

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202293527** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.03.28

(22) Дата подачи заявки
2021.06.02

(51) Int. Cl. *A61K 35/766* (2015.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)

(54) РЕКОМБИНАНТНЫЙ РАБДОВИРУС, КОТОРЫЙ КОДИРУЕТ Fc-СЛИТЫЙ БЕЛОК ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА CD80

(31) 20178032.7

(32) 2020.06.03

(33) EP

(86) PCT/EP2021/064728

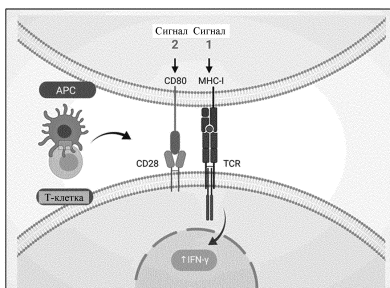
(87) WO 2021/245111 2021.12.09

(71) Заявитель:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Мюллер Филипп, Эрб Клаус, Эрльман
Патрик (DE), Вольман Гвидо (AT)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(57) Изобретение касается области онколитических вирусов, в частности рекомбинантного рабдовируса, такого как вирус везикулярного стоматита, который кодирует в его геноме Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80. Изобретение также направлено на применение рекомбинантного рабдовируса в лечении рака, а также на способы продуцирования таких вирусов.



202293527

A1

A1

202293527

РЕКОМБИНАНТНЫЙ РАБДОВИРУС, КОТОРЫЙ КОДИРУЕТ Fc-СЛИТЫЙ
БЕЛОК ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА CD80

5

Область изобретения

[0001] Настоящее изобретение относится к области онколитических вирусов, в частности, рекомбинантного рабдовируса, кодирующего в его геноме Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80. Изобретение также направлено на применение рекомбинантного рабдовируса в лечении рака и способы продуцирования таких вирусов.

10

Уровень техники

[0002] Онколитические вирусы представляют перспективный класс биологических препаратов, которые селективно реплицируются в раковых клетках и уничтожают их и способны к распространению в пределах опухолей. Попытки дальнейшего усовершенствования онколитических вирусов для повышения их терапевтического потенциала привели к выработке так называемых вооруженных вирусов, кодирующих в их геноме опухолевые антигены или иммуномодулирующие трансгены для улучшения их эффективности в лечении опухолей.

15
20

[0003] Во многих случаях существует нехватка Т-клеток в опухолях, а следовательно, существуют так называемые "иммунные пустыни" – микросреда опухолей, в которой Т-клетки иммунной системы не могут проникать или не проникают в опухоль для уничтожения неконтролируемо разрастающихся клеток. Существует предположение, что во избежание иммунологического надзора опухоли создают иммуносупрессивную микросреду путем привлечения супрессорных клеток миелоидного происхождения или секретируют факторы, включая TGF β , которые играют двойную роль в вызывании экспрессии генов внеклеточного матрикса и ингибирования экспрессии хемокинов и цитокинов, которые требуются для содействия инфильтрации Т-клеток в опухоли (Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment. Nat Rev Cancer 2013; 13: 788 – 99). Кроме того, по результатам исследований было обнаружено, что опухоли, демонстрирующие высокую экспрессию генов, которые соответствуют иммуносупрессивной микросреде, связаны с

25
30

неблагоприятными последствиями при многих типах рака, включая рак яичника и рак ободочной и прямой кишки. (Calon A, Lonardo E, Berenguer-Llargo A, Espinet E, Hernando-Momblona X, Iglesias M, et al. Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet* 2015; 47: 320 – 9; Ryner L, Guan Y, Firestein R, Xiao Y, Choi Y, Rabe C, et al. Upregulation of periostin and reactive stroma is associated with primary chemoresistance and predicts clinical outcomes in epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 2941 – 51; Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer have been linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5198 – 208). Отличительными признаками адаптивного иммунного ответа является специфичность и память. Клеточный ответ опосредуется Т-клетками, экспрессирующими рецепторы Т-клеток (TCR) клеточной поверхности, которые распознают пептидные антигены в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) на антиген-презентирующих клетках (APC). Однако взаимодействие родственных TCR только с комплексами МНС-пептида (сигнал 1) не запускает оптимальную активацию Т-клеток. Кроме сигнала 1, связывание положительных и отрицательных костимуляторных рецепторов с их родственными лигандами модулирует активацию Т-клеток. Кроме сигнала 1, связывание положительных и отрицательных костимуляторных рецепторов с их родственными лигандами модулирует активацию Т-клеток. Эта комплексная сигнальная сеть с одной стороны обеспечивает оптимальную активацию Т-клеток, при этом с другой стороны предотвращая искривленную активацию Т-клеток в физиологических условиях. CD28 (сигнал 2) является главным положительным костимуляторным рецептором на Т-клетках. При отсутствии сигнала 2 (взаимодействия CD28 с B7.1 (CD80) или B7.2 (CD86)), например, на ТАА-презентирующих опухолевых клетках, хроническое взаимодействие с ТАА-специфическими Т-клетками делает последние нереагирующими (анергическими): Т-клетка становится резистентной к сигналам даже тогда, когда TCR взаимодействует с ТАА. Эта ситуация была описана у раковых пациентов, в частности, в хронических ситуациях запущенной болезни. Однако сильная костимуляция Т-клеток может реактивировать ТАА-специфические Т-клетки у пациентов с метастатическим раком поздней стадии.

[0004] Один недавно предложенный подход предполагает применение онколитического вируса, кодирующего в его геноме белок IFN- β в качестве карго. Согласно еще одному подходу, экспрессию опухолевого антигена MAGE-A3 исследуют в клинике. Кроме распознавания подходящего и эффективного карго, экспрессия дополнительных карго из остова вируса всегда несет риск того, что она не только усилит противоопухолевую эффективность, но и противовирусный иммунитет. Следует позаботиться о том, чтобы карго не ограничивало онколитический потенциал вируса настолько, чтобы преимущество, достигнутое благодаря экспрессии терапевтического карго, нивелировалось потерей онколитической активности. Таким образом, в области существует потребность в дополнительных улучшенных вооруженных онколитических вирусах, которые могут быть применены в эффективном лечении рака. Также в области существует потребность в выборочном улучшении инфильтрации Т-клеток и/или дендритных клеток в иммуносупрессивные микросреды опухолей.

Краткое описание изобретения

[0005] Настоящее изобретение удовлетворяет вышеуказанным потребностям путем обеспечения рекомбинантного рабдовируса, такого как вирус везикулярного стоматита, кодирующий в его геноме Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, в оптимальном варианте – человеческого внеклеточного домена CD80.

[0006] Следует понимать, что также существует возможность комбинации любого варианта воплощения, касающегося конкретного аспекта, с другим вариантом воплощения, также касающегося этого конкретного аспекта, даже на разных уровнях и в разных комбинациях, включающих несколько вариантов воплощения этого конкретного аспекта.

[0007] В первом аспекте настоящее изобретение касается рекомбинантного рабдовируса, кодирующего в его геноме по меньшей мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, причем Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает внеклеточный домен CD80, а также включает Fc-домен IgG.

[0008] В одном варианте воплощения, который касается первого аспекта, Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант выбирают из группы, к которой относятся: (I) Fc-слитый белок

внечелочного домена CD80, который включает внечелочный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, (II) Fc-слитый белок внечелочного домена CD80, который включает внечелочный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внечелочный домен CD80
 5 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, (III) Fc-слитый белок внечелочного домена CD80, который включает внечелочный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (IV) Fc-слитый
 10 белок внечелочного домена CD80, который включает внечелочный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внечелочный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (V) Fc-слитый белок внечелочного домена CD80, который включает внечелочный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем
 15 внечелочный домен CD80 состоит из аминокислот 1 - 207 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 1 - 207 SEQ ID NO: 4, и Fc-домен состоит из аминокислот 208 - 433 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 208 - 433 SEQ ID NO: 4, (VI) Fc-слитый белок внечелочного домена CD80 согласно любому из пунктов (I)-(V), который также включает сигнальную пептидную последовательность, (VII) Fc-слитый белок внечелочного домена CD80, который включает SEQ ID NO: 3 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3.

25 **[0009]** В одном варианте воплощения, который касается первого аспекта, рекомбинантный рабдовирус является везикуловирусом.

[0010] В одном варианте воплощения, который касается первого аспекта, везикуловирус выбирают из группы, к которой относятся: вирус везикулярного стоматита Алагоас (VSAV), вирус Карахаса (CJSV), вирус
 30 Чандипура (CHPV), кокальный вирус (COCV), вирус везикулярного стоматита Индиана (VSIV), вирус Исфаган (ISFV), вирус Мараба (MARAV), вирус везикулярного стоматита Нью-Джерси (VSNJV) или вирус Пири (PIRYV), в оптимальном варианте вирус везикулярного стоматита Индиана (VSIV) или в оптимальном варианте вирус везикулярного стоматита Нью-Джерси (VSNJV).

[0011] В одном варианте воплощения, который касается первого аспекта, рекомбинантный рабдовирус является репликационно-компетентным.

[0012] В одном варианте воплощения, который касается первого аспекта, внеклеточный домен CD80 является человеческим внеклеточным доменом CD80.

[0013] В одном варианте воплощения, который касается первого аспекта, рекомбинантный рабдовирус является лишенным функционального гена, который кодирует гликопротеин G, и/или лишенным функционального гликопротеина G; или ген, который кодирует гликопротеин G, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP другого вируса, и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP другого вируса; или ген, который кодирует гликопротеин G, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP аренавируса, и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP аренавируса. В ещё одном оптимальном варианте воплощения ген, который кодирует гликопротеин G, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса Данденонг или вируса Мопея, и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP вируса Данденонг или вируса Мопея. В варианте, которому отдают наибольшее предпочтение, ген, который кодирует гликопротеин G, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP LCMV.

[0014] В оптимальном варианте воплощения, который касается первого аспекта, изобретение обеспечивает рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, который кодирует в его геноме по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, причем Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает внеклеточный домен CD80 и также включает Fc-домен IgG. В родственном варианте воплощения Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 выбирают из группы, к которой относятся: (I) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, (II) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, (III) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80,

который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (IV) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (V) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 состоит из аминокислот 1 - 207 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 1 - 207 SEQ ID NO: 4, и Fc-домен состоит из аминокислот 208 - 433 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 208 - 433 SEQ ID NO: 4, (VI) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 согласно любому из пунктов (I) - (V), который также включает сигнальную пептидную последовательность, или (VII) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает SEQ ID NO: 3 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3; и ген, который кодирует гликопротеин G рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP LCMV.

[0015] Во втором аспекте настоящее изобретение касается рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, который кодирует в его геноме по крайней мере нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант вируса везикулярного стоматита, причем Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает внеклеточный домен CD80 и также включает Fc-домен IgG.

[0016] В одном варианте воплощения, который касается второго аспекта, нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 7.

[0017] В одном варианте воплощения, который касается второго аспекта, фосфопротеин (P) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %
5 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 8.

[0018] В одном варианте воплощения, который касается второго аспекта, большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %
10 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 9.

[0019] В одном варианте воплощения, который касается второго аспекта, матриксный белок (M) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 10 или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %
15 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 10.

[0020] В оптимальном варианте воплощения, который касается второго аспекта, нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %
20 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 7, фосфопротеин (P) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %
25 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 8, большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %
или 99 % идентичный SEQ ID NO: 9, и матриксный белок (M) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 10 или
30 функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %
или 99 % идентичный SEQ ID NO: 10.

[0021] В одном варианте воплощения, который касается второго аспекта, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита является репликационно-компетентным.

[0022] В одном варианте воплощения, который касается второго аспекта, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита является лишенным функционального гена, который кодирует гликопротеин G, и/или лишенным функционального гликопротеина G; или ген, который кодирует гликопротеин G, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP другого вируса, и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP другого вируса; или ген, который кодирует гликопротеин G, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP LCMV.

[0023] В одном варианте воплощения, который касается второго аспекта, Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 выбирают из группы, к которой относятся: (I) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, (II) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, (III) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (IV) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (V) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 состоит из аминокислот 1 - 207 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 1 - 207 SEQ ID NO: 4, и Fc-домен состоит из аминокислот 208 - 433 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с

аминокислотами 208 - 433 SEQ ID NO: 4, (VI) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 согласно любому из пунктов (I) - (V), который также включает сигнальную пептидную последовательность, или (VII) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает SEQ ID NO: 3 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3.

[0024] В оптимальном варианте воплощения, который касается второго аспекта, изобретение обеспечивает рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, который кодирует в его геноме нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, причем Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает внеклеточный домен CD80 и также включает Fc-домен IgG и является выбранным из группы, к которой относятся: (I) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, (II) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, (III) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (IV) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (V) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 состоит из аминокислот 1 - 207 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 1 - 207 SEQ ID NO: 4, и Fc-домен состоит из аминокислот 208 - 433 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 208 - 433 SEQ ID NO: 4, (VI) Fc-слитый белок внеклеточного

домена CD80 согласно любому из пунктов (I) - (V), который также включает сигнальную пептидную последовательность, или (VII) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает SEQ ID NO: 3 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3; причем ген, который кодирует гликопротеин G вируса везикулярного стоматита, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP LCMV, и нуклеопротеин (N) включает аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 7, фосфопротеин (P) включает аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 8, большой белок (L) включает аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 9, и матриксный белок (M) включает аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 10 или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 10.

[0025] В третьем аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, которая характеризуется тем, что композиция включает рекомбинантный рабдовирус в соответствии с первым аспектом или любым из вариантов его воплощения или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита в соответствии со вторым аспектом или любым из вариантов его воплощения.

[0026] У четвертом аспекте настоящее изобретение обеспечивает рекомбинантный рабдовирус в соответствии с первым аспектом или любым из вариантов его воплощения или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита в соответствии со вторым аспектом или любым из вариантов его воплощения или фармацевтическую композицию в соответствии с третьим аспектом или

любым из вариантов его воплощения для применения в качестве лекарственного средства.

5 [0027] В одном варианте воплощения, который касается четвертого аспекта, изобретение обеспечивает рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическую композицию для применения в лечении рака, в оптимальном варианте солидного рака. В оптимальном варианте воплощения солидный рак является выбранным из перечня, который включает: опухоль репродуктивных органов, опухоль яичника, опухоль поджелудочной железы, опухоль яичка, эндокринную опухоль, 10 желудочно-кишечную опухоль, опухоль печени, опухоль почек, опухоль толстой кишки, колоректальную опухоль, опухоль мочевого пузыря, опухоль предстательной железы, опухоль кожи, меланому, опухоль дыхательных путей, опухоль легких, опухоль молочной железы, опухоль головы и шеи, плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC) и опухоль костей.

15 [0028] В одном варианте воплощения, который касается четвертого аспекта, рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция являются предназначенными для внутриопухолевого или внутривенного введения. В другом родственном варианте воплощения рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция являются 20 предназначенными для по крайней мере одноразового внутриопухолевого введения с последующим внутривенным введением. В ещё одном родственном варианте воплощения последующее внутривенное введение рекомбинантного рабдовируса, рекомбинантного вируса везикулярного стоматита или 25 фармацевтической композиции осуществляют через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или 31 день после начального внутриопухолевого введения.

30 [0029] В пятом аспекте настоящее изобретение обеспечивает композицию, которая включает рекомбинантный рабдовирус в соответствии с первым аспектом или любым из вариантов его воплощения или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита в соответствии со вторым аспектом или любым

из вариантов его воплощения, а также ингибитор, причем ингибитор является ингибитором пути PD-1 или миметиком SMAC.

[0030] В одном варианте воплощения, который касается пятого аспекта, ингибитор пути PD-1 является антагонистическим антителом, направленным против PD-1 или PD-L1. В ещё одном родственном варианте воплощения миметик SMAC является выбранным из группы, которая состоит из любого из соединений с 1 по 26 из таблицы 2 или фармацевтически приемлемой соли одного из этих соединений. В другом родственном варианте воплощения ингибитор пути PD-1 является антагонистом, выбранным из группы, которая состоит из пембролизумаба, ниволумаба, пидилизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, PDR-001, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5 (как показано в Таблице 1). В варианте воплощения, которому отдают наибольшее предпочтение, ингибитором пути PD-1 является BI-754091.

[0031] В шестом аспекте настоящее изобретение обеспечивает комплект частей, который включает: рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическую композицию, как определено в любом из аспектов с первого по третий или любом из вариантов их воплощения, и ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC, как определено в любом из вариантов воплощения, которые касаются пятого аспекта.

[0032] У седьмом аспекте настоящее изобретение обеспечивает комбинированное лечение, которое включает: а) рекомбинантный рабдовирус в соответствии с первым аспектом или любым из вариантов его воплощения или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита в соответствии со вторым аспектом или любым из вариантов его воплощения или фармацевтическую композицию в соответствии с третьим аспектом или любым из вариантов его воплощения и б) ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC. В одном варианте воплощения, который касается седьмого аспекта, а) и б) вводят одновременно, последовательно или поочередно. В родственном варианте воплощения а) и б) вводят разными путями. В ещё одном родственном варианте воплощения а) вводят внутриопухолево, а б) вводят внутривенно.

[0033] В одном варианте воплощения, который касается седьмого аспекта, ингибитор пути PD-1 является антагонистическим антителом, направленным против PD-1 или PD-L1. В родственном варианте воплощения ингибитор пути PD-1 выбирают из группы, которая состоит из пембролизумаба,

ниволумаба, пидилизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, PDR-001, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5 (см. Таблицу 1). В ещё одном родственном варианте воплощения миметик SMAC является выбранным из группы, которая состоит из любого из соединений с 1 по 26 согласно с Таблицей 2 или
5 фармацевтически приемлемой соли одного из этих соединений.

[0034] В восьмом аспекте изобретение обеспечивает продуцирующую вирус клетку, которая характеризуется тем, что клетка продуцирует рекомбинантный рабдовирус в соответствии с первым аспектом или любым из вариантов его воплощения или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита
10 в соответствии со вторым аспектом или любым из вариантов его воплощения.

[0035] В одном варианте воплощения, который касается восьмого аспекта, продуцирующей вирус клеткой является клетка Vero, клетка НЕК, клетка НЕК293, клетка яичника китайского хомячка (СНО) или клетка почки новорожденного хомяка (ВНК).

[0036] В девятом аспекте изобретение обеспечивает способ продуцирования рекомбинантного рабдовируса в культуре клеток:

(I) инфицирование клетки-хозяина рекомбинантным рабдовирусом, в оптимальном варианте вирусом везикулярного стоматита,

(II) культивирование клетки-хозяина в условиях, которые обеспечивают
20 возможность репликации рекомбинантного рабдовируса,

(III) собирание рекомбинантного рабдовируса с культуры клеток,

(IV) необязательно ферментативная обработка собранного вируса, в оптимальном варианте бензоназой,

(V) фиксация собранного рабдовируса путем загрузки на
25 катионообменный монолитный мембранный абсорбер или смолу с последующим элюированием,

(VI) шлифование рабдовируса путем подвергания элюата с этапа (V) эксклюзионной, мультимодальной эксклюзионной/ ионообменной или тангенциально-поточковой фильтрации,

(VII) буферный обмен шлифованного рабдовируса путем
30 ультрафильтрации / диафильтрации,

(VIII) стерильная фильтрация рабдовируса.

[0037] В одном варианте воплощения, который касается девятого аспекта, клеткой-хозяином является клетка НЕК293.

[0038] В одном варианте воплощения, который касается девятого аспекта, клетку-хозяина культивируют в суспензии.

[0039] В одном варианте воплощения, который касается девятого аспекта, рекомбинантный рабдовирус рецептируют в фармацевтическую композицию. В оптимальном варианте воплощения рекомбинантный рабдовирус в соответствии с первым аспектом или любым из вариантов его воплощения или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита в соответствии со вторым аспектом или любым из вариантов его воплощения рецептируют в фармацевтическую композицию.

10 Краткое описание фигур

[0040] ФИГУРА 1: Схематическое представление иммунологического синапса и компонентов между антиген-презентирующей клеткой (APC) и Т-клеткой. CD80 является ключевой коstimуляторной молекулой при активации Т-клеток. Эффективная стимуляция Т-клеток требует двух совпадающих молекулярных сигналов в пределах иммунологического синапса. Сигнал 1: Антиген-специфический (TCR:МНС/пептид) и Сигнал 2. Антиген-независимый (CD28:CD80).

[0041] ФИГУРА 2: Изображение Fc-слитого белка (бивалентного) внеклеточного домена (ECD) CD80. Слитый белок экспрессируется в трансдуцированных опухолевых клетках после вирусной инфекции. Два Fc-слитых мономера внеклеточного домена CD80 являются ковалентно связанными дисульфидными связями, образованными между цистеиновыми остатками в каждом мономере, таким образом, образуя Fc-слитый белковый димер внеклеточного домена CD80.

[0042] ФИГУРЫ 3А-В Сравнение репликации (А) и жизнеспособности (В) ВВС-GP-CD80-Fc относительно родительского вируса ВВС-GP. Клетки НЕК293F инфицировали ВВС-GP или ВВС-CD80-Fc. Ось Y показывает жизнеспособность клеток в процентах или копиях генома на мл. И жизнеспособность, и репликацию клеток отслеживали в течение периода до 48 ч после инфицирования (ось X: часы после инфицирования).

[0043] ФИГУРА 4 Обнаружение растворимого CD80-Fc с помощью ELISA в супернатантах культуры ткани из клеток НЕК293, инфицированных ВВС-GP или ВВС-GP-CD80-Fc, оба с множественностью инфицирования 1 (MOI 1). Экспрессию CD80-Fc (ось Y в мкг/мл) определяли для

разных моментов времени после инфицирования в течение периода до 48 ч (ось X).

[0044] ФИГУРЫ 5А-В *In vivo* эффективность (А) и динамика массы тела (В) мышей, которых лечили с применением ВВС-GP-CD80-Fc, по сравнению с родительским вирусом ВВС-GP с использованием опухолевой модели СТ26.CL25-IFNARKO (i.v.). (А) Мышам вводили препарат в 0-й и 3-й дни с низкой вирусной дозой 2×10^7 TCID₅₀. Ось X показывает время (в днях), а ось Y показывает процент выживших мышей. (В) Показана динамика массы тела тех же подвергнутых лечению мышей, что и на ФИГУРЕ 6А. Ось X показывает время (в днях), а ось Y показывает массу тела (в граммах).

[0045] ФИГУРЫ 6А-С *In vivo* эффективность ВВС-GP-CD80-Fc по сравнению с родительским вирусом ВВС-GP у подвергнутых лечению мышей с использованием опухолевой модели В16-F1-OVA (i.t.) с введением препарата в 0-й и 3-й дни с вирусной дозой 10^8 TCID₅₀ ВВС- GP (В), такой же вирусной дозой ВВС-GP-CD80-Fc (С) или PBS (А). Ось X показывает дни после лечения (в днях), а ось Y показывает объем опухоли (в см³).

