми или синергическими противораковыми эффектами (de Gruijl et al., 2015; Hermiston & Kuhn, 2002).

Кодирование биспецифического активатора Т-клеток в онколитических вирусах представляет собой эффективный способ активации инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, которые становятся цитотоксическими и лизируют антиген-положительные целевые клетки, обеспечивая терапевтический метод, совершенно не связанный с эффектами прямого вирусного лизиса. В указанном исследовании авторы показали, что нацеливаемая на биспецифический активатор Т-клеток цитотоксичность является полностью антиген-специфической, может быть опосредована как CD4, так и CD8 Т-клетками (Brischwein et al, 2006), и он может быть включен в онколитический аденовирус и экспрессирован только в клетках, позволяющих репликацию вируса. Кроме того, настоящее исследование впервые показало, что эндогенные Т-клетки в жидких раковых биоптатах могут быть активированы биспецифическим активатором Т-клеток и кодируемыми вирусами биспецифические активаторы Т-клеток, и могут убивать эндогенные опухолевые клетки без какой-либо дополнительной стимуляции или обращения подавления иммунитета. Важно отметить, что это может происходить даже в первичных жидкостях, которые составляют микроокружение перитонеального асцита или плевральных выпотов, в качестве заменителей иммуносупрессивного микроокружения солидных опухолей.

При вооружении онколитических вирусов для экспрессии биспецифического активатора Т-клеток комбинируют два достаточно разных терапевтических механизма, первый из которых обеспечивает литическую смерть опухолевых клеток, перmissive для вирусной инфекции, а второй обеспечивает нацеленную Т-клеточную цитотоксичность через специфический выбранный антиген. Это обеспечивает значительную гибкость при дизайне терапевтического подхода, с возможностью применения биспецифического активатора Т-клеток для обеспечения цитотоксичности для опухолеассоциированных клеток, относительно устойчивых к непосредственному киллингу вирусом. Например, хотя авторы настоящего изобретения приводят в настоящем документе пример технологии, использующей биспецифический активатор Т-клеток, распознающий ассоциированный с карциномой антиген (ErCAM), возможно также использовать способ с биспецифическим активатором Т-клеток для нацеливания цитотоксичности на опухолеассоциированные фибробласты или другие стромальные клетки. Так, даже если мишени, распознаваемые биспецифическим активатором Т-клеток, не ограничены экспрессией в микроокружении опухоли, связывание продуцирования биспецифического активатора Т-клеток с репликацией вируса позволяет пространственно ограничить экспрессию биспецифического активатора Т-клеток опухолью, минимизируя системную токсичность. Это важно, поскольку биспецифические активаторы Т-клеток, введенные внутривенно, демонстрируют кинетику с относительно непродолжительной циркуляцией (Klinger et al, 2012) и часто ассоциированы со значительной целевой токсичностью вне опухолей (Teachey et al, 2013).

Возможность кодирования биспецифического активатора Т-клеток в онколитических вирусах ранее исследовали с применением онколитического вируса осповакцины с нацеленным на эфрин А2 биспецифического активатора Т-клеток. Указанный агент продемонстрировал возможность опосредования активации МКПК и киллинга опухолевых клеток с нацеливанием на антиген нацеленным на эфрин биспецифический активатор Т-клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Интересно, что указанный биспецифический активатор Т-клеток, хотя и способен активировать Т-клетки, не вызывал пролиферацию Т-клеток без добавления экзогенного ИЛ-2, тогда как биспецифический активатор Т-клеток, используемый в настоящем исследовании, вызывал интенсивную пролиферацию и МКПК *in vitro*, и опухолеассоциированных лимфоцитов в клинических биопсийных образцах *ex vivo*.

Авторы настоящего изобретения полагают, что наблюдаемые различия могут отражать различия в дизайне биспецифического активатора Т-клеток, различия используемых онколитических вирусов или,

возможно, зависят от антигенной плотности, обеспечивающей достаточный уровень перекрестного связывания CD3 на Т-клетках. Одной из основных целей терапии онколитическим вирусом является получение противоракового Т-клеточного ответа, распознающего специфические неоантигены у пациента, а также "общераспространенные" опухолеассоциированные антигены. Литические вирусы могут обеспечивать указанный ответ, стимулируя улучшенную презентацию антигенов за счет лизиса опухолевых клеток в контексте DAMP наряду со связанными с вирусами патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (ПАМП). Иммуногистохимическое окрашивание резецированных опухолей ободочной кишки после внутривенной доставки EnAd предполагает, что вирус способствует выраженному входу CD8+ Т-клеток в опухолевую ткань (García-Carbonero, 2017). Однако, хотя указанный подход потенциально является очень эффективным, адаптивные Т-клеточные ответы в конечном итоге зависят от экспрессии антигенов МНС класса I опухолевыми клетками, позволяющей направленный киллинг. Утрата экспрессии МНС представляет собой подробно описанную стратегию иммунной эвазии опухолей (Garrido et al., 2016). Примечательно, что обе цитотоксические стратегии, которые непосредственно задействуют вооруженные биспецифическим активатором Т-клеток онколитические вирусы, действуют в опухолевых клетках независимо от МНС класса I и, соответственно, могут применяться для киллинга раковых клеток даже при утрате экспрессии МНС в опухолевых клетках.

В настоящем исследовании, соответственно, продемонстрировано, что кодирование биспецифического активатора Т-клеток в EnAd представляет собой особенно многообещающую стратегию для достижения нацеленной экспрессии в диссеминированных опухолях, эксплуатирующую известную стабильность в крови и системную биодоступность вируса, которая в настоящее время исследуется в ряде клинических испытаний ранней фазы. Примечательно, что в исследовании с введением вируса внутривенно за несколько дней до резекции первичного рака толстой кишки последующая иммуногистологическая оценка срезов опухоли показала, что вирус достиг областей за опухолями, и обеспечивала выраженные внутриядерные сигналы гексона, указывая на успешную селективную инфекцию и репликацию вируса в опухолевых клетках. Это подтверждает доклинические данные (Di et al., 2014; Illingworth, 2017), указывающие на то, что указанный вирус стабилен в 100% крови человека и должен быть способен к нацеленной на опухоль инфекции диссеминированных и метастатических злокачественных новообразований у пациентов-людей.

Биспецифические активаторы Т-клеток могут быть закодированы в EnAd без какой-либо потери онколитической вирулентности, что отражает значительную пакующую емкость вируса. Присутствие трансгена не влияет на физико-химические свойства вирусных частиц, поэтому модифицированные вирусы должны демонстрировать точно такую же клиническую фармакокинетику, что и исходный агент, и должны быть способны селективно экспрессировать кодируемый биспецифическим активатором Т-клеток в опухолях по всему организму. Это обеспечивает перспективный и потенциально очень эффективный новый подход к системной нацеленной противораковой иммунотерапии, который в настоящее время должен быть приоритизирован для клинической оценки.

Пример 16.

Иммуносупрессия активации Т-клеток человека и цитотоксичности целевых клеток жидкостями злокачественных эксудатов от пациентов.

Злокачественные эксудаты представляют собой потенциально иммунолетантную среду, подавляющую иммунные ответы, что часто наблюдается у пациентов с метастатическим раком на поздних стадиях. Количество ИЛ-10, который считается противовоспалительным цитокином, измеряли в нормальной сыворотке или в жидкостях злокачественных эксудатов от пациентов (А: перитонеальный асцит; Р: плевральный выпот) с применением набора для ИФА ИЛ-10 человека Human IL-10 ELISA MAX (Biolegend, 430604). Уровни ИЛ-10 в эксудатах (88,1-633,4 пг/мл) намного превышали измеренные в нормальной сыворотке (7,2-10 пг/мл).

Исследовали способность гранул с антителами KCD3/CD28 (Gibco, 11161D) активировать Т-клетки МКПК в присутствии нормальной сыворотки, асцитной или плевральной жидкости. Т-клетки МКПК человека (100 000 клеток на лунку 96-луночного планшета) обрабатывали гранулами с CD3/CD28 (следуя инструкциям производителя) в нормальной сыворотке или жидкости эксудата от пациентов (50%). В качестве отрицательного контроля оставляли необработанными Т-клетки в каждой жидкости. Через 24 часа культивирования собирали клетки, после чего анализировали уровни экспрессии CD69 и CD25 на CD3+ Т-клетках с применением окрашивания антителами и проточной цитометрии, представляя результат в виде процента двойных положительных клеток (CD69+CD25+ клетки). В нормальной сыворотке гранулы с антителами против CD3/CD28 давали приблизительно 60% двойных положительных Т-клеток по CD25 и CD69, при этом присутствие асцитной жидкости ослабляло активацию Т-клеток в 6/12 жидкостей. В аналогичном эксперименте 100 000 Т-клеток обрабатывали CD3/CD28 гранулами в присутствии нормальной сыворотки, асцитной или плевральной жидкости (50%). Антитела против CD107a или изотипическое контрольное антитело добавляли непосредственно в культуральную среду. Через 1 час добавляли монезин (BD Golgistor, BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Еще через 5 часов клетки собирали и анализировали с применением проточной цитометрии для определения дегрануляции. В нормальной сыворотке гранулы с антителами против CD3/CD28 обеспечивали деграну-

ляцию приблизительно 22,5% Т-клеток, при этом присутствие асцитной жидкости ослабляло активацию Т-клеток в 10/12 жидкостей. Уровень дегрануляции значимо коррелировал (коэффициент Пирсона, $r = -0,7645$; $p = 0,0038$) с количеством ИЛ-10 в каждой жидкости.

В аналогичном эксперименте 75 000 Т-клеток культивировали совместно с 15 000 SKOV3 и ЕрСАМ в присутствии нормальной сыворотки, асцитной или плевральной жидкости (50%). В качестве отрицательного контроля в каждой жидкости Т-клетки обрабатывали контрольным биспецифическим активатором Т-клеток. Через 24 часа культивирования собирали клетки, после чего анализировали уровни экспрессии CD69 и CD25 на CD3+ Т-клетках с применением окрашивания антителами и проточной цитометрии, представляя результат в виде процента двойных положительных клеток (CD69+CD25+ клетки). В нормальной сыворотке ЕрСАМ биспецифический активатор Т-клеток давал приблизительно 67,6% двойных положительных по CD25 и CD69 Т-клеток, при этом присутствие асцитной жидкости ослабляло активацию Т-клеток в 0/12 жидкостей и незначительно индуцировало активацию в 4/10 жидкостей.

В аналогичном эксперименте 75 000 Т-клеток культивировали совместно с 15 000 SKOV3 и ЕрСАМ в присутствии нормальной сыворотки, асцитной или плевральной жидкости (50%). В качестве отрицательного контроля в каждой жидкости Т-клетки обрабатывали контрольным биспецифическим активатором Т-клеток. Антитело против CD107a или изотипическое контрольное антитело добавляли непосредственно в культуральную среду. Через 1 час добавляли монензин (BD Golgistor, BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Еще через 5 часов клетки собирали и анализировали с применением проточной цитометрии для определения дегрануляции. В нормальной сыворотке ЕрСАМ биспецифические активаторы Т-клеток обеспечивали дегрануляцию приблизительно 41,4% Т-клеток, при этом присутствие асцитной жидкости ослабляло активацию Т-клеток в 2/12 жидкостей.

Способность EnAd-SA-ЕрСАМ биспецифический активатор Т-клеток и EnAd-SA-Контрольный биспецифический активатор Т-клеток индуцировать опосредованный Т-клетками лизис целевых клеток в жидкостях злокачественных экссудатов оценивали с применением технологии xCELLigence. Клетки SKOV3 высевали в 48-луночные планшеты E-plate с плотностью $1e4$ клеток/лунку, соответственно. Планшеты инкубировали на протяжении 18 ч при 37°C с 5% CO₂, после чего клетки либо инфицировали 100 вирусными частицами на клетку (ч/кл), либо оставляли неинфицированными. Через два часа добавляли Т-клетки МКПК (5:1) в нормальной сыворотке или жидкости экссудата от пациента (конечный объем 50%). Для измерения цитотоксичности целевых клеток каждые 10 минут использовали xCELLigence. Результаты показывают, что опосредованный биспецифическим активатором Т-клеток лизис SKOV3 Т-клетками не зависит от использованной жидкости.

Неочищенные асцитные клетки (соответственно, без изменений с момента получения) высевают с плотностью 100 000 клеток на лунку плоскодонного 96-луночного планшета в среду RPMI или асцитную жидкость. Клетки обрабатывали ЕрСАМ или контрольным биспецифическим активатором Т-клеток, а необработанные лунки служили в качестве отрицательного контроля. После инкубации при 37°C в течение 24 часов клетки собирали и определяли уровень экспрессии CD25 и CD69 на CD3 клетках. Результаты демонстрируют, что ЕрСАМ биспецифический активатор Т-клеток обеспечивал значимое повышение активации Т-клеток (двойные положительные CD69/CD25) из опухолеассоциированных лимфоцитов, которое слегка увеличивала асцитная жидкость. В аналогичном эксперименте неочищенные асцитные клетки (соответственно, без изменений с момента получения) высевают с плотностью 100 000 клеток на лунку плоскодонного 96-луночного планшета в среду RPMI или асцитную жидкость. Клетки обрабатывали ЕрСАМ, контрольным биспецифическим активатором Т-клеток или вирусами с рекомбинантным биспецифическим активатором Т-клеток (100 в.ч./клетку), необработанные лунки служили в качестве отрицательного контроля. После инкубации при 37°C в течение 5 дней собирали общую популяцию клеток, определяли число CD3+ клеток, уровень экспрессии CD25 на CD3 клетках и число положительных по эндогенному ЕрСаМ клеток с применением проточной цитометрии. Общее число клеток на лунку определяли с применением гранул для точного подсчета. Результаты демонстрируют, что ЕрСАМ биспецифический активатор Т-клеток и EnAd, экспрессирующий ЕрСАМ биспецифический активатор Т-клеток, обеспечивали значимое повышение активации Т-клеток (количество CD3, CD25) из опухолеассоциированных лимфоцитов и цитотоксичность ЕрСАМ+ клеток как в среде RPMI, так и в асцитной жидкости. В качестве продолжения описанного выше эксперимента, еще шесть образцов экссудата от пациентов (в общей сложности 7) обрабатывали идентичным образом в асцитной жидкости и определяли число CD3+ клеток, экспрессию CD25 Т-клетками и число ЕрСАМ+ клеток с применением проточной цитометрии. Результаты показывают, что ЕрСАМ биспецифический активатор Т-клеток и EnAd, экспрессирующий ЕрСАМ биспецифический активатор Т-клеток, обеспечивали значимое повышение активации Т-клеток (количество CD3, CD25) из опухолеассоциированных лимфоцитов и цитотоксичность ЕрСАМ+ клеток воспроизводимым образом в ряде биопсийных образцов экссудатов.

Пример 17.

FAP биспецифические активаторы Т-клеток опосредуют активацию Т-клеток и киллинг FAP+ клеток различными донорными Т-клетками.

В других экспериментах способы, описанные в примере 2, применяли для дополнительной оценки активирующих Т-клеток свойств рекомбинантного белка FAP биспецифического активатора Т-клеток,

протестированных в совместных культурах NHDF и Т-клеток, в сравнении с контрольным биспецифическим активатором Т-клеток и поликлональной активацией Т-клеток с применением Dynabeads с антителами против CD3/CD28. Супернатанты, полученные через 24 часа культивирования, тестировали с применением ИФА ELISA на ИФН- γ (фиг. 36А) и анализа на цитокины на чипах с микрогранулами (панель Т-хелперных цитокинов человека LEGENDplex, BioLegend #74001) для панели цитокинов (фиг. 36В). Контрольный биспецифический активатор Т-клеток не индуцировал значимого изменения уровня какого-либо цитокина, но FAP-биспецифический активатор Т-клеток вызывал выраженное увеличение уровня интерферона гамма, ИЛ-2, ФНО- α , ИЛ-17 и ИЛ-10, в соответствии со стимуляцией разных подгрупп Т-клеток, и продуцирование ИФН- γ было значительно выше по сравнению с запускаемым антителами против CD3/CD28.

Стимуляция FAP биспецифического активатора Т-клеток, но не контрольным биспецифическим активатором Т-клеток в присутствии клеток NHDF также индуцировала быструю дегрануляцию (в пределах 6 ч) Т-клеток в обеих подгруппах, CD4⁺ и CD8⁺, на основании оценки экстернализации CD107a/LAMP1 на поверхности Т-клеток (определяемой с применением проточной цитометрии), что выражено коррелирует с их способностью к киллингу целевых клеток (фиг. 36А и В). Указанная индукция дегрануляции FAP биспецифического активатора Т-клеток переходила в мощный лизис фибробластов по оценке с применением анализа высвобождения ЛДГ через 24 часа совместного культивирования с Т-клетками МКПК (EC₅₀ ~2,5 нг/мл), с индуцированной активацией Т-клеток и наблюдаемой цитотоксичностью при использовании Т-клеток 6/6 доноров. Контрольный биспецифический активатор Т-клеток не индуцировал цитотоксичности, что соответствует Т-клеткам, остающимся в неактивированном состоянии.

Пример 18.

Эффект FAP биспецифического активатора Т-клеток и вирусов EnAd-FAP биспецифического активатора Т-клеток на клетки в образцах первичного злокачественного асцита от разных пациентов с раком.

В продолжение исследований, описанных в примере 16, получали свежий первичный злокачественный перитонеальный асцит от дополнительных пациентов с раком для исследования активности вируса EnAd FAP биспецифического активатора Т-клеток. Три образца от пациентов, содержащие как опухолевые EpCAM⁺ клетки, так и FAP⁺ фибробласты, размножали *ex vivo*, и смешанные (адгезивные) популяции клеток культивировали с происходящими из МКПК Т-клетками и немодифицированными или экспрессирующими биспецифический активатор Т-клеток вирусами EnAd. Через 72 часа собирали все клетки и определяли число FAP⁺ (фиг. 38А) и EpCAM⁺ клеток (фиг. 38В) с применением проточной цитометрии. Кроме того, измеряли статус активации Т-клеток (по экспрессии CD25) (фиг. 38С). Инфекция как EnAd-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток, так и EnAd-SA-FAP биспецифический активатор Т-клеток индуцировала активацию Т-клеток и истощение по FAP⁺ клеткам во всех образцах пациентов, без значимого изменения уровней опухолевых EpCAM⁺ клеток. Исходный EnAd или контрольные вирусы не индуцировали поддающейся наблюдению активации Т-клеток, при этом число FAP⁺ клеток осталось аналогичным числу для неинфицированных контролей.

Важно отметить, что указанное истощение по FAP⁺ фибробластам стабильно приводило к выраженному снижению уровней иммуносупрессивного цитокина TFR- β , детектированного в супернатантах (фиг. 38D).

Во второй серии экспериментов оценивали общую (и неочищенную) популяцию клеток из пяти образцов биопсии от пациентов для оценки активности эндогенных опухолеассоциированных Т-клеток в образцах. Клетки высевали в 50% асцитную жидкость и обрабатывали белками, рекомбинантным контрольным биспецифическим активатором Т-клеток или FAP биспецифическим активатором Т-клеток, или 100 в.ч./клетку вирусов EnAd или EnAd- биспецифический активатор Т-клеток. Через 5 дней инкубации измеряли активацию Т-клеток (по экспрессии CD25) и число оставшихся FAP⁺ клеток с применением проточной цитометрии (фиг. 39А и В). Все трех образцах от пациентов рекомбинантный FAP-биспецифический активатор Т-клеток и EnAd-CMV-FAP биспецифический активатор Т-клеток индуцировали выраженную активацию Т-клеток, с активацией до ~80% Т-клеток от пациентов, что вызывало значимое истощение по FAP⁺ фибробластам. Интересно, что EnAd-SA-FAP- биспецифический активатор Т-клеток индуцировал экспрессию CD25 в 2/3 образцов, при не поддающихся наблюдению активации или истощению по FAP⁺ клеткам у пациента 1. Возможно, это обусловлено недостаточным для инфекции вирусом и продуцирования белка биспецифического активатора Т-клеток количеством присутствующих опухолевых клеток (в указанном образце не были детектированы EpCAM⁺ опухолевые клетки с помощью проточной цитометрии), в соответствии с требованием наличия опухолевых клеток для управляемой MLP (SA) трансгенной экспрессии (это также предположительно объясняет отсутствие активации Т-клеток и истощения по FAP⁺ клеткам при использовании вируса EnAd-SA-FAP-биспецифический активатор Т-клеток в образце асцита пациента, показанного на фиг. 42-44). В совокупности, эти данные показывают, что EnAd, экспрессирующий FAP-биспецифический активатор Т-клеток, способен после инфицирования опухолевых клеток воспроизводимо приводить к активации опухолеассоциированных Т-клеток для киллинга эндогенных фибробластов. В другом эксперименте исследовали возможность улуч-

шения активности FAP-биспецифического активатора Т-клеток путем блокирования контрольной точки PD-1, используя образец биопсии от пациента, который содержал 73,6% положительных по PD-1 Т-клеток и 62,9% положительных по PDL1 FAP⁺ клеток (фиг. 40А). Получали совместные культуры, аналогичные описанным выше, в присутствии или в отсутствие очищенного блокирующего антитела мыши IgG2b к PDL1 человека (BioLegend, клон 29E.2A3) в конечной концентрации 2,5 мкг/мл. Через 2 дней культивирования собирали все клетки и измеряли число оставшихся FAP⁺ клеток и активацию Т-клеток. Включение блокирующего антитела против PDL1 приводило к умеренному увеличению индукции CD25 (фиг. 40В) и двукратно более высокому продуцированию ИФН- γ (фиг. 40С), без изменений истощения по FAP⁺ клеткам (фиг. 40D) с почти полным лизисом ко 2 дню во всех вариантах условий. Опухолеассоциированные лимфоциты (TAL), выделенные из асцита от пациента с раком яичников, по имеющимся данным, характеризуются повышенной экспрессией PD-1 и нарушенными эффекторными функциями, включая цитотоксичность и продуцирование ИФН- γ . В согласии с указанным, уровень экспрессии PD-1 был в 2 раза выше на CD3⁺ клетках из шести биоптатов асцита пациентов с раком по сравнению с уровнями в мононуклеарных клетках периферической крови (МКПК) от трех здоровых доноров (фиг. 41А). Для оценки функциональности Т-клеток в указанных образцах биопсии рака клетки NHDF и неочищенные МКПК или асцитные клетки (% CD3⁺ клеток для каждого из образцов приведен на фиг. 41В) культивировали совместно с содержащими контрольный биспецифический активатор Т-клеток или FAP биспецифический активатор Т-клеток супернатантами, собирали супернатанты через 5 дней и тестировали на ИФН- γ с применением ИФА ELISA (фиг. 41С). Контрольный биспецифический активатор Т-клеток не индуцировал ИФН- γ . Три из образцов асцитных клеток продуцировали ИФН- γ на уровне, аналогичном уровню в образцах МКПК, а остальные три характеризовались ослабленным ответом на FAP биспецифический активатор Т-клеток. Далее авторы настоящего изобретения исследовали способность указанных Т-клеток индуцировать опосредованный биспецифическим активатором Т-клеток лизис клеток NHDF. NHDF высевали, добавляли МКПК или асцитные клетки наряду с содержащими биспецифический активатор Т-клеток супернатантами и проводили мониторинг жизнеспособности клеток в культуре в реальном времени с применением системы анализа цитотоксичности xCELLigence. Несмотря на вариабельность продуцирования ИФН- γ все образцы асцита индуцировали полную цитотоксичность клеток NHDF при добавлении FAP биспецифический активатор Т-клеток, при общей скорости опосредованного биспецифическим активатором Т-клеток лизиса NHDF, аналогичной наблюдаемой при лизисе, осуществляемом МКПК (фиг. 41D).

Для исследования способности FAP биспецифического активатора Т-клеток опосредовать активацию Т-клеток в присутствии образцов злокачественного экссудата от пациентов (все в количестве 50%), Т-клетки МКПК активировали контрольным биспецифическим активатором Т-клеток или FAP биспецифическим активатором Т-клеток в присутствии клеток NHDF, или активировали направленными против CD3/CD28 Dynabeads, либо в 50% нормальной сыворотки человека (NS), либо в разных образцах (бесклеточных) злокачественного экссудата. При том, что в нормальной сыворотке 74% Т-клеток было активировано (двойные положительные по CD25 и CD69 клетки) через 24 часа после стимуляции направленными против CD3/CD28 гранулами, 3/5 протестированных асцитных жидкостей значительно ослабляли активацию Т-клеток по сравнению с ответом в NS (Фиг. 42А). Однако при культивировании МКПК с NHDF и стимуляции FAP биспецифического активатора Т-клеток отсутствовало поддающееся наблюдению подавление активации Т-клеток в присутствии любых жидкостей экссудатов (Фиг. 42В), что демонстрирует способность FAP биспецифического активатора Т-клеток преодолевать иммуносупрессивные механизмы для активации Т-клеток.

Пример 19.

Опосредованный EnAd-FAP биспецифический активатор Т-клеток онколизис и стимуляция Т-клеток поляризируют CD11b⁺ TAM в асците пациента в направлении более активированного фенотипа.

Для исследования того, было ли продуцирование цитокинов Th1, в том числе ИФН- γ , ФНО- α и ИЛ-2, за счет опосредованной FAP биспецифический активатор Т-клеток активации Т-клеток с последующей элиминацией FAP⁺ фибробластов (и ассоциированным снижением TFP- β 1) ассоциировано с другими сдвигами в микроокружении опухоли от иммуносупрессивной и проонкогенной активности к противоопухолевой активности, оценивали эффект на опухолеассоциированные макрофаги (TAM) в неразделенном образце асцитных клеток. Общую популяцию неочищенных асцитных клеток пациента высевали в 50% асцитной жидкости и обрабатывали свободным контрольным биспецифическим активатором Т-клеток или FAP биспецифическим активатором Т-клеток, или инфицировали вирусом EnAd-SA-контрольный биспецифический активатор Т-клеток или EnAd-SA-FAP биспецифический активатор Т-клеток (в количестве 100 в.ч./клетку). Параллельно некоторые клетки обрабатывали ИФН- γ , чтобы индуцировать активированный CD11b миелоидный клеточный фенотип. Через 3 дня инкубации сначала измеряли статус активации Т-клеток; CD25⁺ клетки подсчитывали с применением проточной цитометрии, а секрецию ИФН- γ - с применением ИФА ELISA. При обработке FAP биспецифическим активатором Т-клеток и EnAd-SA-FAP биспецифическим активатором Т-клеток в культуральных супернатантах до приблизительно 60% CD3⁺ Т-клеток становились CD25⁺ (фиг. 43А) и наблюдались значительные количест-

ва ИФН- γ (фиг. 43В). При использовании контрольного биспецифического активатора Т-клеток или контрольного вируса не наблюдалось повышения экспрессии CD25 или ИФН- γ относительно фоновых значений. Для оценки поляризации ТАМ измеряли уровни экспрессии CD64 и CD86 (M1, или маркеры "активированных" макрофагов) и CD206 и CD163 (M2, или маркеры ТАМ) на CD11b+ клетках с применением проточной цитометрии (Фиг. 43С). Обработка свободным FAP биспецифическим активатором Т-клеток или EnAd, экспрессирующим FAP биспецифический активатор Т-клеток, индуцирует более активированный фенотип, проявляющийся значимым увеличением экспрессии CD64 и выраженным уменьшением CD206 и CD163 - аналогично наблюдаемому при добавлении ИФН- γ в культуры. Хотя обработка свободным FAP биспецифическим активатором Т-клеток или контрольным вирусом не индуцировала явного изменения CD86 относительно фоновых значений в указанном эксперименте, EnAd, экспрессирующий FAP биспецифический активатор Т-клеток, индуцировал значительное повышение экспрессии CD86, указывающее на то, что инфекция вирусом EnAd и активность FAP биспецифического активатора Т-клеток могут действовать синергически, активируя первичные миелоидные клетки в супрессивном микроокружении опухоли, например, в образцах жидкости злокачественного асцита, протестированных в описанных исследованиях. В указанном исследовании обработка ИФН- γ индуцировала умеренное снижение уровня CD86, указывающее на то, что выраженное повышение уровня CD86, наблюдаемое при использовании EnAd-SA-FAP биспецифического активатора Т-клеток, может быть обусловлено ИФН- γ -независимым механизмом.

Пример 20.

EnAd-FAP биспецифический активатор Т-клеток активирует инфильтрирующие опухоль лимфоциты и индуцирует цитотоксичность в биоптатах солидной опухоли предстательной железы *ex vivo*.

Культуры тканевых срезов представляют собой одну из наиболее реалистичных доклинических моделей разнообразных тканей, органов и опухолей. Для оценки активности экспрессирующих FAP биспецифический активатор Т-клеток вирусов в указанных клинически высокорелевантных условиях исследовали несколько парных пункционных биоптатов злокачественной и доброкачественной ткани предстательной железы из резецированной предстательной железы человека. При первоначальном скрининге показано, что ткань предстательной железы воспроизводимо содержала круглые кольца EpCAM+ опухолевых клеток (фиг. 44А), перемежающие большие области стромы, которые содержали рассеянные CD8 Т-клетки (фиг. 44В). Окрашивание FAP было обнаружено на фибробластах, расположенным рядом с областями опухоли (фиг. 44С). Биоптаты нарезали вибратором до толщины 300 мкм и формировали культуры срезов в присутствии вируса ($1,5 \times 10^9$ в.ч./срез) или оставляли культуры неинфицированными. Через 7 дней срезы фиксировали, заливали в парафин, готовили микропрепараты и оценивали статус активации Т-клеток в иммуногистохимическом исследовании (ИНС) путем окрашивания на экспрессию CD25 (фиг. 44D). Только образцы, обработанные EnAd-CMV-FAP биспецифическим активатором Т-клеток или EnAd-SA-FAP биспецифическим активатором Т-клеток, продемонстрировали активацию инфильтрирующих опухоль Т-клеток, что проявляется выраженным окрашиванием на CD25. Ни необработанные, ни обработанные контрольным вирусом препараты не содержали детектируемых CD25-положительных клеток. Супернатанты от указанных культур срезов, взятые на 4 и 7 дни после инфицирования, тестировали на ИФН- γ и ИЛ-2 с применением ИФА ELISA, при этом было детектировано повышение уровней ИФН- γ в супернатантах от злокачественных, но не доброкачественных культур срезов предстательной железы, инфицированных любым вирусом с FAP биспецифический активатор Т-клеток (фиг. 44Е), и ИЛ-2 в культурах с вирусом EnAd-SA-FAP биспецифический активатор Т-клеток (фиг. 44F). EnAd-SA-FAP биспецифический активатор Т-клеток индуцировал продуцирование больших количеств ИФН- γ , детектируемых раньше, чем при использовании управляемого промотором CMV вируса FAP биспецифический активатор Т-клеток.

Пример 21.

Дополнительные вирусы EnAd, экспрессирующие FAP биспецифический активатор Т-клеток.

Получали пять вирусов (NG-611, NG-612, NG-613, NG-614, NG-617), которые кодируют единственный биспецифический активатор Т-клеток (табл. 8).

Таблица 8

ID вируса	Трансгенная кассета
NG-612 (SEQ ID NO: 78)	SSA ¹ -FAP биспецифический активатор Т-клеток ⁵ -His ³ -PA ⁴
NG-613 (SEQ ID NO: 79)	SA ⁶ -FAP биспецифический активатор Т-клеток ⁵ -His ³ -PA ⁴
NG-614 (SEQ ID NO: 73)	SA ⁶ -FAP биспецифический активатор Т-клеток ⁷ -His ³ -PA ⁴
NG-617 (SEQ ID NO: 81)	SSA ¹ -FAP биспецифический активатор Т-клеток ⁵ -PA ⁴

В каждой трансгенной кассете кДНК, кодирующая биспецифический активатор Т-клеток, была фланкирована на 5'-конце либо короткой последовательностью акцептора сплайсинга (SSA, CAGG), либо более длинной последовательностью акцептора сплайсинга (SA, SEQ ID NO: 45). На 3'-конце биспецифического активатора Т-клеток кодировали позднюю поли(А)-последовательность SV40 (PA, SEQ ID NO: 54), перед которой располагалась гистидиновая метка (HIS), либо метка отсутствовала. В вирусах NG-611, NG-612, NG-613 и NG-617 в направленной против CD3 части молекулы биспецифического активатора Т-клеток использовали одноцепочечный вариант моноклонального антитела мыши ОКТ3 против CD3ε человека.

Получение вируса.

Плазмиду рEnAd2.4 использовали для получения плазмид рNG-611, рNG-612, рNG-613, рNG-614 и рNG-617 путем прямой инсерции синтезированных трансгенных кассет (SEQ ID NO: 70-74, соответственно). Трансгенные кассеты рNG-612, рNG-613 и рNG-617 кодируют нацеленный на FAP биспецифический активатор Т-клеток из SEQ ID NO. 75, а трансгенная кассета рNG-614 кодирует нацеленный на FAP биспецифический активатор Т-клеток из SEQ ID NO. 76. Схематические изображения трансгенных кассет приведены на фиг. 45А-С. Конструирование плазмидной ДНК подтверждали с применением рестрикционного анализа и секвенирования ДНК.

Указанные плазмиды, рNG-611, рNG-612, рNG-613, рNG-614 и рNG-617, линейаризовали путем рестрикционного расщепления ферментом AseI для получения вирусных геномов. Вирусы амплифицировали и очищали в соответствии со способами, описанными ниже. Расщепленную ДНК очищали путем экстракции фенолом-хлороформом и осаждали в течение 16 часов при -20°C в 300 мл >95% этанола молекулярно-биологического качества и 10 мл 3М ацетата натрия. Осажденную ДНК пеллетировали путем центрифугирования на 14000 об/мин в течение 5 минут и промывали 500 мл 70% этанола, после чего повторно центрифугировали на 14000 об/мин в течение 5 минут. Чистую пеллетированную ДНК высушивали на воздухе, ресуспендировали в 500 мл OptiMEM, содержащей 15 мл реагента для трансфекции липофектамина, и инкубировали на протяжении 30 минут при КТ. Затем смесь для трансфекции по каплям добавляли во флакон Т-25, содержащий клетки 293, культивированные до 70% конфлюентности. После инкубации клеток со смесью для трансфекции в течение 2 часов при 37°C, 5% CO₂, 4 мл клеточной среды (DMEM с высоким содержанием глюкозы и глутамином, с добавлением 2% ФБС) добавляли в клетки и флаконы инкубировали при 37°C, 5% CO₂.