[0046] ФИГУРЫ 7А-В *In vivo* эффективность ВВС-GP-CD80-Fc у подвергнутых лечению мышей (В) по сравнению с родительским вирусом ВВС-GP (А) с использованием опухолевой модели ЕМТ-6 (i.t.) и введением препарата в 0-й и 3-й дни с низкой вирусной дозой 2×10^7 TCID₅₀. Ось X показывает дни после лечения (в днях), а ось Y показывает объем опухоли (в см³). Пунктирная линия представляет мышей, получавших носитель, а сплошная линия – мышей, получавших вирус.

[0047] ФИГУРА 8 Репликация ВВС-GP-CD80-Fc в пределах инфицированных опухолей СТ26.CL25-IFNARKO, взятых у подвергнутых лечению мышей согласно определению по количеству копий вирусного генома с применением кПЦР на 3-й и 7-й день после инфицирования. Мышам вводили либо PBS, либо 10^8 TCID₅₀ ВВС-GP-CD80-Fc, и количество копий вирусного генома на опухоль (ось Y) определяли через 3 или 7 дней соответственно.

[0048] ФИГУРА 9 Выполненное на основе NanoString измерение N-белка ВВС-GP, а также транскриптов CD80-Fc в контрольных, инфицированных ВВС-GP или ВВС-CD-80-Fc опухолях LLC-IFNARKO, взятых у подвергнутых лечению мышей. Мышей либо использовали как контроль, либо лечили с

применением 10^8 TCID₅₀ ВВС-GP или ВВС-GP-CD80-Fc, и относительную экспрессию вирусного N-белка или CD80-Fc (ось Y) определяли через 3 дня.

[0049] ФИГУРА 10 Выполненное на основе ИНС определение N-белка ВВС-GP, а также CD80-Fc карго (белка) в контрольных, инфицированных ВВС-GP или ВВС-GP-CD80-Fc опухлях LLC-IFNARKO, взятых у подвергнутых лечению мышей. Мышей лечили, как показано на ФИГУРЕ 9, и ИНС выполняли, применяя стандартные протоколы на 3-й день после лечения.

[0050] ФИГУРЫ 11А-С Изображение, на котором показан механизм действия (MoA) CD80-Fc в опухлях. Горячие опухоли (А) со зрелыми, активированными DC, обеспечивающими эффективную костимуляцию Т-клеток. Холодные опухоли (В), в которых отсутствуют DC и/или преобладают незрелые толерогенные подгруппы DC. Отсутствие DC или незрелых толерогенных подгрупп DC в результате ведет к ослаблению иммунитета Т-клеток, клональной толерантности, дисфункции Т-клеток и гибели клеток. CD80-Fc превращает холодные опухоли в горячие опухоли (С) путем компенсации нехватки сильной костимуляции Т-клеток.

[0051] ФИГУРА 12 Смешанную культуру лейкоцитов человека (Т-клетки и незрелые дендритные клетки из двух генетически отличных субъектов совместно культивируют, результатом чего является стимуляция аллогенных Т-клеток) использовали для оценки костимуляции Т-клеток рекомбинантным CD80-Fc. Для этого культуры стимулировали увеличивающимся количеством рекомбинантного белка CD80-Fc, используя секрецию IFN γ в качестве показания.

[0052] ФИГУРЫ 13А-Д Смешанная культура лейкоцитов человека (Т-клетки и моноциты из двух генетически отличных субъектов совместно культивируют), стимулированная рекомбинантным белком CD80-Fc (10 мкг/мл) с добавлением или без добавления Fc γ R-block (и при отсутствии человеческой сыворотки), используя секрецию IFN γ в качестве показания. Различные части фигуры (А-Д) показывают разные пары доноров.

[0053] ФИГУРЫ 14А-Е Культуры РВМС человека стимулировали низкими дозами антитела против CD3 или без них и увеличивающейся концентрацией рекомбинантного белка CD80-Fc (F(ab)₂(A, D), Fc = IgG4 (B, E) или Fc = IgG1 (C, F)), измерение секреции IFN γ (А-С) или IL2 (D-Е) в качестве

индикаторов, обнаруживаемых путем стандартного анализа ELISA супернатантов.

[0054] ФИГУРА 15 Выполненное на основе NanoString измерение FcγR в контрольных или инфицированных ВВС-GP опухолях LLC1-IFNARKO на 7-й день после инфицирования. Мышей либо оставляли без лечения, либо инфицировали вирусной дозой 10^8 TCID₅₀ ВВС-GP. Ось X показывает измерение для различных FcγR (1, 2b, 3 или 4), а ось Y показывает относительную экспрессию через 7 дней.

[0055] ФИГУРЫ 16A-C Улучшенную индукцию опухолеспецифических Т-клеток под действием ВВС-GP-mCD80-Fc по сравнению с ВВС-GP определяли у мышей с опухолями CT26.CL25-IFNARKO с применением ELISPOT и тетрамерного окрашивания. Наблюдали увеличение gr70-специфических α-опухоль-Т-клеток в селезенке мышей, получавших ВВС-GP-mCD80-Fc, по сравнению с теми, которые получали ВВС-GP. Незакрашенные символы представляют собой i.v. введение. Окрашенные символы представляют собой i.v./i.t. введение. (A) Выявление gr70-специфических Т-клеток в селезенке с помощью ELISPOT или (B) в крови с помощью Dextramers. (C) Схема эксперимента.

[0056] ФИГУРА 17 Считывание на базе люминесценции: совместное культивирование клеток-репортеров Jurkat PD-1 и CHO-K1-α-CD3/-PDL1. CD80-Fc, в отличие от антитела против PDL1 Авелумаба, не может предотвратить PD1:PDL1-опосредованное угнетение линии клеток-репортеров Jurkat.

[0057] ФИГУРЫ 18A-B Анализ клеток-репортеров: Jurkat-PD1 (клетки-репортеры люциферазы) в общей культуре с клетками THP-1-PDL1 (экспрессируют FcγRs). Активацию Т-клеток в данной системе запускает CD33XCD3 ViTE (10 нМ). (A) Лечение указанными реагентами (анти-PD1 = Пембролизумаб; анти-Dig = изотипический контроль и рекомбинантный CD80-Fc) в указанных концентрациях. (B) Анти-PD1 (10 нМ) и увеличивающиеся концентрации рекомбинантного CD80-Fc улучшают активацию Т-клеток Jurkat с превышением активности отдельных соединений.

[0058] ФИГУРЫ 19A-C *In vivo* эффективность (A), кривые роста опухолей (B) и изменение массы тела (C) мышей, которым вводили ВВС-GP-mCD80-Fc, родительский вирус ВВС-GP и рекомбинантный мышинный CD80-Fc с использованием опухолевой модели CT26.CL25-IFNARKO (i.v.). (A) Мышам

вводили препарат в 0-й и 3-й дни с вирусной дозой 1×10^8 TCID₅₀ и в 0-й, 3-й и 6-й дни с 1 мг/кг рекомбинантного мышиноного CD80-Fc соответственно. Ось X показывает время (в днях), а ось Y показывает процент выживших мышей. (B) Показана динамика среднего объема опухолей тех же подверженных лечению мышей, что и на ФИГУРЕ 19А. Ось X показывает время (в днях после начала лечения), а ось Y показывает объем опухоли (в мм³). Данные показывают среднее значение по группе с переносом последнего наблюдения до достижения 70% группы (70% LOCF). (C) Показано изменение массы тела тех же подданных лечению мышей, что и на ФИГУРЕ 19А. Ось X показывает время (в днях после начала лечения), а ось Y показывает изменение массы тела по сравнению с начальной массой тела в начале лечения (в %).

Детальное описание изобретения

[0059] В представленном далее подробном описании многочисленные конкретные детали изложены для обеспечения полного понимания настоящего изобретения. Однако для специалистов в данной области должна быть очевидна возможность практического воплощения этой технологии и без некоторых из этих конкретных деталей. В других случаях общеизвестные структуры и технологии не были подробно показаны, чтобы не перегружать пояснение представленного изобретения. Заголовки включены только для удобства для содействия чтению, и их не следует понимать как ограничивающие изобретение конкретными аспектами или вариантами воплощения.

Рабдовирусы

[0060] Семейство рабдовирусов включает 18 родов и 134 вида с отрицательно-полярными, одноцепочечными геномами РНК примерно 10 – 16 т.п.н. (Walke et al., ICTV Virus Taxonomy Profile: Rhabdoviridae, Journal of General Virology, 99: 447 – 448 (2018)).

[0061] Характерными особенностями представителей семейства рабдовирусов являются одна или несколько таких: шарообразная или палочковидная частица 100-430 нм длиной и 45 - 100 нм в диаметре, состоящая из спирального нуклеокапсида, окруженного матриксным слоем и липидной оболочкой, причем некоторые рабдовирусы имеют лишенные оболочки нитчатые вирусы. Отрицательно-полярная одноцепочечная РНК с 10,8-16,1 т.п.н., которые в основном несегментированы. Геном, кодирующий по крайней

мере 5 генов, кодирующих структурные белки нуклеопротеин (N), большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M) и гликопротеин (G).

[0062] В контексте настоящего описания рабдовирус может принадлежать к следующим родам: альмендравиреус, куриовиреус, циторабдовирус, дихорхавиреус, эфемеровиреус, гапавиреус, ледантевиреус, лессавиреус, новиробвиреус, нуклеорабдовирус, перхабдовирус, сигмавиреус, спрививиреус, шрипувиреус, тибровиреус, тупавиреус, варикозавиреус или везикуловиреус.

[0063] В пределах указанного рода рабдовирус может относиться к любому из перечисленных видов. Род альмендравиреусов включает: альмендравиреус дендрарий, альмендравиреус бальзы, альмендравиреус Кут-Бей, альмендравиреус Пуэрто-Альмендрас, альмендравиреус Рио-Чико; род куриовиреусов включает: куриовиреус Курионополиса, куриовиреус Ирири, куриовиреус Итакаюнаса, куриовиреус Рошамбо; род циторабдовирусов включает: циторабдовирус карликовости люцерны, циторабдовирус желто-полосатой мозаики ячменя, циторабдовирус некротической желтизны брокколи, циторабдовирус, связанный с болезнью *Colocasia bobone*, циторабдовирус полосатости листьев овсяницы, циторабдовирус некротической желтизны салата, циторабдовирус желтой мозаики салата, циторабдовирус северной мозаики злаков, циторабдовирус осота 1, циторабдовирус морщинистости земляники, циторабдовирус американской полосатой мозаики пшеницы; род дихорхавиреусов включает: дихорхавиреус кольцевой пятнистости кофе, дихорхавиреус пятнистости орхидеи; род дихорхавиреусов включает: дихоравиреус кольцевой пятнистости кофе, дихоравиреус орхидейных пятен; род эфемеровиреусов включает: эфемеровиреус речки Аделаида, эфемеровиреус Беррима, эфемеровиреус бычьей чумы, эфемеровиреус Кимберли, эфемеровиреус Кулпинья, эфемеровиреус Котонкан, эфемеровиреус Ободханг, эфемеровиреус Ята; род гапавиреусов включает: гапавиреус Фландрии, гапавиреус Грей Лодж, гапавиреус Харт Парк, гапавиреус Джойнджакака, камесский гапавиреус, гапавиреус Ла Хойи, гапавиреус Ланджиа, гапавиреус Манитобы, гапавиреус Марко, гапавиреус Москейру, гапавиреус Моссурил, нгаинганский гапавиреус, гапавиреус речки Орд, гапавиреус Перри-Крик, гапавиреус Вонгабеля; род ледантевиреусов включает: ледантевиреус Барур, ледантевиреус Фикирини, ледантевиреус Фукуока, ледантевиреус Каньявара, ледантевиреус Кернского каньйона, ледантевиреус Кеуралиба, ледантевиреус

Коленте, ледантевирус Кумаси, ледантевирус Ле Дантека, ледантевирус летучей
мыши горы Элгон, ледантевирус Нисимуро, ледантевирус Нколбиссона,
ледантевирус Оита, уханский ледантевирус, ледантевирус Юнцзя; род
лиссавирусов включает: араванский лиссавирус, лиссавирус австралийской
5 летучей мыши, лиссавирус летучей мыши Бокело, лиссавирус Duvenhage,
лиссавирус европейской летучей мыши 1, лиссавирус европейской летучей
мыши 2, лиссавирус летучей мыши Ганнорува, лиссавирус Икома, иркутский
лиссавирус, худжандский лиссавирус, лагосский лиссавирус летучей мыши,
льейдский лиссавирус летучей мыши, лиссавирус Мокола, лиссавирус
10 бешенства, лиссавирус летучей мыши Шимони, западнокавказский лиссавирус
летучей мыши; род новирабдовирусов включает: новирабдовирус Хираме,
новирабдовирус Писцине, новирабдовирус лососевых, новирабдовирус
змееголова; род нуклеорабдовирусов включает: нуклеорхабдовирус желтой
прожилки дурмана; нуклеорхабдовирус пятнистой карликовости баклажанов,
15 нуклеорхабдовирус тонкой полосы кукурузы, нуклеорхабдовирус иранской
мозаики кукурузы, нуклеорхабдовирус мозаики кукурузы, нуклеорхабдовирус
желтой карликовости картофеля, нуклеорхабдовирус желтой низкорослости
риса, нуклеорхабдовирус желтых прожилок осота, нуклеорхабдовирус хлороза
прожилок Таро; род перхабдовирусов включает: перхабдовирус угря,
20 перхабдовирус окуня, перхабдовирус Океанической сельди; род сигмавирусов
включает: сигмавирус *Drosophila affinis*, сигмавирус *Drosophila ananassae*,
сигмавирус *Drosophila immigrans*, сигмавирус *Drosophila melanogaster*,
сигмавирус *Drosophila obscura*, сигмавирус *Drosophila tristis*, сигмавирус
домовой мухи; род спрививирусов включает: спрививирус карпа, спрививирус
25 мальков щуки; род шрипувирусов включает: шрипувирус Альмпивар,
шрипувирус Чако, шрипувирус Niakha, шрипувирус Сена Мадурейра,
шрипувирус Шрипур; род тибровирусов включает: тибровирус Нижнего Конго,
тибровирус Беатрис Гилл, тибровирус прибрежных равнин, тибровирус Экпома
1, тибровирус Экпома 2, тибровирус Sweetwater Branch, тибровирус
30 Тиброгарган; род тупавирусов включает: даремский тупавирус, тупавирус
Клапат, тупавирус Тупайя; род варикозавирусов включает: варикозавирус,
связанный с большой прожилкой салата; род везикуловирусов включает:
везикуловирус Алагоа, американский везикуловирус летучих мышей,
везикуловирус Карахас, везикуловирус Чандипура, кокальный везикуловирус,

везикуловирус Индиана, исфаханский везикуловирус, везикуловирус Юрона, везикуловирус Мальпаис Спринг, везикуловирус Мараба, везикуловирус Морретон, везикуловирус Нью-Джерси, везикуловирус Перинет, везикуловирус Пири, везикуловирус Ради, везикуловирус Юг Богдановац или вирус Мусса.

5 **[0064]** В оптимальном варианте рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению является онколитическим рабдовирусом. В этом смысле термин “онколитический” имеет привычное для специалистов в данной области значение и означает способность рабдовируса к инфицированию и лизису (разрушению) раковых клеток, но не нормальных клеток (любой в значительной
10 степени). В оптимальном варианте онколитический рабдовирус способен к репликации в раковых клетках. Онколитическую активность испытывают в различных аналитических системах, известных специалистам в данной области (типовой анализ *in vitro* описан в публикации Muik et al., Cancer Res., 74(13), 3567 - 78, 2014). Следует понимать, что онколитический рабдовирус способен
15 инфицировать и разрушать только конкретные типы раковых клеток. Кроме того, онколитический эффект является изменчивым и зависит от типа раковых клеток.

[0065] В оптимальном варианте воплощения рабдовирус относится к роду везикуловирусов. Виды везикуловирусов были определены в первую
20 очередь серологическими средствами в сочетании с фитогенетическим анализом геномов. Биологические характеристики, такие как круг хозяев и механизмы передачи, также используются для различения вирусных видов в пределах рода. Как таковой, род везикуловирусов образуют отдельную монофилетическую группу, которая полностью подтверждается деревьями наибольшей вероятности,
25 вытекающими из полных L-последовательностей.

[0066] Вирусы, отнесенные к разным видам в пределах рода везикуловирусов, могут иметь одну или несколько следующих характеристик: А) минимальное расхождение последовательностей аминокислот 20% в L; В) минимальное расхождение последовательностей аминокислот 10% в N; С)
30 минимальное расхождение последовательностей аминокислот 15% в G; D) подвергаются распознаванию через серологические реакции; и Е) занимают различные экологические ниши, о чем свидетельствуют отличия, касающиеся хозяев и/или членистоногих переносчиков.

[0067] Предпочтение отдают вирусу везикулярного стоматита (VBS), в частности, VBS-GP (рекомбинантному с GP LCMV). К благоприятным свойствам VBS-GP относятся одно или несколько из следующих: очень мощный и быстрый киллер (< 8 ч); онколитический вирус; возможное системное применение; снижен нейротропизм/нейротоксичность; литически воспроизводится и вызывает смерть иммуногенных клеток; не реплицируется в здоровых клетках человека благодаря интерферону (IFN) ответа; сильная активация природного иммунитета; примерно 3 т.п.н. пространства для иммуномодулирующих карго и антигенов; рекомбинантный с гликопротеином аренавируса из вируса лимфатического хориоменингита (LCMV); благоприятные характеристики безопасности с учетом пониженной нейротоксичности и меньшей чувствительности к ответам нейтрализующего антитела и разрушению комплемента по сравнению с диким типом VBS (VBS-G); специфически реплицируется в опухолевых клетках, утративших способность к закреплению и реагированию на противовирусные естественные иммунные ответы (например, сигнал IFN типа I); незавершенная репликация в «здоровых клетках» и, таким образом, быстрое исключение из нормальных тканей; вирусная репликация в опухолевых клетках ведет к вызову смерти иммуногенных клеток, высвобождению опухолеассоциированных антигенов, местному воспалению и вызыванию противоопухолевого иммунитета.

[0068] Изобретение далее воплощается через рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, кодирующий в его геноме по крайней мере нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) по крайней мере, один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, который в оптимальном варианте включает человеческий внеклеточный домен CD80.

[0069] В оптимальном варианте воплощения рекомбинантный вирус везикулярного стоматита кодирует в его геноме по крайней мере нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, который включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 7, фосфопротеин (P), который включает аминокислотную

последовательность, как указано в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 8, большой белок (L), который включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 9, и матриксный белок (M), который включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 10, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 10.

[0070] Специалисту в данной области станет понятно, что существует возможность модификаций последовательности нуклеопротеина (N) вируса везикулярного стоматита, большого белка (L), фосфопротеина (P), матриксного белка (M) или гликопротеина (G) без потери основных функций этих белков. Такие функциональные варианты, применяемые в соответствии с изобретением, полностью или частично сохраняют свою основную функцию или активность. Например, белок L является полимеразой и выполняет существенную функцию при транскрипции и репликации вируса. Его функциональный вариант должен сохранять по крайней мере часть этой способности. Четким признаком сохранения основной функциональности или активности является успешное продуцирование вирусов, включая эти функциональные варианты, сохраняющие способность к репликации и инфицированию опухолевых клеток. Продуцирование вирусов и испытание на инфицирование и репликацию в опухолевых клетках испытывают в различных аналитических системах, известных специалистам в данной области (типовой анализ *in vitro* описан в публикации Muik et al., Cancer Res., 74(13), 3567 - 78, 2014).

[0071] В оптимальном варианте воплощения рекомбинантный вирус везикулярного стоматита кодирует в его геноме по крайней мере нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, причем

большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности $\geq 80\%$ с SEQ ID NO: 9.

5 [0072] В оптимальном варианте воплощения рекомбинантный вирус везикулярного стоматита кодирует в его геноме по крайней мере нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, причем нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности $\geq 90\%$ с SEQ ID NO: 7.

10 [0073] В ещё одном оптимальном варианте воплощения рекомбинантный вирус везикулярного стоматита кодирует в его геноме по крайней мере нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, причем большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности, которая равняется или больше, чем 80% , с SEQ ID NO: 9, и нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, которая имеет идентичность последовательности $\geq 90\%$ с SEQ ID NO: 7.

20 [0074] В оптимальном варианте воплощения изобретения геном РНК рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению включает или состоит из последовательности, показанной в SEQ ID NO: 24. Кроме того, геном РНК рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению также может состоять или включать последовательности, в которых нуклеиновые кислоты генома РНК являются замененными согласно вырождению генетического кода, не вызывая изменения в соответствующей аминокислотной последовательности. В еще одном оптимальном варианте воплощения геном РНК рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению включает или состоит из кодирующей последовательности, идентичной или по крайней мере на 75% , 76% , 77% , 78% , 79% , 80% , 81% , 82% , 83% , 84% , 85% , 86% , 87% , 88% , 89% , 90% , 91% , 92% , 93% , 94% , 95% , 96% , 97% , 98% или 99% идентичной SEQ ID NO: 24.

30 [0075] Следует понимать, что рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению может кодировать в его геноме другие карго, такие как опухолевые

антигены, другие хемокины, цитокины или другие иммуномодулирующие элементы.

[0076] В еще одном варианте воплощения рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению дополнительно кодирует в его геноме белок – симпортер йодида натрия (NIS). Экспрессия NIS и совместная инкубация, например, с ^{125}I , позволяет применять NIS как репортер визуализации (Carlson et al., Current Gene Therapy, 12, 33 - 47, 2012).

Рекомбинантный рабдовирус

[0077] Известно, что некоторые штаммы рабдовируса дикого типа, такие как штаммы ВВС дикого типа, считают нейротоксичными. Также есть сведения, что инфицированные субъекты способны быстро обеспечить сильный гуморальный ответ с высокими титрами антител, направленными в основном против гликопротеина. Нейтрализующие антитела, нацеленные на гликопротеин G рабдовирусов в целом и ВВС конкретно, способны ограничить распространение вируса и, таким образом, опосредовать защиту субъектов от повторного инфицирования вирусом. Однако нейтрализация вируса ограничивает повторное применение рабдовируса для раковых пациентов.

[0078] Для устранения этих недостатков гликопротеин G рабдовируса дикого типа заменяют гликопротеином из второго вируса. В этом смысле замена гликопротеина означает (I) замену гена, кодирующего гликопротеин G дикого типа, на ген, кодирующий гликопротеин GP второго вируса, и/или (II) замену гликопротеина G дикого типа на гликопротеин GP второго вируса.

[0079] В оптимальном варианте воплощения гликопротеин G рабдовируса заменяют гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), в оптимальном варианте на штамм WE-HPI. В варианте, которому отдают наибольшее предпочтение, рабдовирус является вирусом везикулярного стоматита с гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), в оптимальном варианте со штаммом WE-HPI. Такой ВВС является описанным, например, в публикации WO2010/040526 и называется ВВС-GP. К преимуществам, которые обеспечиваются, относятся (I) потеря ВВС-G-опосредованной нейротоксичности и (II) отсутствие нейтрализации вектора антителами (как показано на мышах).

[0080] Гликопротеином GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) может быть GP1 или GP2. Изобретение включает гликопротеины из

разных штаммов LCMV. В частности, LCMV-GP может происходить от LCMV дикого типа или штаммов LCMV LCMV-WE, LCMV-WE-NPI, LCMV-WE-NPI на выбор. В оптимальном варианте воплощения ген, который кодирует гликопротеин GP LCMV, кодирует белок с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 11, или аминокислотной последовательностью, которая имеет по крайней мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 11, тогда как функциональные свойства рекомбинантного рабдовируса, который включает гликопротеин GP, который кодирует аминокислотную последовательность, которая показана в SEQ ID NO: 11, сохраняются.

[0081] В ещё одном варианте воплощения рекомбинантный гликопротеин G рабдовируса заменяют на гликопротеин GP вируса Данденонг (DANDV) или вируса Мопея (MOPV). В варианте воплощения, которому отдают наибольшее предпочтение, рекомбинантным рабдовирусом является вирус везикулярного стоматита, в котором гликопротеин G является замененным на гликопротеин GP вируса Данденонг (DANDV) или вируса Мопея (MOPV). К преимуществам, которые обеспечиваются, относятся (I) потеря ВВС-G-опосредованной нейротоксичности и (II) отсутствие нейтрализации вектора антителами (как показано на мышах).

[0082] Вирус Данденонг (DANDV) является аренавирусом Старого света. В настоящее время существует только один штамм, известный специалистам в данной области, который включает гликопротеин GP и пригоден для применения согласно настоящему изобретению в качестве донора гликопротеина GP, содержащегося в рекомбинантном рабдовирусе согласно изобретению. Гликопротеин GP DANDV, содержащийся в рекомбинантном рабдовирусе согласно изобретению, имеет более 6 сайтов гликозилирования, в частности, 7 сайтов гликозилирования. Типичным оптимальным гликопротеином GP является содержащийся в DANDV и доступный под номером Genbank EU136038. В одном варианте воплощения ген, кодирующий гликопротеин GP DANDV, кодирует аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 12, или последовательность, которая имеет по крайней мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, тогда как функциональные свойства рекомбинантного рабдовируса, который включает гликопротеин GP, который кодирует аминокислотную последовательность, которая показана в SEQ ID NO: 12, сохраняются.

96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 12, и при этом функциональные свойства рекомбинантного рабдовируса, который включает гликопротеин GP, который кодирует аминокислотную последовательность, которая показана в SEQ ID NO: 12, сохраняются.

[0083] Вирус Мопея (MOPV) является аренавирусом Старого света. Существуют несколько известных специалистам в данной области штаммов, включающих гликопротеин GP и пригодные для применения согласно настоящему изобретению в качестве доноров гликопротеина GP, содержащегося в рекомбинантном рабдovирусе согласно изобретению. Гликопротеин GP MOPV, содержащийся в рекомбинантном рабдovирусе согласно изобретению, имеет более 6 сайтов гликозилирования, в частности, 7 сайтов гликозилирования. Типичным оптимальным гликопротеином GP является содержащийся в вирусе Мопея и доступный под номером Genbank AY772170. В одном варианте воплощения ген, кодирующий гликопротеин GP MOPV, кодирует аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 13, или последовательность, которая имеет по крайней мере 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, и при этом функциональные свойства рекомбинантного рабдovируса, который включает гликопротеин GP, который кодирует аминокислотную последовательность, которая показана в SEQ ID NO: 13, сохраняются.

[0084] Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80

[0085] CD80, также известный как B7-1, является одноцепочечным гликопротеином типа I с 60 кДа, принадлежащим к сверхсемейству иммуноглобулинов. CD80 экспрессируется на активированных/зрелых антиген-презентирующих клетках, таких как дендритные клетки. CD80 связывается с CD28 и CD152 (CTLA-4). Вместе с CD86 (B7-2) CD80 играет ключевую роль в регулировании активации Т-клеток. Взаимодействие CD80 с CD28 обеспечивает костимуляторный сигнал активации Т-клеток в комплексе привлечения TCR. Его взаимодействие с CTLA-4 (например, экспрессированным на регуляторных Т-клетках), имеющее более высокую аффинность к CD80, чем CD28, и действует как рецептор-ловушка для CD80, а не функционирует как угнетающий

сигнальный рецептор, лишает Т-клетки ключевого костимуляторного сигнала CD28

5 [0086] Ранее высказывалось предположение, что онколитические вирусы, в частности ВВС-GP, способны вызвать лизис опухолевых клеток в комбинации со смертью иммуногенных клеток и стимуляцией естественных
10 иммунных клеток в микросреде опухолей. Также было предположено, что иммуномодулирующие белки могут быть кодированы в геном онколитических вирусов, и что экспрессия вышеупомянутых иммуномодулирующих белков может подтверждать онколитический эффект вируса местной иммуностимулирующей активностью.

15 [0087] Одна из проблем экспрессии иммуностимулирующих молекул из остова вируса, таких как хемокины и/или цитокины, состоит в том, что не просто должно быть достигнуто усиление противоопухолевого иммунитета, но одновременно следует избежать противовирусного иммунного ответа со стороны
20 иммуностимулирующей молекулы. Следует позаботиться о том, чтобы дополнительная иммуностимулирующая молекула не ограничивала онколитический потенциал вируса до степени, при которой потенциальное преимущество, достигаемое благодаря экспрессии терапевтического карго, сводится на нет из-за потери онколитической активности.

25 [0088] Авторами изобретения была высказана гипотеза, что Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 с одной стороны способен обеспечивать эффективную костимуляцию Т-клеток в контексте привлечения рецептора Т-клеток, а с другой стороны не может активировать природные клетки-киллеры (активируемые, например, IL2, IL15, CD137), что должно ограничить вирусную
30 репликацию и/или персистенцию на ранней стадии. Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 является мощной костимуляторной молекулой, которая активна в примировании и реактивации антиген-специфических Т-клеток. Этот стимул является ключевым, поскольку костимуляторные сигналы Т-клеток часто недостаточно представлены в опухолях, что приводит к анергии клональных Т-клеток, потере эффекторной функции и гибели Т-клеток.

[0089] Благодаря обеспечению рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению, ограниченная опухолью репликация Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 может вызвать местную экспрессию костимулирующего Т-клетки слитного белка, что, в свою очередь, усиливает

иммунитет противоопухолевых Т-клеток из-за обеспечения активирующих сигналов на Т-клетки в связи с вовлечением рецептора Т-клеток (например, распознавание опухолевых клеток) в зависимости от Fc γ R.

5 [0090] Авторами изобретения неожиданно было обнаружено, что рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению, кодирующий Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, способен вызвать лизис опухолевых клеток в комбинации со смертью иммуногенных клеток и стимуляцией естественных иммунных клеток в микросреде опухолей. Кроме того, наблюдалось удлинение выживаемости в мышинной модели опухоли поздней стадии, которую лечили 10 таким рекомбинантным рабдовирусом, вооруженным Fc-слитым белком внеклеточного домена CD80.

[0091] Неожиданно было обнаружено, что инфицирование рекомбинантным рабдовирусом согласно изобретению, который кодирует Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, ведет к мощному усилению 15 экспрессии Fc γ R в пределах инфицированных опухолей. Авторами изобретения было продемонстрировано, что оптимальная биологическая активность слитого Fc белка внеклеточного домена CD80 сильно зависит от Fc γ R.

[0092] Без привязывания к какой-либо теории считается, что сильный противоопухолевый эффект, которого позволяет достигать рекомбинантный 20 рабдовирус согласно изобретению, кодирующий Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, по крайней мере частично основывается на Fc γ R-зависимой активности Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80, причем эта активность усиливается повышенной экспрессией Fc γ R в инфицированных опухолях после инфицирования рекомбинантным рабдовирусом согласно 25 изобретению.

[0093] В альтернативном варианте в этом контексте также предусматривается обеспечение слитого белка CD86 (B7-2), т.е. рекомбинантного рабдовируса, который кодирует Fc-слитый белок внеклеточного домена CD86, в частности, BBC-GP, который кодирует Fc-слитый 30 белок внеклеточного домена CD86, причем ген, который кодирует гликопротеин G рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP LCMV.

[0094] “Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80” в контексте данного описания означает слитый белок или его функциональный вариант, который включает или состоит из Внеклеточного домена CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG.

5 **[0095]** “Внеклеточный домен CD80” включает или состоит из природных полипептидов, таких как разные изоформы, а также их функциональные варианты, в оптимальном варианте человеческий внеклеточный домен CD80.

10 **[0096]** В одном аспекте рекомбинантный рабдовирус, который кодирует в его геноме по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, может усиливать рекрутинг Т-клеток и дендритных клеток в среду опухоли.

15 **[0097]** В другом аспекте экспрессия по крайней мере одного Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 или его функционального варианта из генома рекомбинантного рабдовируса обеспечивает возможный способ лечения для пациентов с холодными опухолями и низкой мутационной нагрузкой для усиления опосредованного Т-клетками ответа противоопухолевых Т-клеток против слабоиммуногенных опухолей.

20 **[0098]** В другом аспекте экспрессия по крайней мере одного Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 или его функционального варианта из генома рекомбинантного рабдовируса не индуцирует дополнительные естественные клетки-киллеры (за пределами эффекта родительского вируса (BBC-GP) и избирательно активирует антиген-специфические Т-клетки.

25 **[0099]** В другом аспекте экспрессия по крайней мере одного Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 или его функционального варианта из генома рекомбинантного рабдовируса не вызывает суперагонизма.

30 **[00100]** В другом аспекте экспрессия по крайней мере одного Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 или его функционального варианта из генома рекомбинантного рабдовируса не повышает ранний противовирусный иммунитет к рекомбинантному рабдовирусу.

[00101] В еще одном аспекте, кроме местной экспрессии в опухоли благодаря его растворимости, Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 также может достигать дренирующей опухоли лимфатических протоков (например, лимфатических узлов).

[00102] Белок CD80 человека (UniProtKB - P33681|CD80_HUMAN антиген CD80 активации Т-лимфоцитов) включает или состоит в основном из 288 аминокислот и содержит сигнальный пептид, внеклеточный домен и трансмембранный / топологический домен:

5 **[00103]** MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVIHVTKEVKE
 VATLSCGHNBBCEELAQTRIYWQKEKKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITN
 NLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHLAEVTL SVKADFPTPSISDFEIP
 TSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFNMT
 TNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHFPDNLPSWAITLISVNGIFVICCLT
 10 YCFAPRCRERRRNERLRRESVRPV (SEQ ID NO: 6).

[00104] В одном варианте воплощения внеклеточный домен CD80 Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 включает или состоит из аминокислот 1-242 SEQ ID NO: 6 или имеет по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91
 15 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с аминокислотами 1 - 242 SEQ ID NO: 6.

[00105] В ещё одном варианте воплощения внеклеточный домен CD80 Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 включает или состоит из такой последовательности:

20 **[00106]** VIHVTKEVKEVATLSCGHNBBCEELAQTRIYWQKEKKMVLTM
 MSGDMNIWPEYKNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTYECVVLKYEKDAFKREHL
 AEVTL SVKADFPTPSISDFEIP TSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTV
 SQDPETELYAVSSKLDNFNMTTNHSFMCLIKYGHLRVNQTFNWNTTKQEHFPDN
 (SEQ ID NO: 1)

25 **[00107]** или последовательности, которая имеет по крайней мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 1.

[00108] В одном варианте воплощения Fc-слитый белок внеклеточного
 30 домена CD80 включает сигнальную пептидную последовательность. В ещё одном варианте воплощения Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 не включает сигнальной пептидной последовательности.

[00109] Термин "сигнальный пептид" или "сигнальная пептидная последовательность" описывает пептидную последовательность длиной обычно

от 10 до 30 аминокислот, присутствующую на N-конце новых синтезированных секреторных или мембранных полипептидов, которая направляет полипептид через или в мембрану клетки (цитоплазматическую мембрану в прокариотах и мембрану эндоплазматического ретикулума в эукариотах). Обычно ее
5 впоследствии удаляют. В частности, сигнальный пептид может быть способен направить полипептид в секреторный путь клетки.

[00110] Следует понимать, что настоящее изобретение предполагает возможность применения других (т.е. не принадлежащих к дикому типу) сигнальных пептидных последовательностей вместе с Fc-слитым белком
10 внеклеточного домена CD80. Такие другие сигнальные пептидные последовательности могут заменять первоначальную сигнальную пептидную последовательность дикого типа. Сигнальный пептид включает пептиды, которые направляют новый синтезированный белок в рибосоме к эндоплазматическому ретикулуму и далее к комплексу Гольджи для транспорта
15 к цитоплазматической мембране или из клетки. Они обычно включают в себя ряд гидрофобных аминокислот и включают лидерные последовательности иммуноглобулина, а также другие, известные специалистам в данной области. Сигнальные пептиды включают, в частности, пептиды, которые могут испытывать влияние сигнальной пептидазы, специфической протеазы,
20 расположенной на цистернальной поверхности эндоплазматического ретикулума. Сигнальные пептиды являются хорошо исследованными специалистами в данной области, и к ним может относиться любой известный сигнальный пептид. Сигнальный пептид включен на N-конце белка, и обработка Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 сигнальной пептидазой создает
25 активную биологическую форму.

[00111] В одном варианте воплощения Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает сигнальную пептидную последовательность CD80 дикого
типу. В оптимальном варианте воплощения Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает сигнальную пептидную последовательность
30 человеческого CD80 дикого типу, которая состоит из аминокислот 1 - 34 SEQ ID NO: 6, или последовательность, которая имеет по крайней мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с аминокислотами 1 - 34 SEQ ID NO: 6.

[00112] В ещё одном варианте воплощения Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает сигнальную пептидную последовательность, которая имеет такую последовательность:

[00113] MGWSCIIILFLVATATGVHS (SEQ ID NO: 5)

5 **[00114]** или сигнальную пептидную последовательность, которая имеет по крайней мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 5.

10 **[00115]** В родственном варианте воплощения внеклеточный домен CD80 Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или последовательности, которая имеет по крайней мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и также включает сигнальную пептидную последовательность согласно
15 SEQ ID NO: 5 или сигнальную пептидную последовательность, которая имеет по крайней мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 5.

20 **[00116]** Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 также может включать слитый белок со срезанной сигнальной пептидной последовательностью. В этом контексте термин “срезанная” означает сигнальную пептидную последовательность, которая короче первоначальной сигнальной пептидной последовательности, но всё равно сохраняет по крайней мере часть функциональности, что позволяет действовать как сигнальный
25 пептид. Например, сигнальная пептидная последовательность CD80 человека включает или состоит из аминокислот 1 - 34 SEQ ID NO: 6. Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 со срезанной сигнальной пептидной последовательностью может иметь 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из аминокислот 1
30 - 34 SEQ ID NO: 6. В ещё одном примере сигнальный пептид может включать или состоять из последовательности, которая показана в SEQ ID NO: 5. Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 со срезанной сигнальной пептидной последовательностью может иметь 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из аминокислот 1 - 18 SEQ ID NO: 5.

[00117] Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 со срезанной сигнальной пептидной последовательностью также может быть белком, который включает SEQ ID NO: 1 или последовательность, которая имеет по крайней мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и дополнительно сигнальную пептидную последовательность, которая короче первоначальной сигнальной пептидной последовательности. Кроме того, как пример, сигнальная пептидная последовательность может иметь 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из аминокислот 1 - 34 SEQ ID NO: 6 или, в ещё одном примере, сигнальный пептид может включать или состоять из последовательности, которая показана в SEQ ID NO: 5. Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 со срезанной сигнальной пептидной последовательностью может иметь 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из аминокислот 1 - 18 SEQ ID NO: 5.

[00118] Внеклеточный домен CD80 может иметь любое происхождение, включая мышинное и крысиное. В оптимальном варианте белок внеклеточного домена CD80 имеет человеческое происхождение.

[00119] Fc-домен IgG может быть ковалентно слитым с N- или C-концевой частью внеклеточного домена CD80 или во внутренней позиции. В некоторых вариантах воплощения Fc-домен молекулы IgG может быть слит с внеклеточным доменом CD80 через линкерный пептид, такой как GS-линкер. В оптимальном варианте Fc-домен является слитым с C-концевой частью внеклеточного домена CD80.

[00120] В некоторых вариантах воплощения Fc-домен имеет последовательность дикого типа. В других вариантах воплощения Fc-домен является либо естественным, либо подвергнутым инженерии вариантом. В некоторых вариантах воплощения Fc-домен включает в себя одну или несколько мутаций, замещений и/или делеций по сравнению с его последовательностью дикого типа. В некоторых вариантах воплощения выбирают Fc-домен, имеющий измененное взаимодействие Fc с одним или несколькими Fc-гамма-рецепторами (Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, Fc γ RIIIA, Fc γ RIIIB). В оптимальном варианте Fc-домен происходит от человеческого IgG, такого как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В варианте, которому отдают наибольшее предпочтение, Fc-домен происходит от человеческого IgG1.

[00121] В оптимальном варианте воплощения Fc-домен Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 включает или состоит из такой последовательности:

5 **[00122]** EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVBBLCLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 2)

10 **[00123]** или последовательности, которая имеет по крайней мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 2.

15 **[00124]** В оптимальном варианте воплощения Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает или состоит из такой последовательности:

[00125] VIHVTKEVKEVATLSCGHNBBCEELAQTIRIYWQKEKMKMVLTMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITNLSIVILALRPSDEGTYECCVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPSPISDFEIPSTSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFNMTTNSFMCLIKYGHRLVNQTFNWNTTKQEHFPDD
20 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVBBLCLTVLHQQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 4)

25 **[00126]** или последовательности, которая имеет по крайней мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 4.

30 **[00127]** У ещё одном оптимальном варианте воплощения Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает или состоит из внеклеточного домена CD80, слитого с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из аминокислот 1 - 207 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 %

идентичности с аминокислотами 1 - 207 SEQ ID NO: 4, а Fc-домен включает или состоит из аминокислот 208 - 433 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с аминокислотами 208 - 433 SEQ ID NO: 4.

[00128] В ещё одном оптимальном варианте воплощения Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает или состоит из такой последовательности:

[00129] MGHTRRQGTSPSKCPYLNFFQLLVLAGLSHFCSGVINHVTKEVKE
 VATLSCGHNBBCEELAQTRIYWQKEKMMVLTMMMSGDMNIWPEYKNRTIFDITN
 NLSIVILALRPSDEGTYECCVVLKYEKDAFKREHLAEVTLVSKADFPTPSISDFEIP
 TSNIRRIICSTSGGFPEPHLSWLENGEELNAINTTVSQDPETELYAVSSKLDNFNMT
 TNHSFMCLIKYGHRLRVNQTFNWNTTKQEHFPDDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVBBCLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
 YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:
 3)

[00130] или последовательности, которая имеет по крайней мере 70 %, 72 %, 74 %, 76 %, 78 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 3.

[00131] В контексте данного описания термины "идентичный" или "процент идентичности" по отношению к двум или нескольким нуклеиновокислотным или полипептидным последовательностям означают две или несколько последовательностей или подпоследовательностей, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые оказались одинаковыми при выравнивании для сравнения на максимальное соответствие. Для определения процента идентичности последовательности выравнивают в целях оптимального сравнения (например, возможное включение разрывов в последовательности первой аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательности для оптимального сопоставления со второй аминокислотной или нуклеиновокислотной последовательностью). После этого сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных

позициях или нуклеотидных позициях. Если позицию в первой последовательности занимает такой же аминокислотный остаток или нуклеотид, что и в соответствующей позиции во второй последовательности, молекулы в этой позиции идентичны. Процент идентичности между двумя последовательностями зависит от количества идентичных позиций, которые являются общими для последовательностей (т.е. % идентичности = количество идентичных позиций / общее количество позиций (например, частично перекрывающихся позиций) x 100). В некоторых вариантах воплощения две сравниваемые последовательности имеют одинаковую длину после соответствующего включения разрывов в последовательности (например, с исключением дополнительной последовательности, выходящей за пределы сравниваемых последовательностей).

[00132] Определение процента идентичности или процента сходства между двумя последовательностями выполняют, применяя математический алгоритм. Оптимальным неограничивающим примером математического алгоритма, применяемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Карлина и Альтшуля, описанный в публикации Karlin and Altschul 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264 - 2268, модифицированный согласно с публикацией Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873 - 5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST согласно с публикацией Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215: 403 - 410. Поиск нуклеотидов BLAST выполняют с помощью программы NBLAST, количество баллов = 100, длина слова = 12, для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных нуклеиновой кислоте, кодирующей нужный белок. Поиск белков BLAST выполняют с помощью программы XBLAST, количество баллов = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных нужному белку. Для получения выравнивания с разрывами в целях сравнения применяют Gapped BLAST, как описано в публикации Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389 - 3402. В альтернативном варианте применяют PSI-Blast для выполнения повторного поиска, позволяющего выявлять далекое родство между молекулами (Id.). При применении программ BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast применяют параметры соответствующих программ по умолчанию (например, XBLAST и NBLAST). Еще одним оптимальным неограничивающим примером математического алгоритма,

применяемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Миллера-Майерса, описанный в публикации Myers and Miller, CABIOS (1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), являющуюся частью пакета программ выравнивания последовательностей GCG. При применении программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей применяют таблицу веса остатков PAM120, штраф за длину разрыва 12 и штраф за разрыв 4. Дополнительные алгоритмы для анализа последовательностей известны специалистам в данной области и включают ADVANCE и ADAM, как описано в публикации Torellis and Robotti, 1994, Comput. Appl. Biosci. 10: 3 - 5; и FASTA, как описано в публикации Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444 - 8. В FASTA *ktup* является вариантом управления, который устанавливает чувствительность и скорость. Если *ktup*=2, подобные участки в двух сравниваемых последовательностях находят, глядя на пары выровненных остатков; если *ktup*=1, проверяют отдельные выровненные аминокислоты. Значение *ktup* может быть установлено на 2 или 1 для белковых последовательностей или от 1 до 6 для последовательностей ДНК. Значение по умолчанию, если *ktup* не указано, равно 2 для белков и 6 для ДНК. В альтернативном варианте выравнивания белковой последовательности выполняют, применяя алгоритм CLUSTAL W, как описано в публикации Higgins et al., 1996, Methods Enzymol. 266: 383 – 402.

[00133] Функциональные варианты Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 включают биологически активные варианты и биологически активные фрагменты указанных описанных Fc-слитых белков внеклеточного домена CD80. Функциональные варианты могут иметь различия во внеклеточном домене CD80, Fc-доме и/или в обоих доменах. Например, некоторые функциональные варианты внеклеточного домена CD80 были описаны в публикации WO2017181152. В еще одном примере функциональные варианты Fc-домена были описаны в публикации WO17079117, и они включают, например, Fc-домены IgG1 человека с аминокислотными замещениями L234F, L235E и/или P331S.

[00134] Например, варианты могут иметь одну или несколько различных аминокислот в позиции конкретно описанного белка внеклеточного домена CD80 или Fc-домена. Варианты могут иметь по крайней мере примерно 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с аминокислотной последовательностью, описанной в WO2017181152.

89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % или больше идентичности аминокислот с таким внеклеточным доменом CD80 или Fc-доменом. Фрагменты имеют такие же аминокислоты, как и данный конкретно описанный белок внеклеточного домена CD80 или Fc-домена, но в них может отсутствовать конкретная часть или участок белка внеклеточного домена CD80 или Fc-домена.