Мониторинг трансфицированных клеток 293 проводили каждые 24 часа и добавляли дополнительную среду каждые 48-72 часа. Продукцию вируса отслеживали по наблюдаемому значимому цитопатическому эффекту (CPE) в монослое клеток. После обнаружения наблюдаемой интенсивной CPE собирали вирус из клеток 293, проводя три цикла замораживания-оттаивания. Собранные вирусы использовали для повторного инфицирования клеток 293 для амплификации стокового вирусного материала. Продукцию жизнеспособного вируса в ходе амплификации подтверждали на основании наблюдаемой значимой CPE в монослое клеток. После обнаружения наблюдаемой CPE собирали вирус из клеток 293, проводя три цикла замораживания-оттаивания. Амплифицированный вирусный стоковый материал использовали для дальнейшей амплификации, после чего вирусы очищали путем двойного разделения в хлориде цезия с получением очищенного вирусного стокового материала.

Оценка активности вируса с применением кПЦР.

Клетки A549, которые либо инфицировали в течение 72 ч 1 ч/кл NG-611, NG-612, NG-617, энаденотуциревом, либо оставляли неинфицированными, использовали для количественного определения вирусных ДНК с применением кПЦР. Клеточные супернатанты собирали и осветляли путем центрифугирования в течение 5 минут на 1200 об/мин. ДНК экстрагировали из 45 мкл супернатанта с применением набора Qiagen DNeasy в соответствии с протоколом производителя. Также строили стандартную кривую с применением вирусных частиц энаденотуцирева (2,5e10-2,5e5 в.ч.) и проводили экстракцию с применением набора DNeasy. Каждый экстрагированный образец или стандарт анализировали с применением кПЦР, используя специфический для вирусных генов праймер/зонд, настроенный на ранний ген E3.

Количественное определение числа детектированных вирусных геномов на клетку продемонстрировало, что в линиях клеток A549 наблюдается значимая репликация генома NG-611, NG-612 и NG-617 (фиг. 45D). Этот результат был аналогичен для всех протестированных вирусов, включая исходный вирус энаденотуцирев, что указывает на то, что включение трансгена биспецифического активатора Т-клеток не влияет на репликативную активность вируса. В неинфицированных клетках не были детектированы вирусные геномы (данные не показаны).

Активация и дегрануляция Т-клеток, опосредованные экспрессирующими биспецифический активатор Т-клеток вирусами.

Инфицирование клеток карциномы.

Клетки A549 высевали в 24-луночные планшеты с плотностью, составляющей $2,5 \times 10^5$ клеток/луночку. Планшеты инкубировали на протяжении 4 часов при 37°C в 5% CO_2 , после чего клетки инфицировали 1 ч/кл NG-611, NG-612, энаденотуцирева, или оставляли неинфицированными. Через 24, 48 или 72 часов после инфицирования собирали супернатанты от клеток, осветляли центрифугированием в течение 5 минут на 1200 об/мин и мгновенно замораживали.

Т-клеточный анализ.

Линии экспрессирующих FAP фибробластов легких MRC-5 или экспрессирующие ErCam клетки карциномы яичников SKOV3 высевали в 48-луночные планшеты с плотностью $5,7 \times 10^4$ клеток/луночку и $1,2 \times 10^5$ клеток/луночку, соответственно. Планшеты инкубировали на протяжении 4 часов при 37°C в 5% CO_2 , после чего среду заменяли размороженным супернатантом, собранным из планшетов с A549, в объеме 150 мкл/луночку. Очищенные CD3 Т-клетки, выделенные из МКПК доноров-людей, также добавляли в планшеты в соотношении Т-клеток к MRC-5 или SKOV3, равном 2 к 1. Совместные культуры инкубировали на протяжении 16 часов при 37°C в 5% CO_2 , после чего клеточные супернатанты собирали для проведения ИФА ELISA, а Т-клетки собирали для проведения проточно-цитометрического анализа. Культуральную среду, содержащую неадгезивные клетки, извлекали из лунок с совместной культурой и центрифугировали ($300 \times g$). Супернатант аккуратно извлекали, разводили 1:2 в ФСБ с 5% БСА и сохраняли для ИФА ELISA. Монослои адгезивных клеток однократно промывали ФСБ и затем рассоединяли с применением трипсина. Трипсин инактивировали средой RPMI с 10% ФБС и клетки добавляли к клеточным осадкам, полученным из культуральных супернатантов. Клетки центрифугировали ($300 \times g$), супернатант утилизировали, а клеточный осадок промывали 200 мкл ФСБ. Клетки повторно центрифугировали, после чего ресуспендировали в 50 мкл ФСБ, содержащего Live/Dead Aqua (Life tech), в течение 15 минут при КТ. Клетки однократно промывали в FACs-буфере перед окрашиванием панелями прямо конъюгированных антител: против CD3, конъюгированное с AF700; против CD25, конъюгированное с BV421; против HLA-DR, конъюгированное с ФЭ/CY5; против CD40L, конъюгированное с BV605; против CD69, конъюгированное с ФЭ, и против CD107a, конъюгированное с ФИТЦ. Образец клеток из каждого варианта совместной культуры также окрашивали релевантными изотипическими контрольными антителами. Все окрашивания проводили в FACs-буфере в общем объеме 50 мкл/луночку в течение 15 минут при 4°C . Затем клетки двукратно промывали FACs-буфером (200 мкл) перед ресуспендированием в 200 мкл FACs-буфера и анализом с применением проточной цитометрии (Attune).

Положительная регуляция маркеров активации Т-клеток.

Проводили проточно-цитометрический анализ активации Т-клеток с оценкой экспрессии маркеров активации Т-клеток CD25, CD69, HLA-DR и CD40L или маркера дегрануляции Т-клеток, CD107a, на живых одиночных клетках. Полученные данные показали, что при культивировании совместно с ErCam⁺ клетками SKOV3 число Т-клеток, экспрессирующих CD25, CD69, HLA-DR, CD40L или CD107a поверхности клеток, значимо увеличивалось при добавлении супернатантов с NG-611 к клеткам по сравнению с супернатантами с NG-612, энаденотуциревым или необработанными контрольными супернатантами (фиг. 47). Судя по результатам для всех указанных маркеров, супернатанты от клеток A549 через 24 часа инфекции стимулировали незначительную активацию Т-клеток, тогда как через 48 ч после инфицирования супернатанты стимулировали значимую активацию Т-клеток по результатам для всех маркеров. То же самое наблюдалось и через 72 часа после инфицирования.

При культивировании совместно с FAP⁺ клетками MRC-5 число Т-клеток, экспрессирующих CD25, CD69, HLA-DR, CD40L или CD107a поверхности клеток, значимо увеличивалось при добавлении в клетки супернатантов с NG-612 по сравнению с супернатантами с NG-611, энаденотуциревым или необработанными контрольными супернатантами (фиг. 48). Можно также наблюдать некоторую активацию Т-клеток при использовании вируса NG-611, предположительно обусловленную низкой, но детектируемой экспрессией ErCam (~5%) на клетках линий MRC-5, действующую экспрессируемый вирусом NG-611 ErCam биспецифический активатор Т-клеток (фиг. 49). Судя по результатам для всех указанных маркеров, супернатанты от клеток A549 через 24 часа инфекции стимулировали незначительную активацию Т-клеток, тогда как полученные через 48 ч после инфицирования супернатанты стимулировали значимую активацию Т-клеток по результатам для всех маркеров. Также происходит стимулирующая регуляция маркеров CD25 и CD69 после инкубации с супернатантами, собранными через 72 часа после инфицирования, однако при использовании супернатантов, собранных через 72 часа после инфицирования были

детектированы более низкие уровни маркеров активации, HLA-DR, CD40L и CD107a, чем при использовании супернатантов, собранных через 48 часов после инфицирования. Это может быть обусловлено высокими уровнями биспецифического активатора Т-клеток на указанной более поздней стадии инфекции, которые приводят к быстрой и мощной активации Т-клеток, что означает, что эффекторские функции необходимо измерять в точках времени до истечения 16 часов после инкубации с супернатантами.

Для детекции экспрессии ИФН- γ супернатанты совместных культур разводили в аналитическом буфере с 5% БСА/ФСБ (в диапазоне разведений от 1:10 до 1:1000) и проводили ИФА ELISA с применением набора для ИФА ELISA на ИФН-гамма человека Quantikine (R&D Systems) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию секретированного ИФН- γ определяли путем интерполяции по стандартной кривой. Экспрессия ИФН- γ может быть детектирована в супернатантах совместных культур при применении NG-611 на клетках SKOV3 (Фиг. 50A) или при применении NG-611, NG-612 на клетках MRC-5 (фиг. 50B).

Пример 22.

Иммунная активация и противоопухолевая эффективность экспрессирующих биспецифический активатор Т-клеток вирусов *in vivo*.

Мышам NSG, гуманизированным CD34+ гематопозитическими стволовыми клетками (из Jackson Labs), подкожно имплантировали опухолевые клетки HCT116 в оба бока через 18 недель после прививки. После того, как опухоли достигали размера 80-400 мм³, мышей разделяли на группы по 7 мышей таким образом, чтобы в каждой группе варианта лечения распределение объема опухолей было эквивалентным. Мышам инъецировали внутрь опухолей либо солевой раствор, либо энаденотуцирев, либо NG-611 в количестве 5×10^9 частиц на инъекцию, по 2 инъекции на опухоль. Обрабатывали опухоли на обоих боках. Объем опухолей измеряли 3-4 раза в неделю; было продемонстрировано, что обработка NG-611 приводила к значимому противоопухолевому ответу вплоть до 20 дней после дозирования по сравнению с энаденотуциревом или необработанными контролями (фиг. 51a). Через 20 дней после дозирования одну опухоль от 4 мышей в каждой группе подготавливали для проточной цитометрии, а остальные опухоли замораживали на сухом льду.

Проточная цитометрия.

Образцы опухоли механически измельчали непосредственно после резекции в небольшом объеме среды RPMI. Затем измельченные опухоли проводили через клеточное сито с диаметром пор 70 мкм и центрифугировали при 300 g в течение 10 минут. Клеточные осадки ресуспендировали в 100 мкл ФСБ, содержащем Live/Dead Aqua (Life tech), в течение 15 минут на льду. Клетки однократно промывали в FACs-буфере (5% БСА в ФСБ) перед окрашиванием панелью прямо конъюгированных антител: против CD8 (RPA-T8, AF700); против CD4 (RPA-T4, PE); против CD45 (2D1, APC-Fire 750); против CD3 (OKT3, PerCP-Cy5.5); против CD25 (M-A251, PE-Dazzle 594); против CD69 (FN50, APC); против HLA-DR (L243, BV605); против CD107a (H4A3, ФИТЦ). Пул суспензий опухолевых клеток также окрашивали релевантными изотипическими контрольными антителами. Во всех случаях окрашивание проводили в FACs-буфере в общем объеме 50 мкл/лунку в течение 20 минут при 4°C. Клетки трехкратно промывали FACs-буфером (200 мкл) перед ресуспендированием в 200 мкл FACs-буфера и анализом с применением проточной цитометрии (Attune). FACs-анализ продемонстрировал, что отношение CD8 к CD4 Т-клеткам в опухоли значимо увеличивалось в обработанных NG-611 опухолях по сравнению с обработанными энаденотуциревом или необработанными контролями (фиг. 51b).

Пример 23.

Вирусы EnAd, коэкспрессирующие FAP биспецифический активатор Т-клеток и иммуномодулирующие цитокины и хемокины.

Получали три вируса (NG-615, NG-640 и NG-641), которые кодировали FAP биспецифический активатор Т-клеток и иммуномодулирующие белки (табл. 9).

Таблица 9

ID вируса	Трансгенная кассета
NG-615 (SEQ ID NO: 82)	SSA ¹ -FAP биспецифический активатор Т-клеток ² -E2A ³ -Flt3L ⁴ -P2A ⁵ -MIP1 α ⁶ -T2A ⁷ -IFN α ⁸ -PA ⁹
NG-640 (SEQ ID NO: 83)	SSA ¹ -FAP биспецифический активатор Т-клеток ² -P2A ⁵ -CXCL10 ¹⁰ -T2A ⁷ -CXCL9 ¹¹ -PA ⁶
NG-641 (SEQ ID NO: 84)	SSA ¹ -FAP биспецифический активатор Т-клеток ⁵ -P2A ⁵ -CXCL10 ¹⁰ -T2A ⁷ -CXCL9 ¹¹ -E2A ³ -IFN α ⁸ -PA ⁶
NG-615 (SEQ ID NO: 278)	SA ¹² -FAP биспецифический активатор Т-клеток ² -E2A ³ -Flt3L ⁴ -P2A ⁵ -MIP1 α ⁶ -T2A ⁷ -IFN α ⁸ -PA ⁹

Получение вируса.

Плазмиду pEnAd2.4 использовали для получения плазмид pNG-615, pNG-616, pNG-640 и pNG-641 путем прямой инсерции синтезированных трансгенных кассет (SEQ ID NO: 93-95, соответственно). NG-615 и NG-616 содержат четыре трансгена, кодирующих нацеленные на FAP биспецифический активатор

Т-клеток (SEQ ID NO: 75), Flt3L (SEQ ID NO. 96), MIP1 α (SEQ ID NO. 97) и ИФН- α (SEQ ID NO. 98). NG-640 и NG-641 кодируют нацеленный на FAP биспецифический активатор Т-клеток (SEQ ID NO. 75), CXCL9 (SEQ ID NO. 99) и CXCL10 (SEQ ID NO. 100), NG-641 также содержит четвертый трансген, кодирующий ИФН- α (SEQ ID NO. 98). Конструирование плазмидной ДНК подтверждали с применением рестрикционного анализа и секвенирования ДНК. Указанные плазмиды, pNG-615, pNG-616, pNG-640 и pNG-641, линеаризовали путем рестрикционного расщепления ферментом *AscI* с получением вирусных геномов. Вирусы амплифицировали и очищали в соответствии со способами, подробно описанными в примере 33.

Оценка активности вирусов с применением кПЦР и ИФА ELISA на трансгены.

Инфицирование клеток карциномы.

Клетки A549, которые инфицировали в течение 72 ч 1 ч/кл NG-615, энаденотуцирева или оставляли неинфицированными, использовали для количественного определения вирусной ДНК с применением кПЦР и анализа трансгенной экспрессии с использованием ИФА ELISA. Клеточные супернатанты собирали и осветляли путем центрифугирования в течение 5 минут на 1200 об/мин. 45 мкл супернатанта использовали для анализа ДНК, а остальной супернатант использовали для ИФА ELISA.

кПЦР.

ДНК экстрагировали из образца супернатанта с применением набора Qiagen DNeasy в соответствии с протоколом производителя. Также строили стандартную кривую с использованием вирусных частиц энаденотуцирева (2,5e10-2,5e5 в.ч.) и проводили экстракцию с применением набора DNeasy. Каждый экстрагированный образец или стандарт анализировали с применением кПЦР, используя специфический для вирусных генов праймер/зонд, настроенный на ранний ген E3. Количественное определение числа детектированных вирусных геномов на клетку продемонстрировало значимую репликацию генома NG-615 в линиях клеток A549, на уровне, аналогичном уровню для исходного вируса энаденотуцирева (фиг. 52). Эти данные указывают на то, что включение биспецифических активаторов Т-клеток и трех иммуномодулирующих трансгенов значимо не влияет на вирусную репликативную активность. В неинфицированных клетках не были детектированы вирусные геномы.

ELISA.

ИФА ELISA на ИФН- α проводили с применением набора для анализа ИФН-альфа человека Verikine (PBL Assay Science), ИФА ELISA на MIP1 α проводили с применением набора для ИФА ELISA CCL3 человека Quantikine (R&D Systems); и ИФА ELISA на Flt3L проводили с применением набора для ИФА ELISA для Flt3L человека (Abcam). Все анализы проводили в соответствии протоколом производителя.

Концентрации секретированных ИФН- α , MIP α или Flt3L определяли путем интерполяции по стандартным кривым. Экспрессия ИФН- α , MIP1 α и Flt3L может быть детектирована в клеточном супернатанте NG-615, но не энаденотуцирева или необработанных контрольных клеток (фиг. 53).

Активация и дегрануляция Т-клеток, опосредованные экспрессирующими биспецифический активатор Т-клеток вирусами.

Инфицирование клеток карциномы.

Клетки A549 высевали в 24-луночные планшеты с плотностью, составляющей 2,5e5 клеток/луночку. Планшеты инкубировали на протяжении 4 часов при 37°C с 5% CO₂, после чего клетки инфицировали 1 ч/кл NG-612, NG-615, энаденотуцирева или оставляли неинфицированными. Через 24, 48 или 72 часа после инфицирования собирали клеточные супернатанты, осветляли путем центрифугирования в течение 5 минут на 1200 об/мин и мгновенно замораживали.

Т-клеточный анализ.

Клетки экспрессирующих FAP линий фибробластов легких MRC-5 высевали на 48-луночные планшеты с плотностью 5,7e4 клеток/луночку. Планшеты инкубировали на протяжении 4 часов при 37°C, с 5% CO₂, после чего среду заменяли размороженным супернатантом, собранным из планшетов с A549, в объеме 150 мкл/луночку. Затем в планшеты также добавляли очищенные CD3 Т-клетки, выделенные из МКПК доноров-людей, с получением отношения Т-клеток к MRC-5, составляющего 2:1. Совместные культуры инкубировали на протяжении 16 часов при 37°C с 5% CO₂, после чего клеточные супернатанты собирали для ИФА-анализа ELISA и собирали Т-клетки для проточно-цитометрического анализа в соответствии со способами, подробно описанными в примере 29.

Положительная регуляция маркеров активации Т-клеток.

Проточно-цитометрический анализ активации Т-клеток оценивали по экспрессии маркеров активации Т-клеток CD25, CD69, HLA-DR и CD40L или маркера дегрануляции Т-клеток, CD107a, на живых одиночных CD3⁺ клетках. Эти данные показали, что при культивировании совместно с FAP⁺ клетками MRC-5 число Т-клеток, экспрессирующих CD25, CD69, HLA-DR, CD40L или CD107a, значимо увеличилось при добавлении супернатантов NG-615 или 612 в клетки по сравнению с обработанными энаденотуциревом или необработанными контрольными супернатантами (фиг. 54).

Секреция стимулирующего цитокина ИФН- γ .

Для детекции экспрессии ИФН- γ супернатанты совместных культур разводили в аналитическом

буфере с 5% БСА/ФСБ (в диапазоне от 1:10 до 1:1000) и проводили ИФА ELISA с применением набора Human IFN gamma Quantikine kit (R&D Systems) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию секретированного ИФН- γ определяли путем интерполяции по стандартной кривой. Экспрессия ИФН- γ может быть детектирована только в супернатантах совместных культур при применении супернатантов от A549, инфицированных NG-612 или NG-615 (фиг. 55).

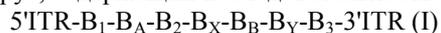
SEQ ID NO: 95 Трансгенная кассета для NG-641.

```
CAGGCCCACCATGGGCTGGAGCTGCATCATCTTGTTCCCTGGTCGCAACTGCTACCGGAGT
CCATTCGGACATCGTCATGACCCAAAGCCCTGACTCGCTCGCTGTGTCACTGGGAGAGCG
GGCGACTATCAACTGCAAATCATCCCAGAGCCTGCTGTATTACGCAATCAGAAAACTAC
CTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCGGGCCAGCCTCCCAAGCTGCTGATCTTCTGGGCCTC
CACCCGCGAAAGCGGCCTGCCGGACCGCTTACGCGGAAGCGGATTTCGGAAGTACTTTA
CTCTGACCATTAGCTCCTTGCAGGCGGAGGACGTGGCCGTCTACTACTGCCAGCAGTATT
TCTCCTATCCGCTCACSTTTGGGCAAGGCACCAAGGTGGAGATTAAGGGAGGGGGCGGC
AGCGGGGGAGGCGGCAGCGGCGGGGGGATCGCAGGTCCAGCTCGTCCAATCCGGA
GCCGAAGTCAAGAAGCCGGGAGCGTCCGGTCAAGGTCAGCTGCAAAACTTCGCGCTACAC
STTCACTGAGTACACGATCCACTGGGTCCGCCAGGCGCCCGGCCAGCGGCTGGAGTGGA
TCGGCGGGATCAACCCAAACAACGGAATCCCAAATTACAATCAGAAATTTAAAGGGCGGG
TGA CTATCACCGTGGATACCTCGGCCTCCACGGCGTACATGGAGCTCTCATCACTCAGAT
CGGAGGACACCGCGGTCTATTACTGCGCCCGCCCGGATCGCTTATGGATACGATGAA
GGACATGCGATGGATTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTCACGGTGTCTCAGGAGGCG
GCGGTTACAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCA
GTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACSTTTACTAGGTACACGATGCACTGGGTA
AAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTAGCCGTGGTTAT
ACTAATTACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTACAGACAAATCCTCCAGCA
CAGCCTACATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAA
```

GATATTATGATGATCATTACTGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTC
 CTCAGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGATCTGGTGGCGGCGGATCTGATATCGTG
 CTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGC
 AGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCC
 AAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCACTTCAGGGGCA
 GTGGGTCTGGGACCTTACTCTCTCACAATCAGCGGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCA
 CTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGG
 AAATAAACCGGGGAAGCGGAGCTACTAAGTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACGTG
 GAGGAGAACCCTGGACCTAATCAAAGTCCATTCTGATTTGCTGCCTTATCTTTCTGACTC
 TAAGTGGCATTCAAGGAGTACCTCTCTAGAACTGTACGCTGTACCTGCATCAGCATTAG
 TAATCAACCTGTTAATCCAAGGTCTTTAGAAAACTTGAATTTCTGCAAGCCAATTTT
 GTCCACGTGTTGAGATCATTGCTACAATGAAAAAGAAGGGTGAGAAGAGATGTCTGAATC
 CAGAATCGAAGGCCATCAAGAATTTACTGAAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGCTAAAAGATC
 TCCTGGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATC
 CTGGACCTAAGAAAAGTGGTGTCTTTTCTCTTGGGCATCATCTTGCTGGTTCTGATTGG
 AGTGCAAGGAACCCAGTAGTGAGAAAGGGTCGCTGTTCTGCATCAGCACCAACCAAG
 GGACTATCCACCTACAATCCTTGAAGACCTTAAACAATTTGCCCAAGCCCTTCTGCGA
 GAAAATTGAAATCATTGCTACACTGAAGAATGGAGTTCAAACATGTCTAAACCCAGATTCA
 GCAGATGTGAAGGAACTGATTAATAAAGTGGGAGAAACAGGTCAGCCAAAAGAAAAAGCAA
 AAGAATGGGAAAAACATCAAAAAAGAAAGTTCTGAAAGTTCGAAAATCTCAACGTTCTC
 GTCAAAAAGAAGACTACAGGAAGCGGACAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAATTTGGCTGG
 AGATGTTGAGAGCAACCCCTGGACCTGCCTTGACCTTTGCTTACTGGTGGCCCTCTGGT
 GCTCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCCTCAAACCCACAGCCTGGG
 TAGCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAATCTCTTTTCTCCTGCTT
 GAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCGAGGAGGATTTGGCAACCAGTTCCAAAAGGC
 TGA AACCATCCCTGCTCCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTACGACAAAG
 GACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCTCCTAGACAAATCTACACTGAACTCTACCAGC
 AGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGTGGGGTGACAGAGACTCCCTG
 ATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATACTTCCAAAGAATCACTCTCTATCTGA
 AAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGTTGTCAGAGCAGAAATCATGAGATCTT
 TTTCTTTGTCAACAACTTGCAAGAAAGTTAAGAAGTAAGGAATAAGCTAGCTTGACTGAC
 TGAGATACAGCGTACCTTACGCTCACAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAA
 CCACA ACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTA
 TTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTT
 CAGGTT CAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGT
 AGTCGTCAGCTAT

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный аденовирус, содержащий последовательность формулы (I):



где: B_1 представляет собой связь или содержит: E1A, E1B или E1A-E1B;

B_A содержит E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

B_2 представляет собой связь или содержит: E3;

B_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую: сайт рестрикции, один или более трансгенов; или и первое, и второе;

B_B содержит L5;

B_Y содержит трансгенную кассету, содержащую четыре трансгена, причем указанные гены кодируют FAP-биспецифический активатор Т-клеток, CXCL10, CXCL9 и ИФН- α ;

B_3 представляет собой связь или содержит: E4.

2. Рекомбинантный аденовирус по п.1, отличающийся тем, что указанный кодируемый FAP-биспецифический активатор Т-клеток содержит направленную против CD3 последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной, например, SEQ ID NO: 5.

3. Рекомбинантный аденовирус по п.1 или 2, отличающийся тем, что указанный FAP-

биспецифический активатор Т-клеток содержит направленную против FAP последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной, например, SEQ ID NO: 9.

4. Рекомбинантный аденовирус по п.1, отличающийся тем, что указанный кодируемый FAP-биспецифический активатор Т-клеток содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 75, 76, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную любой из указанных последовательностей.

5. Рекомбинантный аденовирус по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что указанная трансгенная кассета кодирует CXCL10, представленный в SEQ ID NO: 100, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной, например, SEQ ID NO: 100.

6. Рекомбинантный аденовирус по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что указанная трансгенная кассета кодирует CXCL9, представленный в SEQ ID NO: 99, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной, например, SEQ ID NO: 99.

7. Рекомбинантный аденовирус по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что указанная трансгенная кассета кодирует ИФН- α , представленный в SEQ ID NO: 98, или последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную указанной, например, SEQ ID NO: 98.

8. Рекомбинантный аденовирус по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанные трансгены функционально связаны.

9. Рекомбинантный аденовирус по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что указанные трансгены разделены 3 разными высокоэффективными саморасщепляющимися пептидами.

10. Рекомбинантный аденовирус по п.9, отличающийся тем, что указанные саморасщепляющиеся пептиды независимо выбраны из E2A, F2A, P2A и T2A.

11. Рекомбинантный аденовирус по любому из пп.1-10, отличающийся следующим относительным порядком трансгенов от L5 к E4: FAP-биспецифический активатор Т-клеток, CXCL10, CXCL9 и ИФН- α , например, как показано на фиг. 1С.

12. Рекомбинантный аденовирус по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что указанная трансгенная кассета содержит последовательность полинуклеотидов, представленную в SEQ ID NO: 95, или полинуклеотид, кодирующий такую же последовательность аминокислот, в частности, SEQ ID NO: 95.

13. Рекомбинантный аденовирус по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что указанный аденовирус содержит SEQ ID NO: 84.

14. Рекомбинантный аденовирус по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что указанный аденовирус является репликативно-компетентным.

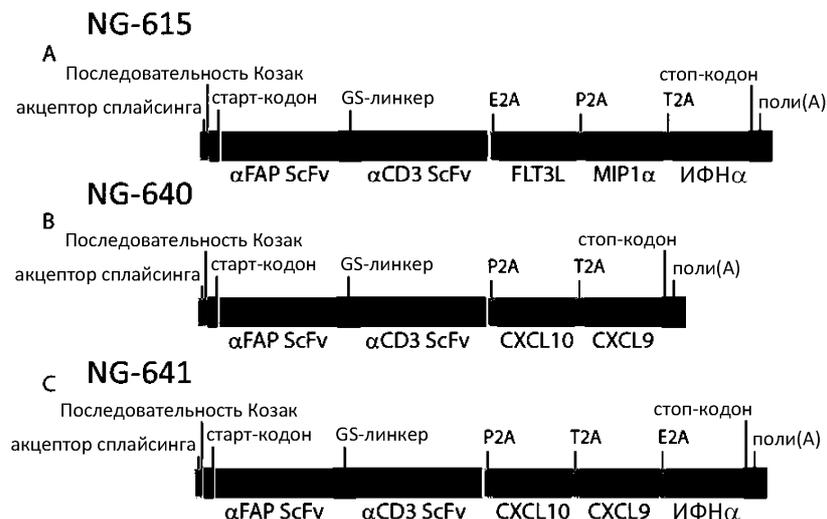
15. Рекомбинантный аденовирус по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что указанный аденовирус является онколитическим.

16. Рекомбинантный аденовирус по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что указанный вирус содержит гексон и волоконный белок из Ad11.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный аденовирус по любому из пп.1-16 и вспомогательное вещество, разбавитель или носитель.

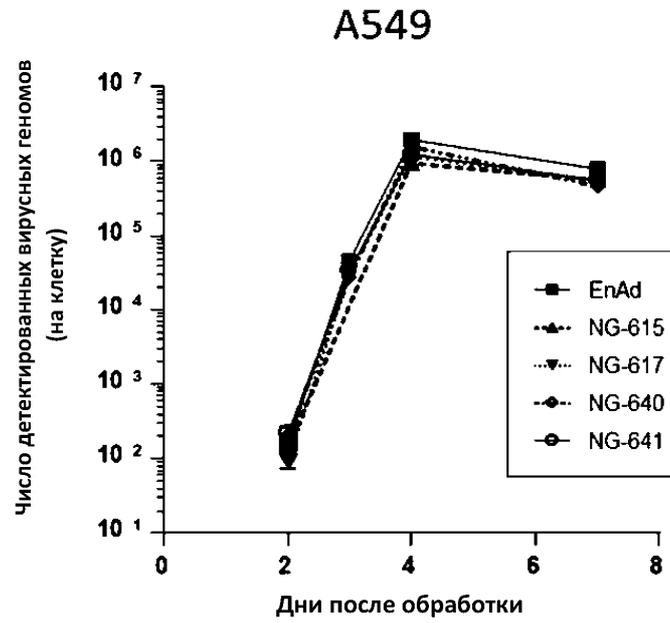
18. Способ лечения пациента, включающий введение рекомбинантного аденовируса по любому из пп.1-16 или фармацевтической композиции по п.17.

19. Применение рекомбинантного аденовируса по любому из пп.1-16 или фармацевтической композиции по п.17 для лечения рака.