[00135] Функциональные варианты Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 включают только варианты и фрагменты Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80, которые являются биологически активными. С точки зрения настоящего изобретения биологическую активность варианта Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 или фрагмента Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80, кодируемого в геноме рекомбинантного рабдовируса, определяют после его экспрессии в соответствующей клетке или опухолевой клетке. Это означает, что биологическую активность определяют в контексте рекомбинантного рабдовируса, кодирующего вариант Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 или фрагмент Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 (например, в анализе Transwell или *in vitro* модели опухоли). В оптимальном варианте биологическую активность определяют с везикуловиром, который кодирует вариант Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 или фрагмент Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80. В варианте, которому отдают наибольшее предпочтение, биологическую активность определяют из ВВС-GP, который кодирует вариант Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 или фрагмент Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80.

[00136] Биологическая активность включает одну или несколько из следующих возможностей: хемоаттрактантную активность, противоопухолевую активность, модуляцию экспрессии цитокина, такую как повышение экспрессии полипептидов интерферона-гамма (IFN-гамма) или снижение экспрессии полипептидов трансформирующего фактора роста-бета (TGF-бета) в популяции сингенных клеток млекопитающих, включая CD8-положительные Т-клетки, CD4-положительные Т-клетки, антиген-презентирующие клетки и опухолевые клетки. Испытания на биологическую активность осуществляют без ограничений, например, согласно протоколу, показанному в Примерах. С точки зрения изобретения функциональный вариант или фрагмент Fc-слитого белка

внеклеточного домена CD80 является биологически активным, если он демонстрирует по крайней мере 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % активности Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 с последовательностью, которая показана в SEQ ID NO: 3 или 4 (соответственно, с сигнальной пептидной последовательностью или без неё) при испытании в одном анализе и в одинаковых условиях.

[00137] Рабдовирусы имеют отрицательно-полярную одноцепочечную РНК (оцРНК) как их генетический материал (геном). Вирусы с отрицательно-полярной оцРНК требуют РНК-полимеразы для образования положительно-полярной РНК. Положительно-полярная РНК действует как вирусная мРНК, которая транслируется в белке для продуцирования новых вирусных материалов. Новообразованный вирус позволяет продуцировать больше молекул отрицательно-полярной РНК.

[00138] Типичный геном рабдовируса кодирует по крайней мере пять структурных белков в таком порядке: 3'-N-P-M-G-L-5'. Геном может содержать другие короткие межгенные участки или дополнительные гены между структурными белками, следовательно, могут иметь изменчивую длину и организацию.

[00139] Согласно изобретению ген Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 вводят в любое место генома рабдовируса. В зависимости от места вставки существует возможность воздействия на эффективность транскрипции гена Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80. В целом эффективность транскрипции гена Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 снижается с 3' инсерции до 5' первичной инсерции. Ген Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 вставляют в следующие геномные локации: 3'-Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80-N-P-M-G-L-5', 3'-N-Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80-P-M-G-L-5', 3'-N-P-Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80-M-G-L-5', 3'-N-P-M-Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80-G-L-5', 3'-N-P-M-G-Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80-L-5' или 3'-N-P-M-G-L-Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80-5'. В оптимальном варианте воплощения ген Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 вставляют между G-белком и L-белком.

[00140] После инфицирования опухолевых клеток ген Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80, кодируемого в геноме рекомбинантного рабдовируса, транскрибируется в положительно-полярную РНК, а затем транслируется в Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 опухолевой клеткой. Термин "кодирование" касается неотъемлемого свойства конкретных последовательностей нуклеотидов в нуклеиновой кислоте, которая заключается в том, что они служат шаблонами для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (например, молекул РНК) или аминокислот и биологических свойств, являющихся её результатом. Соответственно ген кодирует белок, если нужный белок продуцируется в клетке или другой биологической системе путем транскрипции и последующей трансляции мРНК. И кодирующая нить, нуклеотидная последовательность которой является идентичной последовательности мРНК, и некодирующая нить могут служить шаблоном для транскрипции гена и могут быть указаны как кодирующие белок или другой продукт этого гена. Нуклеиновые кислоты и нуклеотидные последовательности, кодирующие белки, могут включать интроны.

[00141] Транскрипция гена Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 в оптимальном варианте происходит не под контролем его собственного промотора, а только четко связана с вирусной репликацией, которая таким образом обеспечивает нацеливание экспрессии Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 на место вирусной репликации и распространения (опухоль). Таким образом, транскрипция гена Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80 не контролируется дополнительными элементами, такими как промоторы или экспрессионные элементы индуцибельного гена.

[00142] Транслируемый Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 обычно существует в растворе в качестве димерного слитого белка, который включает два идентичных мономерных зрелых Fc-слитых белка внеклеточного домена CD80. В этом случае каждый мономерный Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает внеклеточный домен CD80, слитый на его С-конце с N-концом Fc-домена IgG. Два Fc-слитых мономера внеклеточного домена CD80 являются ковалентно связанными дисульфидными связями, образованными между цистеиновыми остатками в каждом мономере, таким образом, образуя Fc-слитый белковый димер внеклеточного домена CD80.

[00143] Следует учитывать, что нуклеиновокислотная последовательность может варьироваться с изменением или без изменения первичной последовательности кодированного полипептида. Нуклеиновая кислота, кодирующая белок, включает любые нуклеиновые кислоты, имеющие различные нуклеотидные последовательности, но кодирующие одну аминокислотную последовательность белка через вырождение генетического кода. Специалист в данной области в пределах своей квалификации сможет выбрать нуклеиновокислотную последовательность, которая в результате обеспечивает экспрессию Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80, в частности любого специфического Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80, как описано авторами. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие аминокислотные последовательности Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80, получают разными способами, известными специалистам в данной области. Эти способы включают, кроме прочих, выделение из природного источника или приготовление путем опосредованного олигонуклеотидом (или сайт-специфического) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее полученного Fc-слитого белка внеклеточного домена CD80.

[00144] Фармацевтические композиции

[00145] Фактическое фармацевтически эффективное количество или терапевтическая доза обычно зависит от факторов, известных специалистам в данной области, таких как возраст и масса тела пациента, путь введения и тяжесть заболевания. В любом случае рекомбинантный рабдовирус вводят в дозах и способом, позволяющим доставлять фармацевтически эффективное количество в зависимости от уникального состояния пациента.

[00146] Как правило, для лечения и/или облегчения упомянутых авторами болезней, нарушений и состояний и в зависимости от конкретной болезни, нарушения или состояния, подлежащих лечению, активности конкретного рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению, конкретного пути введения и конкретной применяемой фармацевтической рецептуры или композиции, рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению обычно вводят, например, дважды в неделю, раз в неделю или раз в месяц, но дозировка может колебаться в широких пределах в зависимости от вышеупомянутых параметров. Таким образом, в некоторых случаях достаточным может быть применение дозы меньше указанной выше минимальной дозы, тогда как в других случаях

возникает необходимость в превышении верхнего предела. При введении большого количества может быть желательным его разделение на определенное количество меньших доз, распределенных в течение суток.

[00147] Для применения в терапии рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению рецептируют в фармацевтические композиции, подходящие для содействия введению животным и человеку. Типичные рецептуры приготавливают путем смешивания рекомбинантного вируса с физиологически приемлемыми носителями, формообразователями или стабилизаторами в виде водных растворов или водных или неводных суспензий. Носители, формообразователи, модификаторы или стабилизаторы нетоксичны в применяемых дозах и концентрациях. Они включают буферные системы, такие как фосфат, цитрат, ацетат и другие неорганические или органические кислоты и их соли; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты, такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол; белки, такие как альбумин сыворотки, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон или полиэтиленгликоль (PEG); аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды, олигосахариды или полисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу, сахарозу, трегалозу, декстрины или декстраны; хелатообразователи, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, комплексы ZN-белок); и/или ионные или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™ (полисорбаты), PLURONICS™ или эфиры жирных кислот, эфиры жирных кислот или эфиры сахаров. Формообразователи могут также выполнять модифицирующую высвобождение или модифицирующую абсорбцию функцию.

[00148] В одном варианте воплощения рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению рецептируют в фармацевтическую композицию, которая включает Tris, аргинин и необязательно цитрат. Tris в оптимальном варианте применяют в концентрации от примерно 1 до примерно 100 мМ. Аргинин в оптимальном варианте применяют в концентрации от примерно 1 до примерно

100 мМ. Цитрат может находиться в концентрации до 100 мМ. Оптимальная рецептура включает примерно 50 мМ Tris и 50 мМ аргинина.

[00149] Фармацевтическая композиция может быть предусмотрена в форме жидкости, замороженной жидкости или в лиофилизированной форме. Замороженную жидкость хранят при температурах от приблизительно 0 °С до приблизительно -85 °С, включая температуры от -70 °С до -85 °С и приблизительно -15 °С, -16 °С, -17 °С, -18 °С, -19 °С, -20 °С, -21 °С, -22 °С, -23 °С, -24 °С или приблизительно -25 °С.

[00150] Рекомбинантный рабдовирус или фармацевтическую композицию согласно изобретению необязательно рецептируют с одним или несколькими агентами, которые в настоящее время применяют для профилактики или лечения данного нарушения. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества рекомбинантного антитела, присутствующего в рецептуре, типа нарушения или их лечения и других факторов, обсуждаемых выше. Их обычно применяют в таких же дозах и вводят такими путями, которые описаны авторами, или в количестве, которое составляет примерно от 1 до 99% описанных в настоящем описании доз, или в любой дозе и любым путем, который эмпирически / клинически определен как надлежащий.

[00151] Для профилактики или лечения заболевания надлежащая доза рекомбинантного рабдовируса или фармацевтической композиции согласно изобретению (при применении отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими агентами) зависит от типа заболевания, подлежащего лечению, типа рекомбинантного рабдовируса, тяжести и протекания заболевания, от того, вводят ли рекомбинантный рабдовирус с профилактической или терапевтической целью, от предварительной терапии, от истории болезни пациента и его ответа на рекомбинантный рабдовирус и от мнения врача. Рекомбинантный рабдовирус или фармацевтическую композицию согласно изобретению соответствующим образом вводят пациенту за один раз или последовательно курсом лечения.

[00152] В зависимости от типа и тяжести заболевания, примерно от 10^8 до 10^{13} инфекционных частиц, измеренных по TCID₅₀ рекомбинантного рабдовируса, могут быть начальной подходящей дозой для введения пациенту, например, один или несколько отдельных раз или путем непрерывной инфузии. Для многократного введения в течение нескольких дней или дольше, в

зависимости от состояния, лечение в целом должно быть длительным до выявления желаемого угнетения симптомов болезни. Типичная доза рекомбинантного рабдовируса должна составлять от примерно 10^8 до 10^{13} инфекционных частиц, измеренных по TCID₅₀. Таким образом, пациенту вводят одну или несколько доз приблизительно 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} или 10^{13} инфекционных частиц, измеренных по TCID₅₀ (или их любой комбинации). Такие дозы вводят периодически, например, раз в неделю или раз в три недели (например, таким чином, чтобы пациент получил от приблизительно двух до приблизительно двадцати или, например, приблизительно шесть доз рекомбинантного рабдовируса). Возможным является введение начальной высшей насыщающей дозы с последующими одной или несколькими более низкими дозами, или наоборот. Однако возможно и применение других режимов дозировки. Прогресс этой терапии легко отслеживается с помощью традиционных технологий и анализов.

[00153] Эффективность рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению и композиций, которые их включают, испытывают, применяя любой подходящий *in vitro* анализ, анализ на основе клеток, *in vivo* анализ и/или животную модель, которая известна сама по себе, или любой их комбинацию в зависимости от конкретного заболевания. Подходящие анализы и животные модели станут понятны специалисту в данной области и включают, например, анализы и животные модели, применяемые в приведенных ниже Примерах.

[00154] Конечно, фактическое фармацевтически эффективное количество или терапевтическая доза зависит от факторов, известных специалистам в данной области, таких как возраст и масса тела пациента, путь введения и тяжесть заболевания. В любом случае рекомбинантный рабдовирус в соответствии с изобретением вводят в дозах и способах, позволяющих доставлять фармацевтически эффективное количество в зависимости от уникального состояния пациента.

[00155] В альтернативном варианте рекомбинантный рабдовирус или фармацевтическую композицию согласно изобретению доставляют в объеме от приблизительно 50 мкл до приблизительно 100 мл, включая все значения в рамках этого диапазона, в зависимости от размера участка, который подвергают лечению, применяемого вирусного титра, пути введения и желаемого эффекта способа.

[00156] Для внутриопухолевого введения объём в оптимальном варианте составляет от приблизительно 50 мкл до приблизительно 5 мл, включая значения приблизительно 100 мкл, 200 мкл, 300 мкл, 400 мкл, 500 мкл, 600 мкл, 700 мкл, 800 мкл, 900 мкл, 1000мкл, 1100 мкл, 1200 мкл, 1300 мкл, 1400 мкл, 1500 мкл, 1600 мкл, 1700 мкл, 1800 мкл, 1900 мкл, 2000 мкл, 2500 мкл, 3000 мкл, 3500 мкл, 4000 мкл или приблизительно 4500 мкл. В оптимальном варианте воплощения объём составляет приблизительно 1000 мкл.

[00157] Естественно, для системного введения, например, путем инфузии рекомбинантного рабдовируса, объемы могут быть больше. В альтернативном варианте возможно растворение концентрированного раствора рекомбинантного рабдовируса в большем объеме раствора для инфузии непосредственно перед инфузией.

[00158] В частности, для внутривенного введения объём в оптимальном варианте составляет от 1 мл до 100 мл, включая объёмы приблизительно 2 мл, 3 мл, 4 мл, 5 мл, 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 11 мл, 12 мл, 13 мл, 14 мл, 15 мл, 16 мл, 17 мл, 18 мл, 19 мл, 20 мл, 25 мл, 30 мл, 35 мл, 40 мл, 45 мл, 50 мл, 55 мл, 60 мл, 70 мл, 75 мл, 80 мл, 85 мл, 90 мл, 95 мл или приблизительно 100 мл. В оптимальном варианте воплощения объём составляет от приблизительно 5 мл до 15 мл, в варианте, которому отдают наибольшее предпочтение, объём составляет приблизительно 6 мл, 7 мл, 8 мл, 9 мл, 10 мл, 11 мл, 12 мл, 13 мл или приблизительно 14 мл.

[00159] В оптимальном варианте одну и ту же рецептуру применяют для внутриопухолевого введения и внутривенного введения. Соотношение дозы и/или объема между внутриопухолевым введением и внутривенным введением может составлять примерно 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1 :9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19 или приблизительно 1:20. Например, соотношение дозы и/или объема 1:1 означает, что одинаковые дозы и/или объемы вводят внутриопухолево и внутривенно, тогда как, например, соотношение дозы и/или объема приблизительно 1:20 означает, что для внутривенного введения доза и/или объем в двадцать раз выше дозы и/или объема для внутриопухолевого введения. В оптимальном варианте соотношение дозы и/или объема между внутриопухолевым введением и внутривенным введением составляет приблизительно 1:9.

[00160] Эффективная концентрация рекомбинантного рабдовируса в оптимальном варианте составляет от приблизительно 10^8 до 10^{14} векторных геномов на миллилитр (вг/мл). Инфекционные дозы измеряют, как описано в публикации McLaughlin et al., J Virol.; 62(6): 1963 - 73 (1988). В оптимальном варианте концентрация составляет от приблизительно $1,5 \times 10^9$ до приблизительно $1,5 \times 10^{13}$, в варианте, которому отдают наибольшее предпочтение, от приблизительно $1,5 \times 10^9$ до приблизительно $1,5 \times 10^{11}$. В одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^9$. В ещё одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{10}$. В ещё одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{11}$. В ещё одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{12}$. В ещё одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{13}$. В ещё одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{14}$. Предпочтительным может быть применение самой низкой эффективной концентрации с целью снижения риска нежелательных эффектов. Врачам могут быть выбраны и другие дозы в этих пределах с учетом физического состояния субъекта, в оптимальном варианте поддающегося лечению человека, возраста субъекта, конкретного типа рака и степени, до которой развился рак в случае его прогрессирования.

[00161] Эффективную целевую концентрацию рекомбинантного рабдовируса выражают через $TCID_{50}$. $TCID_{50}$ определяют, например, применяя способ Спирмана-Кербера. Оптимальные диапазоны охватывают эффективную целевую концентрацию от 1×10^8 /мл до 1×10^{14} /мл $TCID_{50}$. В оптимальном варианте эффективная целевая концентрация составляет от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 1×10^{12} /мл, в варианте, которому отдают наибольшее предпочтение, от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 1×10^{11} /мл. В одном варианте воплощения эффективная целевая концентрация составляет приблизительно 1×10^{10} /мл. В оптимальном варианте воплощения целевая концентрация составляет 5×10^{10} /мл. В ещё одном варианте воплощения эффективная целевая концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{11}$ / мл. В одном варианте воплощения эффективная целевая концентрация составляет

приблизительно 1×10^{12} /мл. В ещё одном варианте воплощения эффективная целевая концентрация составляет приблизительно $1,5 \times 10^{13}$ /мл.

[00162] Эффективную целевую дозу рекомбинантного рабдовируса также выражают через TCID₅₀. В оптимальном варианте диапазоны охватывают целевую дозу от 1×10^8 до 1×10^{14} TCID₅₀. В оптимальном варианте целевая доза составляет от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 1×10^{13} , в варианте, которому отдают наибольшее предпочтение, от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 1×10^{12} . В одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1×10^{10} . В оптимальном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1×10^{11} . В одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1×10^{12} . В ещё одном варианте воплощения эффективная концентрация составляет приблизительно 1×10^{13} .

[00163] В другом аспекте обеспечивается комплект или комплект частей, содержащий материалы, применяемые для лечения, профилактики и/или диагностики описанных авторами изобретения нарушений. Комплект или комплект частей включает контейнер и этикетку или вкладыш в упаковку, прикрепленный к контейнеру или связанный с ним. Подходящими контейнерами являются, например, бутылки, флаконы, шприцы, пакеты с растворами для внутривенного введения и т.п. Контейнеры выполняют из разных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в комбинации с другой композицией является эффективной для лечения, профилактики и/или диагностики нарушения и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может быть пакетом с раствором для внутривенного введения или флаконом, имеющим пробку, которую прокалывают иглой для подкожных инъекций). По крайней мере, один активный агент в композиции является рекомбинантным рабдовирусом или фармацевтической композицией согласно изобретению. Ярлык или инструкция по применению указывает, что композиция предназначена для применения в лечении соответствующего состояния.

[00164] Кроме того, комплект или комплект частей может включать (а) первый контейнер с композицией, которая в нем содержится, причем композиция включает рекомбинантный рабдовирус или фармацевтическую композицию согласно изобретению; и (б) второй контейнер с композицией,

которая в нем содержится, причем композиция включает еще один цитотоксический или другой терапевтический агент, такой как ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC. Комплект или комплект частей в этом варианте воплощения изобретения также может включать инструкцию по применению, в которой указано, что композиция предназначена для применения в лечении конкретного состояния, в частности, рака. В альтернативном или дополнительном варианте комплект или комплект частей также может включать второй (или третий) контейнер, который содержит фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-буферный раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. Он также может включать другие материалы, необходимые с коммерческой или потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иголки и шприцы.

[00165] В еще одном аспекте рекомбинантного рабдовируса согласно заявке применяют в комбинации с прибором, предназначенным для введения рекомбинантного рабдовируса, таким как шприц, ручка для инъекций, микронасос или другой прибор. В оптимальном варианте рекомбинантный рабдовirus согласно изобретению включен в комплект частей, который, например, также включает инструкцию по применению с указаниями, касающимися применения рекомбинантного рабдовируса.

Медицинское применение

[00166] Еще один аспект изобретения обеспечивает рекомбинантный рабдовirus, который кодирует в его геноме по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант для применения в медицине.

[00167] Рекомбинантный рабдовirus согласно изобретению эффективно вызывает лизис опухолевых клеток в комбинации со смертью иммуногенных клеток и стимуляцией естественных иммунных клеток в микросреде опухолей. Соответственно, рекомбинантный рабдовirus согласно изобретению полезен для лечения и/или профилактики рака.

[00168] В ещё одном аспекте рекомбинантный рабдовirus согласно изобретению применяют в способе лечения и/или профилактики рака, который включает введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного

рабдовируса субъекту, страдающему раком, для ослабления таким образом одного или нескольких симптомов рака.

5 [00169] В ещё одном аспекте изобретение также обеспечивает применение рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению для производства медикамента для лечения и/или профилактики рака.

10 [00170] В ещё одном аспекте рекомбинантный рабдовirus согласно изобретению применяют в способе лечения и/или профилактики рака желудочно-кишечного тракта, рака легких или рака головы и шеи, который включает введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного рабдовируса субъекту, страдающему раком желудочно-кишечного тракта, раком легких или раком головы и шеи, для ослабления таким образом одного или нескольких симптомов рака желудочно-кишечного тракта, рака легких или рака головы и шеи.

15 [00171] Для профилактики или лечения заболевания надлежащая доза рекомбинантного рабдовируса зависит от различных факторов, таких как тип заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, тяжесть и течение заболевания, вводят ли рекомбинантный рабдовirus с профилактической или терапевтической целью, предварительная терапия, история болезни пациента и ответ на рекомбинантный рабдовirus, а также решение врача. Рекомбинантный рабдовirus соответствующим образом вводят пациенту за один раз или последовательно курсом лечения.

20 [00172] В одном аспекте рак является солидным раком. Сольдный рак может быть раком головного мозга, раком эндометрия, раком влагалища, раком анального канала, раком ободочной и прямой кишки, орофарингеальной плоскоклеточной карциномой, раком желудка, аденокарциномой желудочно-пищеводного соединения, карциномой пищевода, гепатоцеллюлярной карциномой, аденокарциномой поджелудочной железы, холангиокарциномой, уротелиальной карциномой мочевого пузыря, метастатической меланомой, карциномой предстательной железы, карциномой молочной железы, раком яичника, плоскоклеточной карциномой головы и шеи (HNSCC), глиобластомой, немелкоклеточным раком легких, опухолью головного мозга или мелкоклеточным раком легких. Предпочтение отдают лечению рака желудочно-кишечного тракта, рака легких и рака головы и шеи.

[00173] Рекомбинантный рабдовирус вводят любыми подходящими способами, включая пероральное, парентеральное, подкожное, внутриопухолевое, внутривенное, интрадермальное, внутрибрюшинное, внутрилегочное и интраназальное введение. Парентеральные инфузии включают
5 внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Кроме того, рекомбинантный рабдовирус соответствующим образом вводят путём пульсирующей инфузии. В одном аспекте дозу вводят путем инъекции, в лучшем варианте – внутривенной или подкожной инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение
10 кратковременным или длительным.

[00174] В зависимости от конкретного рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению и его конкретных фармакокинетических и других свойств его вводят ежедневно, раз в два, три, четыре, пять или шесть дней, раз в неделю, раз в месяц и т.п. Режим введения может включать длительное, еженедельное
15 лечение. Под "длительным" следует понимать длительность по крайней мере две недели, в оптимальном варианте месяцы или годы.