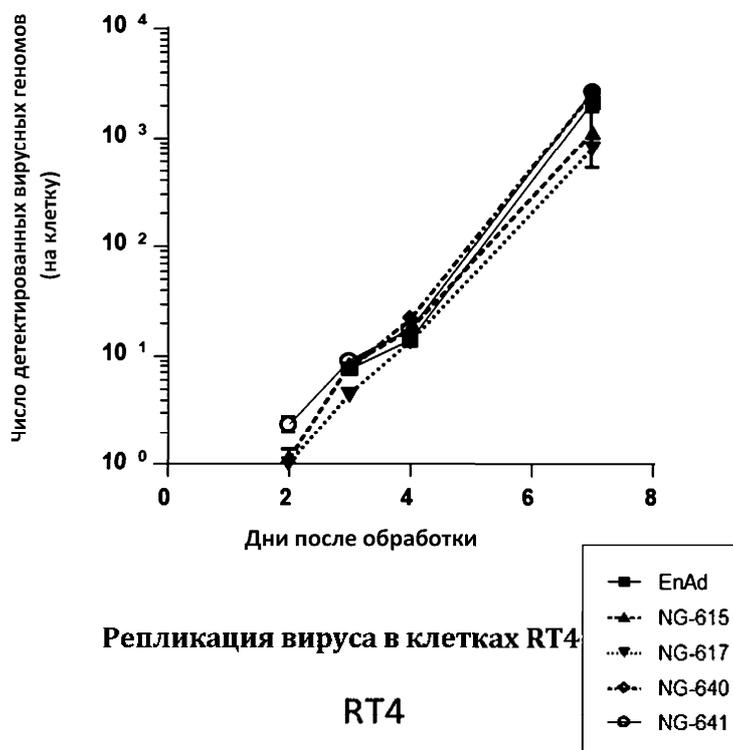
Фиг. 1

Репликация вируса в клетках A549



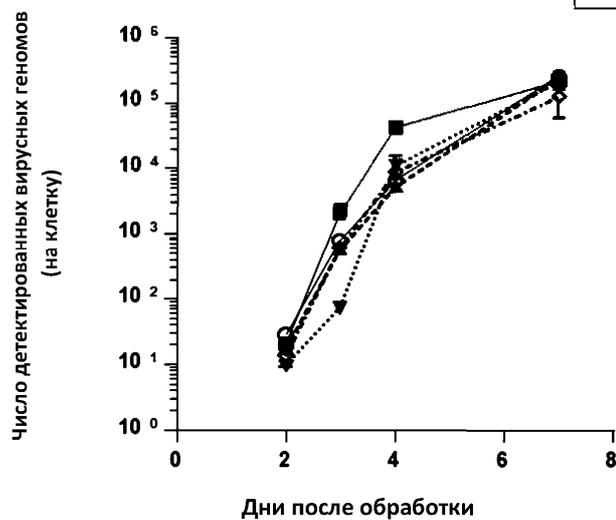
Репликация вируса в клетках MDA-MB-453

MDA-MB-453

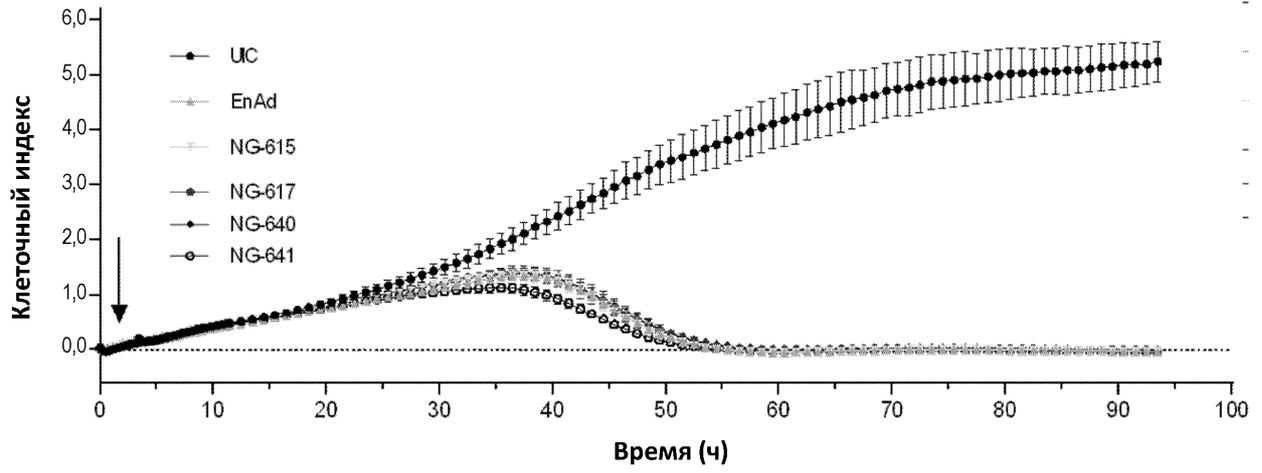


Репликация вируса в клетках RT4

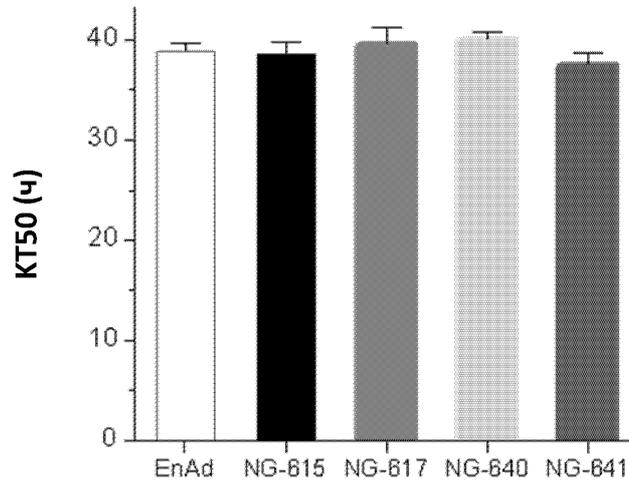
RT4



Фиг. 2В

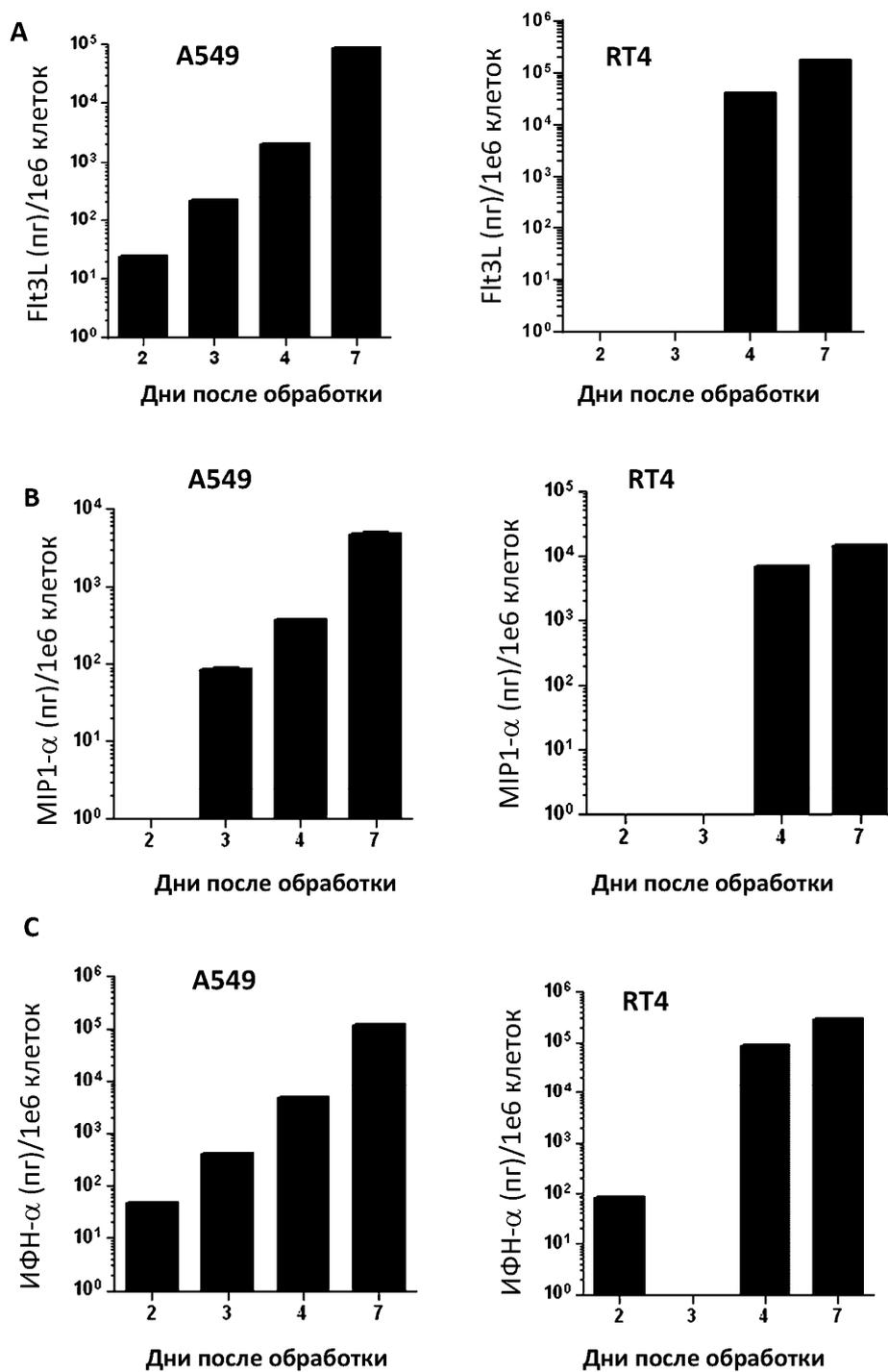


Фиг. 3А



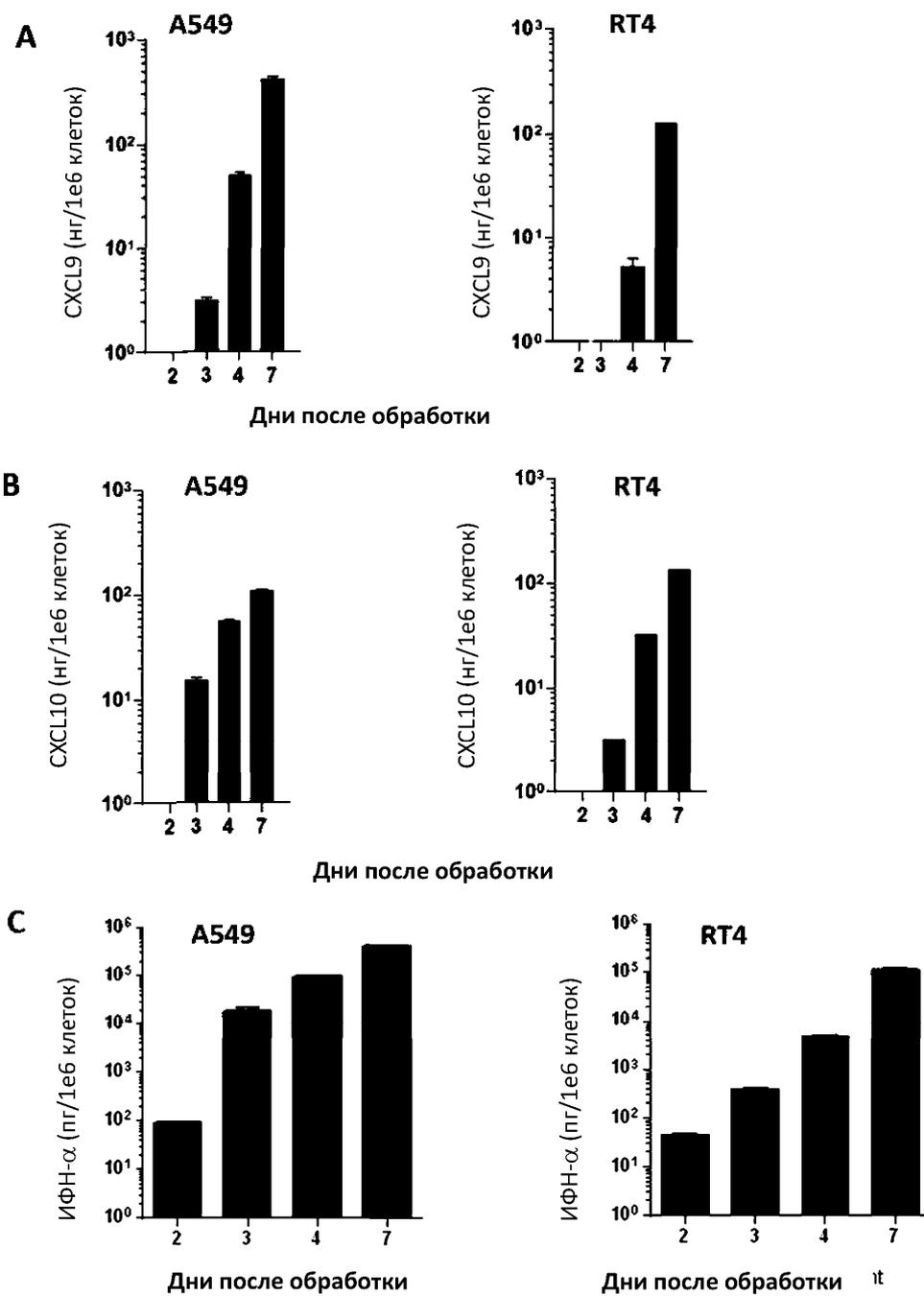
Фиг. 3В

Трансгенная экспрессия цитокинов для NG-615 в легких и клетках карциномы

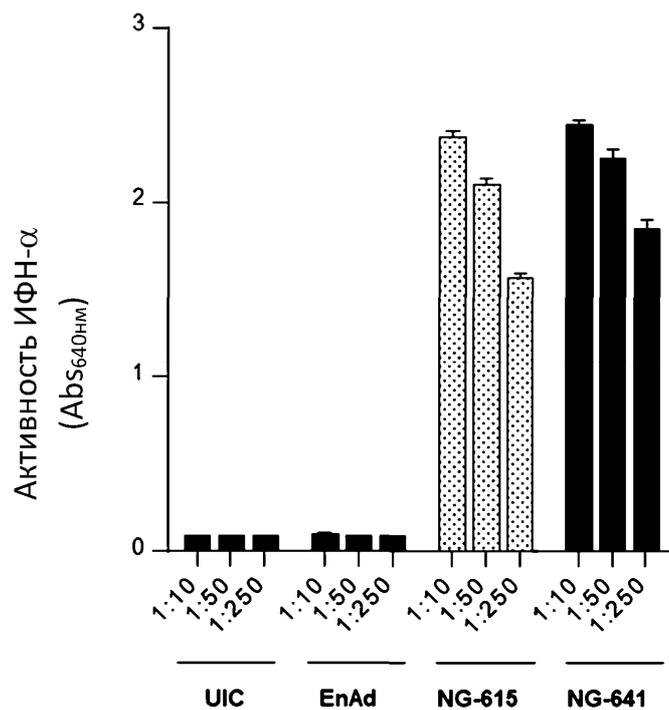


Фиг. 4

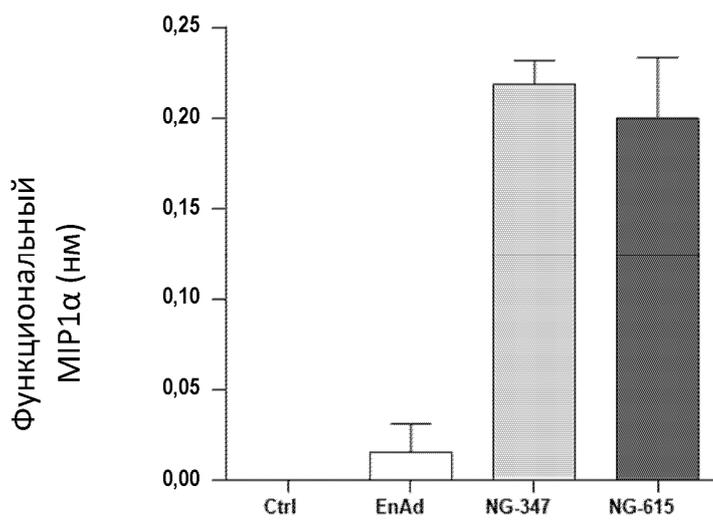
Трансгенная экспрессия цитокинов для NG-641 в легких и клетках карциномы



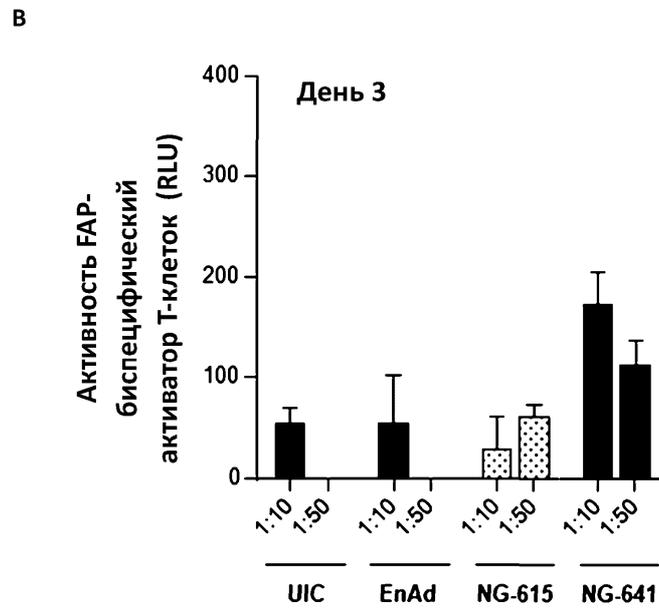
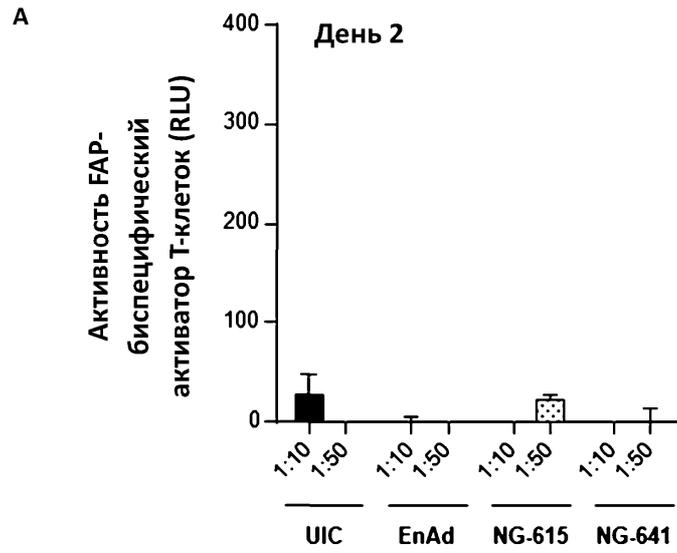
Фиг. 5



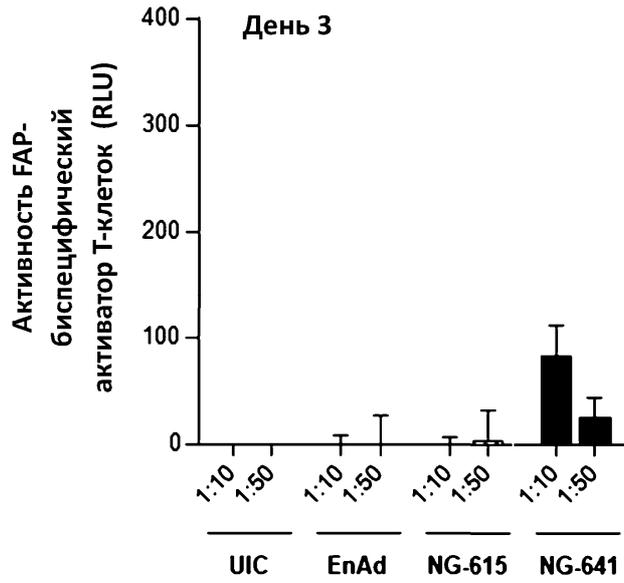
Фиг. 6А



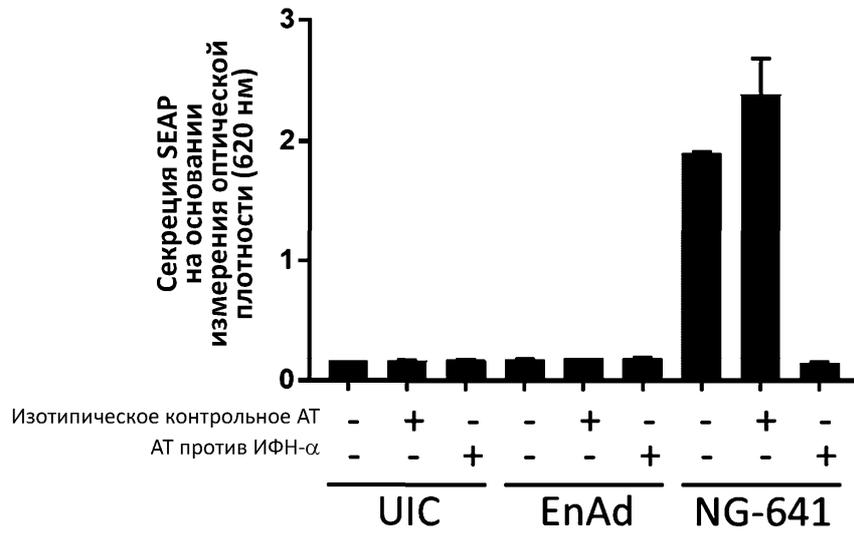
Фиг. 6В



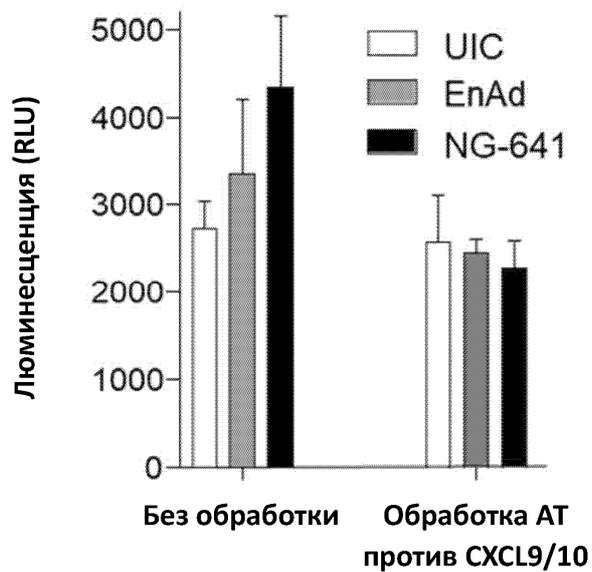
Фиг. 7А, В



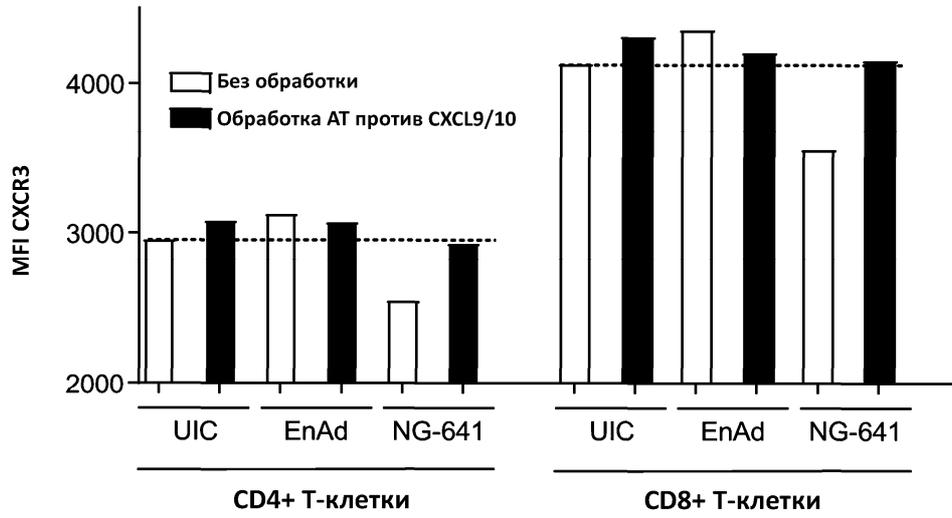
Фиг. 7С



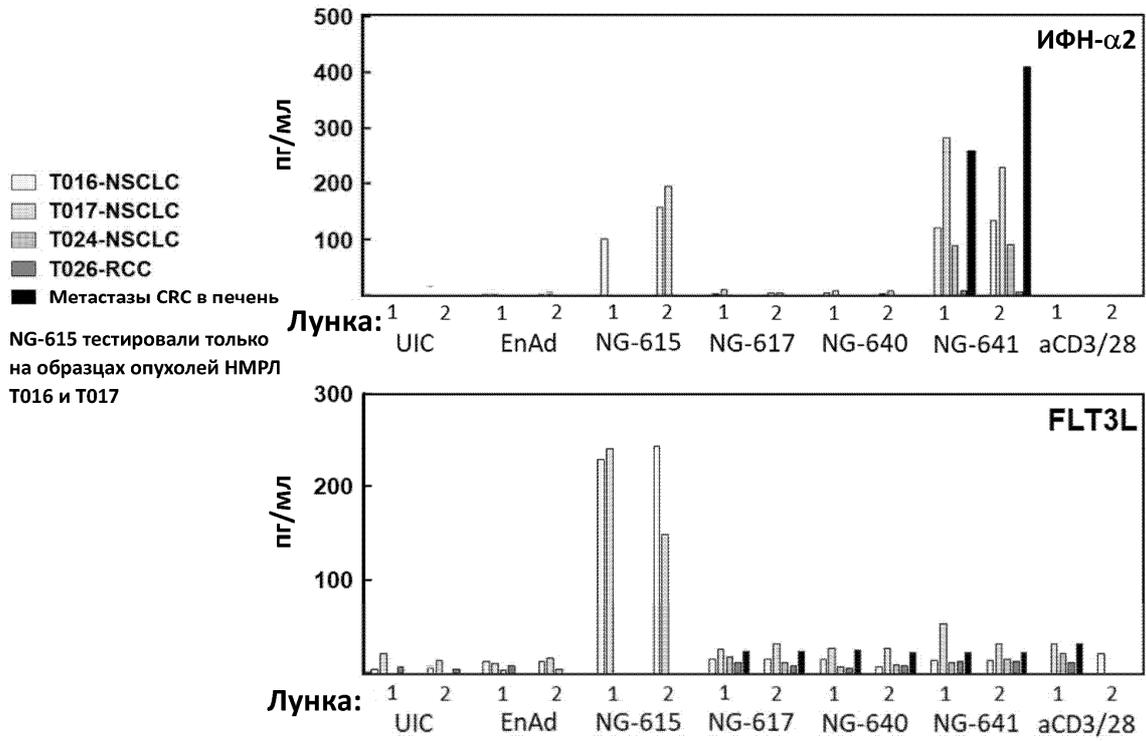
Фиг. 8А



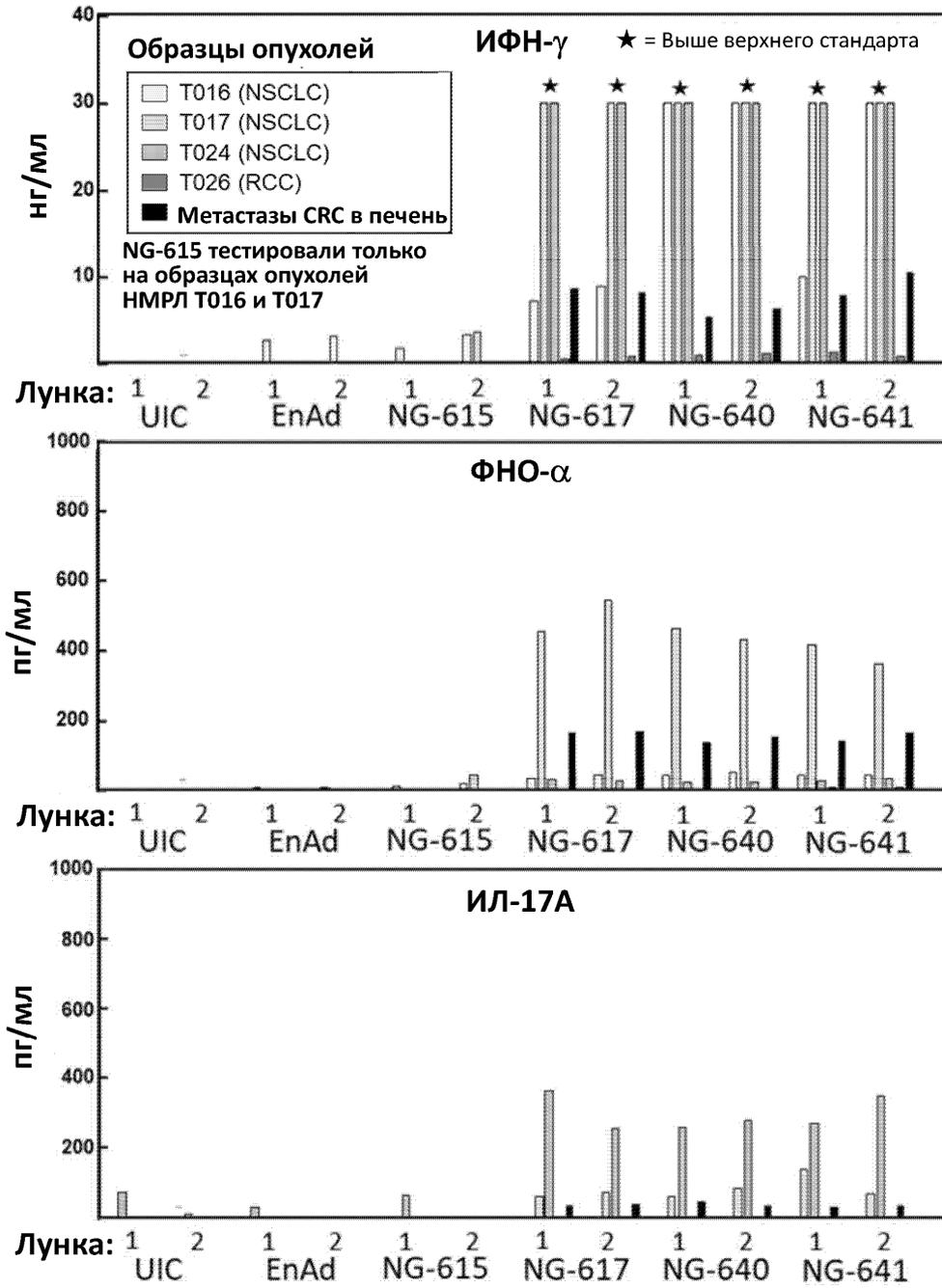
Фиг. 8В



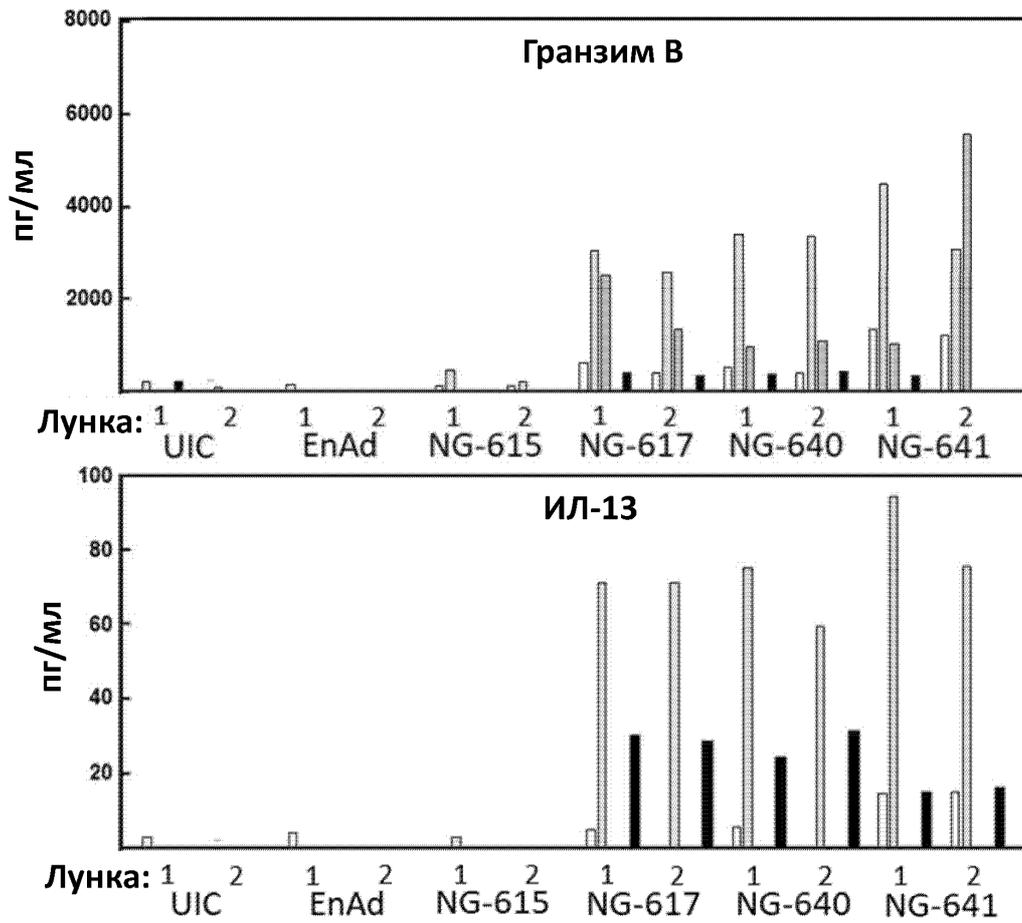
Фиг. 9



Фиг. 10А



Фиг. 10В



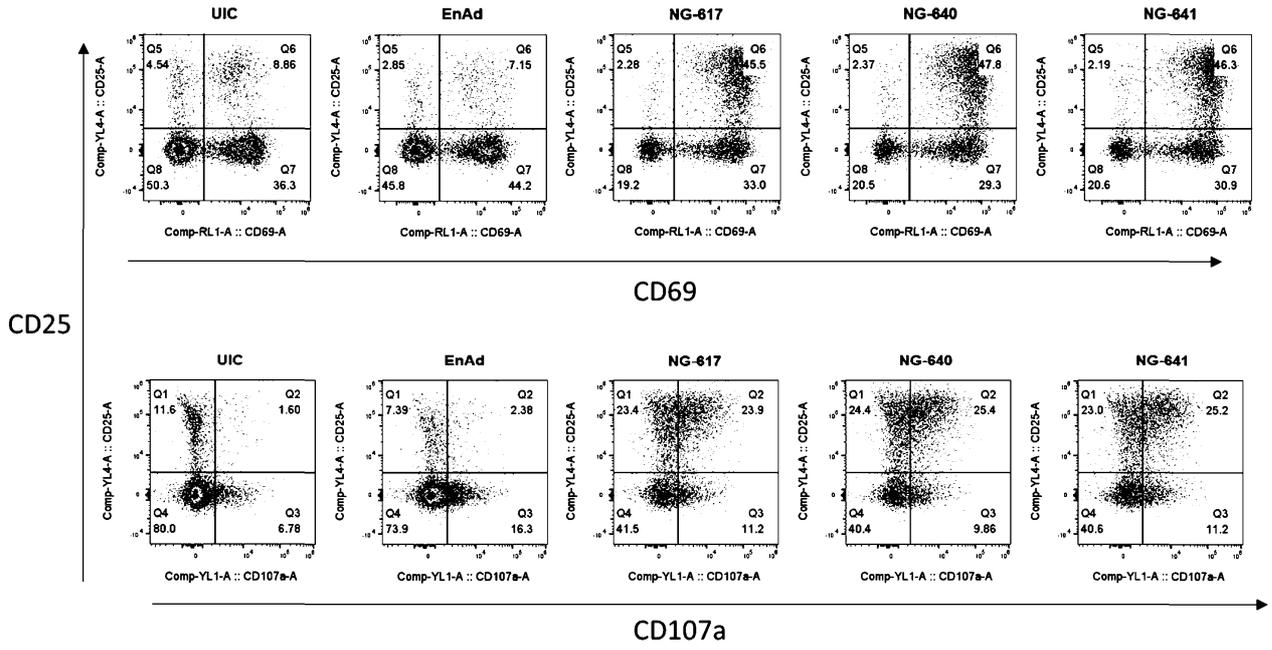
Образцы опухолей



**NG-615 тестировали только
на образцах опухолей НМРЛ
T016 и T017**

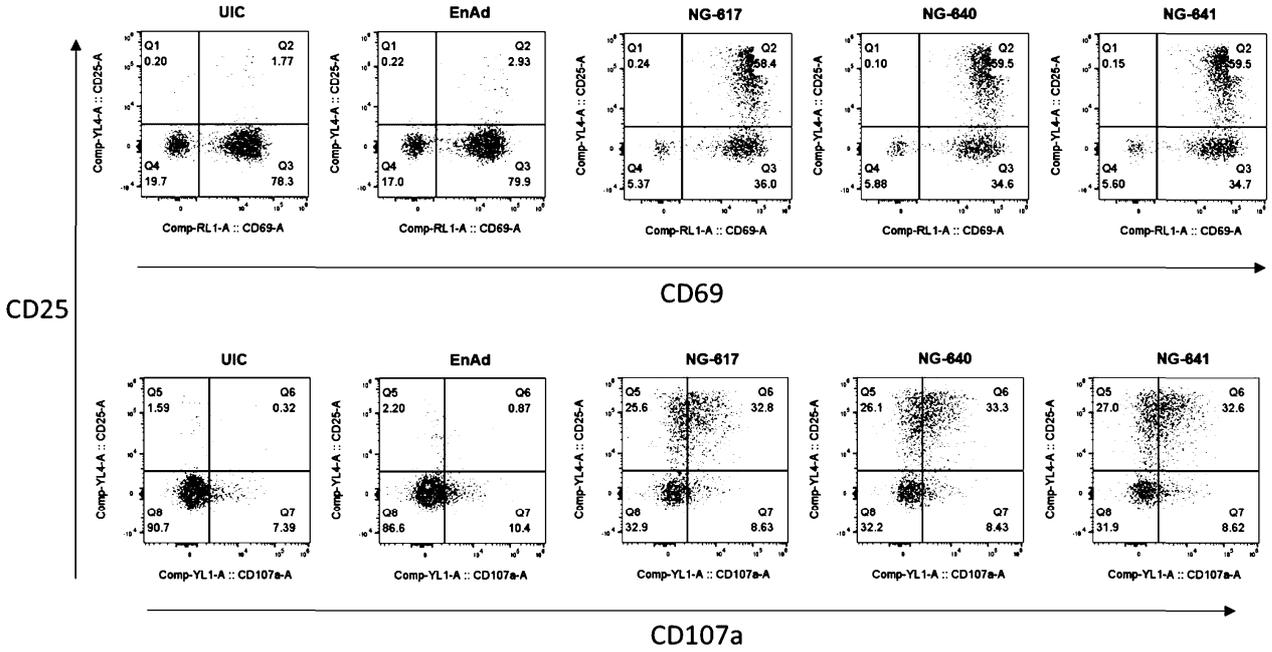
Фиг. 10В, продолжение

(X-ось: Comp-RL1-A:CD69-A или YL1A:107a-A, Y-ось: Comp-YL4-A: CD25-A)