[00175] Курс лечения может включать различные режимы и, как правило, требуют многих доз, которые вводят пациенту в течение периода в одну, две, три или четыре недели, необязательно с последующими одним или несколькими
20 циклами лечения. В одном аспекте рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят пациенту 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дозами в пределах данного периода времени. В оптимальном варианте первый цикл лечения завершают в пределах трех недель. В течение трехнедельного лечения рекомбинантный рабдовирус вводят пациенту, как описано в следующих схемах: (I) один раз в 0-й
25 день (II) в 0-й день и 3-й день; (III) в 0-й день, 3-й день и 6-й день; (IV) в 0-й день, 3-й день, 6-й день и 9-й день; (V) в 0-й день и 5-й день; (VI) в 0-й день, 5-й день и 10-й день; (VII) в 0-й день, 5-й день, 10-й день и 15-й день. Возможно повторение этих режимов, и может возникать потребность во втором и третьем циклах лечения, в зависимости от результата первого цикла лечения.
30 Рассчитанный на основе первого цикла второй цикл лечения в оптимальном варианте включает дальнейшее лечение в 21-й день, 42-й день и 63-й день. В оптимальном варианте воплощения рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят пациенту согласно такой схеме: в 0-й день, 3-й день, 21-й день, 42-й день и 63-й день.

[00176] Термин "угнетение" употреблен авторами в том же контексте, что и "ослабление" и "облегчение" для обозначения уменьшения или снижения одной или нескольких характеристик заболевания. Рекомбинантный рабдовирус или фармацевтическую композицию согласно изобретению рецептируют, дозируют и вводят способом, совместимым с надлежащей медицинской практикой. К факторам, которые должны быть учтены в этом контексте, относятся конкретное заболевание, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причина заболевания, место доставки агента, способ введения, график введения и другие факторы, известные практикующим медикам. Эти рассуждения обуславливают "терапевтически эффективное количество" рекомбинантного рабдовируса, подлежащего введению, и минимальное количество, необходимое для предотвращения, ослабления или лечения клинических симптомов рака, в частности, минимальное количество, эффективное при этих нарушениях.

[00177] В другом аспекте рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят много раз и несколькими дозами. В одном аспекте первую дозу рекомбинантного рабдовируса вводят внутриопухолево, а следующие дозы рекомбинантного рабдовируса вводят внутривенно. В ещё одном аспекте первую дозу и по крайней мере одну или несколько следующих доз рекомбинантного рабдовируса вводят внутриопухолево, а следующие после них дозы рекомбинантного рабдовируса вводят внутривенно. Последующие дозы вводят через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или 31 день после начального внутриопухолевого введения.

[00178] В другом аспекте первую дозу рекомбинантного рабдовируса вводят внутривенно, а следующие дозы рекомбинантного рабдовируса вводят внутриопухолево. Следующие дозы вводят через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или 31 день после начального внутривенного введения.

[00179] В другом аспекте рекомбинантный рабдовирус вводят внутривенно, а следующие дозы рекомбинантного рабдовируса вводят внутриопухолево.

5 [00180] В другом аспекте рекомбинантный рабдовирус вводят в каждый момент времени внутривенно и внутриопухолево.

10 [00181] Как указано выше, рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению очень полезен для стимулирования иммунного ответа против раковых клеток. Наблюдали, что мощный иммуноактивирующий потенциал был ограничен микросредой опухолей. Таким образом, в оптимальном аспекте рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению является подходящим для системного введения пациенту. Возможность системного применения является ключевым свойством, поскольку многие виды рака высокометастатичны, и это позволяет лечить труднодоступные, а также недоступные опухолевые поражения. Благодаря этим уникальным иммуностимулирующим свойствам, 15 рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению особенно полезен для лечения метастазирующих опухолей.

20 [00182] У некоторых пациентов развивается резистентность к терапии с применением ингибитора контрольных точек и, по наблюдениям, у таких пациентов накапливаются мутации в пути IFN. Таким образом, в одном аспекте рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению, в частности, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита согласно изобретению, является подходящим для применения в лечении пациентов, у которых развилась резистентность к терапии с применением ингибитора контрольных точек. Благодаря уникальным иммуностимулирующим свойствам рекомбинантного 25 рабдовируса, в частности рекомбинантного вируса везикулярного стоматита согласно изобретению, пациенты, прошедшие такое лечение, могут быть допущены к продолжению терапии с применением ингибитора контрольных точек.

30 [00183] В оптимальном варианте воплощения рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению, в частности, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита согласно изобретению, является подходящим для применения в лечении пациентов с немелкоклеточным раком легких, которые завершили терапию с применением ингибиторов контрольных точек PD-1 или PD-L1, например, антагонистических антител против PD-1 или PD-L1.

[00184] Понятно, что любые из упомянутых выше фармацевтических рецептур или терапевтических способов могут быть осуществлены с применением любых из рекомбинантных рабдовирусов или фармацевтических композиций согласно изобретению.

5 **[00185]** Комбинации

[00186] Настоящее изобретение также обеспечивает комбинированное лечение/способы, обеспечивающие определенные преимущества по сравнению с лечением/способами, применяемыми в настоящее время и/или известными специалистам в данной области. К этим преимуществам могут относиться *in vivo* эффективность (например, улучшенный клинический ответ, степень ответа, увеличение скорости ответа, длительность ответа, показатель стабилизации заболевания, длительность стабилизации, время до прогрессирования заболевания, выживаемость без прогрессирования (PFS) и/или общая выживаемость (OS), более позднее возникновение резистентности и т.п.), безопасное и хорошо переносимое введение и снижение частоты и тяжести неблагоприятных явлений.

[00187] Рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению применяют в комбинации с другими фармакологически активными ингредиентами, такими как соединения существующего уровня техники или те, которые являются стандартом лечения, например, цитостатические или цитотоксические вещества, ингибиторы пролиферации клеток, антиангиогенные вещества, стероиды, иммуномодуляторы/ингибиторы контрольных точек и т.п. Рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению также применяют в комбинации с лучевой терапией.

20 **[00188]** Цитостатические и/или цитотоксические активные вещества, подходящие для введения в комбинации с рекомбинантным рабдовирусом согласно изобретению, включают, но не ограничиваются ими, гормоны, аналоги гормонов и антигормоны, ингибиторы ароматазы, агонисты и антагонисты LHRH, ингибиторы факторов роста (факторы роста, такие как, например, тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), эпидермальный фактор роста (EGF), инсулиноподобные факторы роста (IGF), эпидермальный фактор роста человека (HER, например, HER2, HER3, HER4) и фактор роста гепатоцитов (HGF)), ингибиторами являются, например, антитела (против) фактора роста, антитела

(против) рецептора фактора роста и ингибиторы тирозинкиназы, такие как, например, цетуксимаб, гефитиниб, афатиниб, нинтеданиб, иматиниб, лапатиниб, бозутиниб и трастузумаб; антиметаболиты (например, антифолаты, такие как метотрексат, ралтитрексед, аналоги пиримидина, такие как 5-фторурацил (5-FU), гемцитабин, иринотекан, доксорубицин, TAS-102, капецитабин и гемцитабин, аналоги пурина и аденозина, такие как меркаптопурин, тиогуанин, кладрибин и пентостатин, цитарабин (ара С), флударабин); противоопухолевые антибиотики (например, антрациклины); производные платины (например, цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин); алкилирующие агенты (например, эстрамустин, мехлоретамин, мелфалан, хлорамбуцил, бусульфан, дакарбазин, циклофосфамид, ифосфамид, темозоломид, нитрозомочевини, такие как, например, кармустин и ломустин, тиотепа); антимитотические агенты (например, алкалоиды барвинка, такие как, например, винбластин, виндезин, винорелбин и винкристин; и таксаны, такие как паклитаксель, доцетаксель); ингибиторы ангиогенеза, включая бевацизумаб, рамуцирумаб и афлиберцепт, ингибиторы тубулина; Ингибиторы синтеза ДНК, Ингибиторы PARP, Ингибиторы топоизомеразы (например, эпиподофилотоксины, такие как, например, этопозид и этопозифос, тенипозид, амсакрин, топотекан, иринотекан, митоксантрон), Ингибиторы серин-/треонинкиназы (например, Ингибиторы PDK1, Ингибиторы Raf, Ингибиторы A-Raf, Ингибиторы B-Raf, Ингибиторы C-Raf, Ингибиторы mTOR, Ингибиторы mTORC1/2, Ингибиторы PI3K, Ингибиторы PI3K α , двойные Ингибиторы mTOR/PI3K, Ингибиторы STK33, Ингибиторы АКТ, Ингибиторы PLK1 (такие как воласертиб), Ингибиторы CDK, включая Ингибиторы CDK9, Ингибиторы киназы Aurog), Ингибиторы тирозинкиназы (например, Ингибиторы PTK2/FAK), Ингибиторы белок-белкового взаимодействия, Ингибиторы MEK, Ингибиторы ERK, Ингибиторы FLT3, Ингибиторы BRD4, Ингибиторы IGF-1R, Ингибиторы Vcl-xL, Ингибиторы Vcl-2, Ингибиторы Vcl-2/Vcl-xL, Ингибиторы рецепторов EgbV, Ингибиторы BCR-ABL, Ингибиторы ABL, Ингибиторы Src, аналоги рапамицина (например, эверолимус, темсиролимус, ридафоролимус, сиролимус), Ингибиторы синтеза андрогена, Ингибиторы рецептора андрогена, Ингибиторы DNMT, Ингибиторы HDAC, Ингибиторы ANG1/2, Ингибиторы CYP17, радиофармацевтические вещества, иммунотерапевтические агенты, такие как Ингибиторы иммунных контрольных точек (например, CTLA4, PD1, PD-L1, LAG3 и TIM3 связующие

молекулы / иммуноглобулин, такие как ипилимумаб, ниволумаб, пембролизумаб) и разные химиотерапевтические агенты, такие как амифостин, анагрелид, клодронат, филграстин, интерферон, интерферон альфа, лейковорин, ритуксимаб, прокарбазин, левамизол, месна, митотан, памидронат и порфирин; Ингибиторы протеасом (такие как Бортезомиб); миметики Smac и BH3; агенты восстановления функциональности p53, включая антагонист mdm2-p53; Ингибиторы пути сигнала Wnt/бета-катенина; Flt3L, а также Flt3-стимулирующие антитела или миметики лигандов; блокирующие SIRPальфа и CD47 терапевтические средства; и/или Ингибиторы циклинзависимой киназы 9.

10 **[00189]** Кроме того, возможно превращение иммунологических "холодных" опухолей в "горячие", активация миелоидных/дендритных клеток в связи с опосредованной CD80-Fc активацией Т-клеток также благоприятно взаимодействует со средствами терапевтического воздействия, такими как рекрутеры Т-клеток. Таким образом, в одном варианте воплощения существует возможность применения рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению в комбинированном лечении с рекрутерами Т-клеток, такими как, например, биспецифические связыватели DLL3/CD3, обеспечивающие стимуляцию рецептора Т-клеток, но не костимуляцию. Кроме того, потенциальные партнеры по клинической комбинации также могут включать модулирующие агенты 15 сосудистой сети опухоли. Таким образом, в еще одном варианте воплощения существует возможность применения рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению в комбинированном лечении с модулирующими агентами сосудистой сети опухолей, такими как, например, биспецифические связыватели VEGF/ANG2.

20 **[00190]** Рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению применяют в комбинированном лечении с ингибитором пути PD-1 или антагонистом SMACst / IAP. Такое комбинированное лечение возможно в форме нефиксированной (например, свободной) комбинации веществ или в форме фиксированной комбинации, включая комплект частей.

30 **[00191]** В этом контексте термины "комбинация" или "комбинированный" с точки зрения настоящего изобретения включают, помимо прочего, продукт, являющийся результатом смешивания или комбинирования более чем одного активного агента и включающего как фиксированные, так и нефиксированные (например, свободные) комбинации (включая комплекты) и способы

применения, например, одновременное, параллельное, последовательное, поочередное или отдельное применение компонентов или агентов. Термин "фиксированная комбинация" означает, что оба активных агента вводят пациенту одновременно в форме отдельной единицы или дозы. Термин "нефиксированная комбинация" означает, что оба активных агента вводят пациенту как отдельные единицы одновременно, параллельно или последовательно без конкретных ограничений времени, причем такое введение обеспечивает терапевтически эффективный уровень двух соединений в организме пациента. Последнее также касается коктейльной терапии, например, введения трех или более активных агентов.

[00192] Изобретение обеспечивает рекомбинантный рабдовирус в комбинации с ингибитором пути PD-1 или антагонистом SMACm / IAP для применения в лечении рака, как описано авторами, в оптимальном варианте для лечения солидного рака.

[00193] Изобретение также обеспечивает применения рекомбинантного рабдовируса в комбинации с ингибитором пути PD-1 или антагонистом SMACm / IAP для производства медикамента для лечения и/или профилактики рака, как описано авторами, в оптимальном варианте для лечения солидного рака.

[00194] Изобретение также обеспечивает способ лечения и/или профилактики рака, который включает введение терапевтически эффективного количества рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению и ингибитора пути PD-1 или антагониста SMACm / IAP субъекту, который страдает раком, для ослабления таким образом одного или нескольких симптомов рака. Рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению и ингибитор пути PD-1 или антагонист SMACm / IAP вводят одновременно, последовательно или поочередно.

[00195] Рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению и ингибитор пути PD-1 или антагонист SMACm / IAP вводят одинаковыми путями введения или разными путями введения. В оптимальном варианте ингибитор пути PD-1 или антагонист SMACm / IAP вводят внутривенно, а рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят внутриопухолево. В ещё одном варианте воплощения ингибитор пути PD-1 или антагонист SMACm / IAP вводят внутривенно, а рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят по крайней мере один раз внутриопухолево, а следующие дозы рекомбинантного

рабдовируса вводят внутривенно. Следующие дозы вводят через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или 31 день после начального внутриопухолевого введения. В оптимальном варианте воплощения ингибитор пути PD-1 или антагонисты SMACm / IAP вводят 21 день после начального внутриопухолевого введения.

[00196] Особенное предпочтение отдают лечению с применением рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению в комбинации с:

10 **[00197]** (I) миметиком SMAC (SMACm) / антагонистами IAP,

[00198] (II) иммунотерапевтическими агентами, включая агенты против PD-1 и против PD-L1 и агенты против LAG3, такие как пембролизумаб и ниволумаб, и антитела, описанные в публикации WO2017/198741.

15 **[00199]** Комбинация, которая обеспечивается согласно настоящему изобретению, включает (I) рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению и (IIa) ингибитор пути PD-1, в оптимальном варианте антагонистическое антитело, направленное против PD-1 или PD-L1, или (IIb) антагонисты SMACm/IAP. Также обеспечивается применение такой комбинации, которая включает (I) и (IIa) или (I) и (IIb), для лечения рака, как описано авторами.

20 **[00200]** В другом аспекте обеспечивается комбинированное лечение, которое включает применение (I) рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению и (IIa) ингибитора пути PD-1 или (IIb) антагонистов SMACm / IAP. При таком комбинированном лечении рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению вводят одновременно, последовательно или поочередно с ингибитором пути PD-1 или антагонистами SMACm / IAP.

25 **[00201]** Например, "сопутствующее" введение включает введение активных агентов в течение одного общего периода времени, например, в тот же день (дни), но не обязательно одновременно. Поочередное введение включает введение одного агента в течение периода времени, например, в течение нескольких дней или недели, с последующим введением другого агента в течение следующего периода времени, например, в течение нескольких дней или недели, и повторением этой схемы одним или несколькими циклами. Последовательное введение включает введение одного агента в течение первого периода времени (например, в течение нескольких дней или недели) с

применением одной или нескольких доз, с последующим введением другого агента в течение второго периода времени (например, в течение нескольких дней или недели) с применением одной или нескольких доз. Также возможно применение частично сходящейся схемы, которая включает введение активных агентов в разные дни в течение периода лечения, не обязательно в соответствии с постоянной последовательностью. Также возможно применение различных вариантов этих общих рекомендаций, например в зависимости от применяемых агентов и состояния субъекта.

[00202] Последовательные курсы лечения включают введение рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению с последующим введением ингибитора пути PD-1 или антагонистов SMACm/IAP. Последовательные курсы лечения также включают введение ингибитора пути PD-1 или антагонистов SMACm / IAP с последующим введением рекомбинантного рабдовируса согласно изобретению. Последовательные курсы лечения могут включать введение через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней или 31 день один после другого.

[00203] Ингибитор пути PD-1 с точки зрения этого изобретения и всех вариантов его воплощения является соединением, которое ингибирует взаимодействие PD-1 с его рецептором(ами). Ингибитор пути PD-1 способен нарушать шлюх сигнала PD-1, в оптимальном варианте – опосредованный рецептором PD-1. Ингибитор PD-1 может быть любым ингибитором, направленным против любого элемента пути PD-1, который может антагонизировать путь сигнала PD-1. Ингибитор может быть антагонистическим антителом, нацеленным на любой элемент пути PD-1, в оптимальном варианте направленным против рецептора PD-1, PD-L1 или PD-L2. Также ингибитор пути PD-1 может быть фрагментом рецептора PD-1 или рецептора PD-1, который блокирует активность лигандов PD1.

[00204] Антагонисты PD-1 являются общеизвестными среди специалистов в данной области, например, как описано в публикации Li et al., *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1151 (включенной в настоящее описание путем ссылки). Любой антагонист PD-1, в частности, антитела, такие как описанные в публикации Li et al., а также другие антитела, описанные ниже авторами,

являются подходящими для применения согласно изобретению. В оптимальном варианте антагонист PD-1 согласно настоящему изобретению и все варианты его воплощения выбирают из группы, которая состоит из таких антител:

- пембролизумаб (антитело против PD-1);
- 5 • ниволумаб (антитело против PD-1);
- пидилизумаб (антитело против PD-1);
- PDR-001 (антитело против PD-1);
- PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5, как описано авторами ниже
(антитела против PD-1);
- 10 • атезолизумаб (антитело против PD-L1);
- авелумаб (антитело против PD-L1);
- дурвалумаб (антитело против PD-L1).

[00205] Пембролизумаб (также известный под старым названием как ламбролизумаб; торговое название Keytruda; также известный как МК-3475),
15 описанный, например, в публикации Hamid, O. et al. (2013) *New England Journal of Medicine* 369(2): 134 - 44, является гуманизированным моноклональным антителом IgG4, связывающимся с PD-1; он содержит мутацию в С228Р, предназначенную для предотвращения Fc-опосредованной цитотоксичности. Пембролизумаб описан, например, в публикациях US 8,354,509 и
20 WO2009/114335. Он является утвержденным Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для лечения пациентов, страдающих неоперабельной или метастатической меланомой и пациентов с метастатическим НМКРЛ.

[00206] Ниволумаб (регистрационный номер CAS: 946414-94-4; BMS-
25 936558 или MDX1106b) является полностью человеческим моноклональным антителом IgG4, которое специфически блокирует PD-1, лишенным заметной антителозависимой клеточной токсичности (ADCC). Ниволумаб описан, например, в публикациях US 8,008,449 и WO2006/121168. Он был утвержден
30 Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для лечения пациентов, страдающих неоперабельной или метастатической меланомой, метастатической НМКРЛ и почечноклеточной карциномой на поздних стадиях.

[00207] Пидилизумаб (CT-011; Cure Tech) является гуманизированным моноклональным антителом IgG1k, которое связывается с PD-1. Пидилизумаб описан, например, в публикации WO2009/101611.

5 [00208] PDR-001 или PDR001 является высокоаффинным блокирующим лиганд гуманизированным антителом IgG4 против PD-1, которое блокирует связывание PD-L1 и PD-L2 с PD-1. PDR-001 описан в публикациях WO2015/112900 и WO2017/019896.

10 [00209] Антитела с PD1-1 по PD1-5 являются молекулами антител, которые определяются последовательностями, как показано в Таблице 1, где HC означает тяжелую цепь (полной длины), а LC означает легкую цепь (полной длины):

[00210] Таблица 1:

SEQ ID NO:	Название последовательности	Аминокислотная последовательность
14	HC PD1-1	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVBBLCLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
15	LC PD1-1	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWFYQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
16	HC PD1-2	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSASAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNPNYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVBBLCLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
17	LC PD1-2	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDTSGISFMNWFYQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	HC PD1-3	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKASAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPETCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVBBLCLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
19	LC PD1-3	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWFYQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20	HC PD1-4	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVBBLCTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
21	LC PD1-4	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWFYQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
22	HC PD1-5	EVMLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSKSAMSWVRQAPGKGLEWVAYISGGGGDTYYSSSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSNVNYYAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVBBLCTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLG
23	LC PD1-5	EIVLTQSPATLSLSPGERATMSCRASENIDVSGISFMNWFYQQKPGQAPKLLIYVASNQSGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[00211] В частности, описанная авторами молекула антитела против PD-1 имеет:

(PD1-1:) тяжелую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и легкую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; или

(PD1-2:) тяжелую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и легкую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; или

(PD1-3:) тяжелую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и легкую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; или

(PD1-4:) тяжелую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, и легкую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21; или

(PD1-5:) тяжелую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, и легкую цепь, которая включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23.

[00212] Атезолизумаб (Tecentriq, также известный как MPDL3280A) является человеческим моноклональным антителом IgG1k фагового происхождения, нацеленным на PD-L1, которое описано, например, в

публикации Deng et al. *mAbs* 2016; 8: 593 - 603. Он был утвержден Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для лечения пациентов, страдающих уротелиальной карциномой.

5 [00213] Авелумаб является полностью человеческим моноклональным антителом IgG1 против PD-L1, описанным, например, в публикации Boyerinas et al. *Cancer Immunol. Res.* 2015; 3: 1148 - 1157.

10 [00214] Дурвалумаб (MEDI4736) является человеческим моноклональным антителом IgG1k с высокой специфичностью к PD-L1, описанным, например, в публикациях Stewart et al. *Cancer Immunol. Res.* 2015; 3: 1052 - 1062 или Ibrahim et al. *Semin. Oncol.* 2015; 42: 474 - 483.

15 [00215] Другие антагонисты PD-1, описанные в публикации Li et al. (см. выше), или те, которые, по сведениям, проходят клинические испытания, такие как AMP-224, MEDI0680 (AMP-514), REGN2810, BMS-936559, JS001-PD-1, SHR-1210, BMS-936559, TSR-042, JNJ-63723283, MEDI4736, MPDL3280A и MSB0010718C, могут быть применены как альтернативные или дополнительные к вышеупомянутым антагонистам.

20 [00216] INN в контексте данного описания также охватывают все биологически подобные антитела, которые имеют такие же или по существу такие же аминокислотные последовательности, что и первоначальное антитело, включая, помимо прочих, биологически подобные антитела, утвержденные в соответствии с Кодексом законов США 42 USC §262, пункт (k) в США и аналогичными правилами в других юрисдикциях.

25 [00217] Вышеперечисленные антагонисты PD-1 являются известными специалистами в данной области, с их соответствующими способами производства, терапевтическим применением и свойствами.

[00218] В одном варианте воплощения антагонистом PD-1 является пембролизумаб.

[00219] В ещё одном варианте воплощения антагонистом PD-1 является ниволумаб.

30 [00220] В ещё одном варианте воплощения антагонистом PD-1 является пидилизумаб.

[00221] В ещё одном варианте воплощения антагонистом PD-1 является атезолизумаб.

[00222] В ещё одном варианте воплощения антагонистом PD-1 является авелумаб.

[00223] В ещё одном варианте воплощения антагонистом PD-1 является дурвалумаб.

5 [00224] В ещё одном варианте воплощения антагонистом PD-1 является PDR-001.

[00225] В ещё одном варианте воплощения антагонистом PD-1 является PD1-1.

10 [00226] В ещё одном варианте воплощения антагонистом PD-1 является PD1-2.

[00227] В ещё одном варианте воплощения антагонистом PD-1 является PD1-3.

[00228] В ещё одном варианте воплощения антагонистом PD-1 является PD1-4.

15 [00229] В ещё одном варианте воплощения антагонистом PD-1 является PD1-5.

[00230] Миметик SMAC с точки зрения данного изобретения и всех вариантов его воплощения является соединением, которое связывается с белками IAP и вызывает их распад. В оптимальном варианте миметик SMAC с точки зрения данного изобретения и всех вариантов его воплощения выбирают из группы, которая состоит из таких соединений (A0):

25 • миметик SMAC (т.е. соединение), как (в целом и/или конкретно) описан в публикации WO 2013/127729, или его фармацевтически приемлемая соль;

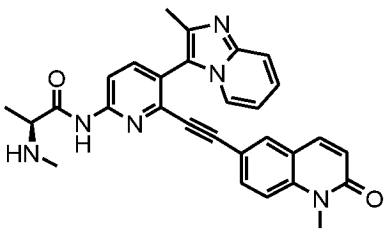
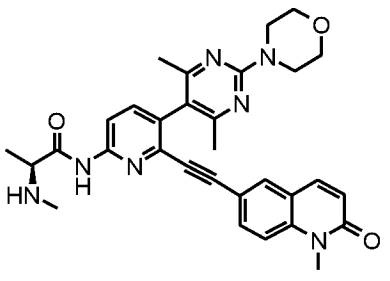
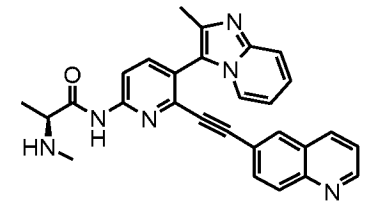
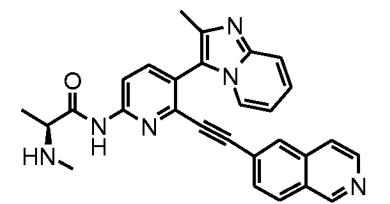
• миметик SMAC (т.е. соединение), как (в целом и/или конкретно) описан в публикации WO 2015/025018, или его фармацевтически приемлемая соль;

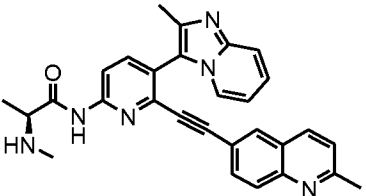
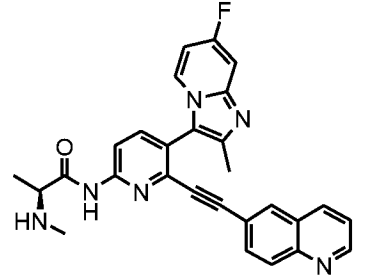
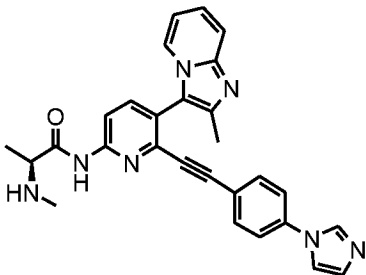
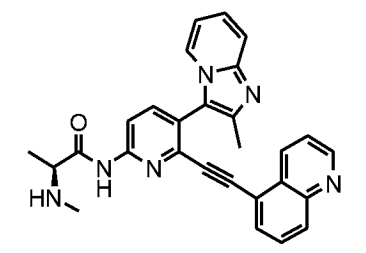
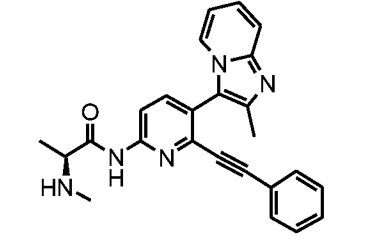
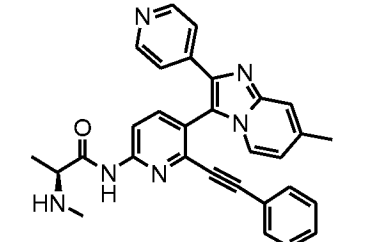
30 • миметик SMAC (т.е. соединение), как (в целом и/или конкретно) описан в публикации WO 2015/025019, или его фармацевтически приемлемая соль;

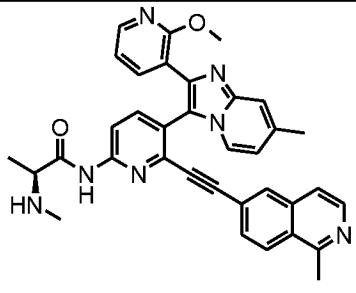
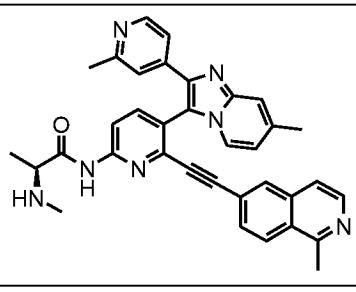
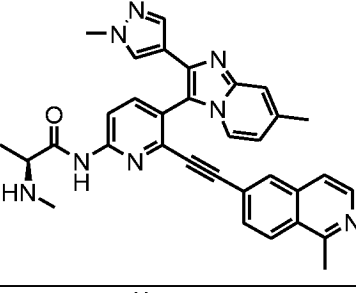
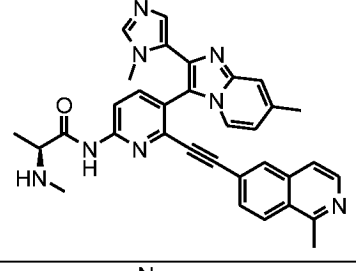
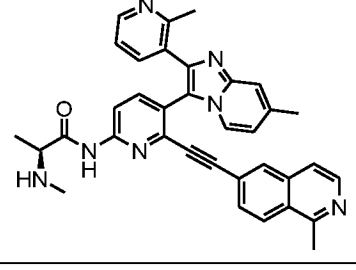
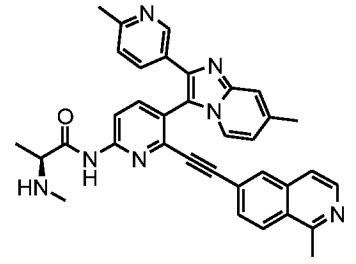
• миметик SMAC (т.е. соединение), как (в целом и/или конкретно) описан в публикации WO 2016/023858, или его фармацевтически приемлемая соль;

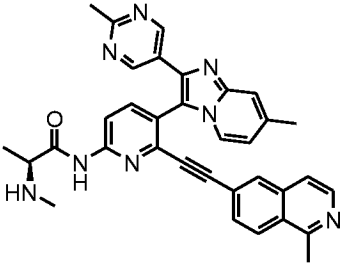
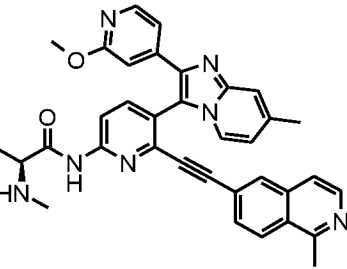
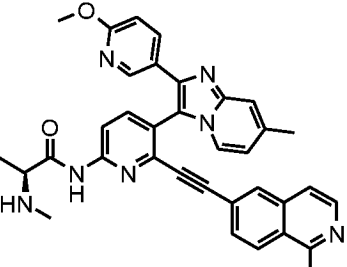
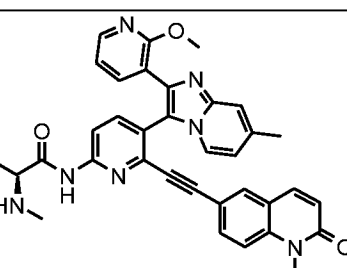
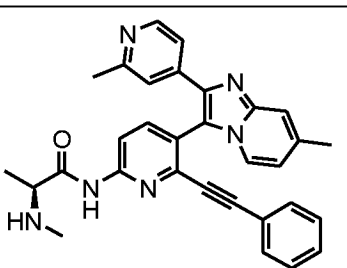
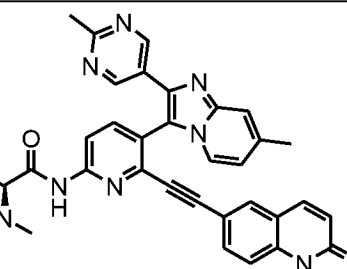
- миметик SMAC (т.е. соединение), как (в целом и/или конкретно) описан в публикации WO 2008/0016893, или его фармацевтически приемлемая соль;
- LCL161, то есть, соединение А из Примера 1 публикации WO 5 2008/016893 (стр. 28/29; [122]), или его фармацевтически приемлемая соль;
- миметик SMAC, известный как Debio-1143, или его фармацевтически приемлемая соль;
- миметик SMAC, известный как бинапант, или его фармацевтически приемлемая соль;
- 10 • миметик SMAC, известный как ASTX-660, или его фармацевтически приемлемая соль;
- миметик SMAC, известный как CUDC-427, или его фармацевтически приемлемая соль;
- любой из миметиков SMAC с 1 по 26 из Таблицы 2 или его 15 фармацевтически приемлемая соль:

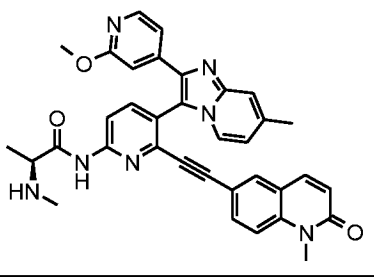
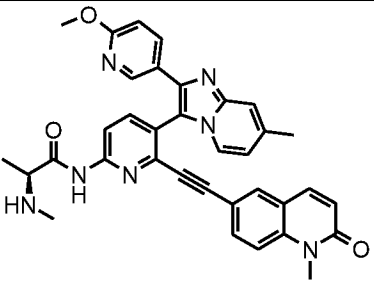
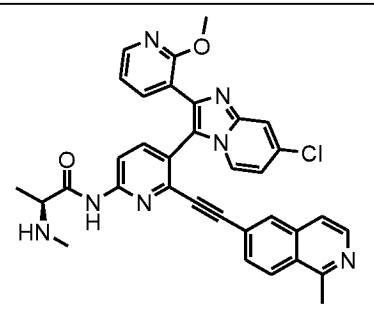
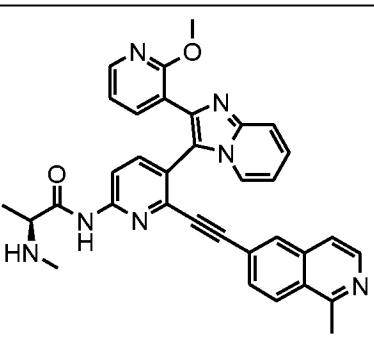
[00231] Таблица 2:

1	
2	
3	
4	

5	 <chem>CN(C)C(=O)Nc1cc(C)c(C2=CN(C)CC2)c1C#Cc3ccc4nc(C)ccc34</chem>
6	 <chem>CN(C)C(=O)Nc1cc(C)c(C2=CN(C)C(F)=N2)c1C#Cc3ccc4nc(C)ccc34</chem>
7	 <chem>CN(C)C(=O)Nc1cc(C)c(C2=CN(C)CC2)c1C#Cc3ccc4c5c(N)ncn5c4</chem>
8	 <chem>CN(C)C(=O)Nc1cc(C)c(C2=CN(C)CC2)c1C#Cc3ccc4nc(C)ccc34</chem>
9	 <chem>CN(C)C(=O)Nc1cc(C)c(C2=CN(C)CC2)c1C#Cc3ccccc3</chem>
10	 <chem>CN(C)C(=O)Nc1cc(C)c(C2=CN(C)CC2)c1C#Cc3ccccc3</chem>

11	
12	
13	
14	
15	
16	

17	
18	
19	
20	
21	
22	

23	
24	
25	
26	

[00232] Примеры соединений с 1 по 10 в Таблице 2 описаны в публикации WO 2013/127729. Примеры соединений с 11 по 26 в Таблице 2 описаны в публикации WO 2016/023858.

- 5 [00233] Термин “миметик SMAC / антагонист IAP” в контексте данного описания также включает вышеперечисленные миметики SMAC в форме таутомера, фармацевтически приемлемой соли, гидрата или сольвата (включая гидрат или сольват фармацевтически приемлемой соли). Он также включает миметик SMAC во всех его твердых, в оптимальном варианте кристаллических
- 10 формах и во всех кристаллических формах его фармацевтически приемлемых

солей, гидратов и сольватов (включая гидраты и сольваты фармацевтически приемлемых солей).

5 [00234] Все вышеперечисленные миметики SMAC известны специалистам в данной области, с их соответствующими способами синтеза и свойствами. Все упомянутые выше патентные заявки включены путем ссылки в их полном объеме.

[00235] В одном варианте воплощения миметиком SMAC является LCL161 или его фармацевтически приемлемая соль (A1).

10 [00236] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 1 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A2).

[00237] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 2 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A3).

[00238] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 3 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A4).

15 [00239] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 4 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A5).

[00240] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 5 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A6).

20 [00241] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 6 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A7).

[00242] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 7 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A8).

[00243] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 8 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A9).

25 [00244] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 9 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A10).

[00245] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 10 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A11).

30 [00246] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 11 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A12).

[00247] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 12 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A13).

[00248] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 13 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A14).

[00249] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 14 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A15).

[00250] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 15 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A16).

5 [00251] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 16 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A17).

[00252] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 17 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A18).

10 [00253] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 18 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A19).

[00254] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 19 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A20).

[00255] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 20 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A21).

15 [00256] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 21 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A22).

[00257] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 22 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A23).

20 [00258] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 23 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A24).

[00259] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 24 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A25).

[00260] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 25 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A26).

25 [00261] В ещё одном варианте воплощения миметиком SMAC является соединение 26 из Таблицы 2 или его фармацевтически приемлемая соль (A27).

[00262] Все варианты воплощения с (A1) по (A27) являются оптимальными вариантами варианта воплощения (A0) касательно характера миметика SMAC.

30 [00263] В оптимальном варианте воплощения, который касается способов комбинированного лечения, рекомбинантный рабдовирус является рекомбинантным вирусом везикулярного стоматита, который кодирует в его геноме по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, в оптимальном варианте человеческий

внеклеточный домен CD80, выбранный из группы, к которой относятся: (I) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, (II) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, (III) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (IV) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (V) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 состоит из аминокислот 1 - 207 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 1 - 207 SEQ ID NO: 4, и Fc-домен состоит из аминокислот 208 - 433 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 208 - 433 SEQ ID NO: 4, (VI) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 согласно любому из пунктов (I)-(V), который также включает сигнальную пептидную последовательность, или (VII) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает SEQ ID NO: 3 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3, причем ген, который кодирует гликопротеин G рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP LCMV.

30 [00264] В ещё одном оптимальном варианте воплощения, который касается комбинированного лечения, рекомбинантный рабдовирус является рекомбинантным вирусом везикулярного стоматита, который кодирует в его геноме нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и по крайней мере

один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, в оптимальном варианте человеческий внеклеточный домен CD80, причем Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант выбирают из группы, к которой относятся: (I) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, (II) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, (III) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (IV) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2, (V) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 состоит из аминокислот 1 - 207 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 1 - 207 SEQ ID NO: 4, и Fc-домен состоит из аминокислот 208 - 433 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 208 - 433 SEQ ID NO: 4, (VI) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 согласно любому из пунктов (I)-(V), который также включает сигнальную пептидную последовательность, или (VII) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает SEQ ID NO: 3 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3, причем ген, который кодирует гликопротеин G вируса везикулярного стоматита, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP LCMV, и нуклеопротеин (N) включает аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % или 100 % идентичности с SEQ ID NO: 7.

98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 7, фосфопротеин (P) включает аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 8, большой белок (L) включает аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 9, и матриксный белок (M) включает аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 10 или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 10.

[00265] В варианте воплощения, которому отдают наибольшее предпочтение, и который касается способов комбинированного лечения, рекомбинантный рабдовирус является рекомбинантным вирусом везикулярного стоматита, который кодирует в его геноме по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, в оптимальном варианте человеческий внеклеточный домен CD80, причем Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант включает или состоит из SEQ ID NO: 3 или имеет по меньшей мере 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичности с SEQ ID NO: 3, причем ген, который кодирует гликопротеин G рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP LCMV.

Генерирование и продуцирование вируса и продуцирующая вирус клетка

[00266] Изобретение также обеспечивает продуцирующую вирус клетку, которая характеризуется тем, что эта клетка продуцирует рекомбинантный рабдовирус или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита согласно изобретению.

[00267] Клетка может иметь любое происхождение и может присутствовать как выделенная клетка или клетка, которая включена в популяцию клеток. Предпочтение отдают варианту, в котором клетка,

продуцирующая рекомбинантный рабдовирус или рекомбинантный вирус
везикулярного стоматита, является клеткой млекопитающего. В варианте
воплощения, которому отдают наибольшее предпочтение, продуцирующая вирус
клетка согласно изобретению характеризуется тем, что клетка млекопитающего
5 является мультипотентной зрелой клеткой-предшественником (МАРС),
нейтральной стволовой клеткой (NSC), мезенхимальной стволовой клеткой
(MSC), клеткой HeLa, клеткой НЕК, любой клеткой НЕК293 (например,
НЕК293F или НЕК293Т), клеткой яичника китайского хомячка (СНО), клеткой
почки новорожденного хомяка (ВНК) или клеткой Vero или взятые из костного
10 мозга инфильтрирующие в опухоль клетки (BM-TIC).

[00268] В альтернативном варианте продуцирующая вирус клетка может
быть клеткой человека, клеткой обезьяны, клеткой мыши или клеткой хомяка.
Специалистам в данной области известны способы, подходящие для применения
в испытании на продуцирование клеткой вируса и определение таким образом,
15 охватывается ли конкретная клетка объемом настоящего изобретения. В этом
отношении количество вируса, продуцируемого клеткой согласно изобретению,
не имеет конкретных ограничений. Оптимальными вирусными титрами являются
 $\geq 1 \times 10^7$ TCID₅₀/мл или $\geq 1 \times 10^8$ копий генома/мл в необработанных супернатантах
данной культуры клетки после инфицирования без дальнейшей обработки.

[00269] У конкретном варианте воплощения продуцирующая вирус
клетка согласно изобретению характеризуется тем, что эта клетка включает одну
или несколько экспрессионных касет для экспрессии по крайней мере одного из
генов, выбранных из группы, яка состоит из генов n, l, p и m, которые кодируют
белки N, L, P и M ВВС, и гена gr, который кодирует гликопротеин LCMV-GP,
25 Данденонг-GP или Мопея-GP.

[00270] Продуцирующие вирус клетки в контексте изобретения включают
классические упаковочные клетки для продуцирования рекомбинантного
рабдовируса из нереплицируемых векторов, а также клетки-продуценты для
продуцирования рекомбинантного рабдовируса из векторов, способных к
30 воспроизведению. Упаковочные клетки обычно включают одну или несколько
плазмид для экспрессии существенных генов, в которых не хватает
соответствующего вектора, который должен быть упакован, и/или необходимых
для продуцирования вируса. Такие клетки известны специалистам в данной

области, которые могут выбрать соответствующие линии клеток, подходящие для нужной цели.

[00271] Рекомбинантный рабдовирус согласно изобретению продуцируют согласно способам, известным специалистам в данной области, к которым, кроме других, относятся (1) применение кДНК, трансфицированных в клетку, или (2) комбинация кДНК, трансфицированных в хелперную клетку, или (3) кДНК, трансфицированных в клетку, которую затем инфицируют хелпером/минивирусом, обеспечивая *in trans* остальные компоненты или виды активности, необходимых для получения инфекционного или неинфекционного рекомбинантного рабдовируса. При применении любых из этих способов (например, хелпера/минивируса, линии хелперных клеток или только трансфекции кДНК) минимальными необходимыми компонентами являются молекула ДНК, содержащая действующие в цис-позиции сигналы для (1) инкапсулирования геномной (или антигеномной) РНК N-белком, Р-белком и L-белком рабдовируса и (2) репликации эквивалента геномной или антигеномной РНК (промежуточного продукта репликации).

[00272] Реплицирующий элемент или репликон является цепью РНК, минимально содержащей на 5' и 3' концах лидерную последовательность и трейлерную последовательность рабдовируса. В геномном направлении лидерная последовательность находится на 3' конце, а трейлерная последовательность – на 5' конце. Любая РНК, расположенная между этими двумя сигналами репликации, в свою очередь, реплицируется. Лидерные и трейлерные участки также должны содержать минимальные действующие в цис-позиции элементы с целью инкапсулирования N-белком и для связывания полимеразы, которые необходимы для инициации транскрипции и репликации. Для приготовления рекомбинантного рабдовируса минивирус, содержащий G-ген, также должен содержать лидерный участок, трейлерный участок и G-ген с соответствующими сигналами инициации и терминации для продуцирования мРНК G-белка. Если минивирус также включает M-ген, также должны присутствовать ответные сигналы инициации и терминации для продуцирования мРНК M-белка.

[00273] Для любого гена, содержащегося в геноме рекомбинантного рабдовируса, ген должен быть фланкирован соответствующими сигналами инициации и терминации транскрипции, обеспечивающих возможность

экспрессии этих генов и продуцирования белковых продуктов (Schnell et al., Journal of Virology, p. 2318). – 2323, 1996). Для продуцирования "неинфекционного" рекомбинантного рабдовируса рекомбинантный рабдовирус должен иметь минимальные репликонные элементы и N-, P- и L-белки, а также должен содержать M-ген. Таким образом, продуцируются частицы вируса, которые отщепляются от клетки, но являются неинфекционными частицами. Для продуцирования "инфекционных" частиц частицы вируса должны дополнительно включать белки, способные опосредовать связывание и слияние частиц вируса, например, через применение прикрепляющего белка или рецепторного лиганда. Естественным рецепторным лигандом рабдовирусов является G-белок.

[00274] Для использования приемлема любая клетка, которая обеспечивает возможность составления рекомбинантного рабдовируса. Один способ получения инфекционных частиц вируса включает соответствующую линию клеток, инфицированную плазмидой, которая кодирует РНК-полимеразу T7 или другую подходящую полимеразу бактериофагов, такую как полимеразы T3 или SP6. Затем клетки трансфицируют отдельной кДНК, содержащей гены, кодирующие G-, N-, P-, L- и M-белки рабдовируса. Эти кДНК обеспечивают белки для построения частиц рекомбинантного рабдовируса. Клетки трансфицируют любым способом, известным специалистам в данной области.