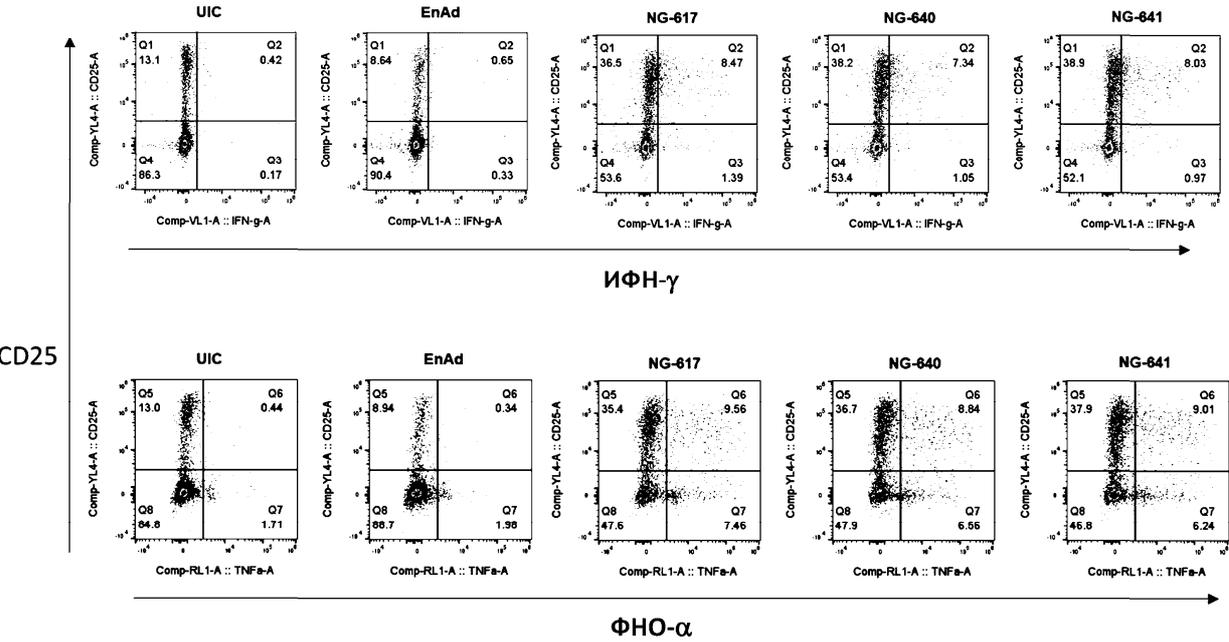
Фиг. 11А

(X-ось: Comp-RL-A:CD69-A или YL1-1:CD107-а-A, Y-ось: Comp-YL4-A: CD25-A)



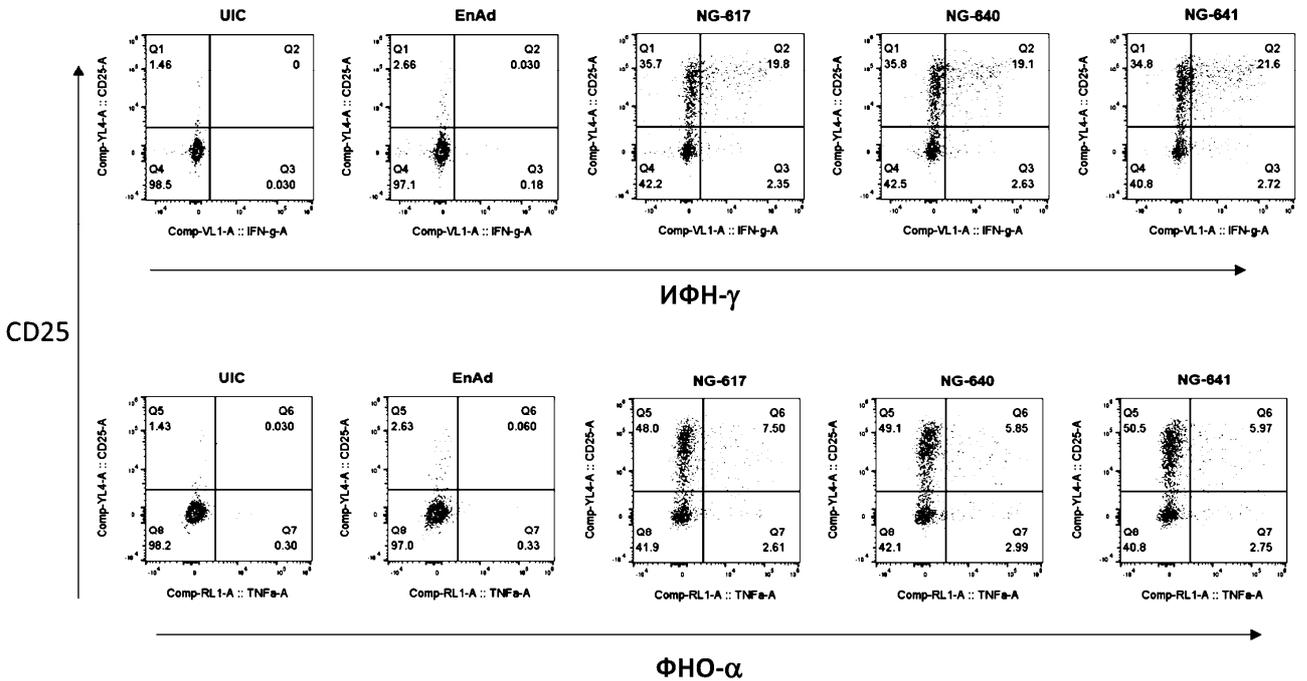
Фиг. 11В

(X-ось: Comp-VL-A: IFN-g-A (ИФН-гамма) или RL1-A: TNF-a-A (ФНО-альфа), Y-ось: Comp-YL4-A: CD25-A)

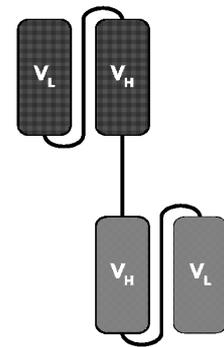
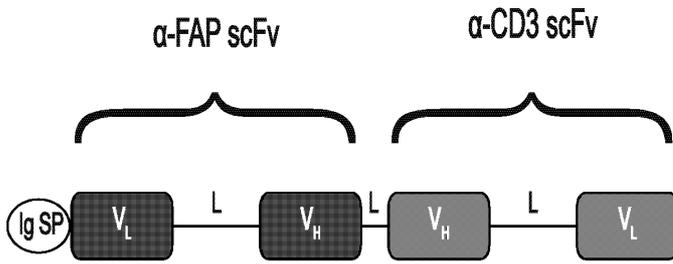
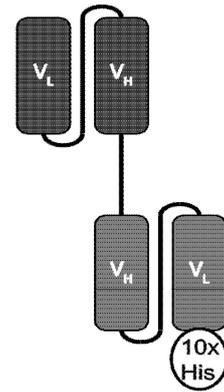
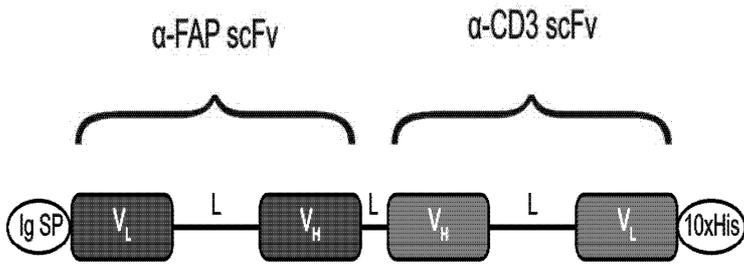


Фиг. 11С

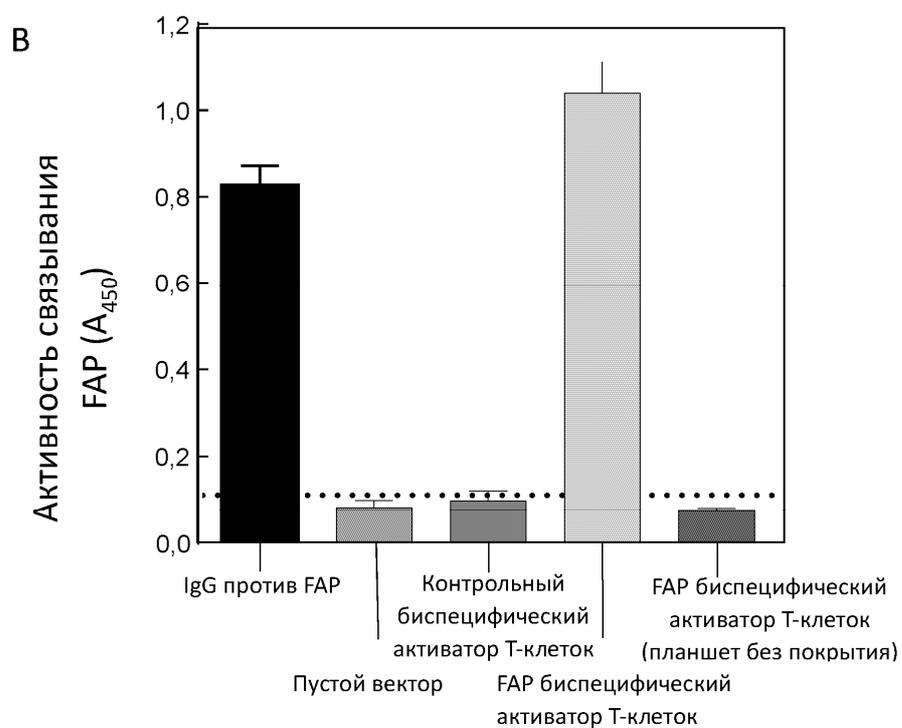
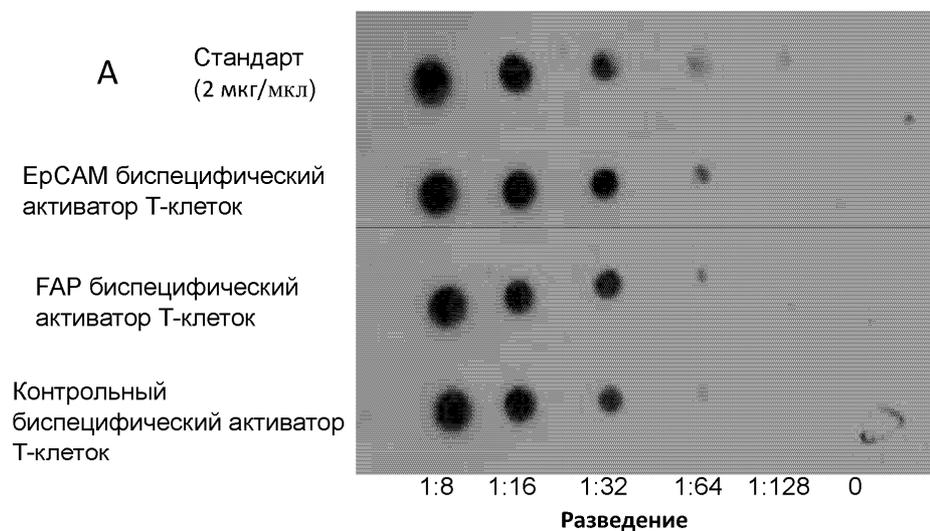
(X-ось: Comp-VL-A: IFN-g-A(ИФН-гамма) или RL1-A: TNF-a-A (ФНО-альфа), Y-ось: Comp-YL4-A: CD25-A)



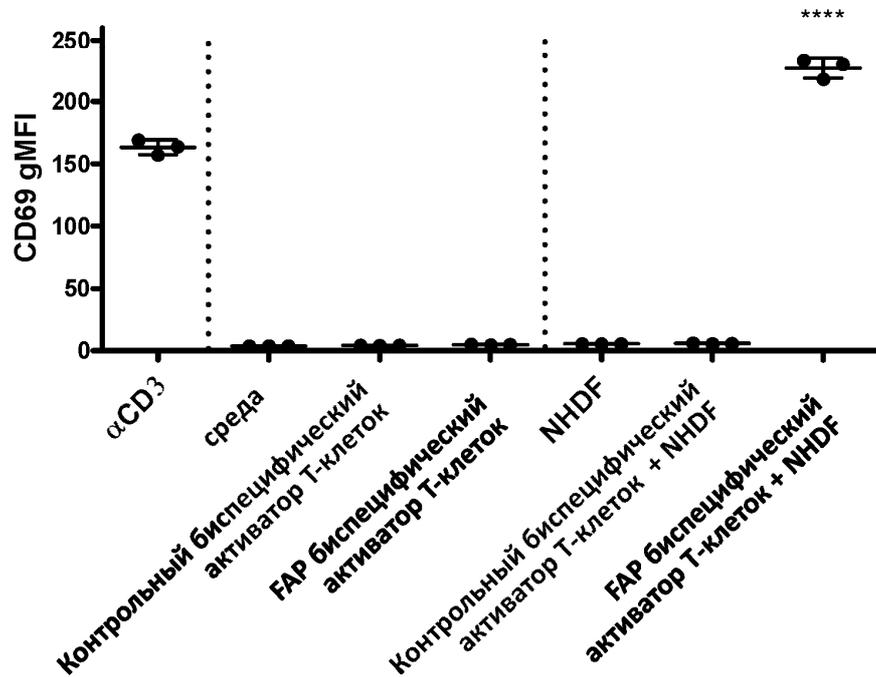
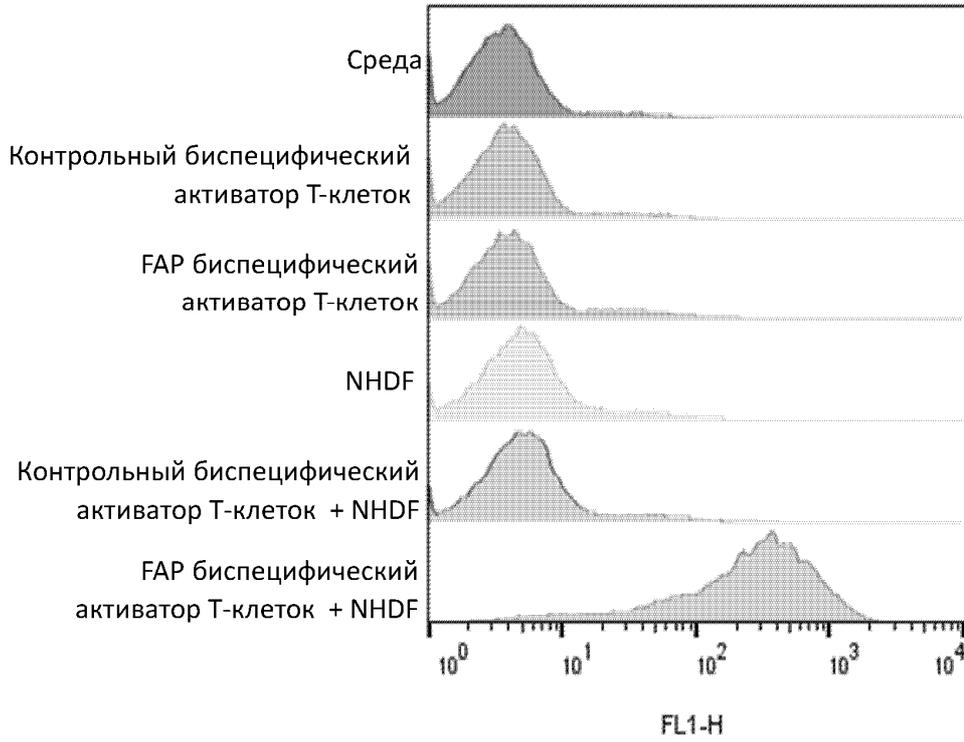
Фиг. 11D



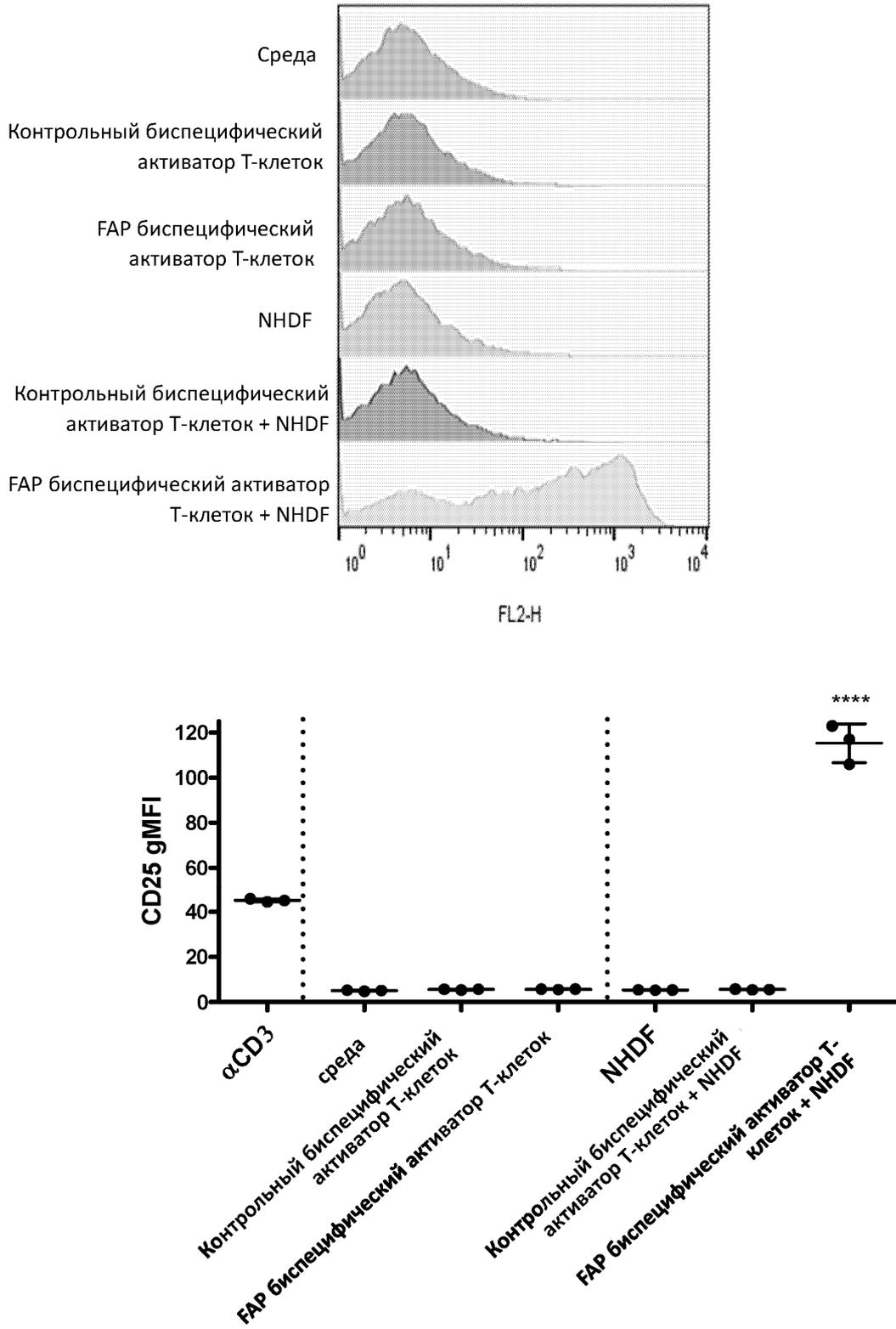
Фиг. 12



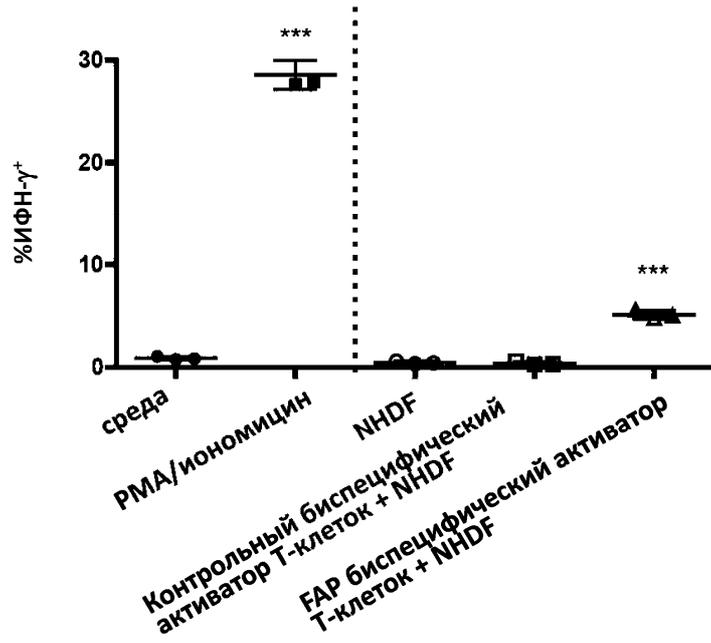
Фиг. 13



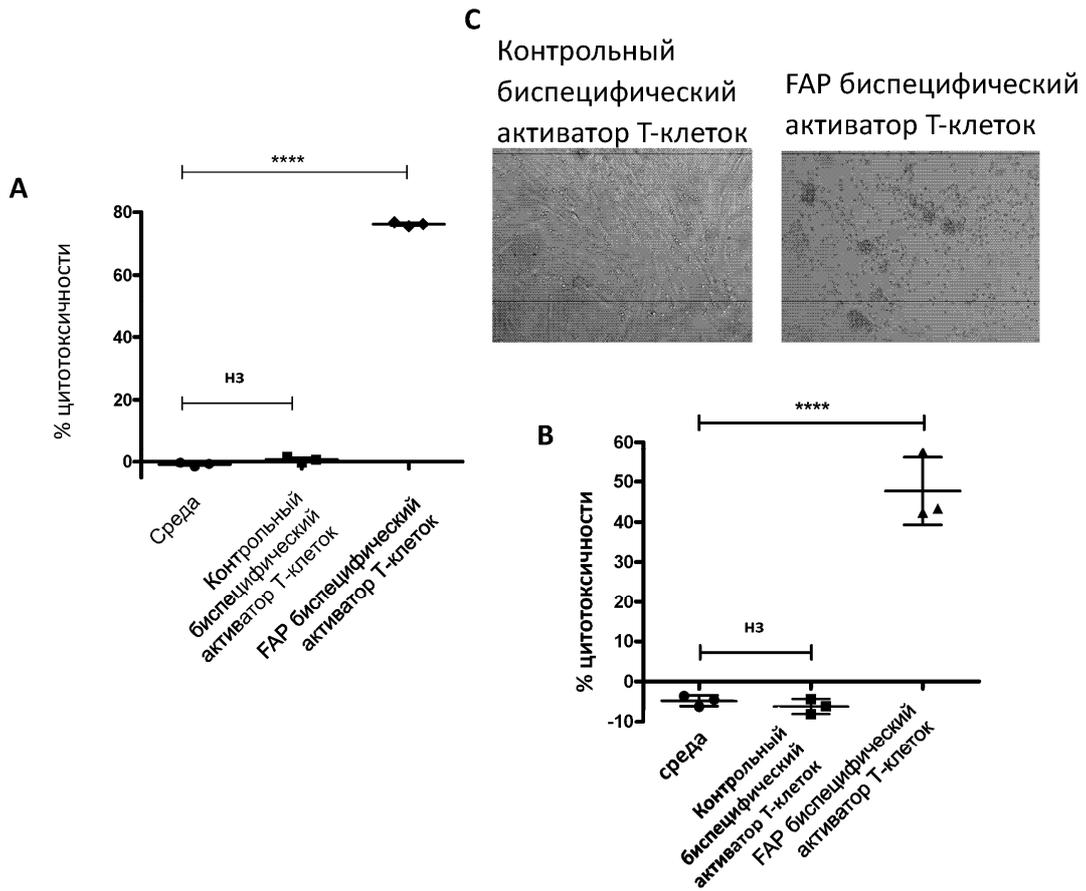
Фиг. 14А



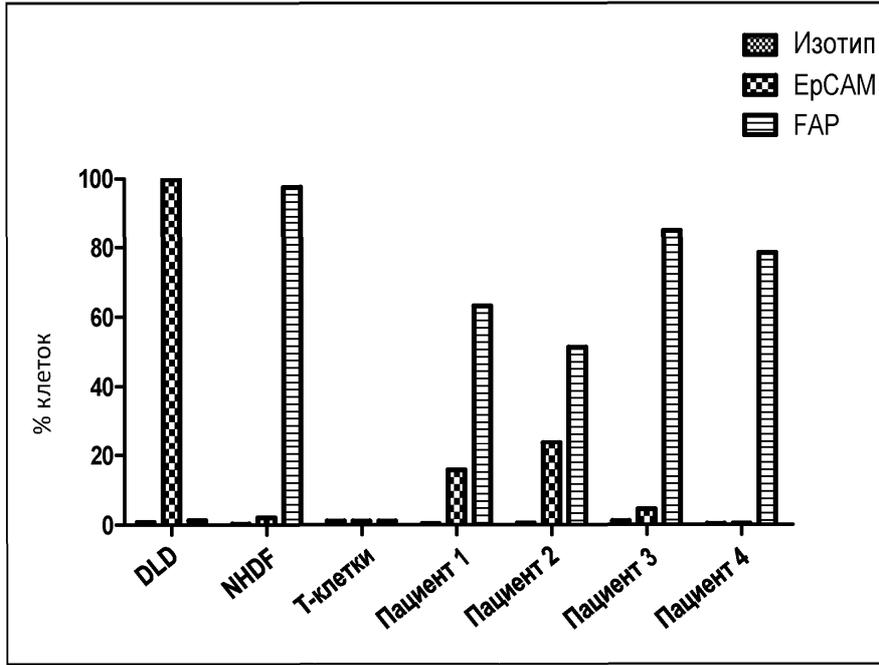
Фиг. 14В



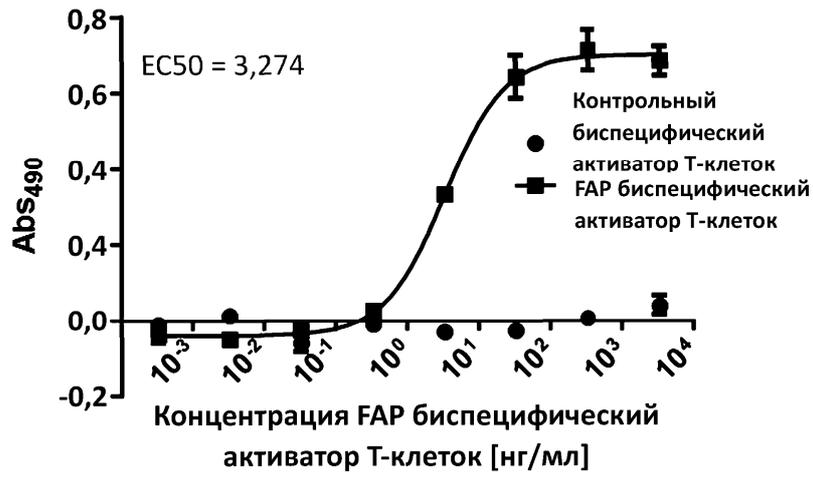
Фиг. 14С



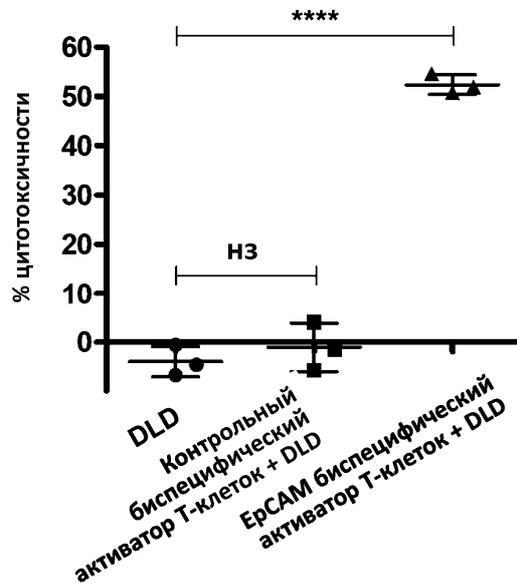
Фиг. 15



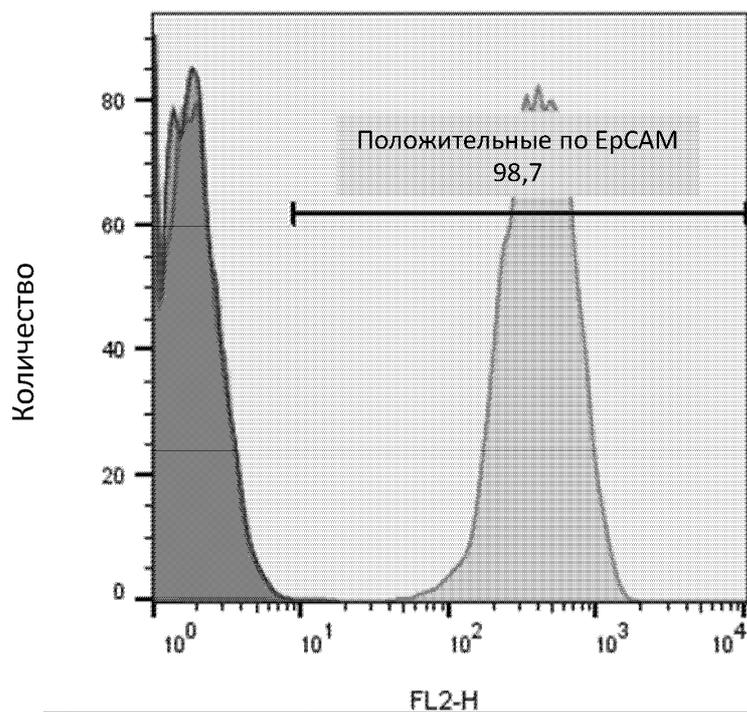
Фиг. 16



Фиг. 17А

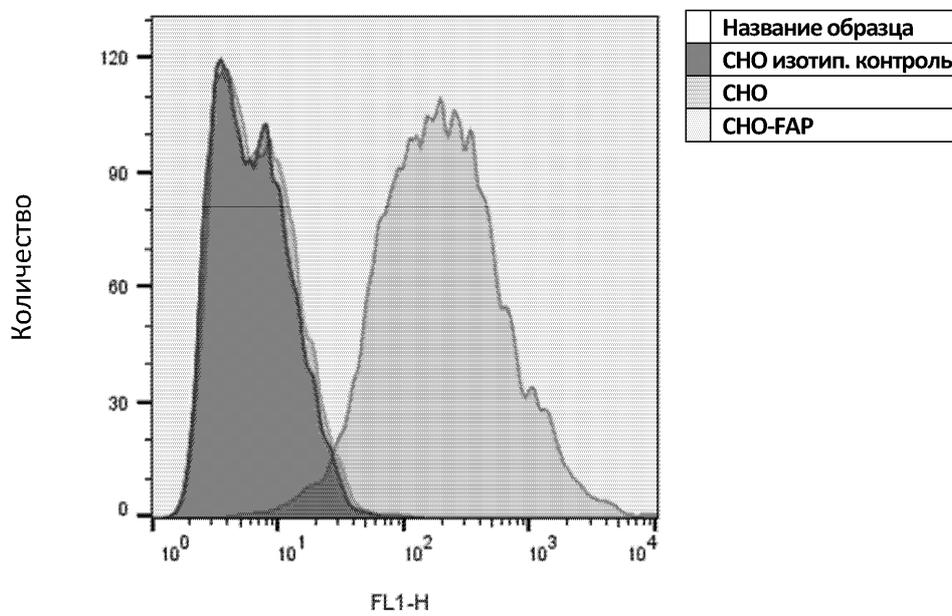


Фиг. 17В

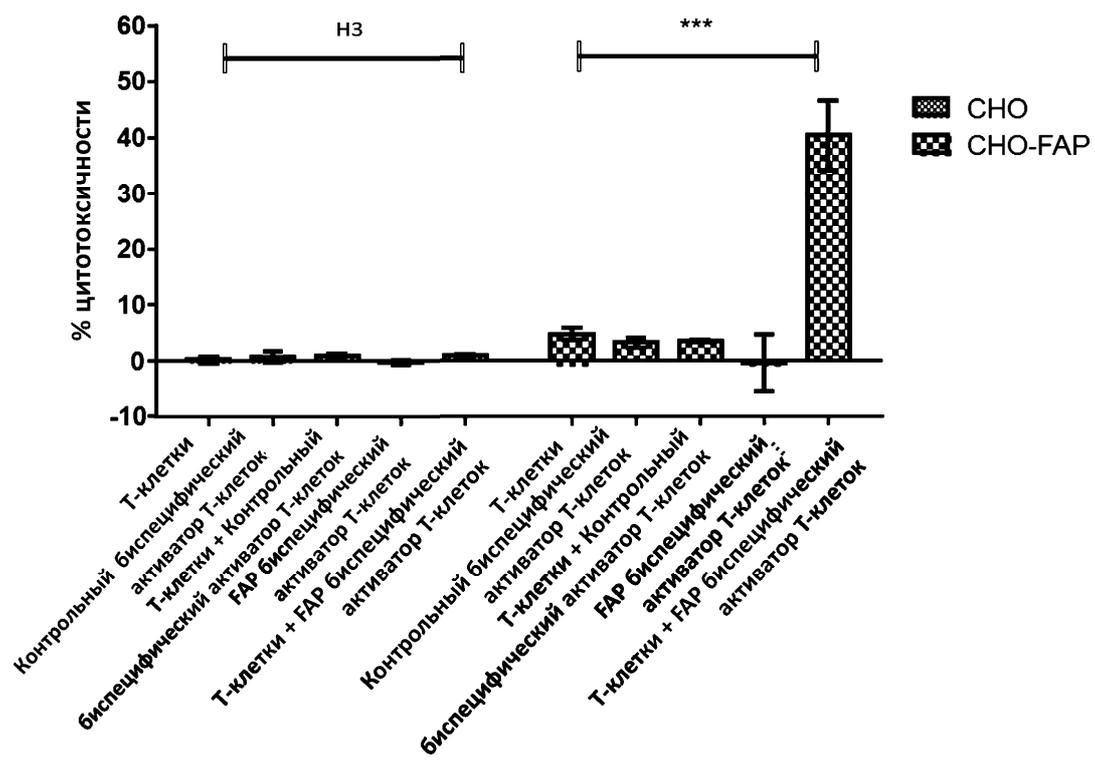


Название образца	Положит. по EpCAM:: Частота исходн.	Геометрическое среднее : FL2-H
[DLD неокраш.021]	0,40	1,77
[DLD изотип.022]	0,36	1,81
[DLD Ep.023]	98,7	361