[00275] Также в линию клеток трансфицируют "полицистронную кДНК", содержащую эквивалент геномной РНК рабдовируса. Если частица инфекционного рекомбинантного рабдовируса предполагается как литическая в инфицированной клетке, должны присутствовать гены, кодирующие N-, P-, M- и L-белки, а также любой сегмент гетерологической нуклеиновой кислоты. Если частица инфекционного рекомбинантного рабдовируса предполагается как нелитическая, ген, кодирующий M-белок, не включают в полицистронную ДНК. Под "полицистронной кДНК" следует понимать кДНК, которая включает по крайней мере транскрипционные единицы, содержащие гены, кодирующие N-, P- и L-белки. Полицистронная ДНК рекомбинантного рабдовируса также может содержать ген, кодирующий вариант белка или его полипептидный фрагмент, или терапевтическую нуклеиновую кислоту или белок. В альтернативном варианте любой белок, который должен быть первоначально ассоциирован с

образовавшейся сначала вирусной частицей или ее фрагментом, может быть снабжен *in trans*.

[00276] Также предусмотрена полицистронная кДНК, которая включает ген, кодирующий Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80. Предполагаемая полицистронная кДНК может содержать ген, кодирующий вариант белка, ген, который кодирует репортер, терапевтическую нуклеиновую кислоту и/или N-P-L-гены или N-P-L-M-гены. Первым этапом в генерировании рекомбинантного рабдовируса является экспрессия РНК, являющаяся геномным или антигеномным эквивалентом кДНК. Затем эту РНК упаковывают N-белком, а затем реплицируют P/L-белками. Образующийся таким образом рекомбинантный вирус может быть восстановлен. Если G-белок отсутствует в геноме рекомбинантной РНК, его обычно обеспечивают *in trans*. Если белки G и M отсутствуют, то оба обеспечивают *in trans*. Для получения частиц "неинфекционного рабдовируса" процедура может быть такой, как описано выше, за исключением того, что полицистронная кДНК, трансфицированная в клетки, должна содержать N-, P- и L-гены только рабдовируса. Полицистронная кДНК частиц неинфекционного рабдовируса может дополнительно содержать ген, который кодирует белок.

[00277] Трансфицированные клетки обычно инкубируют в течение по крайней мере 24 ч при требуемой температуре, обычно приблизительно 37 градусов. Для частиц неинфекционного рабдовируса супернатант собирают и выделяют частицы вируса. Для частиц инфекционного рабдовируса супернатант, содержащий вирус, собирают и переносят в свежие клетки. Свежие клетки инкубируют в течение примерно 48 часов и супернатант собирают.

[00278] Другие особенности и преимущества настоящего изобретения станут очевидными по ознакомлению с представленными выше подробными Примерами, объясняющими принципы изобретения.

ПРИМЕРЫ

[00279] Пример 1

[00280] Генерирование BBC-GP-huCD80-Fc (IgG1) – Вирусное спасение

[00281] Геном онколитического вируса BBC-GP подвергали инженерии для кодирования гена CD80-Fc для местной экспрессии слитого белка CD80-Fc в месте опухоли во время вирусной репликации. Репликационно-компетентные варианты вируса BBC-GP-CD80-Fc генерировали с помощью обратной генетики

(клонирование нужного гена (GOI), спасения вируса и многократное очищение
бляшек) из бактериальных плазмид, содержащих кДНК для полного вирусного
генома ВВС-GP и человеческого CD80-Fc. Плазмиды pВВС-GP-CD80-Fc были
получены на основе плазмиды pВВС-XN1 (Schnell et al.), содержащей полный
5 геном кДНК ВВС серотипа Indiana под контролем промотора Т7. Для
генерирования вариантов pВВС-GP-CD80-Fc полную последовательность для
оболочкового белка G ВВС замещали кодон-оптимизированную
последовательность оболочкового белка GP из вируса лимфоцитарного
хориоменингита (LCMV, штамм WE-HPI). Кроме того, синтетическую
10 нуклеиновую кислоту, кодирующую ген CD80-Fc, вставляли между
гликопротеином GP и вирусной полимеразой L посредством сборки Гибсона.
Транскрипцию гена CD80-Fc в контексте вирусной инфекции обеспечивают с
помощью дополнительной последовательности старт-сигнала ВВС на 3' конце и
дополнительной последовательности стоп-сигнала на 5' конце открытой рамки
15 считывания CD80-Fc.

[00282] Инфекционные вирусы восстанавливали (или спасали) из
плазмидных кДНК путем трансфекции НЕК293Т или любой другой разрешенной
линии клеток ВВС с применением стандартных способов трансфекции
(например, осаждение из СаРО₄, доставка липосомальной ДНК). В общих чертах
20 клетки НЕК293Т трансфицировали экспрессионными плазмидами на основе pSF-
CAG-amp, которые кодируют белки ВВС N, P и L, а также кодон-
оптимизированной Т7-полимеразой. Кроме того, котрансфицировали плазмиду,
кодирующую вирусную геномную кДНК ВВС-GP, ВВС-GP-CD80-Fc или ее
вариант. На первом этапе процесса спасения Т7 полимеразы транскрибирует
25 геном РНК вируса с кодированной плазмидой вирусной кДНК. На втором этапе
L- и P-белки ВВС, экзогенно экспрессируемые из котрансфицированных
плазмид, далее амплифицируют вирусные геномы РНК. Вирусные геномы РНК
котранскрипционно инкапсулируются N-белком ВВС. Кроме того,
30 полимеразный комплекс P/L обеспечивает возможность транскрипции полного
набора вирусных генных продуктов N, P, M, GP и L, а также вставленных
вариантов CD80-Fc. Вирусные геномы РНК после этого упаковывают в
инфекционные частицы ВВС, содержащие рибонуклеопротеин, матриксный
белок и вирусный оболочковый GP. Частицы вируса высвобождаются из клеток
путем отщепления.

[00283] Спасенные вирусы пересеивали на разрешенных линиях клеток, таких как, например, НЕК293Т. Выполняли несколько циклов клонирования с помощью метода бляшкообразования перед генерированием вирусного посевного материала стандартными способами. В общих чертах клетки НЕК293Т инфицировали серийными десятикратными разведениями спасенного предварительного посевного материала. Приблизительно через два часа монослой клеток дважды промывали и покрывали средами, содержащими 0,8 % низкоплавкой агарозы. Через 24 - 48 ч после инфицирования бляшки собирали и вирус использовали для дополнительного цикла клонирования с помощью метода бляшкообразования или генерировали вирусные посевные материалы.

[00284] Пример 2

[00285] Подтверждение репликативной способности вируса – TCID₅₀ / уничтожение клеток

[00286] ФИГУРЫ 3А-В

[00287] Клетки НЕК293F, выращиваемые в суспензионной культуре (среды Freestyle™ 293 Expression Medium (ThermoFisher Scientific)) инфицировали с низким значением MOI (0,0005) или ВВС-GP, или ВВС-GP-CD80-Fc. В день инфицирования клетки имели конfluence 60 – 70 %. Подсчитывали одну лунку (счетчик клеток Countess™, Invitrogen) перед инфицированием других лунок с 0,005 MOI одного из вирусных конструкторов ВВС-GP (GP) или ВВС-GP-CD80-Fc. Супернатанты культур (общий объем 3 мл) собирали и образцы анализировали через 8 ч, 16 ч, 24 ч, 32 ч, 40 ч и 48 ч после инфицирования для вирусной репликации и уничтожения клеток. Вирусную репликацию оценивали, применяя обнаружение вирусных геномов путем кПЦР в супернатанте культур в указанные моменты времени (ФИГУРА 3А). Вызванное вирусом уничтожение клеток оценивали путем подсчета жизнеспособных клеток в образцах культуры в указанные моменты времени (ФИГУРА 3В). Оба вируса ведут себя одинаково, что указывает на то, что добавление человеческого трансгена CD80-Fc не влияет на репликативную способность вируса.

[00288] Пример 3

[00289] Экспрессия карго – ELISA

[00290] ФИГУРА 4

[00291] Супернатанты из инфицированных ВВС-GP-CD80-Fc клеток НЕК293 анализировали в разные моменты времени после вирусной инфекции,

применяя ELISA. Экспрессию кодируемого вирусом слитого белка CD80-Fc инфицированными клетками млекопитающего подтверждали путем инфицирования клеток НЕК293 родительским вирусом ВВС-GP или кодирующим CD80-Fc новым вирусом ВВС-GP-CD80-Fc, обоими при МОИ1.

5 Экспрессия трансгена CD80-Fc, измеряемая с помощью ELISA в супернатантах культуры ткани, легко подвергалась выявлению через 24, 31 и 48 часов после инфицирования клеток.

[00292] Пример 4

10 [00293] ВВС-GP-huCD80-Fc (*in vivo*) – Опухолевая модель СТ26.CL25-IFNARKO (с экспрессией карго)

[00294] ФИГУРЫ 5А-В

15 [00295] При применении опухолевой модели СТ26.CL25-IFARKO, подвергнутой инженерии для лишения рецептора интерферона альфа (IFNAR), для лучшего отражения ситуации у пациента-человека и обеспечения возможности улучшенной репликации вируса, а также экспрессии карго в мышинной системе, родительский вирус ВВС-GP и кодирующий CD80-Fc новый вирус ВВС-GP-CD80-Fc сравнивали, сопоставляя друг с другом. С этой целью два вируса вводили внутривенно (*i.v.*) в дозе 2×10^7 TCID₅₀ в 0-й день и 3-й день (график выживаемости) мышам с развитыми опухолями. Как показано на графике (А), родительский вирус ВВС-GP не демонстрирует значительного улучшения выживаемости животных с опухолями при этой низкой вирусной дозе, тогда как лечение укрепленным карго новым вирусом ВВС-GP-CD80-Fc в результате обеспечило заметно улучшенную выживаемость по сравнению с контрольными животными и получавшими ВВС-GP. Кроме того, лечение кодирующим CD80-Fc вирусом не приводило к увеличению потери массы тела по сравнению с контрольными животными и получавшими ВВС-GP (В), доказывая безопасность этого нового вируса.

[00296] Пример 5

30 [00297] ВВС-GP-huCD80-Fc (*in vivo*) – Опухолевые модели В16-F1-OVA и ЕМТ-6 (низкая экспрессия карго)

[00298] ФИГУРЫ 6А-С и ФИГУРЫ 7А-В

[00299] Низкоразрешающие опухолевые модели В16-F1-OVA (ФИГУРЫ 6А-С) и ЕМТ-6 (ФИГУРЫ 7А-В), разрешающие только минимальную вирусную репликацию и, соответственно, экспрессию карго (CD80-Fc), лечили двумя

внутриопухолевыми (i.t.) инъекциями родительского вируса ВВС-GP или кодирующим CD80-Fc новым вирусом ВВС-GP-CD80-Fc в 0-й и 3-й день. Для инъекций использовали только мышей с развитыми опухолями. В результате лечения опухолевых моделей В16-F1-OVA с применением ВВС-GP-CD80-Fc было достигнуто улучшение задержки роста опухолей по сравнению с контролем и ВВС-GP. В результате лечения опухолевой модели ЕМТ-6 с применением ВВС-GP-CD80-Fc был достигнут улучшенный показатель клиренса опухоли (33% подвергнутых лечению животных) по сравнению с контрольными (0% подвергнутых лечению животных) и лечеными ВВС-GP (8% подвергнутых лечению животных) мышами. Эти результаты свидетельствуют в пользу потенциала улучшения укрепленного карго нового вируса ВВС-GP-CD80-Fc по сравнению с родительским вирусом ВВС-GP даже в опухолях с низким уровнем репликации вируса и экспрессии карго, что тесно связано со способностью вируса к репликации.

15 [00300] Пример 6

[00301] *In vivo* вирусная персистенция и репликация, а также экспрессия карго

[00302] ФИГУРЫ 8 – 10

[00303] Мышей Balb/c с развитыми опухолями СТ26.CL25-IFNARKO (опухолевые клетки СТ26.CL25 с делецией рецептора интерферона альфа) использовали в качестве контрольных или лечили с применением однократной внутривенной инъекции 1×10^8 TCID₅₀ ВВС-GP-CD80-Fc. Через три и семь дней после лечения опухоли вырезали; полную РНК извлекали и анализировали с применением праймеров кПЦР, специфичных к п-гену ВВС (ФИГУРА 8). Мышей C57BL/6 с развитыми опухолями LLC1-IFNARKO (LLC1 опухолевые клетки с делецией рецептора интерферона альфа) использовали как контрольные или лечили с применением однократной внутривенной инъекции 1×10^8 TCID₅₀ ВВС-GP или ВВС-GP-CD80-Fc. Через три дня после лечения опухоли вырезали и анализировали РНК, применяя технологию “Pan Cancer Immune Profiling Panel” от NanoString в комбинации с вирусом и карго-специфическими зондами (spike-in) согласно инструкциям производителя (ФИГУРА 9). Вместе эти результаты демонстрируют активную репликацию ВВС-GP-CD80-Fc у подвергнутых лечению животных и экспрессию мРНК карго в опухоли. Пиковую репликацию наблюдали около третьего дня. Вирус также сохраняется до седьмого дня.

Мышей C57BL/6 с развитыми опухолями LLC1-IFNARKO использовали в качестве контрольных или лечили с применением однократной внутривенной инъекции 1×10^8 TCID₅₀ ВВС-GP или ВВС-GP-CD80-Fc. Через три дня после лечения опухоли вырезали, фиксировали формалином и заливали парафином.

5 Тонкие срезы окрашивали специфическими антителами к белку ВВС-N или белку CD80 человека (ФИГУРА 10). Окрашивание N-белком было одинаковым как для ВВС-GP, так и для ВВС-GP-CD80-Fc, в то время как человеческий CD80 был специфически обнаружен только для последнего.

[00304] Пример 7

10 [00305] CD80-Fc обеспечивает костимуляцию Т-клеток в смешанной культуре лейкоцитов человека. Блокада FcγR уменьшает активацию Т-клеток, существенную роль Fc

[00306] ФИГУРА 12 и ФИГУРЫ 13А-D

15 [00307] Смешанную культуру лейкоцитов человека (выбранные популяции лейкоцитов из двух генетически отличных субъектов совместно культивируют, результатом чего является стимуляция аллогенных Т-клеток) использовали для оценки костимуляторного потенциала рекомбинантного CD80-Fc относительно Т-клеток (ФИГУРЫ 12 и 13), а также участия человеческого Fc IgG1 дикого типа в костимуляции Т-клеток (ФИГУРА 13). Для этого культуры из ФИГУРЫ 12 стимулировали увеличивающимся количеством рекомбинантного CD80-Fc, используя IFNγ в качестве считанных данных. Секретия IFNγ значительно улучшилась из-за добавления CD80-Fc к культурам дозозависимым способом, что подтверждало его костимуляторный потенциал относительно Т-клеток. На основе этих данных и с целью объяснения роли Fc в 25 слитом белке CD80-Fc смешанные культуры лейкоцитов человека вновь стимулировали рекомбинантным белком CD80-Fc (10 мкг/мл) с добавлением или без добавления FcγR-блока (при отсутствии человеческой сыворотки), используя IFNγ в качестве считанных данных (ФИГУРА 13). Различные части фигуры (А-D) показывают разные пары доноров. CD80-Fc-опосредованная стимуляция Т-клеток была сильно снижена из-за добавления FcγR-блока, что указывало на то, что взаимодействие FcγR и FcγR-опосредованная кластеризация являются 30 ключевыми для активности CD80-Fc.

[00308] Пример 8

[00309] Fc γ R зависимость активации Т-клеток со стороны CD80-Fc в активированных CD3 PBMC (F(ab)₂ и IgG4)

[00310] ФИГУРЫ 14А-F

5 **[00311]** Культуры PBMC человека стимулировали низкими дозами антитела против CD3 или без них (клон ОКТ3; 10 нг/мл) и увеличивающейся концентрацией рекомбинантного белка CD80-Fcs, используя IFN γ (ФИГУРЫ 14А-С) или IL2 (ФИГУРЫ 14D-F) в качестве индикаторов, выявляемых путем стандартного анализа ELISA. Для подтверждения костимуляторного потенциала

10 рекомбинантного CD80-Fc в отношении Т-клеток, а также участия человеческого Fc IgG1 дикого типа в костимуляции Т-клеток и подтверждения Fc-селекции сравнивали, сопоставляя друг с другом, такие варианты рекомбинантного CD80-Fc: CD80-Fc (рекомбинантный вариант вирусного карго с человеческим Fc IgG1 дикого типа, ФИГУРЫ 14С и F)); CD80 FAB (вариант

15 F(ab)₂ CD80-Fc, который является лишенным Fc, но сохраняет бивалентность, ФИГУРЫ 14А и D) и CD80 IgG4 (подобный CD80-Fc, но с человеческим IgG4 Fc, ФИГУРЫ 14В и E). Хотя CD80-Fc сам по себе существенно не стимулирует PBMC, комбинация CD80-Fc и стимулирующего антитела против CD3 в результате обеспечивала зависимое от дозы повышение стимуляции Т-клеток, о

20 чем свидетельствует секреция IFN γ и IL2 (ФИГУРЫ 14С и F). И наоборот, лишенный Fc вариант F(ab)₂ CD80-Fc не был активным и не обеспечивал улучшенной стимуляции Т-клеток, ни в отдельности, ни в сочетании со стимуляцией антителом против CD3 (ФИГУРЫ 14А и D). Слияние CD80 на основе IgG4 (ФИГУРЫ 14В и E) демонстрировало костимуляторный потенциал

25 относительно Т-клеток, но в значительно меньшей степени, чем слитый конструктор CD80 на основе IgG1 (ФИГУРЫ 14В и F), подобно вирусному карго, включенному путем инженерии в новый вирус ВВС-GP-CD80-Fc. Эти результаты также подтверждают зависимость CD80-Fc от Fc γ R, а также выбор человеческого Fc IgG1. Кроме того, отсутствие активности CD80-Fc без

30 сопутствующей стимуляции TCR свидетельствует в пользу его благоприятного профиля безопасности.

[00312] Пример 9

[00313] ВВС-GP вызывает местное повышение Fc γ R в инфицированных опухолях, подтверждая механизм действия CD80-Fc

[00314] ФИГУРА 15

[00315] С учетом FcγR-зависимости вирусного CD80-Fc карго для костимуляции Т-клеток исследовали влияние инфекции ВВС-GP на экспрессию FcγR в опухолях. Для этого осуществляли выполненные на основе NanoString измерения экспрессии FcγR в контрольных или инфицированных ВВС-GP опухолях LLC1-IFNARKO на 7-й день после инфицирования. Мышей либо оставляли без лечения, либо инфицировали вирусной дозой 10⁸ TCID₅₀ ВВС-GP. Ось X показывает измерение для различных FcγR (1, 2b, 3 или 4), а ось Y показывает относительную экспрессию. Поскольку данные четко показывают, что инфицированные ВВС-GP опухоли неожиданно демонстрируют сильную повышающую регуляцию экспрессии для всех четырех анализируемых FcγR. Эти данные обеспечивают механистическую основу для благоприятного терапевтического взаимодействия онколитического вируса ВВС-GP и FcγR-зависимого, вирусно кодированного карго CD80-Fc, и этот положительный результат обусловлен вирусно-опосредованной повышающей регуляцией FcγR в инфицированных опухолях.

[00316] Пример 10

[00317] ВВС-GP-CD80-Fc вызывает лучший опухолеспецифический Т-клеточный иммунитет по сравнению с родительским вирусом ВВС-GP

[00318] ФИГУРЫ 16А-С

[00319] Влияние кодируемого вирусом CD80-Fc карго на обусловленный специфическими к опухолевому антигену Т-клетками иммунитет объясняли с использованием опухолевой модели СТ26.CL25-IFNARKO, которую лечили либо родительским вирусом ВВС-GP, либо новым вирусом ВВС-GP-CD80-Fc. Специфические к Gr70/опухоли Т-клетки обнаруживали в селезенке и крови мышей, которых лечили как показано на ФИГУРЕ 16С, с помощью анализа ELISPOT (ФИГУРА 16А) и окрашивания декстрамером на основе FACS (ФИГУРА 16В), соответственно. Значительное увеличение частоты специфических к опухолевому антигену Т-клеток в группе ВВС-GP-CD80-Fc по сравнению с группой ВВС-GP объясняет потенциал улучшения, обусловленный новым карго-вооруженным вирусом по сравнению с родительским вирусом, а также обеспечивает иммунологическую/механистическую основу для улучшенной противоопухолевой активности нового онколитического вируса ВВС-GP-CD80-Fc.

[00320] Пример 11

[00321] CD80-Fc не взаимодействует с PD-L1

[00322] ФИГУРА 17

[00323] Было заявлено, что CD80 может быть способным к прямому
5 взаимодействию с лигандом 1 запрограммированной смерти клеток 1 (PD-L1),
таким образом, блокируя ингибиторное взаимодействие PD-L1 с его рецептором
запрограммированной смерти клеток 1 (PD-1) на активированных Т-клетках. Для
того чтобы определить, действительно ли слитый белок CD80-Fc, кодированный
в ВВС-GP-CD80-Fc, прямо взаимодействует с PD-L1, авторами изобретения
10 было выполнено исследование связывания на клетках CHO-K1, стабильно
трансфицированных человеческим PD-L1. Специфическое к PD-L1 антитело
Авелумаб использовали как положительный контроль. Если Авелумаб легко
связывался с PD-L1 на поверхности клеток CHO-K1-PD-L1, то рекомбинантный
белок CD80-Fc не связывался с PD-L1 ни на одном испытанном уровне доз.
15 Таким образом, было сделано заключение, что CD80-Fc прямо не связывается с
PD-L1.

[00324] Пример 12

[00325] α -PD-1 и CD80-Fc улучшают стимуляцию Т-клеток аддитивным
способом

20 [00326] ФИГУРЫ 18А-В

[00327] Для того чтобы исследовать, способна ли CD80-Fc-
опосредованная костимуляция Т-клеток в комбинации с опосредованным
антителом ингибированием PD-1 обеспечивать дополнительное преимущество
по сравнению с монотерапевтическим лечением, авторами изобретения была
25 обеспечена Т-клеточная репортерная система, в которой экспрессирующие PD-1
Т-клетки Jurkat реагируют на стимуляцию рецептора Т-клеток (TCR)
повышающей регуляцией активности люциферазы, подвергающейся
биохимическому обнаружению. Клетки-репортеры Jurkat-PD-1 совместно
культивировали с Fc γ R-положительными клетками THP1-PD-L1 (в отличие от
30 Fc γ R-отрицательных клеток CHO-K1), которые стабильно экспрессировали PD-
L1. Результатом взаимодействия PD-L1 и PD-1 является ингибирование
активации Т-клеток Jurkat, сравнимое с ингибированием Т-клеток, которое
наблюдается у раковых пациентов. Стимуляции TCR достигают путем
добавления биспецифической молекулы ViTE, соединяющей CD33 на клетках

ТНР1 с CD3 на Т-клетках Jurkat. Как можно увидеть из ФИГУРЫ 18А, блокирующее PD-1 антитело Пембролизумаб способно к восстановлению CD3хCD33 ВiТЕ-опосредованной стимуляции Т-клеток дозозависимым способом путем блокирования ингибиторного взаимодействия PD-1:PD-L1. В то же время неожиданно было обнаружено, что CD80-Fc в отдельности может обеспечивать костимуляцию Т-клеток и улучшать активацию Т-клеток Jurkat дозозависимым способом, несмотря на ингибиторное взаимодействие PD-1:PD-L1. Специфическое к дигитонину (Dig) антитело использовали как изотипический контроль. Как показано на ФИГУРЕ 18В, фиксированную концентрацию антитела против PD-1 (10 нМ, в насыщении) комбинировали с увеличивающимися концентрациями рекомбинантного CD80-Fc. Результатом добавления CD80-Fc вдобавок к антителу против PD-1 была улучшена активация Т-клеток, что четко свидетельствует о благоприятном взаимодействии этих различных способов терапевтического воздействия, обусловленном взаимодополняющими механизмами их действия.