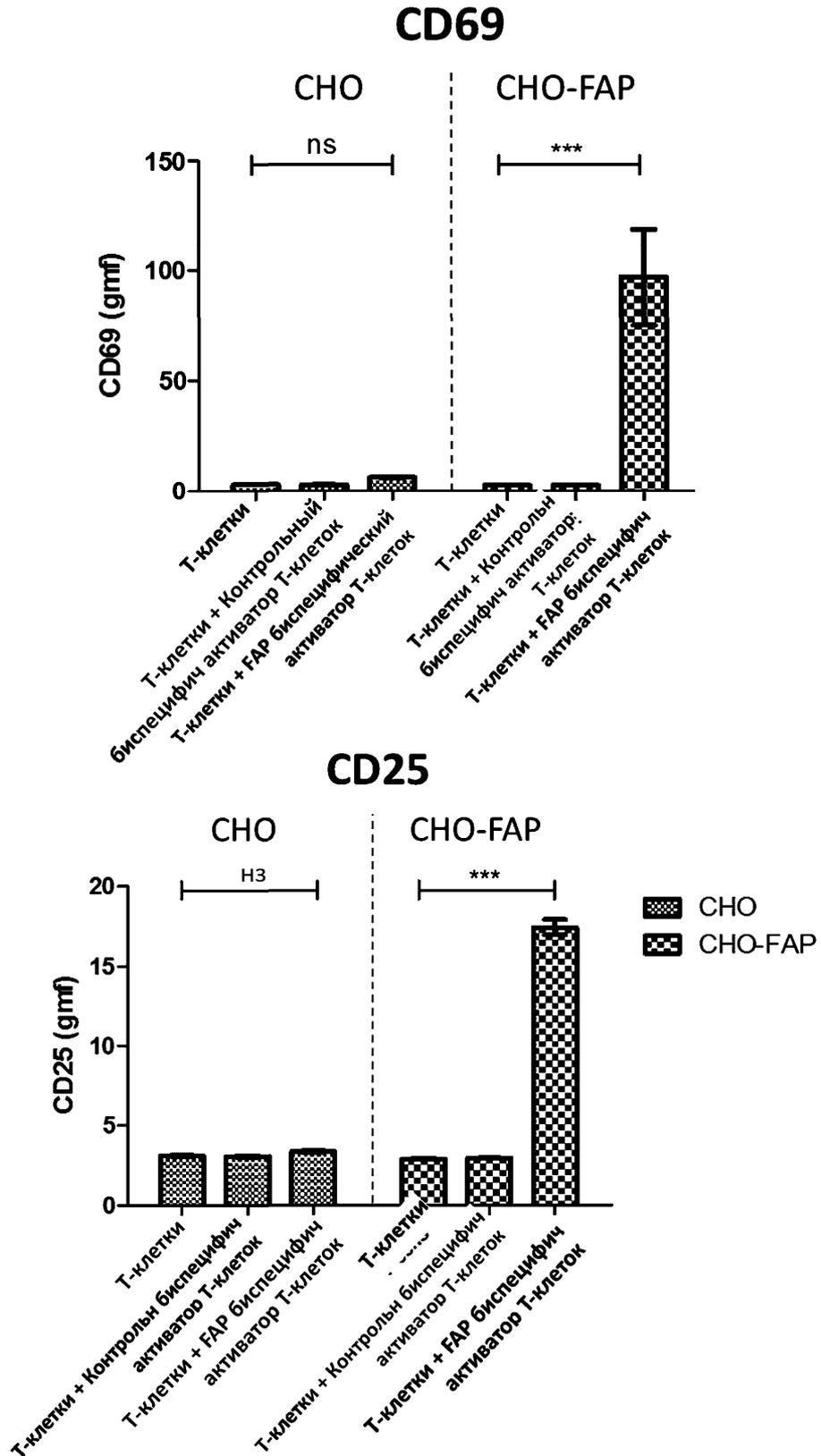
Фиг. 17С



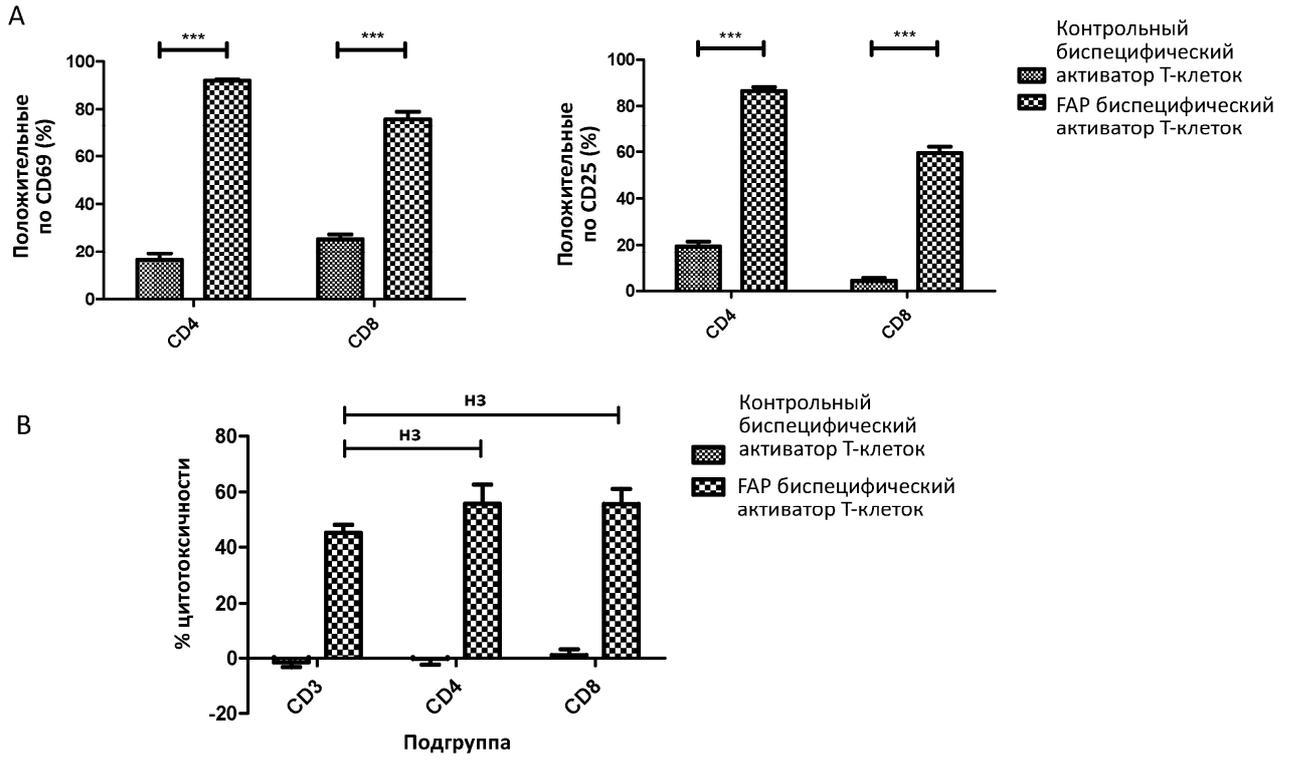
Фиг. 18А



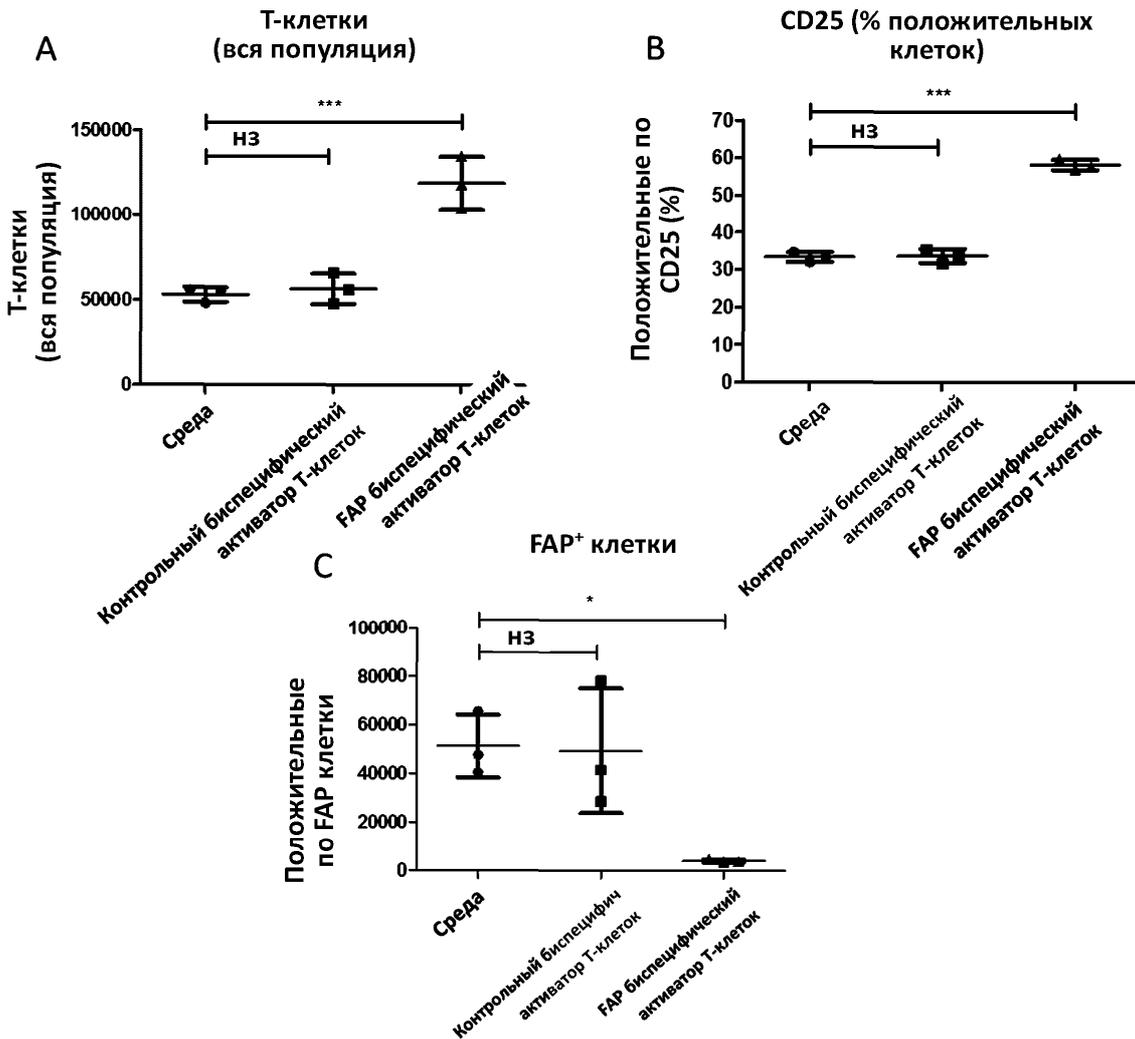
Фиг. 18В



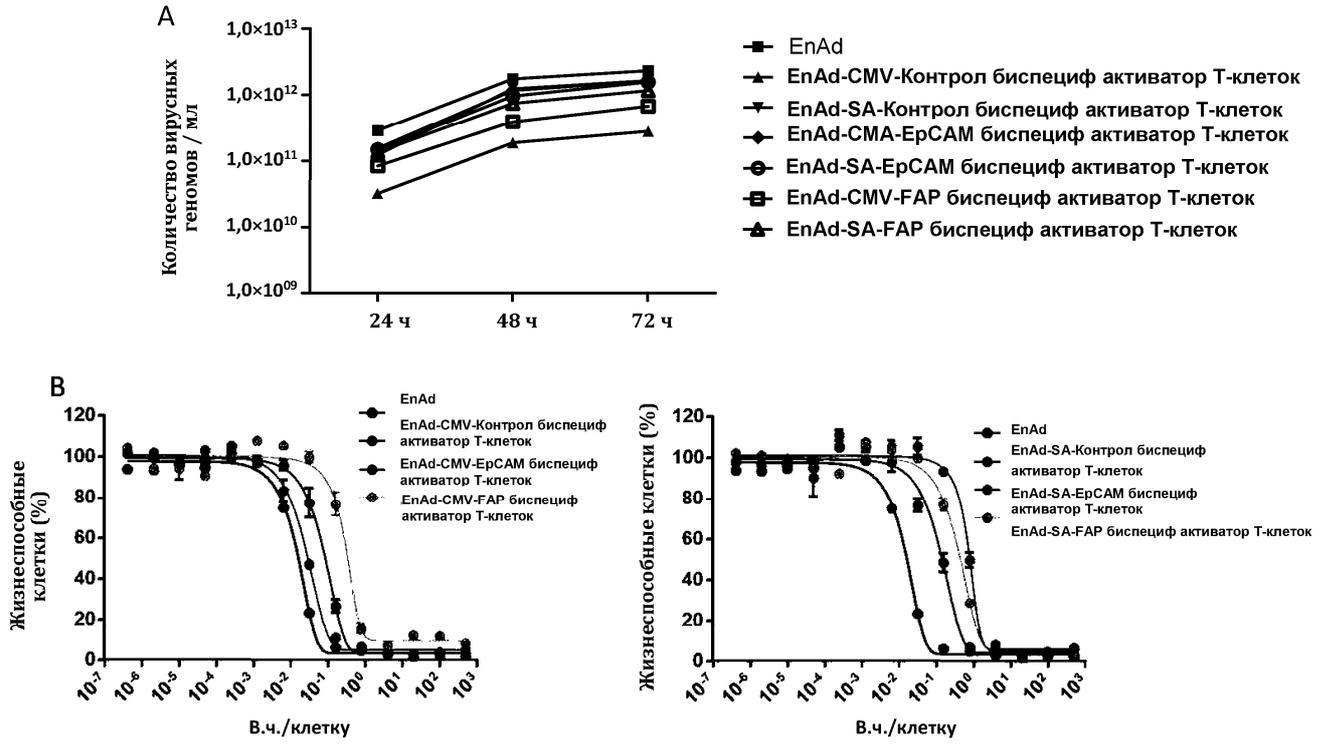
Фиг. 19



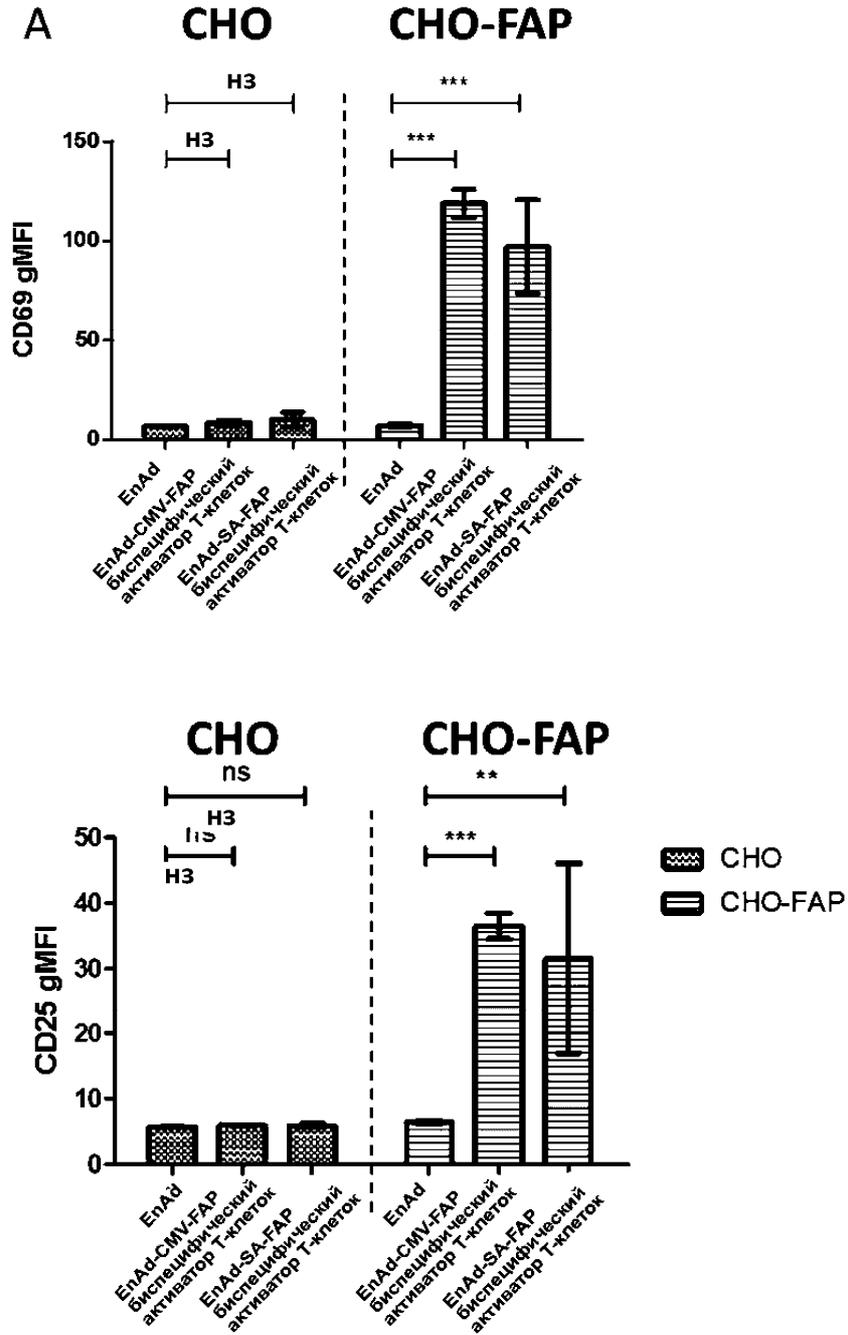
Фиг. 20



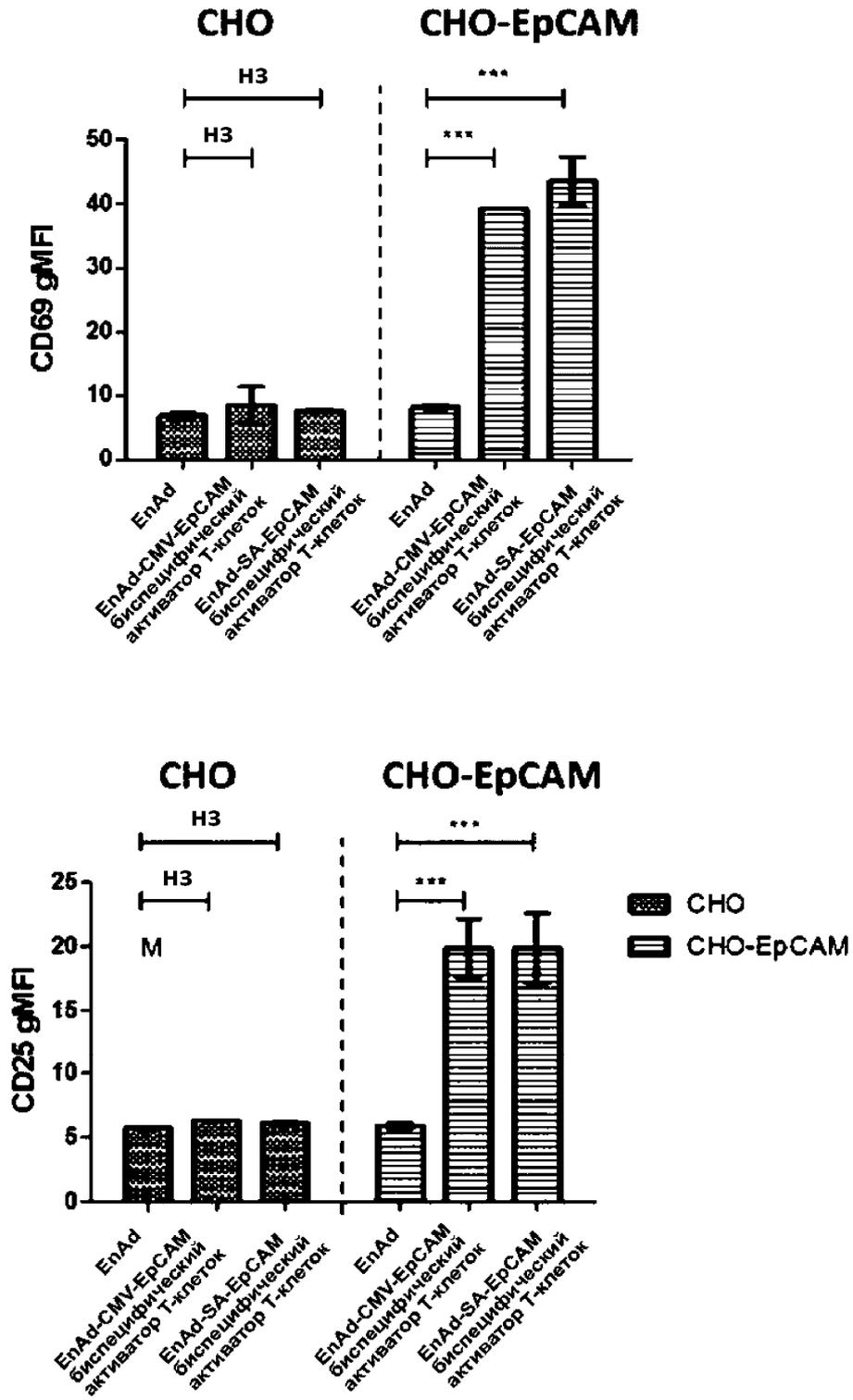
Фиг. 21



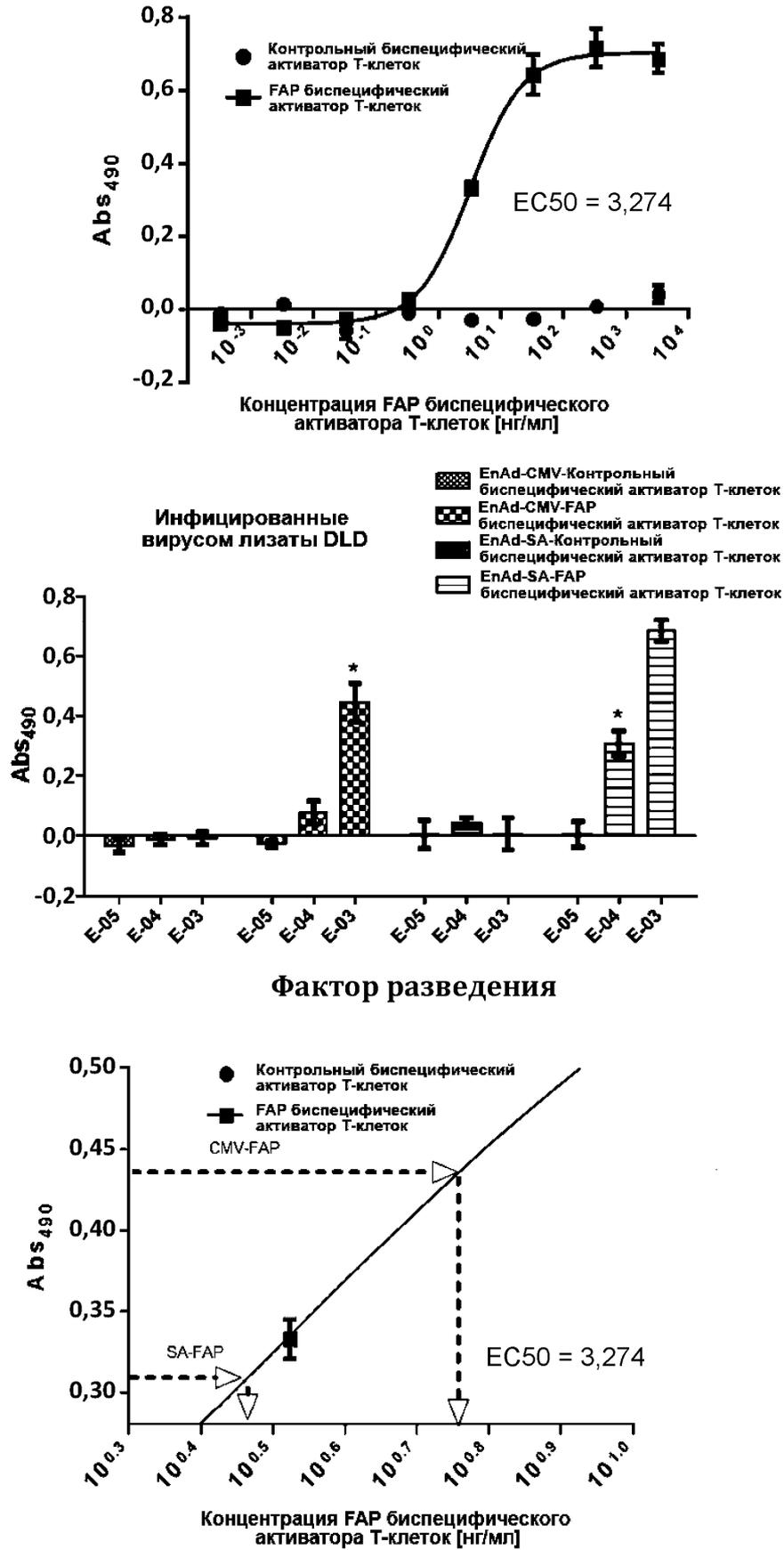
Фиг. 22



Фиг. 23А



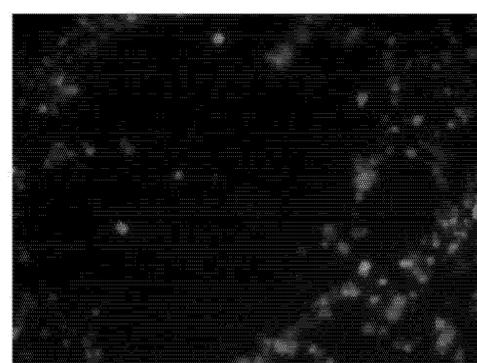
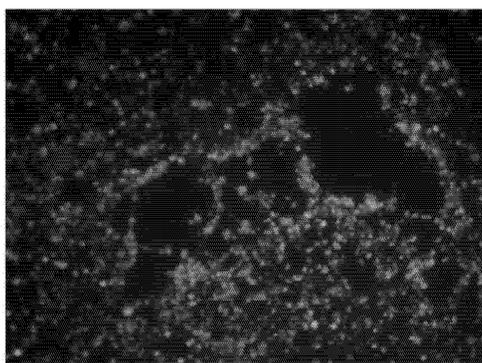
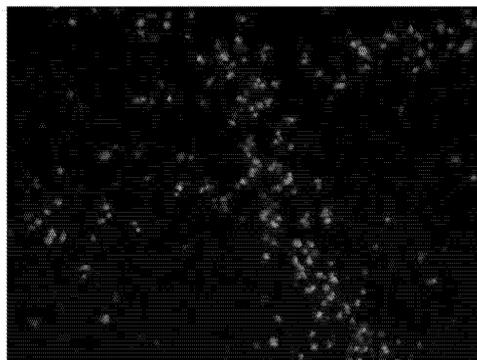
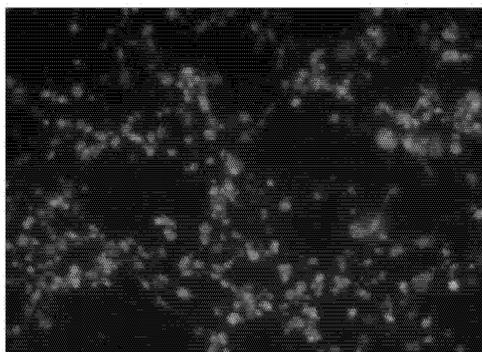
Фиг. 23В



Фиг. 24

EnAd-SA-Контрольный биспецифичекий активатор Т-клеток-P2A-RFP

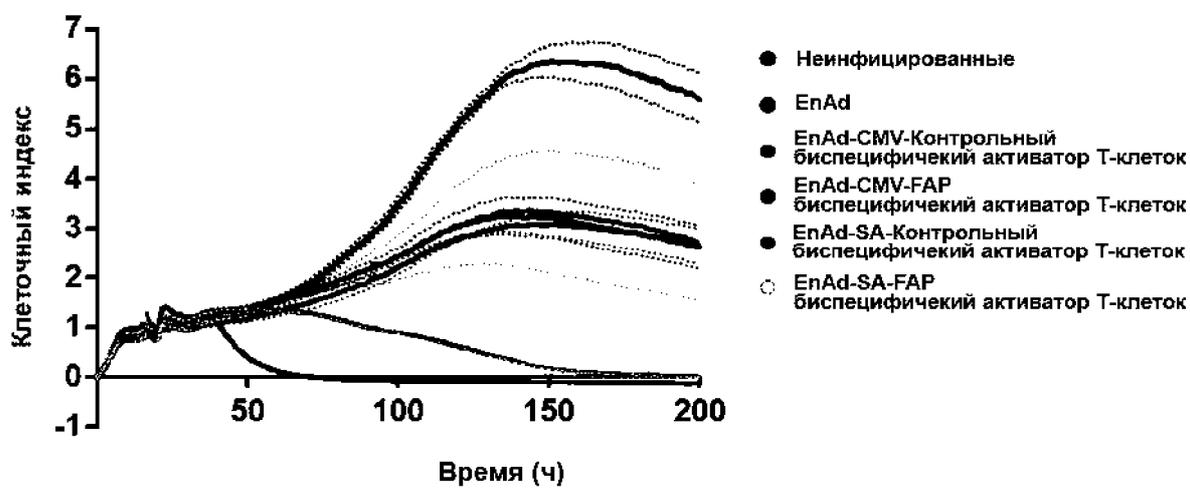
EnAd-SA-FAP биспецифичекий активатор Т-клеток-P2A-RFP



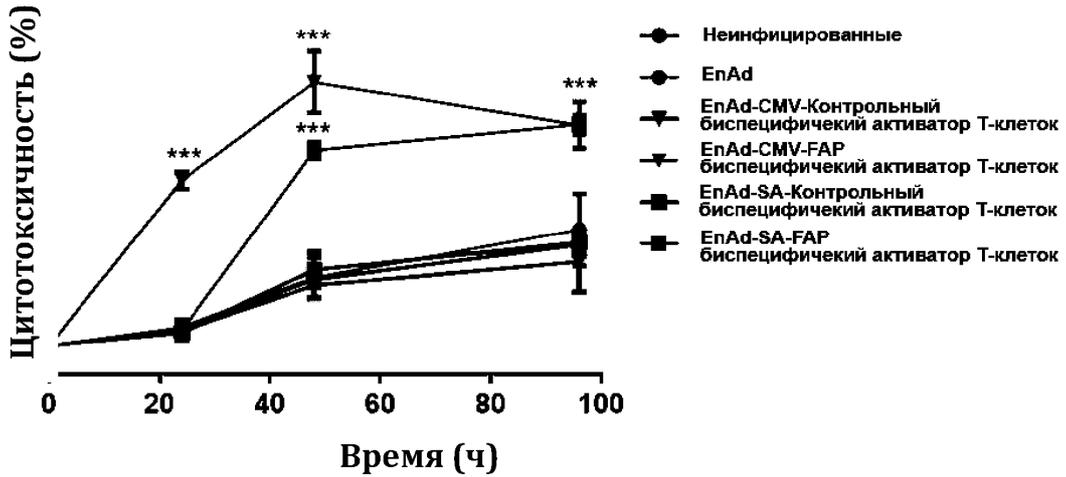
EnAd-CMV-Контрольный биспецифичекий активатор Т-клеток-P2A-RFP

EnAd-CMV-FAP биспецифичекий активатор Т-клеток-P2A-RFP

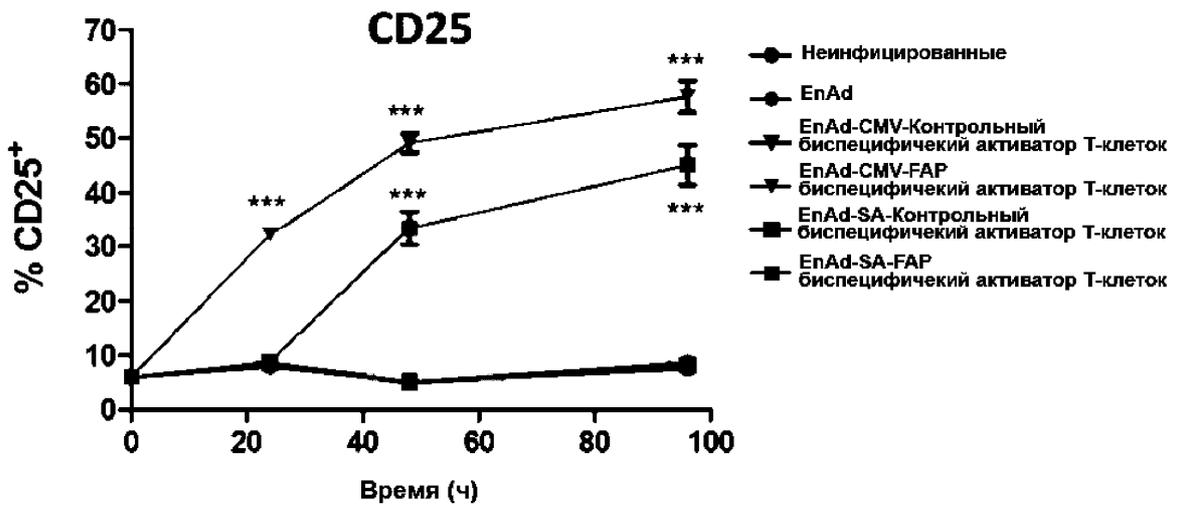
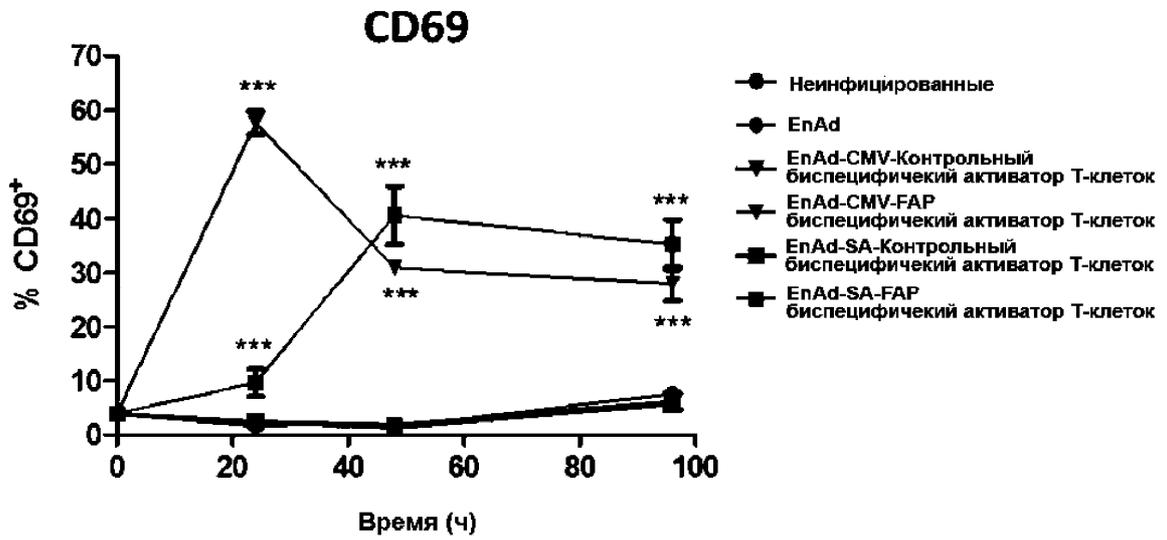
Фиг. 25



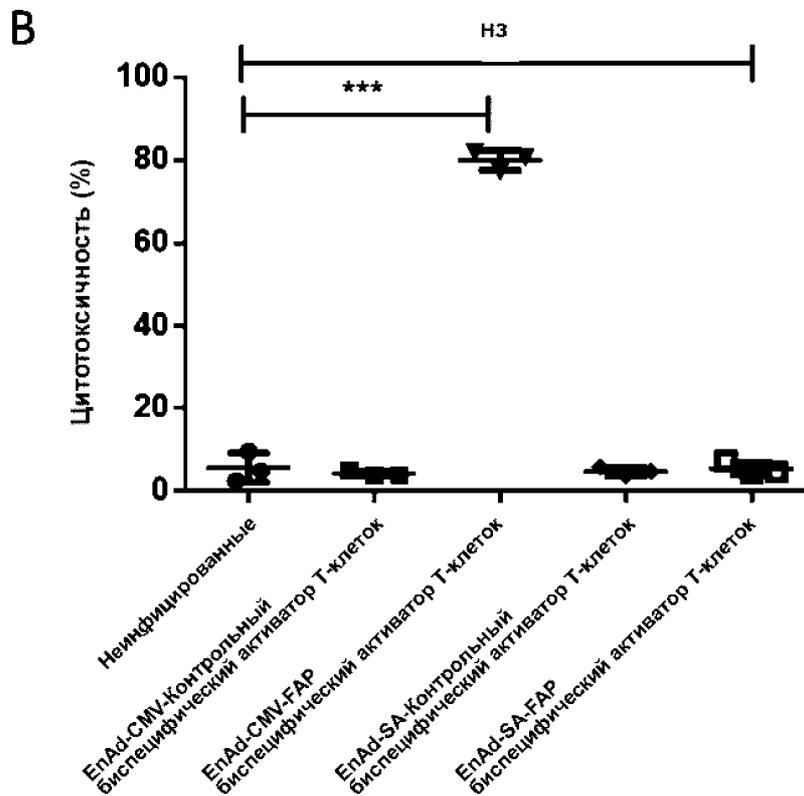
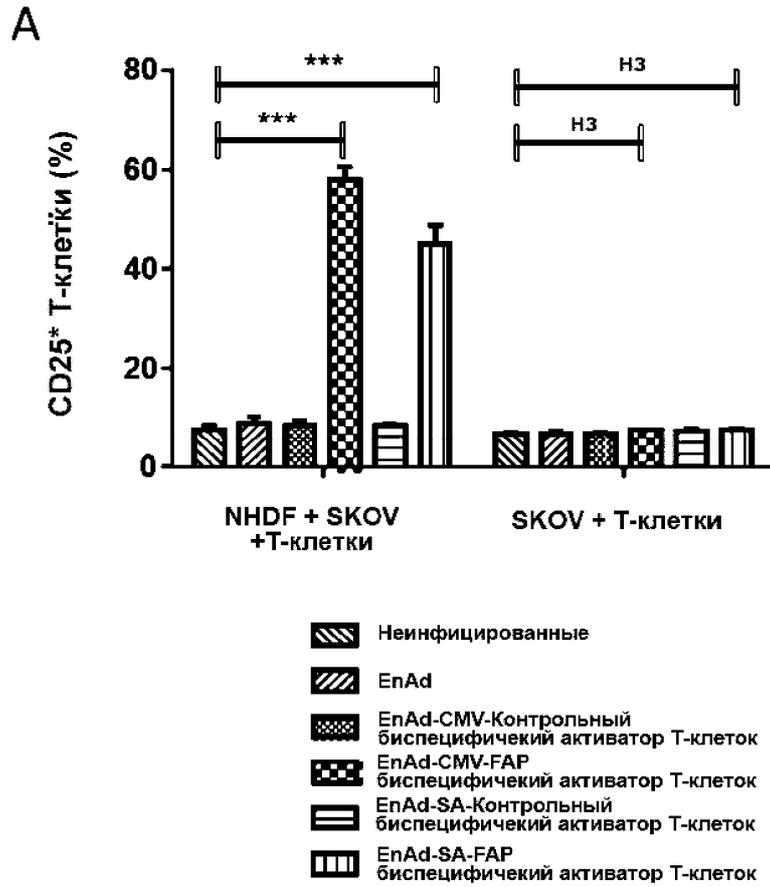
Фиг. 26А



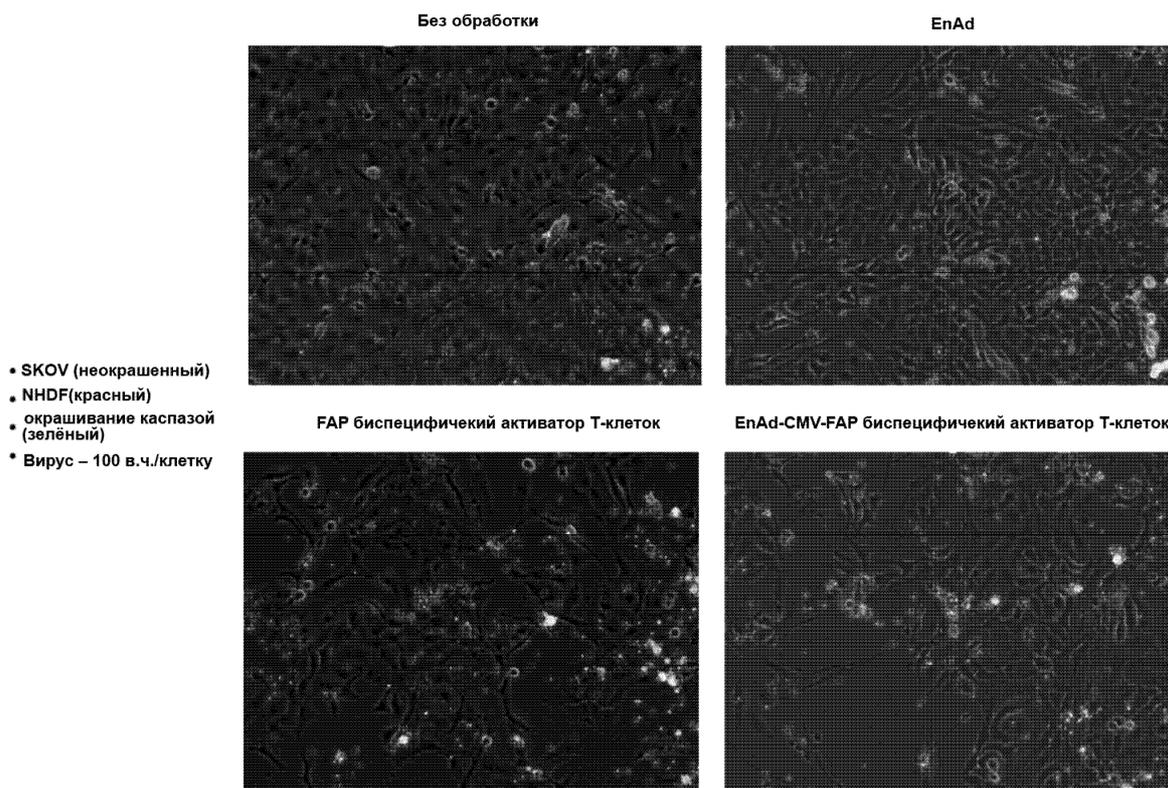
Фиг. 26В



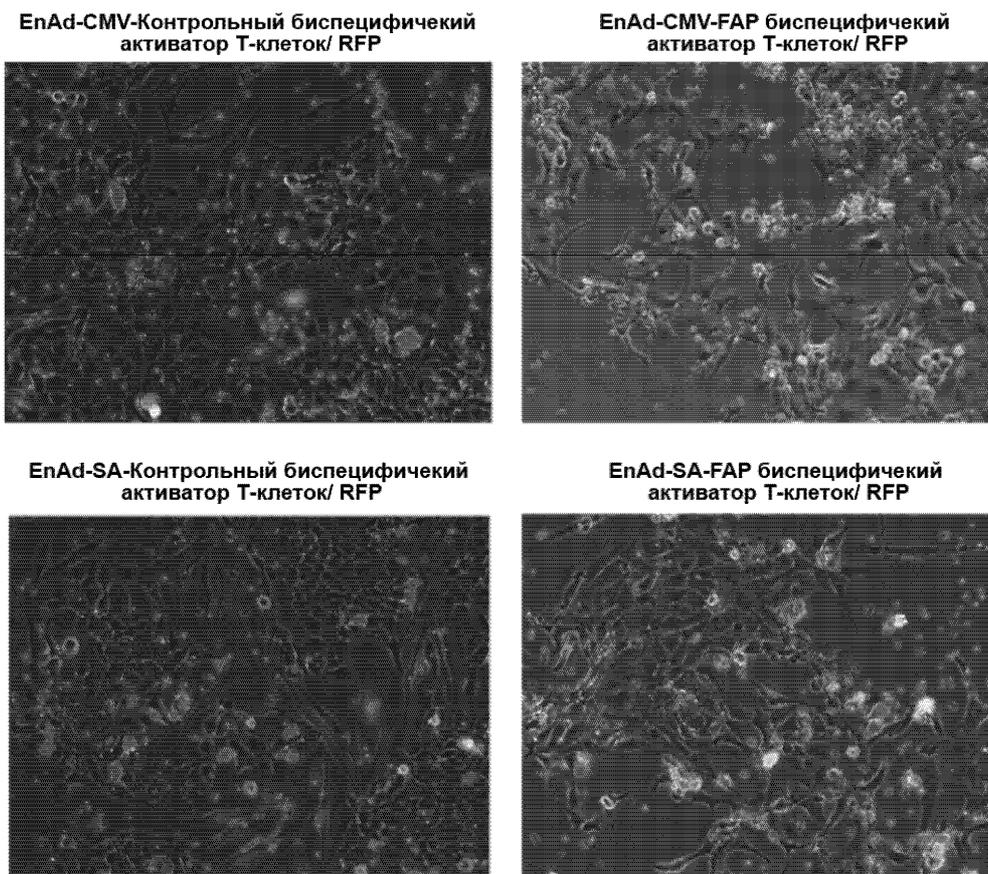
Фиг. 27



Фиг. 28

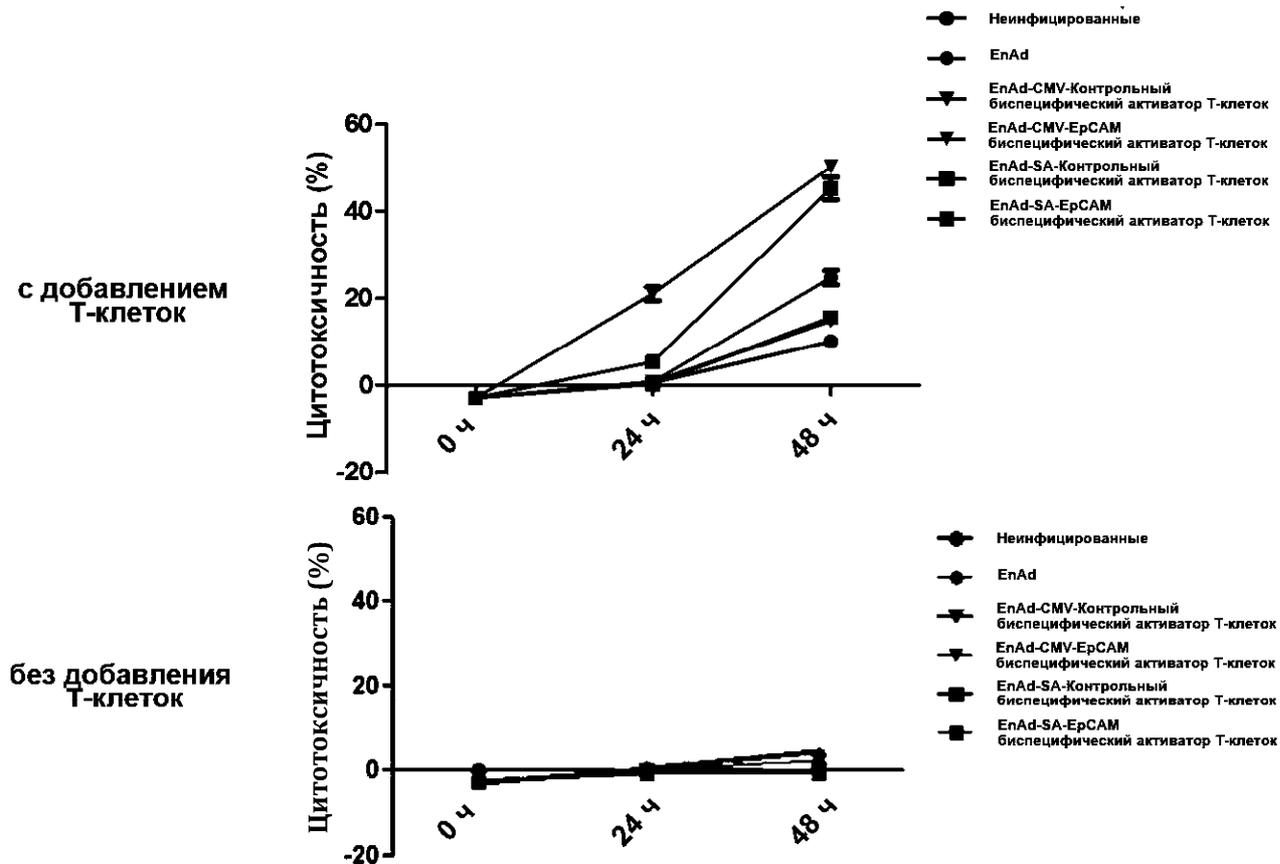


Фиг. 29

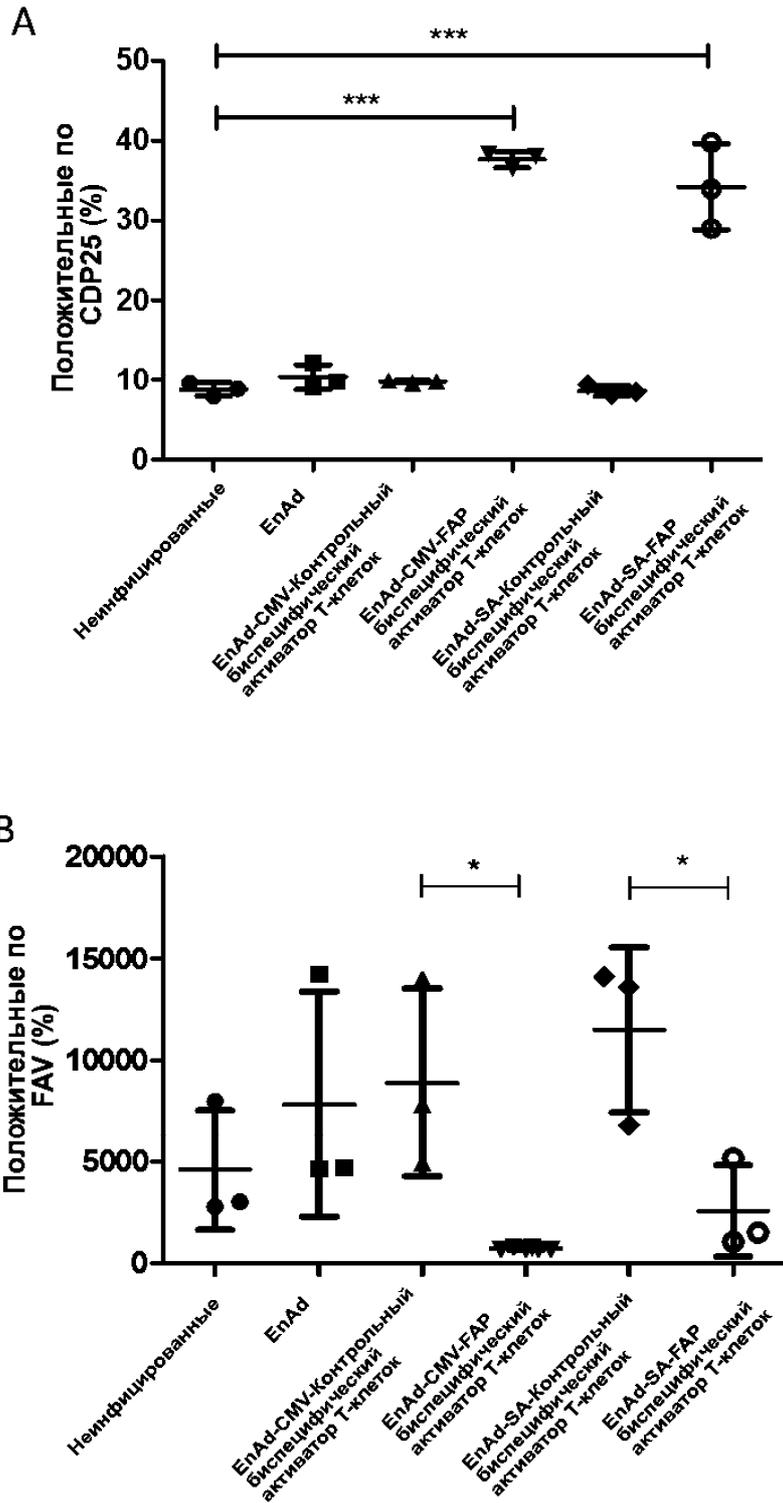


- SKOV (неокрашенные)
- NHDF (зелёный)
- Вирус с RFP (красный) MOI = 1 для CMV, 10 для SA

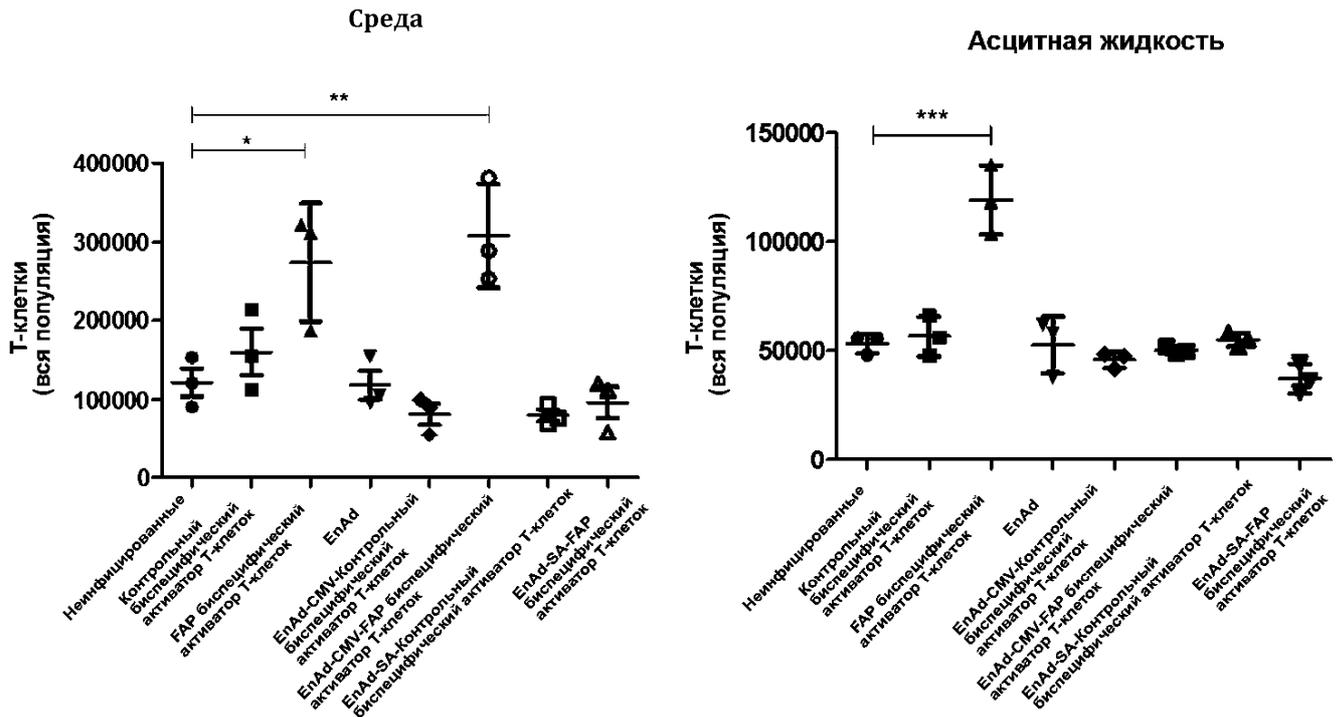
Фиг. 30



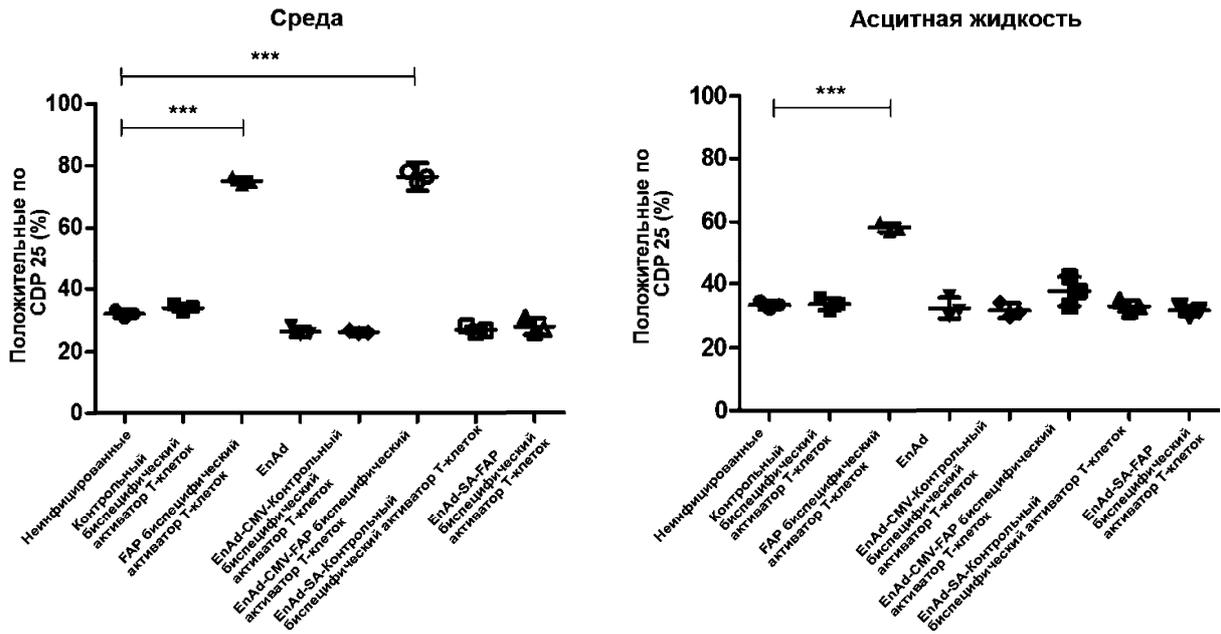
Фиг. 31



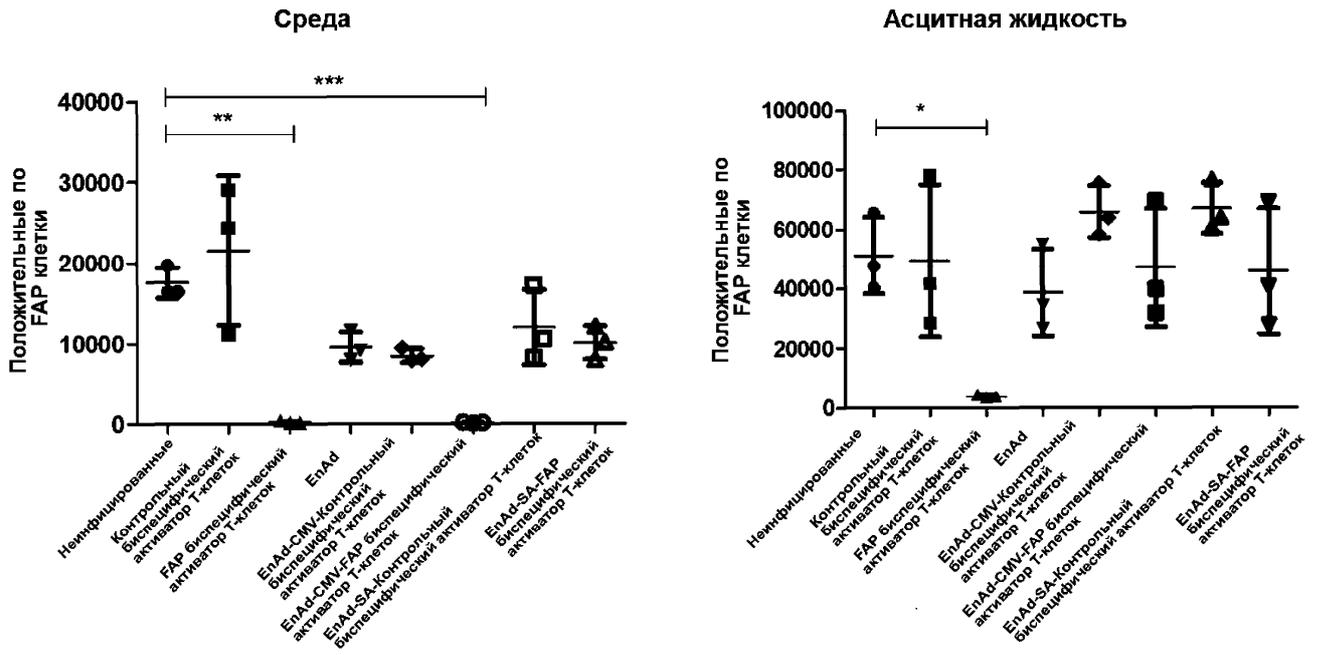
Фиг. 32



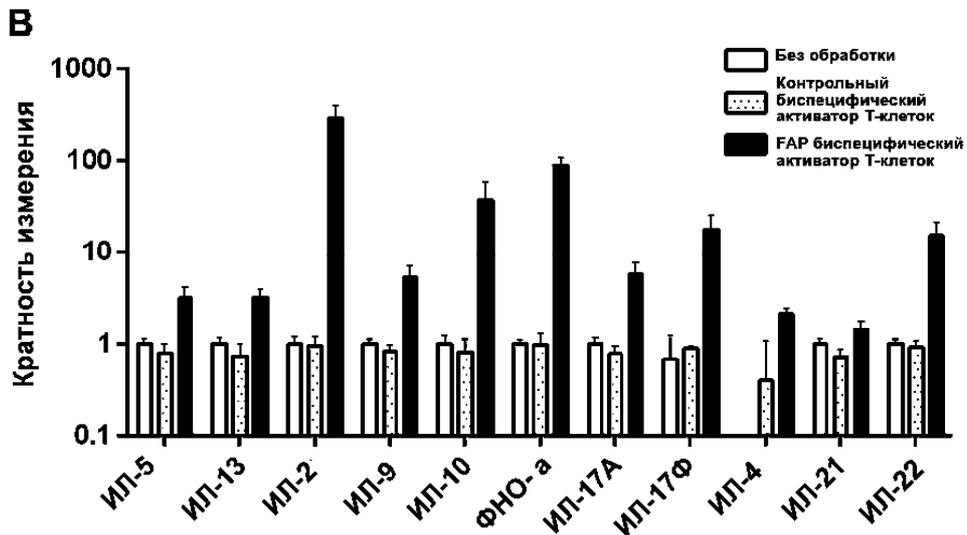
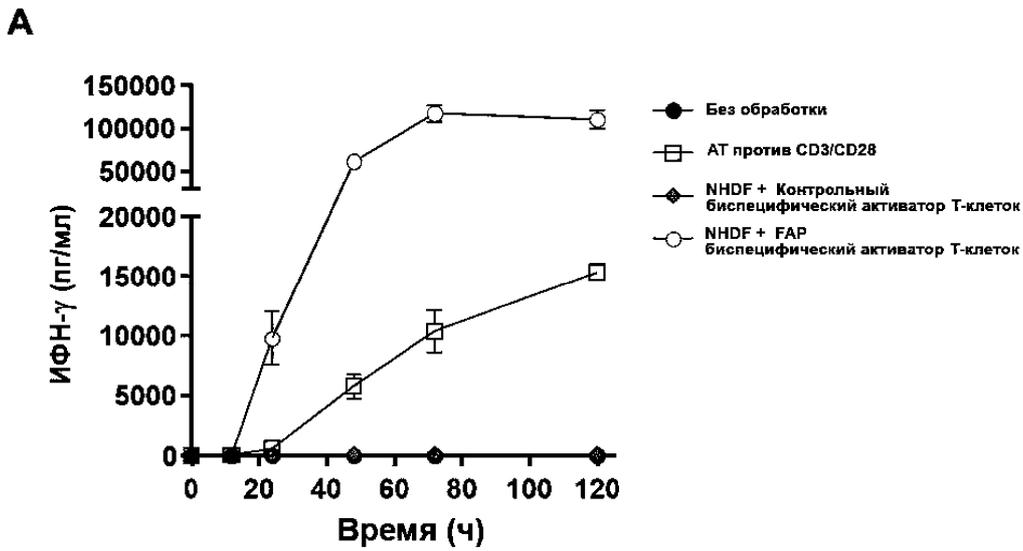
Фиг. 33



Фиг. 34

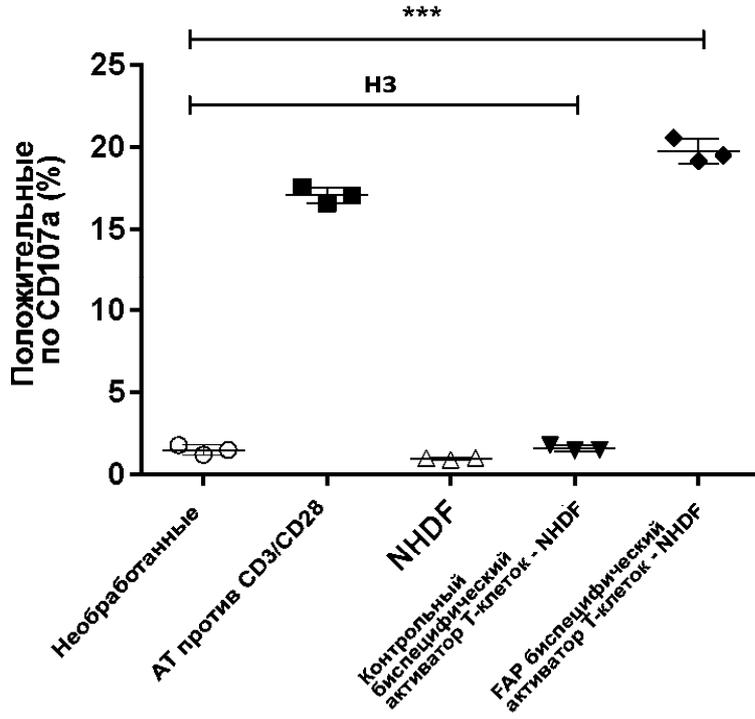


Фиг. 35

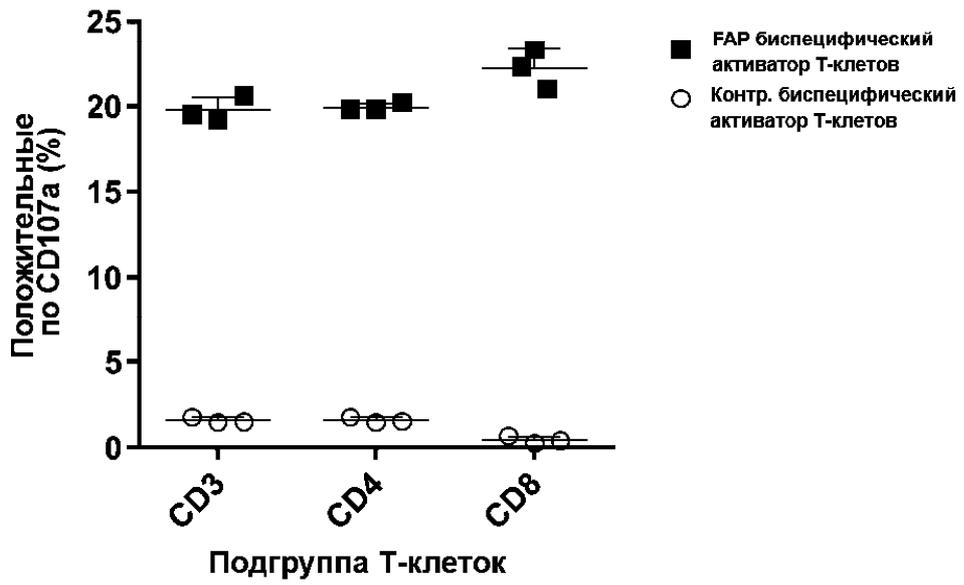


Фиг. 36

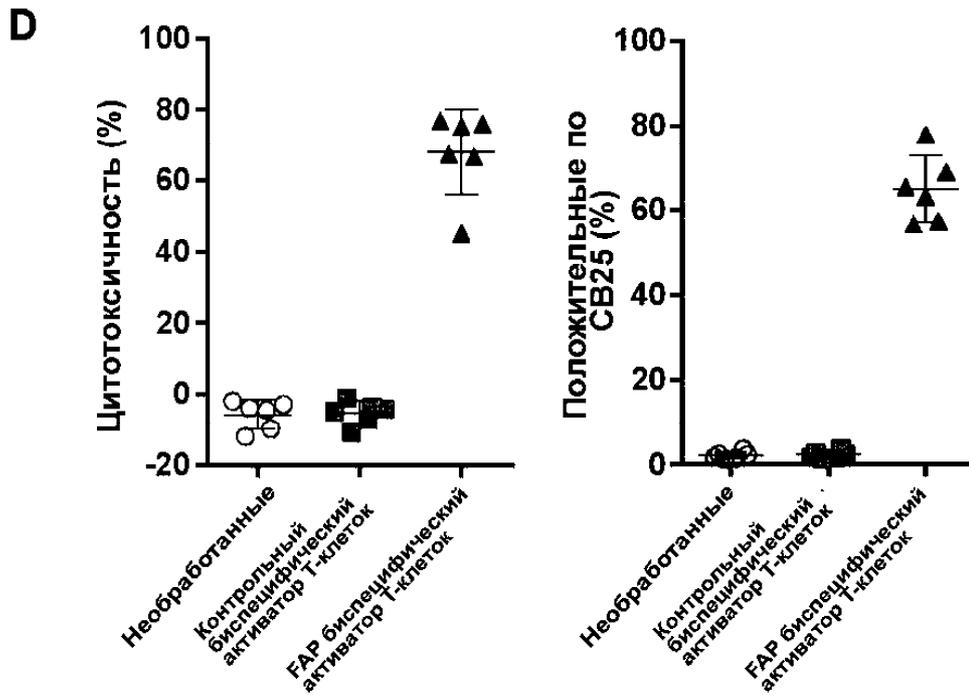
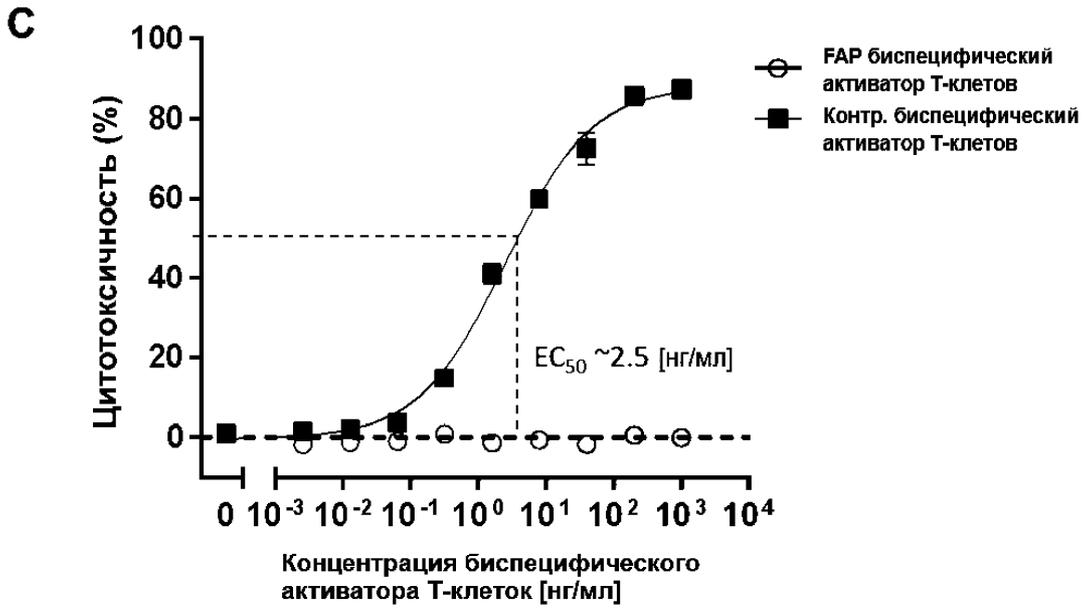
A



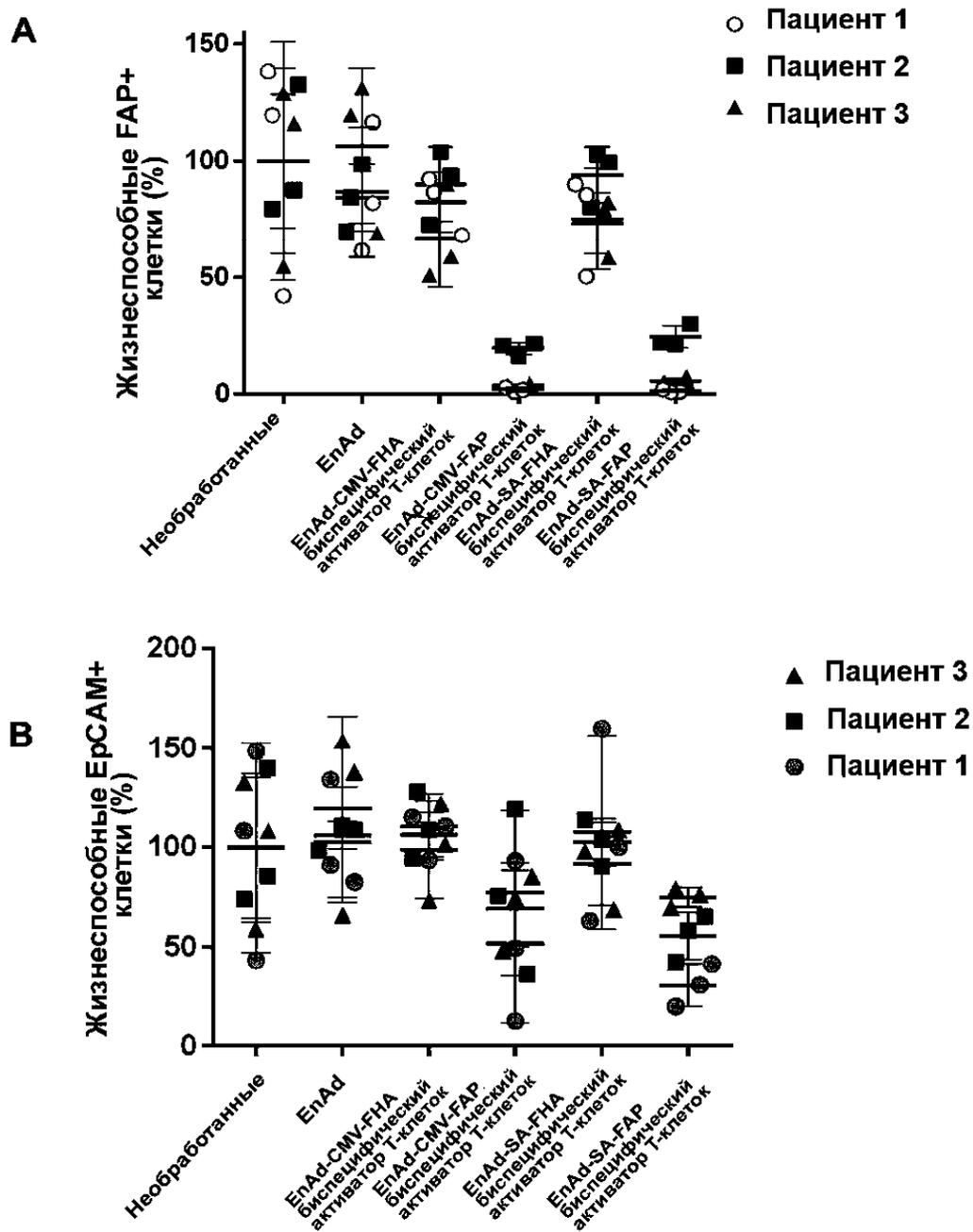
B



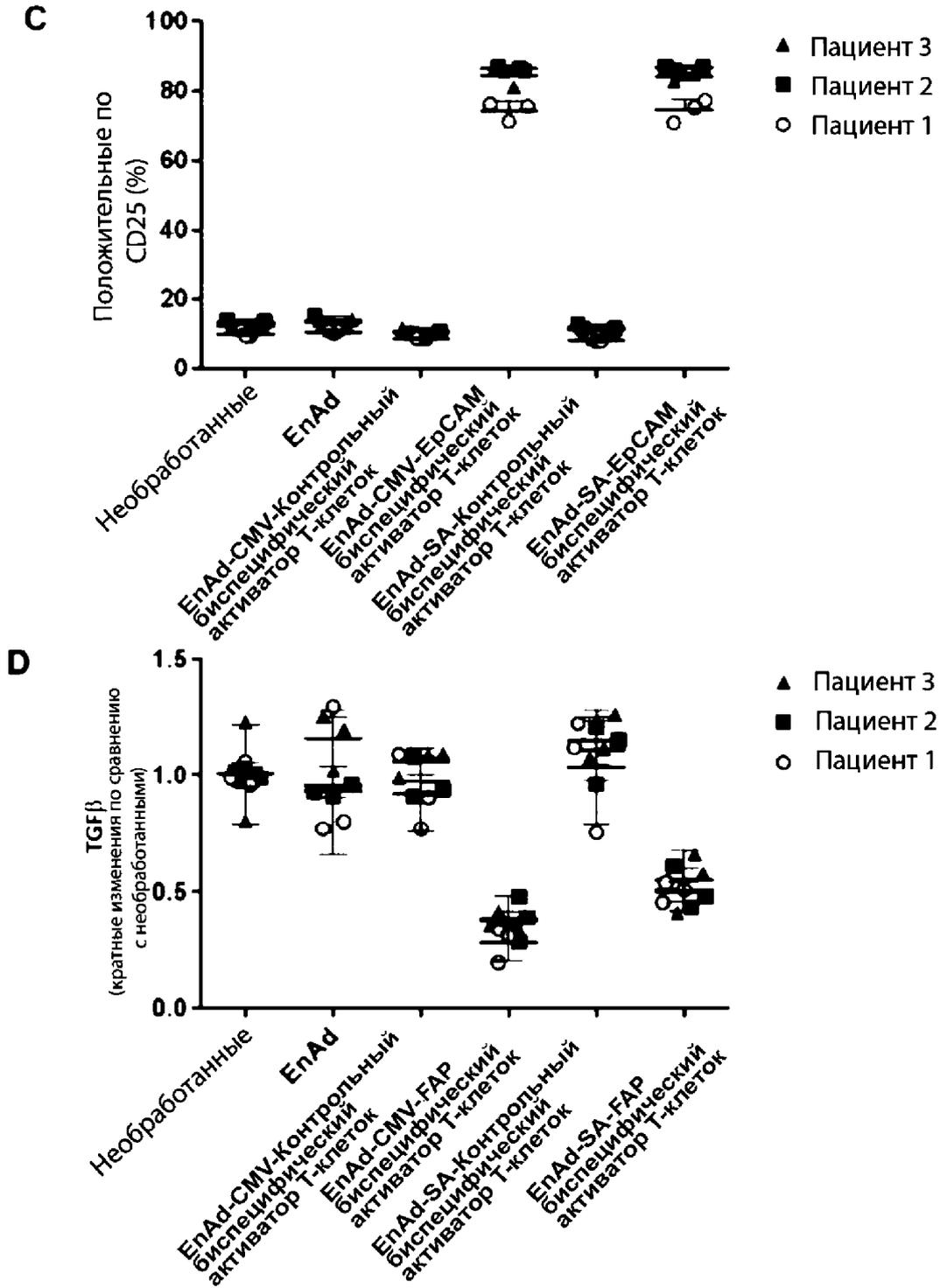
Фиг. 37



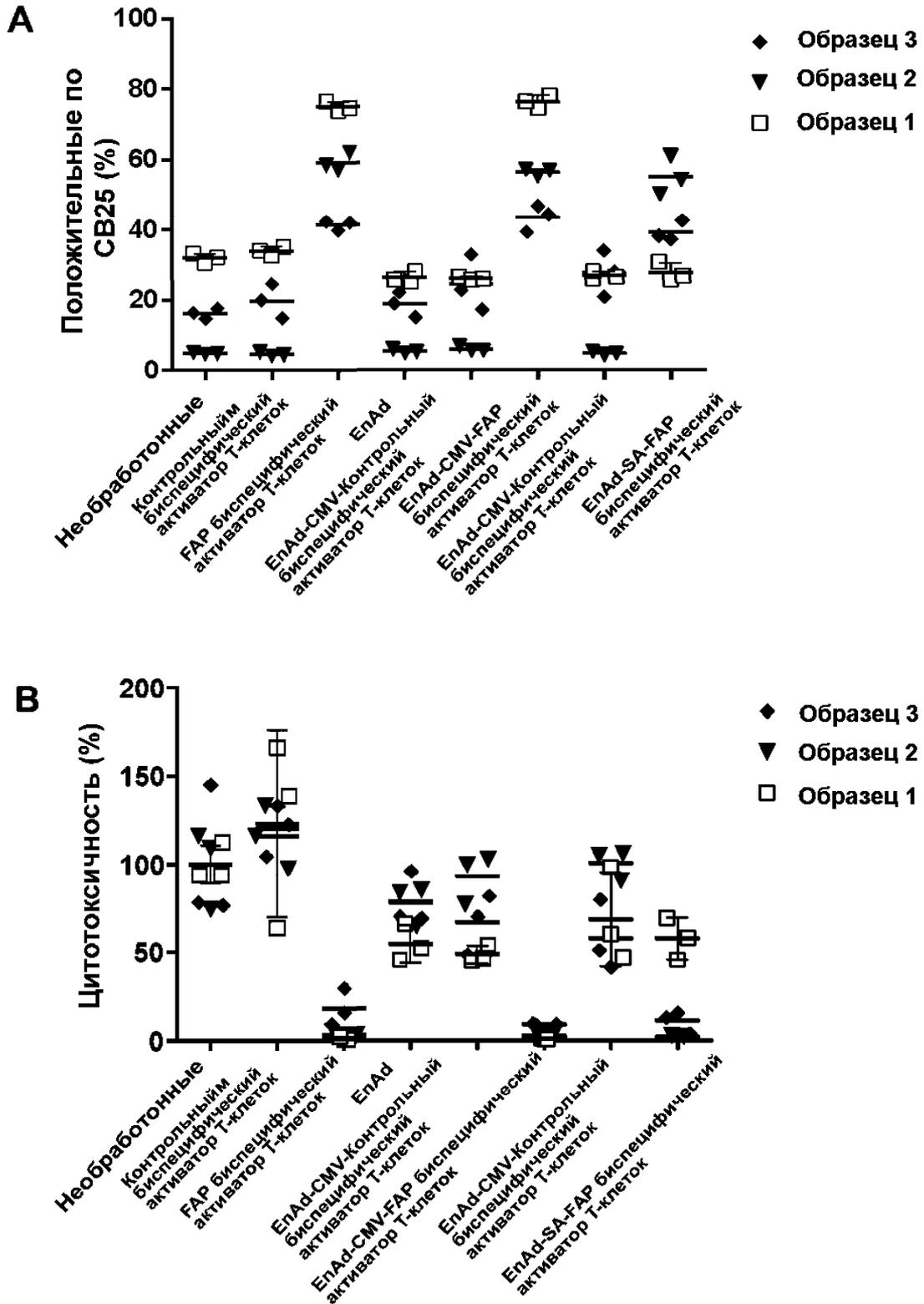
Фиг. 37, продолжение



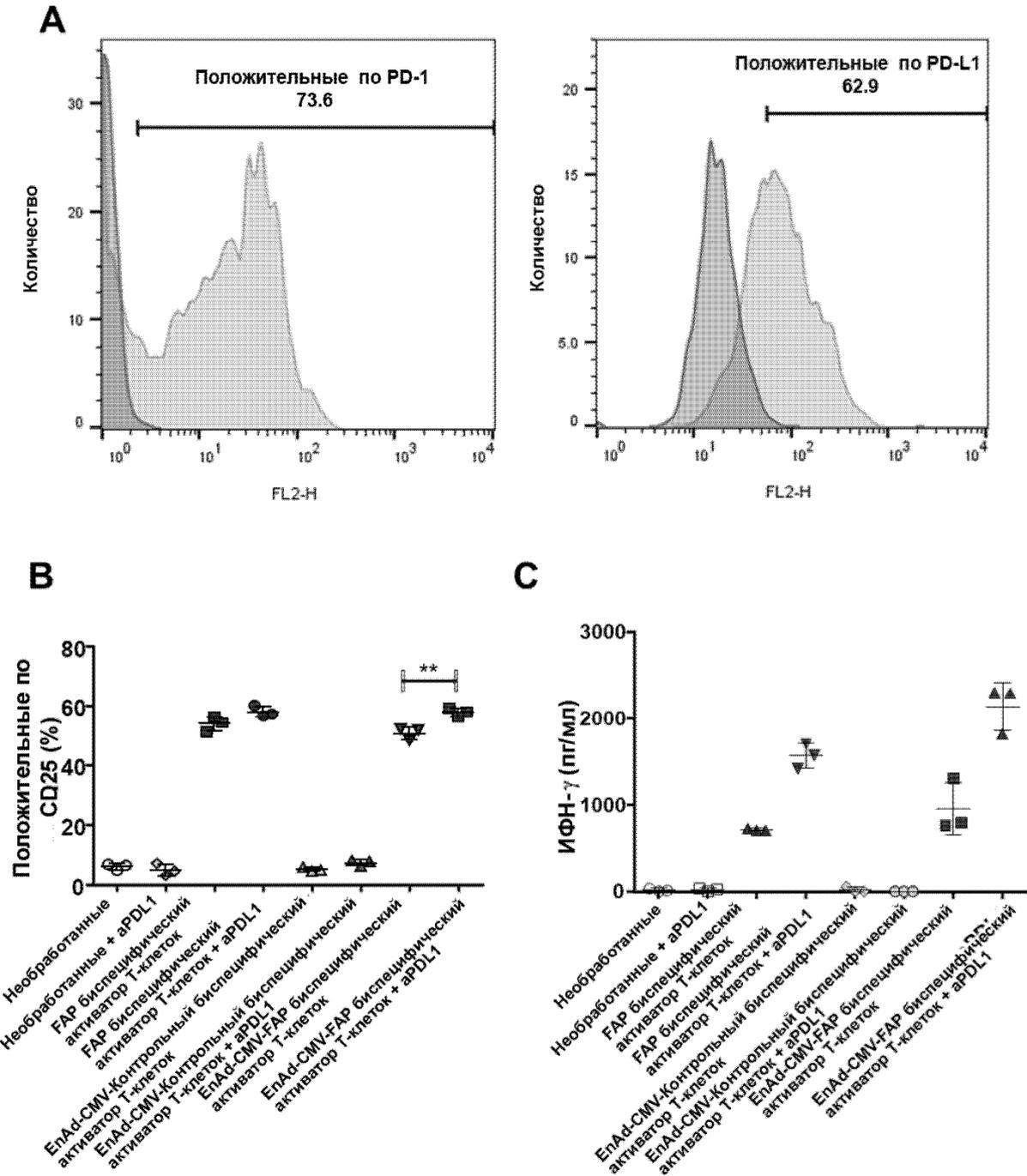
Фиг. 38



Фиг. 38, продолжение

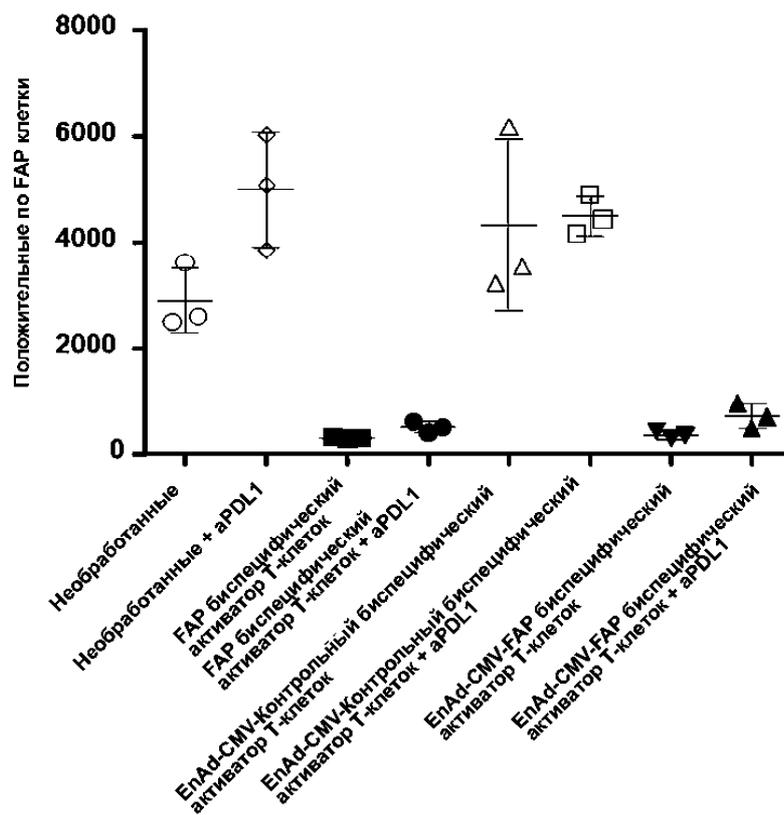


Фиг. 39

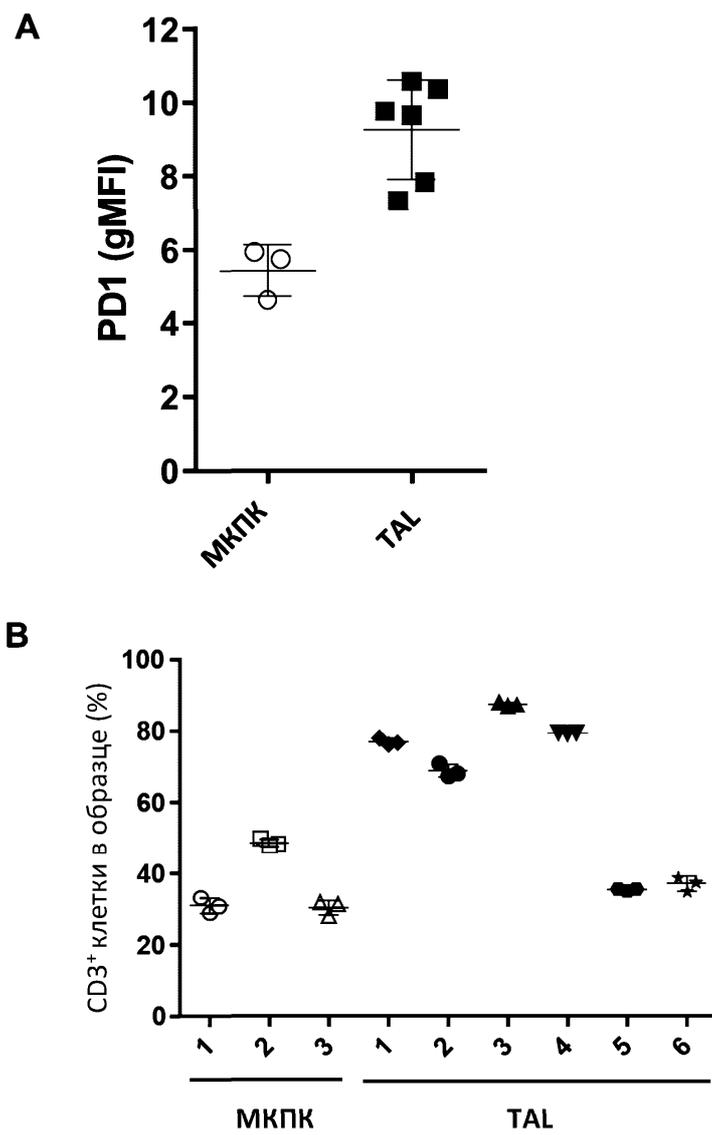


Фиг. 40

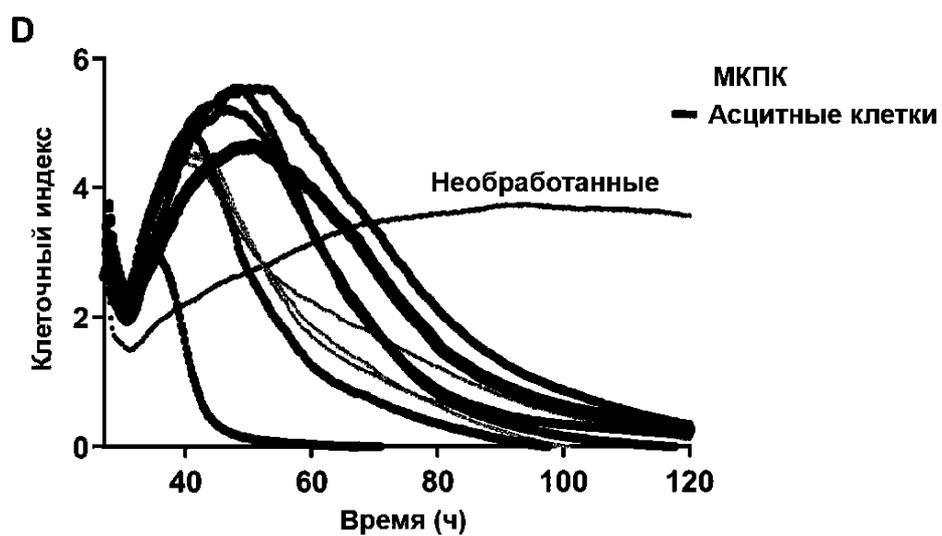
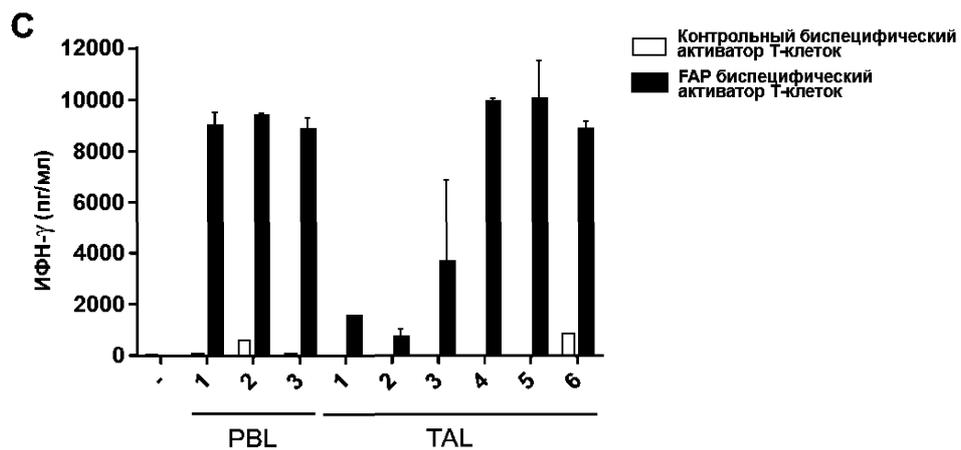
D



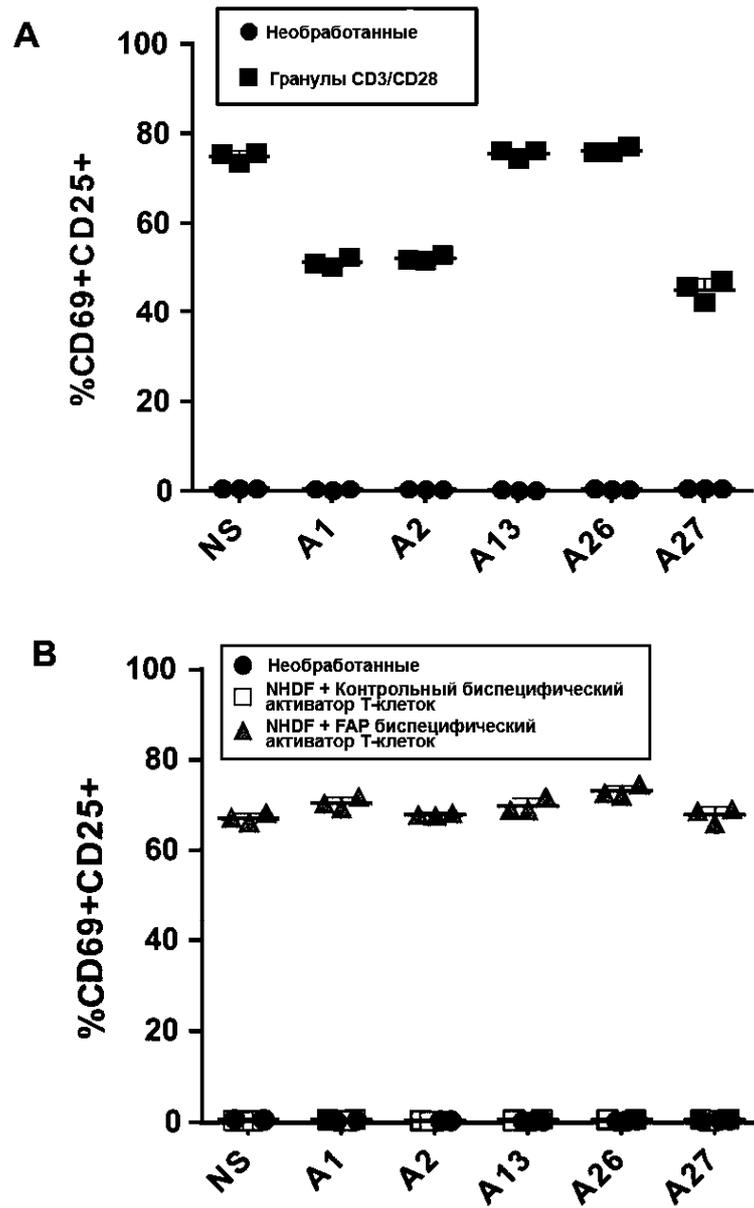
Фиг. 40, продолжение



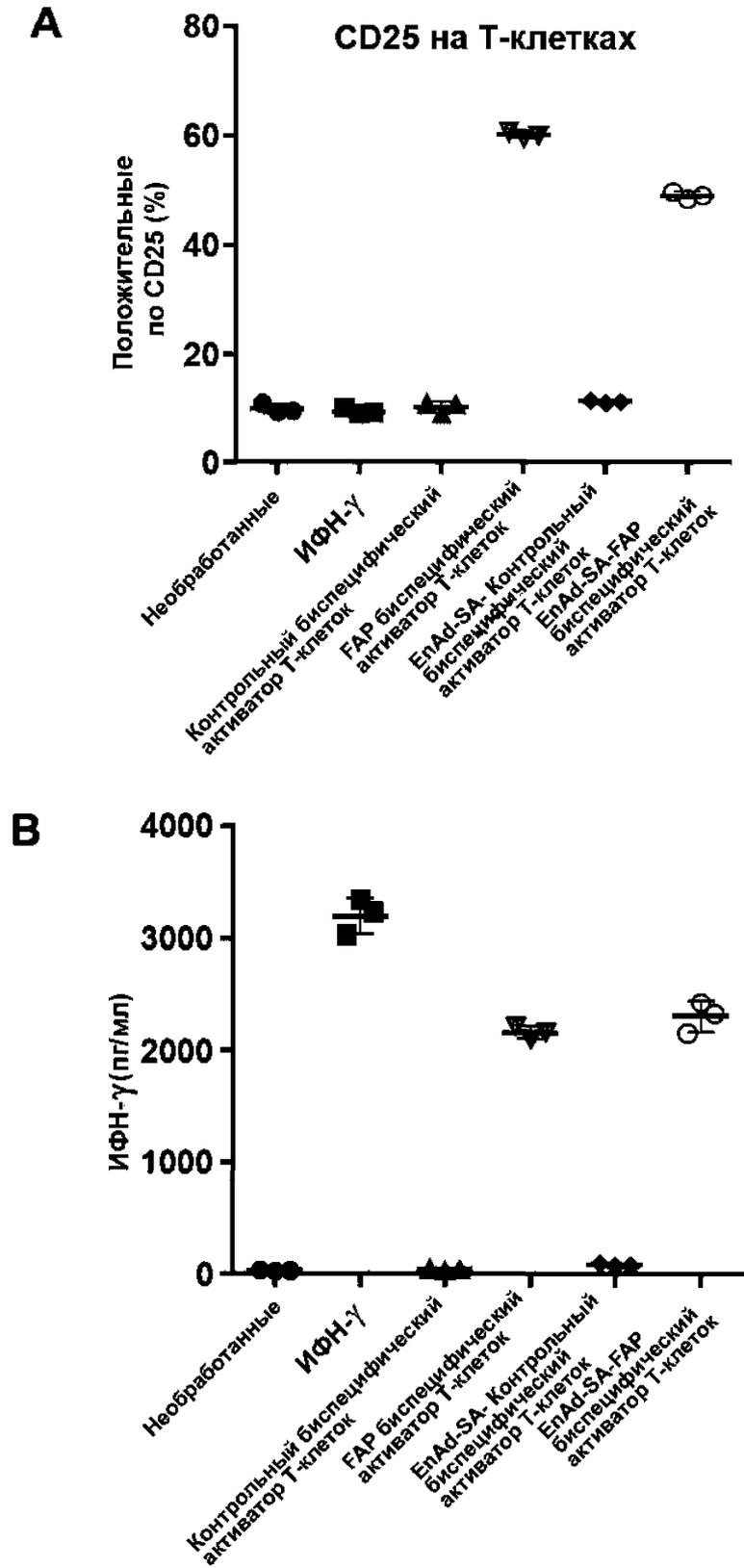
Фиг. 41



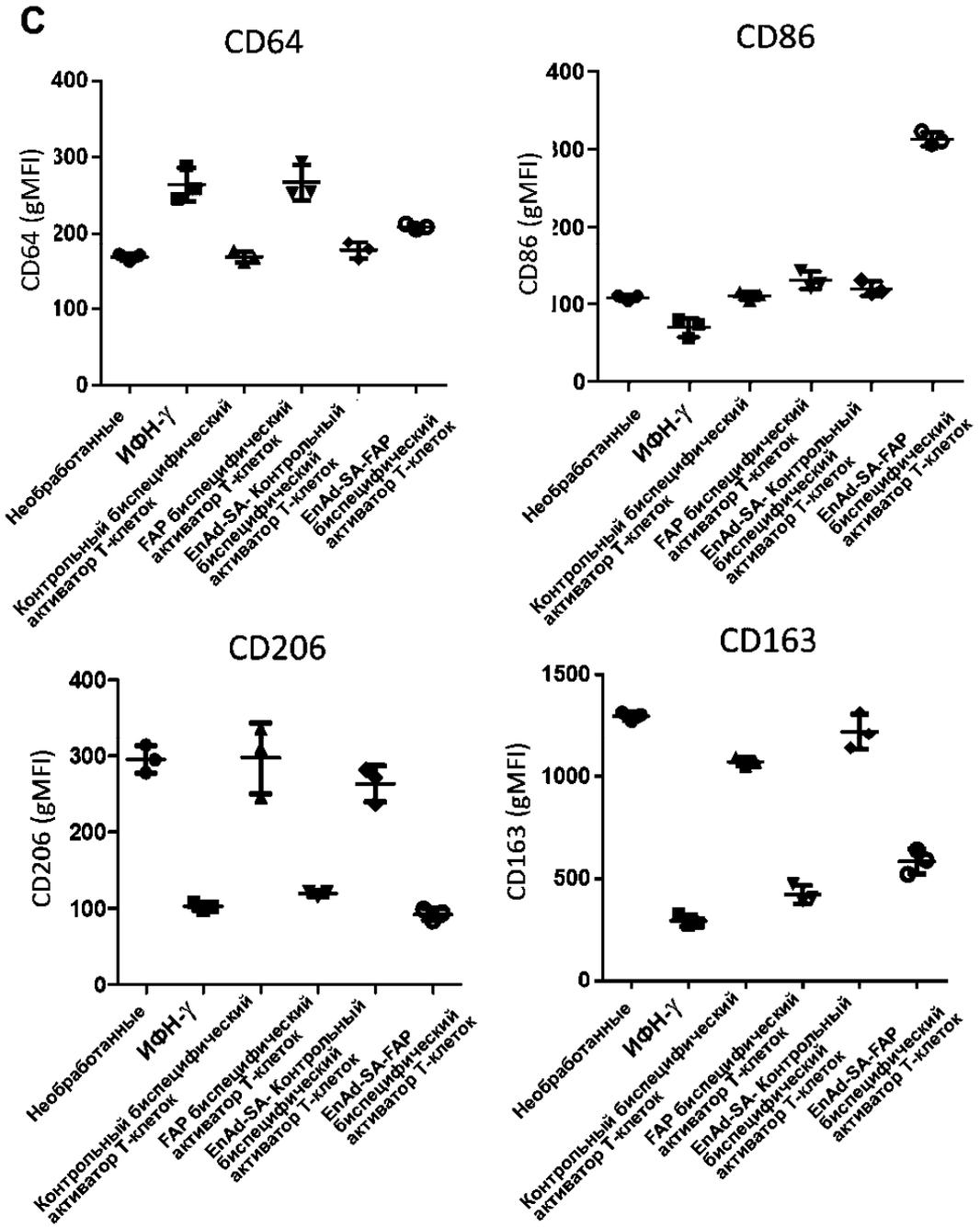
Фиг. 41, продолжение



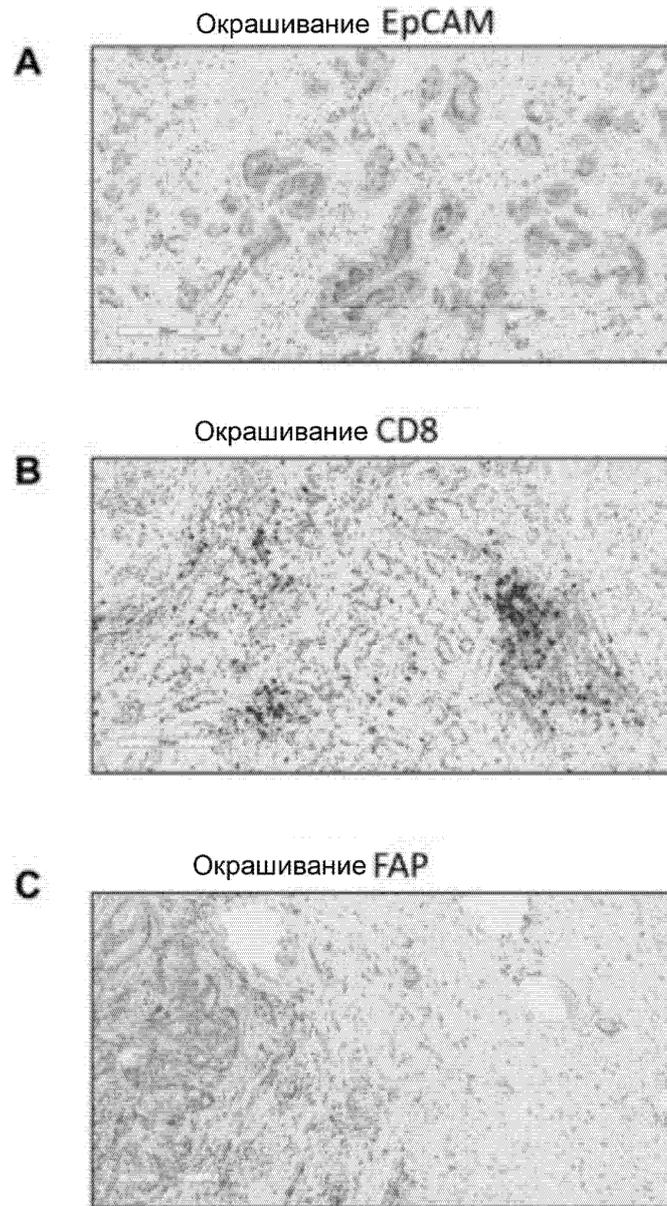
Фиг. 42



Фиг. 43



Фиг. 43, продолжение



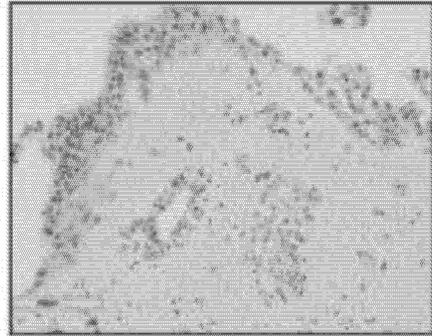
Фиг. 44

D

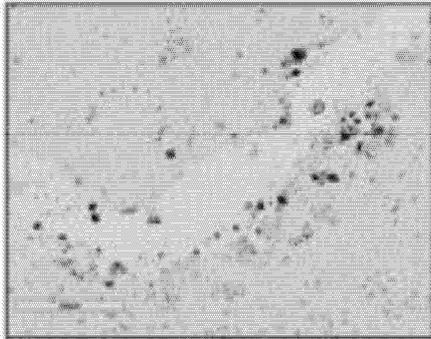
Необработанные



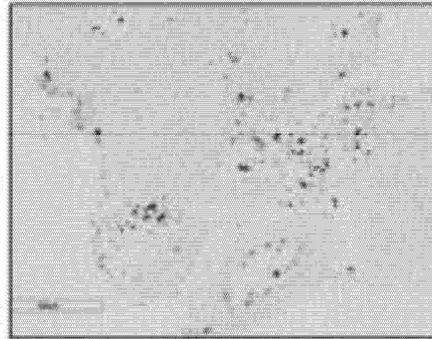
EnAd-CMV-Контрольный
биспецифический активатор Т-клеток



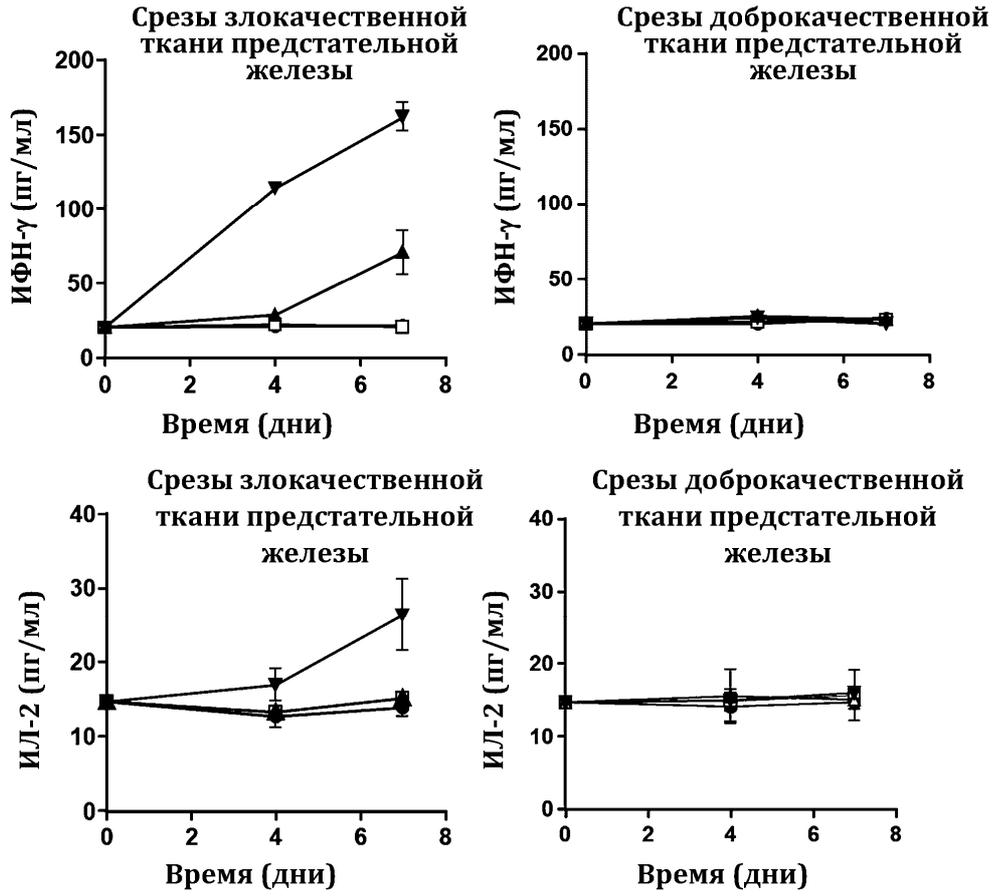
EnAd-CMV-FAP
биспецифический активатор Т-клеток



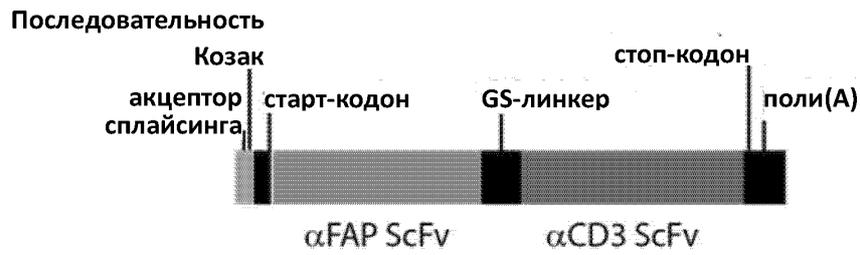
EnAd-SA-Контрольный
биспецифический активатор Т-клеток



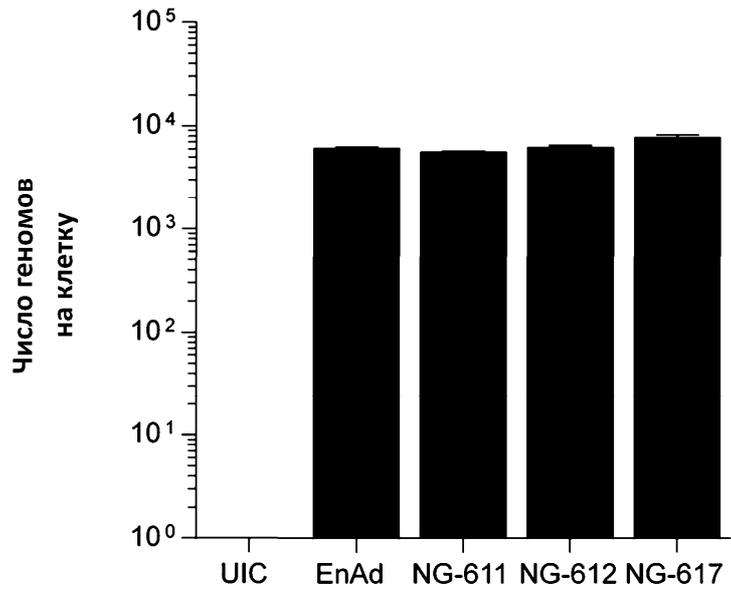
Фиг. 44, продолжение

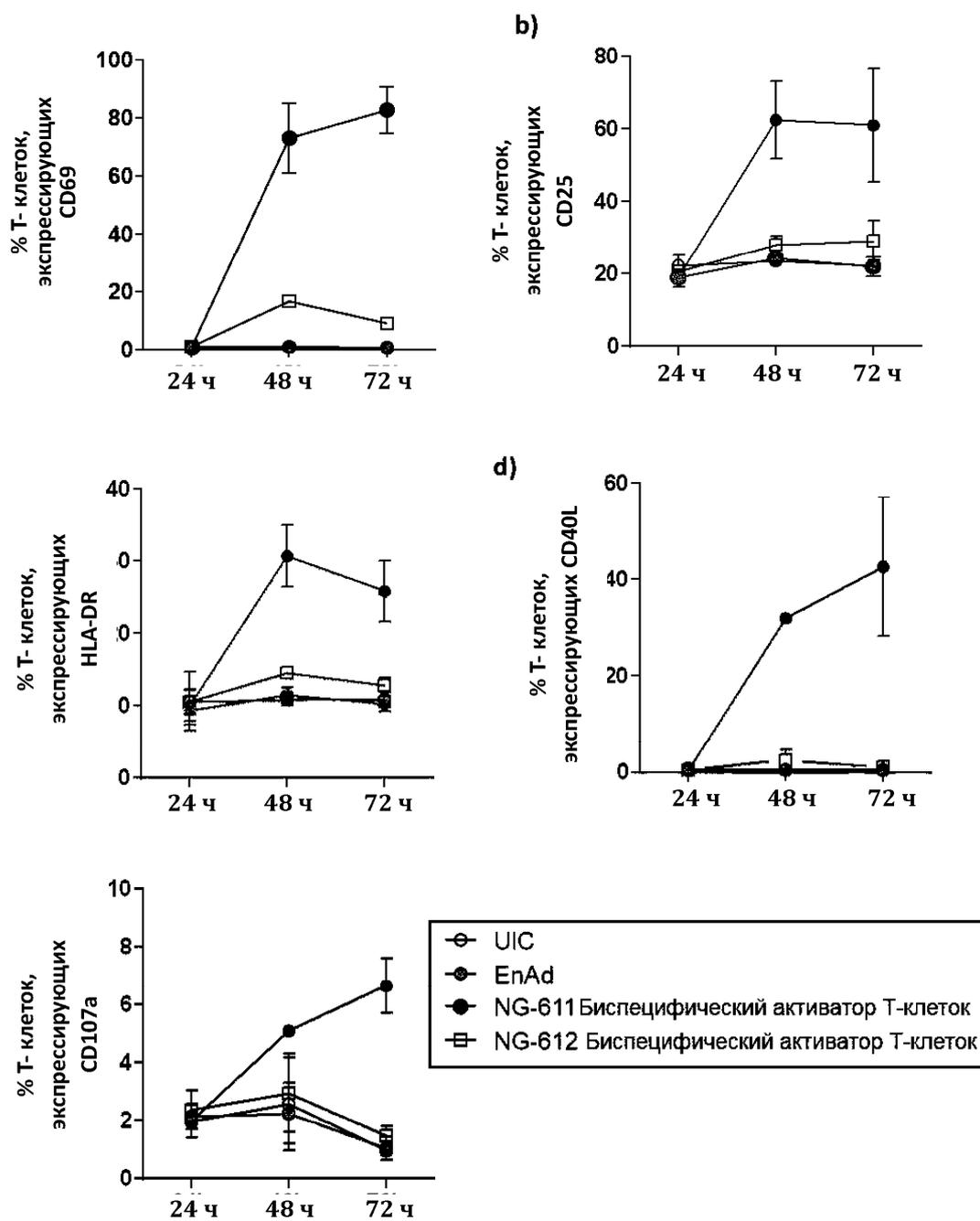


Фиг. 44, продолжение

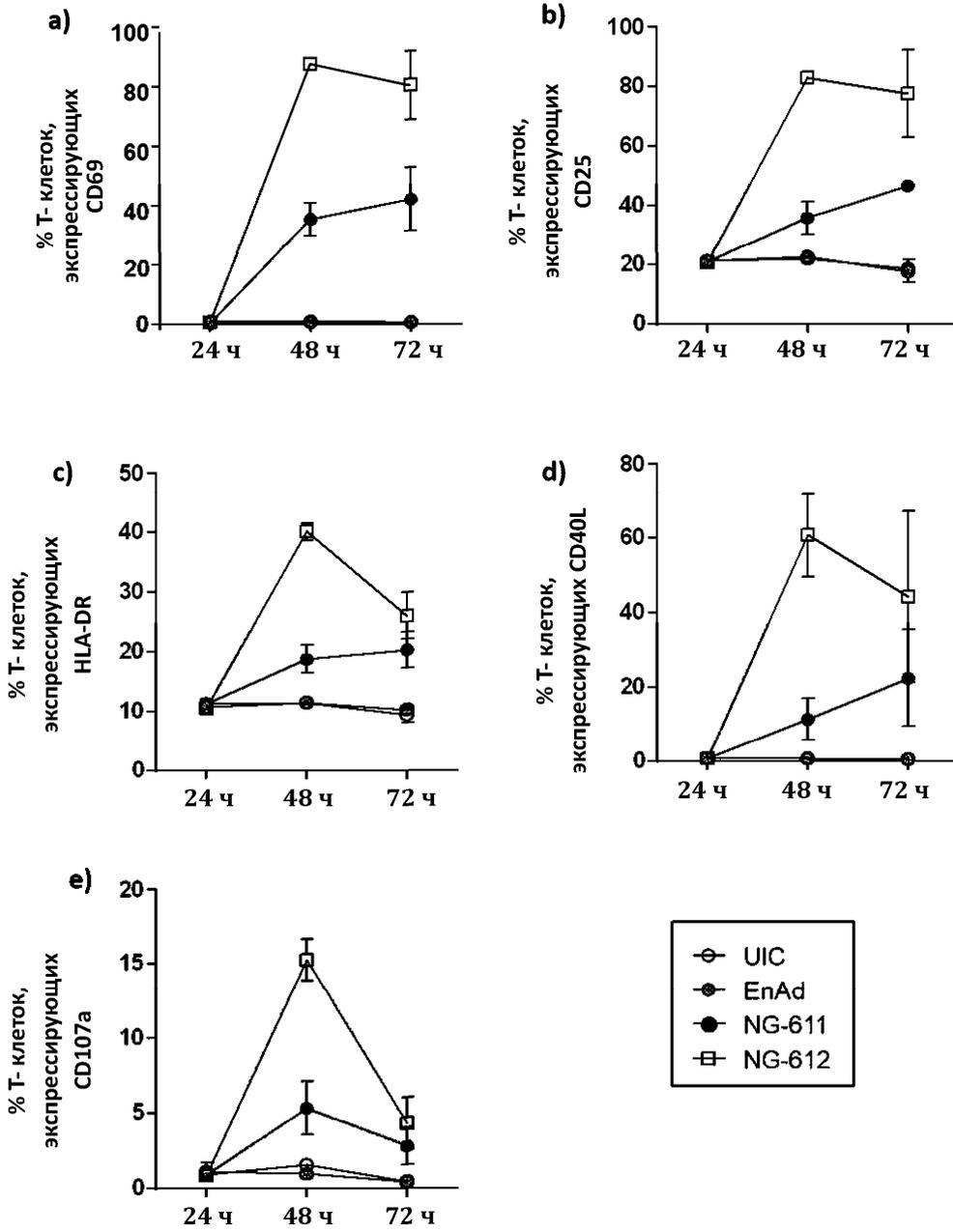


Фиг. 45

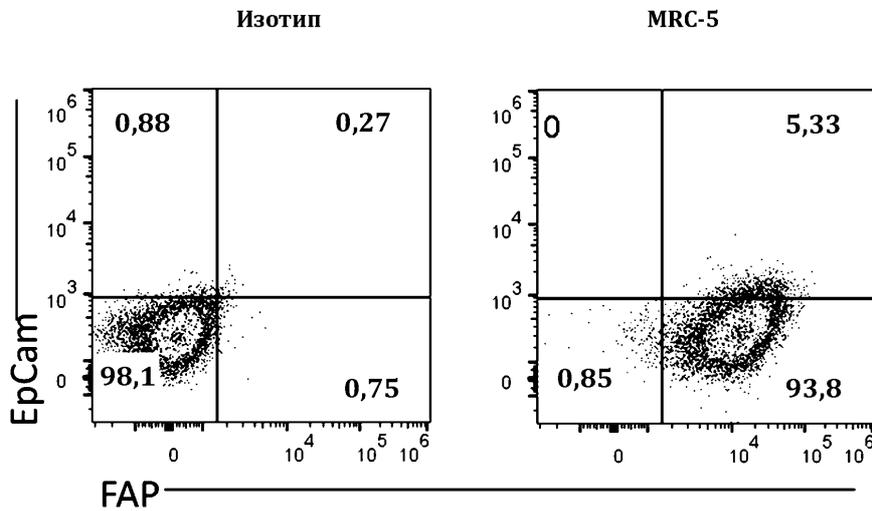




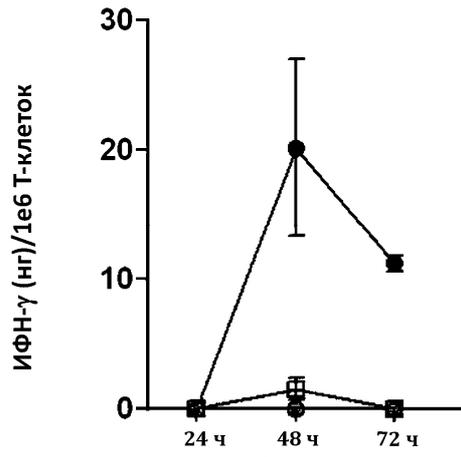
Фиг. 47



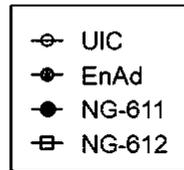
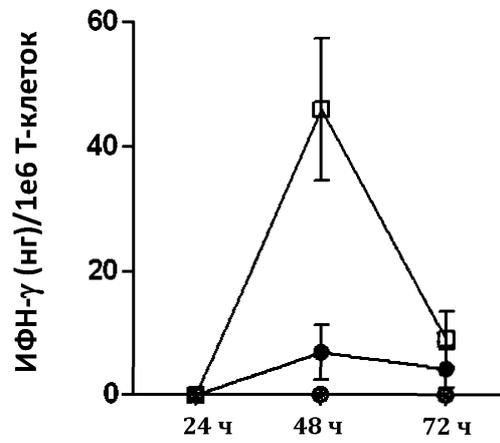
Фиг. 48



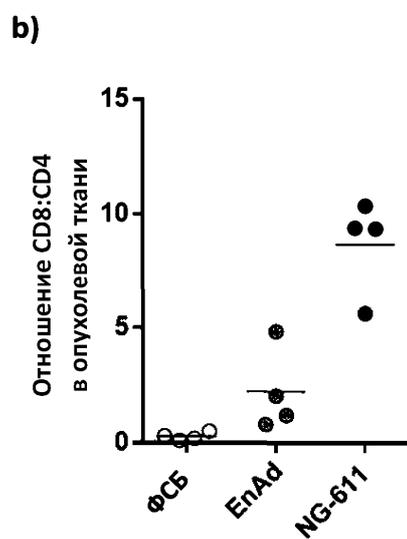
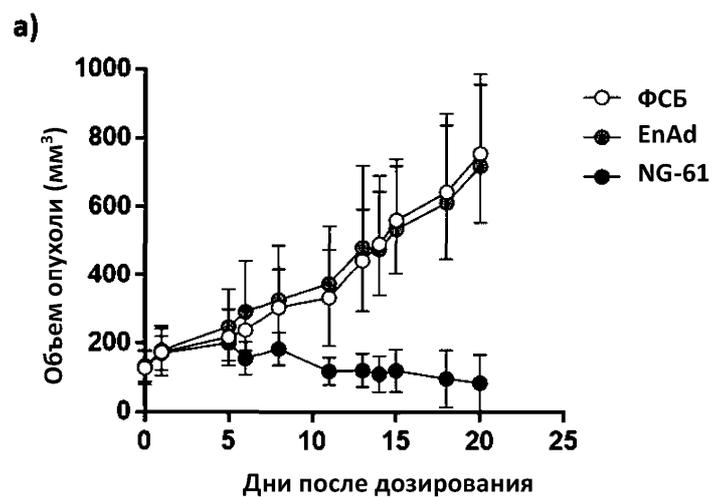
Фиг. 49



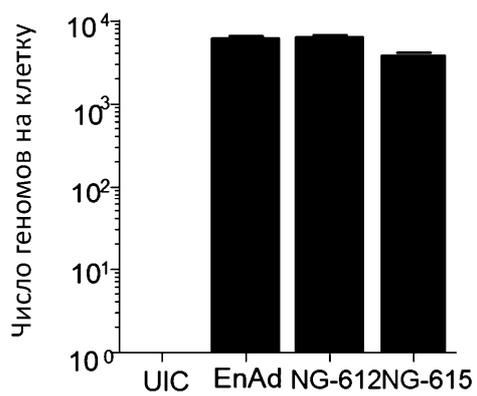
Фиг. 50А



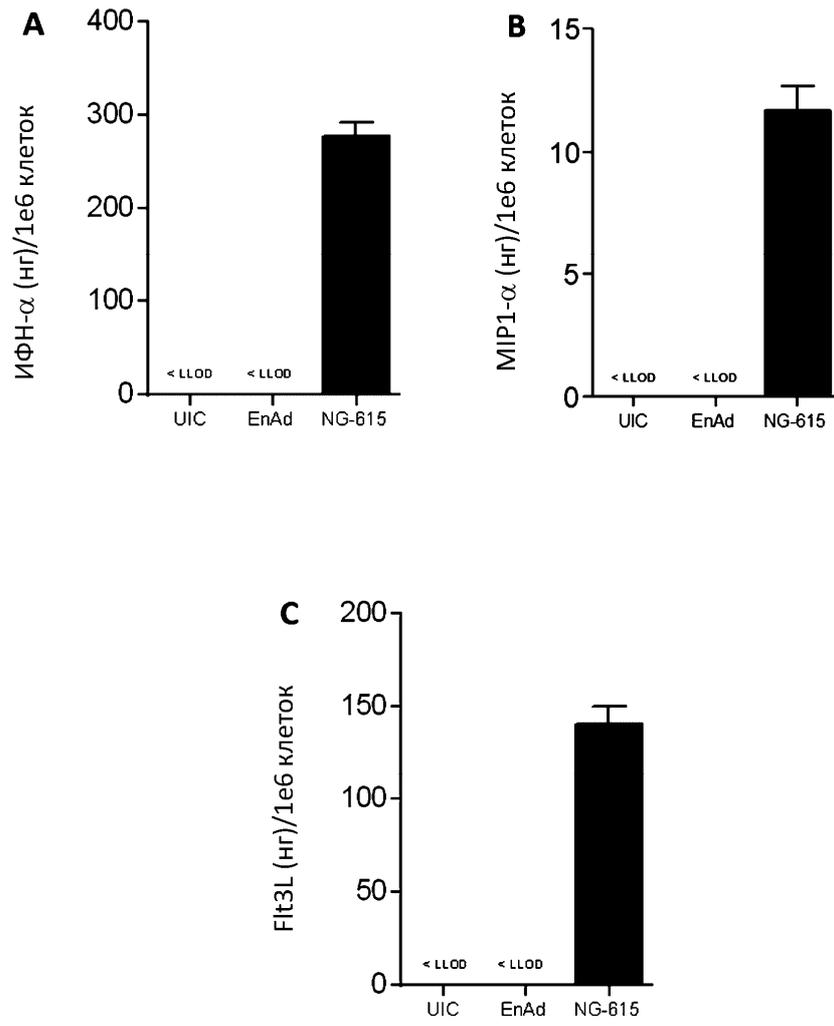
Фиг. 50В



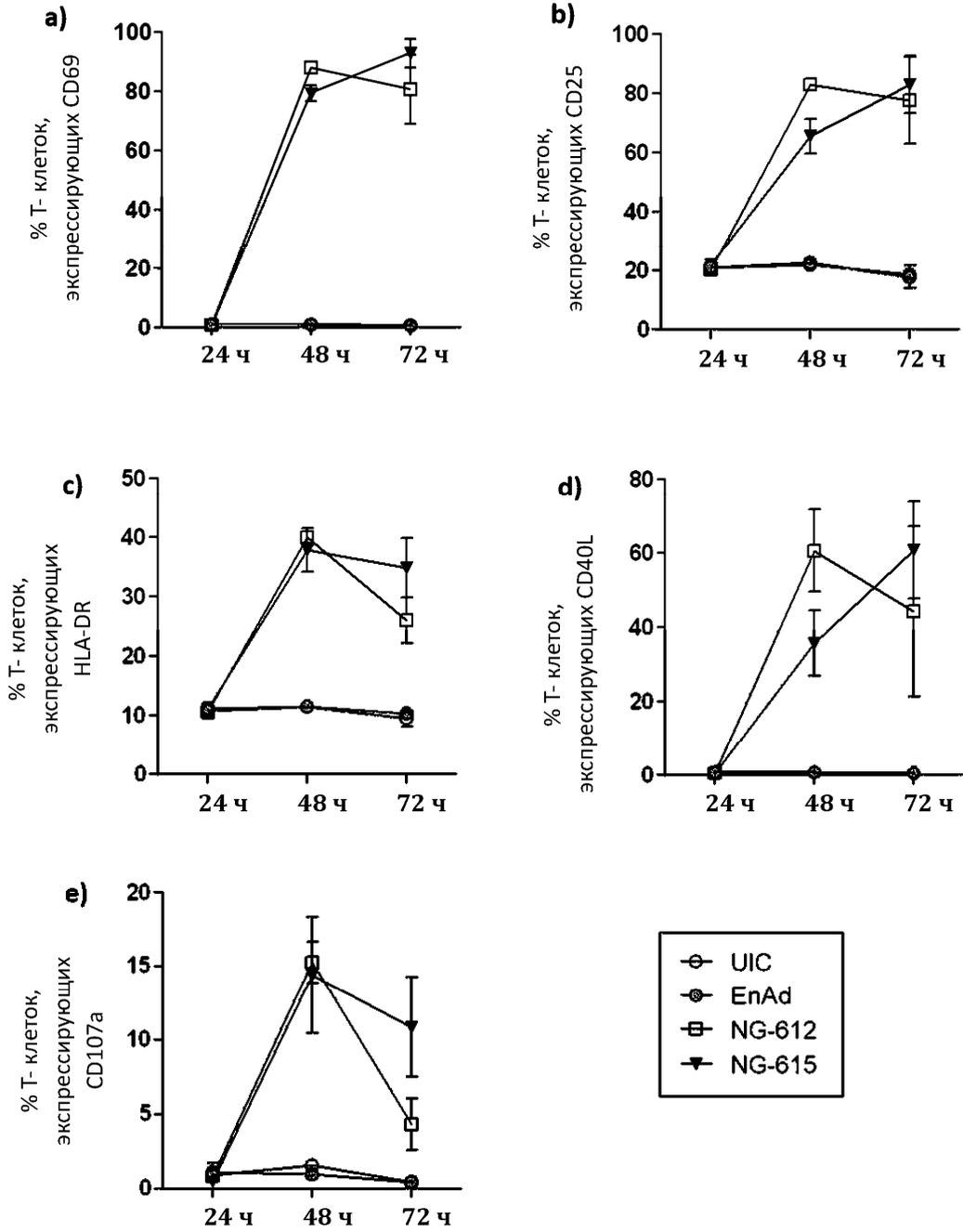
Фиг. 51



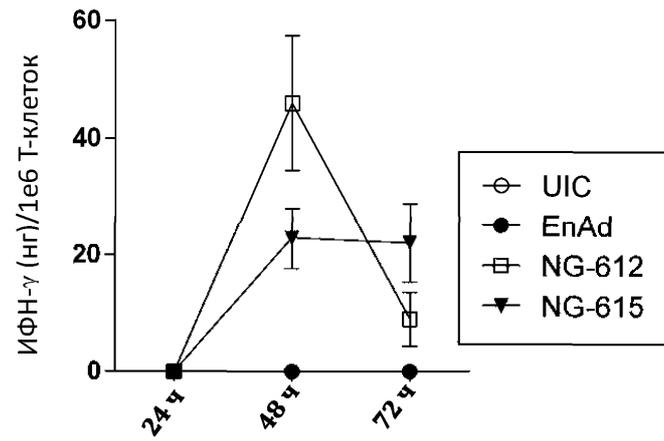
Фиг. 52



Фиг. 53



Фиг. 54



Фиг. 55