[00328] Пример 13

[00329] ВВС-GP-muCD80-Fc (*in vivo*) - Опухолевая модель СТ26.CL25-IFNARKO (высокая экспрессия карго)

[00330] ФИГУРЫ 19А-С

[00331] Также с применением опухолевой модели СТ26.CL25-IFNARKO в этом исследовании сравнивают *in vivo* эффективность рекомбинантного мышинового CD80Fс, ВВС-GP или ВВС-muCD80Fс. Для этого мышам с развитыми опухолями в 0-й и 3-й день внутривенно вводили вирусную дозу 1×10^8 TCID₅₀ и в 0-й, 3-й и 6-й дни - 1 мг/кг рекомбинантного мышинового CD80-Fc, соответственно.

[00332] Как показано на ФИГУРЕ 19, график (А), кривые выживаемости демонстрируют улучшенный терапевтический эффект в группах, получавших ВВС-GP-muCD80Fс. Значительное преимущество в выживаемости по сравнению с рекомбинантным белком CD80Fс или ВВС-GP демонстрирует 1×10^8 TCID₅₀ ВВС-GP-muCD80Fс (проверка по логранговому критерию (Мантеля-Кокса); Р-значение 0,0394).

[00333] Средние размеры опухолей, показанные на ФИГУРЕ 19, график (В), являются сводными кривыми роста опухолей и отражают мощное угнетение роста опухолей после лечения с применением ВВС-GP-muCD80Fс (доза 1×10^8

TCID₅₀), что намного превосходит BBC-GP, а также 1 мг/кг рекомбинантного белка CD80Fc.

5 [00334] Снижение массы тела наблюдали после первой инъекции обоих вирусов (ФИГУРА 19, график (С)), однако выздоровление происходило сразу, не испытывало влияния последующих инъекций веществ и не имело значительных отличий между родительским вирусом (BBC-GP) и кодирующим muCD80-Fc вирусом (BBC-GP-muCD80Fc).

10 [00335] В общих чертах в этом исследовании сравнивали, в частности, *in vivo* эффект рекомбинантного мышинового CD80Fc или BBC-GP с BBC-GP-muCD80Fc. Было показано, что путем внедрения muCD80Fc в основу вируса достигается синергетический эффект на рост опухоли, а также на общую выживаемость.

ПЕРВОНАЧАЛЬНАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный рабдовирус, который кодирует в его геноме по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, причем Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает внеклеточный домен CD80 и также включает Fc-домен IgG.

2. Рекомбинантный рабдовирус по п. 1, отличающийся тем, что Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 выбирают из группы, к которой относятся:

(I) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1,

(II) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1,

(III) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2,

(IV) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2,

(V) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 состоит из аминокислот 1 - 207 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 1 - 207 SEQ ID NO: 4, и Fc-домен состоит из аминокислот 208 - 433 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 208 - 433 SEQ ID NO: 4,

(VI) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 по любому из пунктов (I)-(V), который также включает сигнальную пептидную последовательность, и

(VII) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает SEQ ID NO: 3 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3.

3. Рекомбинантный рабдовирус по любому из пунктов с 1 по 2, отличающийся тем, что он является везикуловирусом.

4. Рекомбинантный рабдовирус по п. 3, отличающийся тем, что везикуловирус выбирают из группы, к которой относятся: вирус везикулярного стоматита Алагоас (VSAV), вирус Карахаса (CJSV), вирус Чандипура (CHPV), кокальный вирус (COCV), вирус везикулярного стоматита Индиана (VSIV), вирус Исфаган (ISFV), вирус Мараба (MARAV), вирус везикулярного стоматита Нью-Джерси (VSNJV) или вирус Пири (PIRYV).

5. Рекомбинантный рабдовирус по п. 3, отличающийся тем, что он является вирусом везикулярного стоматита, в оптимальном варианте вирусом везикулярного стоматита Индиана (VSIV) или вирусом везикулярного стоматита Нью-Джерси (VSNJV).

6. Рекомбинантный рабдовирус по любому из пунктов с 1 по 5, отличающийся тем, что рабдовирус является репликационно-компетентным.

7. Рекомбинантный рабдовирус по любому из пунктов с 1 по 6, отличающийся тем, что рабдовирус

(I) лишен функционального гена, который кодирует гликопротеин G, и/или

(II) лишен функционального гликопротеина G.

8. Рекомбинантный рабдовирус по п. 7, отличающийся тем, что

(I) ген, который кодирует гликопротеин G, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP другого вируса, и/или

(II) гликопротеин G заменен гликопротеином GP другого вируса.

9. Рекомбинантный рабдовирус по п. 8, отличающийся тем, что
(I) ген, который кодирует гликопротеин G, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP аренавируса, и/или
(II) гликопротеин G заменен гликопротеином GP аренавируса.

5

10. Рекомбинантный рабдовирус по любому из п.п. 8 или 9, отличающийся тем, что

(I) ген, который кодирует гликопротеин G, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса Данденонг или вируса Мопея, и/или

10 (II) гликопротеин G заменен гликопротеином GP вируса Данденонг или вируса Мопея.

11. Рекомбинантный рабдовирус по любому из пунктов с 7 по 9, отличающийся тем, что

15 (I) ген, который кодирует гликопротеин G, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или

(II) гликопротеин G заменен гликопротеином GP LCMV.

20 12. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, который кодирует в его геноме по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, причем Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает внеклеточный домен CD80, а также включает Fc-домен IgG.

25

13. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 12, отличающийся тем, что Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 выбирают из группы, к которой относятся:

30 (I) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1,

(II) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1,

(III) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2,

5 (IV) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 %
10 идентичности с SEQ ID NO: 2,

(V) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, причем внеклеточный домен CD80 состоит из аминокислот 1 - 207 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 1 - 207 SEQ
15 ID NO: 4, и Fc-домен состоит из аминокислот 208 - 433 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 208 - 433 SEQ ID NO: 4,

(VI) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 по любому из пунктов (I)-(V), который также включает сигнальную пептидную последовательность, и

(VII) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает
20 SEQ ID NO: 3 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3,

причем ген, который кодирует гликопротеин G рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен гликопротеином GP LCMV.

25 14. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 13, отличающийся тем, что геном кодирует внеклеточный домен CD80, слитый с Fc-доменом IgG1.

30 15. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 14, отличающийся тем, что внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1.

16. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 14, отличающийся тем, что Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2.

5 17. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 14, отличающийся тем, что внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2.

10

18. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из пунктов с 14 по 17, отличающийся тем, что также включает сигнальную пептидную последовательность.

15 19. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 13, отличающийся тем, что геном кодирует Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает SEQ ID NO: 3 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3.

20 20. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, который кодирует в его геноме по крайней мере нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, большой белок (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, причем Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80
25 включает внеклеточный домен CD80 и также включает Fc-домен IgG.

21. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по п. 20, отличающийся тем, что нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант,
30 по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 7.

22. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 20 или 21, отличающийся тем, что фосфопротеин (P) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 8.

23. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из пунктов с 20 по 22, отличающийся тем, что большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 9.

24. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. 20 по 23, отличающийся тем, что матриксный белок (M) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 10 или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 10.

25. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из пунктов с 20 по 24, отличающийся тем, что:

- нуклеопротеин (N) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 7,

- причем фосфопротеин (P) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 8,

- причем большой белок (L) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант,

по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 9, и

5 - матриксный белок (М) включает аминокислотную последовательность, как указано в SEQ ID NO: 10 или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 10.

10 26. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из пунктов с 20 по 25, отличающийся тем, что он является репликационно-компетентным.

27. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из пунктов с 20 по 26, отличающийся тем, что он

15 (I) лишен функционального гена, который кодирует гликопротеин G, и/или

(II) лишен функционального гликопротеина G.

20 28. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из пунктов с 20 по 27, отличающийся тем, что

(I) ген, который кодирует гликопротеин G, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP другого вируса, и/или

(II) гликопротеин G заменен гликопротеином GP другого вируса.

25 29. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из пунктов с 20 по 28, отличающийся тем, что

(I) ген, который кодирует гликопротеин G, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или

30 (II) гликопротеин G заменен гликопротеином GP LCMV.

30. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из пунктов с 20 по 29, отличающийся тем, что Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 выбирают из группы, к которой относятся

(I) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1,

(II) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, 5
причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1,

(III) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, 10
причем Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2,

(IV) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, 15
причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2,

(V) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, 20
причем внеклеточный домен CD80 состоит из аминокислот 1 - 207 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 1 - 207 SEQ ID NO: 4, и Fc-домен состоит из аминокислот 208 - 433 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 208 - 433 SEQ ID NO: 4,

(VI) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 по любому из пунктов (I)-(V), который также включает сигнальную пептидную последовательность, и

(VII) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает SEQ ID NO: 3 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3. 25

31. Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, который кодирует в его геноме нуклеопротеин (N) вируса везикулярного стоматита, большой белок 30 (L), фосфопротеин (P), матриксный белок (M), гликопротеин (G) и по крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его функциональный вариант, причем Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 включает внеклеточный домен CD80 и также включает Fc-домен IgG и является выбранным из группы, к которой относятся:

(I) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1,

(II) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, 5
причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1,

(III) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, 10
причем Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2,

(IV) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, 15
причем внеклеточный домен CD80 включает или состоит из SEQ ID NO: 1 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 1, и Fc-домен включает или состоит из SEQ ID NO: 2 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 2,

(V) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает внеклеточный домен CD80, который является слитым с Fc-доменом IgG1, 20
причем внеклеточный домен CD80 состоит из аминокислот 1 - 207 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 1 - 207 SEQ ID NO: 4, и Fc-домен состоит из аминокислот 208 - 433 SEQ ID NO: 4 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с аминокислотами 208 - 433 SEQ ID NO: 4,

(VI) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 по любому из пунктов (I)-(V), который также включает сигнальную пептидную последовательность, и 25

(VII) Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80, который включает SEQ ID NO: 3 или имеет по меньшей мере 80 % идентичности с SEQ ID NO: 3,

причем ген, который кодирует гликопротеин G вируса везикулярного стоматита, заменен геном, который кодирует гликопротеин GP вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV), и/или гликопротеин G заменен 30
гликопротеином GP LCMV, и

- нуклеопротеин (N) включает аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 7, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 7,

- фосфопротеин (P) включает аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 8, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 8,

5 - большой белок (L) включает аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 9, или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 9, и

10 - матриксный белок (M) включает аминокислоту, как указано в SEQ ID NO: 10 или функциональный вариант, по крайней мере на 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичный SEQ ID NO: 10.

15 32. Фармацевтическая композиция, отличающаяся тем, что композиция включает рекомбинантный рабдовирус по любому из п.п. с 1 по 11 или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. с 12 по 31.

20 33. Рекомбинантный рабдовирус по любому из п.п. с 1 по 11, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. с 12 по 31 или фармацевтическая композиция по п. 32 для применения в качестве лекарственного средства.

25 34. Рекомбинантный рабдовирус по любому из п.п. с 1 по 11, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из п.п. с 12 по 31 или фармацевтическая композиция по п. 32 для применения в лечении рака, в оптимальном варианте солидного рака.

30 35. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по п. 34, отличающиеся тем, что солидный рак выбирают из перечня, который включает: опухоль репродуктивных органов, опухоль яичника, опухоль яичка, эндокринную опухоль, желудочно-кишечную опухоль, опухоль поджелудочной железы, опухоль печени, опухоль почек, опухоль толстой кишки, колоректальную опухоль, опухоль мочевого пузыря, опухоль предстательной

железы, опухоль кожи, меланома, опухоль дыхательных путей, опухоль легких, опухоль молочной железы, опухоль головы и шеи, плоскоклеточную карциному головы и шеи (HNSCC) и опухоль костей.

5 36. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного
стоматита или фармацевтическая композиция для применения по любому из
пунктов с 33 по 35, отличающиеся тем, что рекомбинантный рабдовирус,
рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая
композиция предназначены для внутриопухолевого или внутривенного
10 введения.

 37. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного
стоматита или фармацевтическая композиция для применения по любому из
пунктов с 34 по 36, отличающиеся тем, что рекомбинантный рабдовирус,
15 рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая
композиция предназначены для по крайней мере одноразового
внутриопухолевого введения с последующим внутривенным введением.

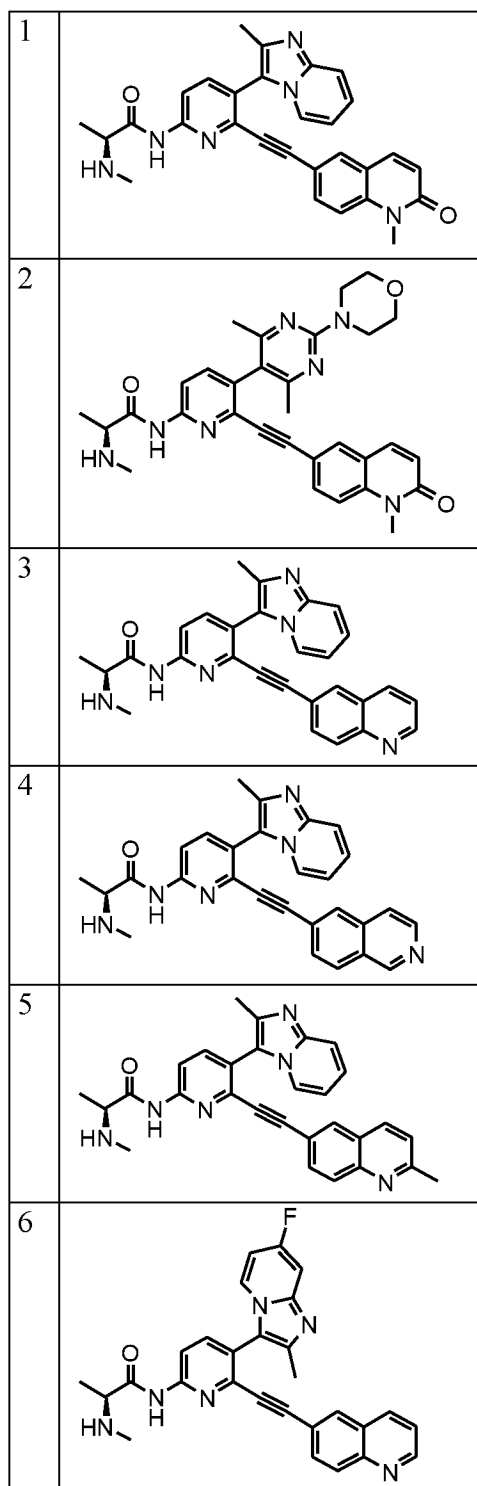
 38. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного
20 стоматита или фармацевтическая композиция для применения по п. 37,
отличающиеся тем, что последующее внутривенное введение предусмотрено
через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней,
11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней,
20 дней, 21 день, 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29
25 дней, 30 дней или 31 день после начального внутриопухолевого введения.

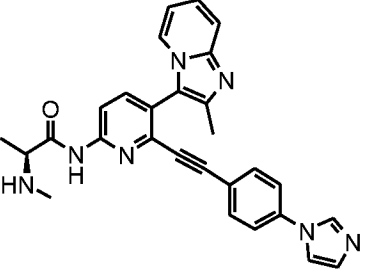
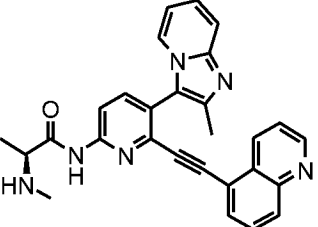
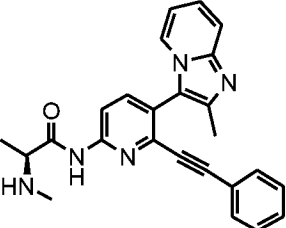
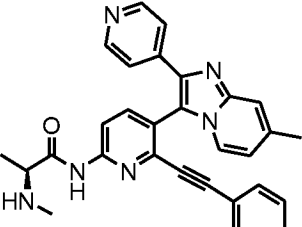
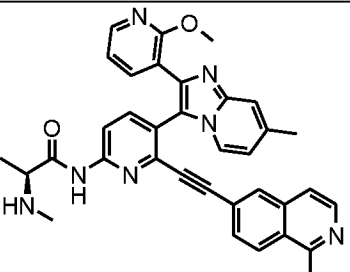
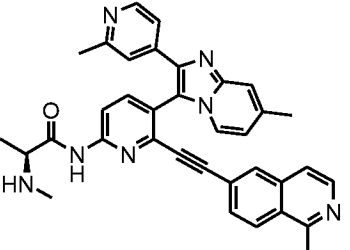
 39. Композиция, которая включает рекомбинантный рабдовирус или
рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из предыдущих
пунктов, а также ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC.

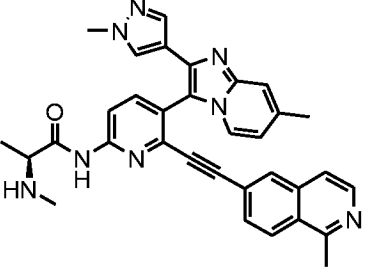
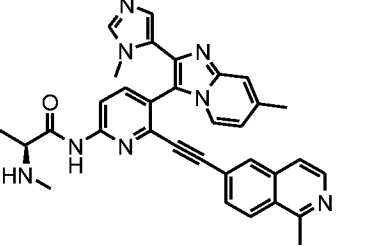
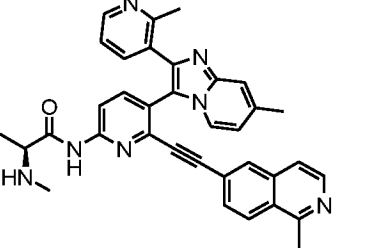
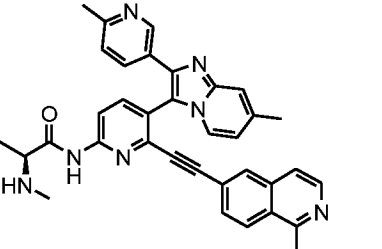
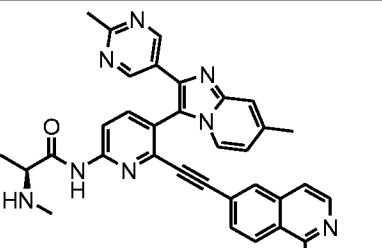
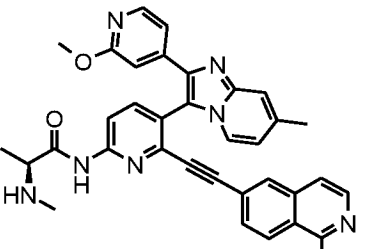
30

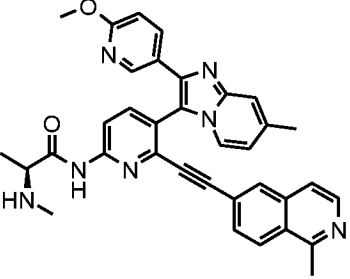
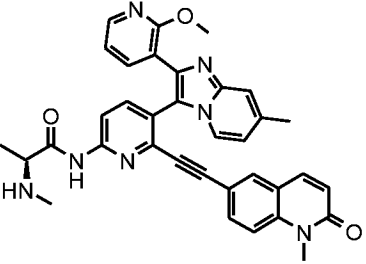
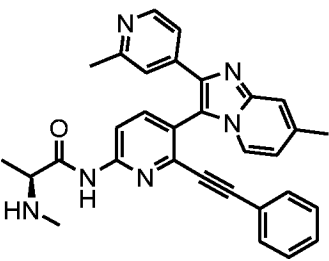
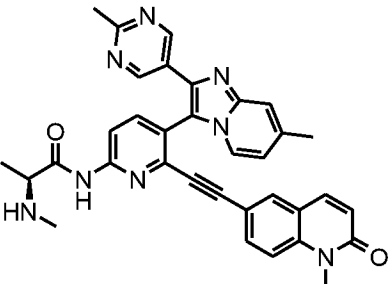
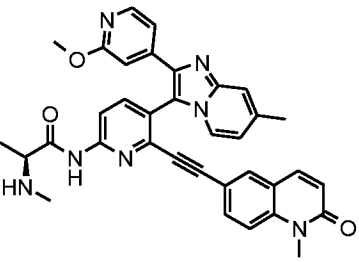
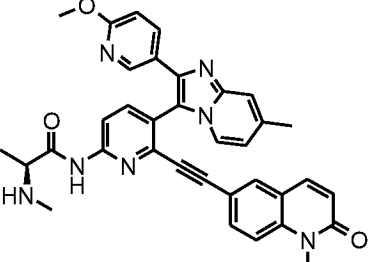
 40. Композиция по п. 39, отличающаяся тем, что ингибитор пути PD-1
является антагонистическим антителом, направленным против PD-1 или PD-L1.

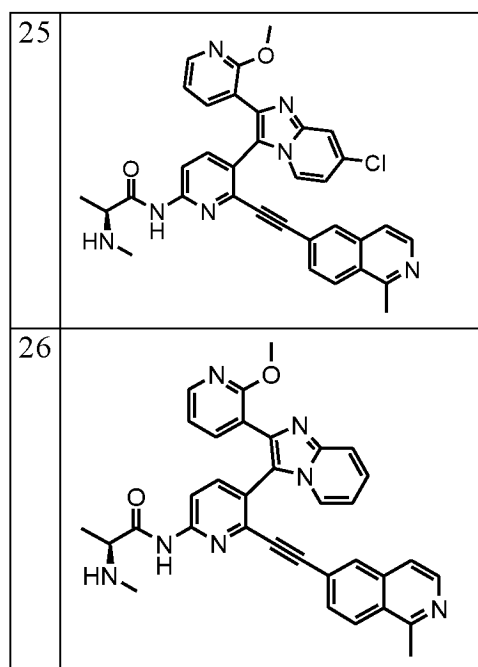
41. Композиция по п. 39, отличающаяся тем, что миметик SMAC выбирают из группы, которая состоит из любого из соединений с 1 по 26:



7	
8	
9	
10	
11	
12	

13	
14	
15	
16	
17	
18	

19	
20	
21	
22	
23	
24	



или фармацевтически приемлемой соли одного из этих соединений.

42. Композиция по п. 39, отличающаяся тем, что ингибитор пути PD-1 является антагонистом, выбранным из группы, которая состоит из пембролизумаба, ниволумаба, пидилизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, PDR-001, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5.

43. Комплект частей, который включает:

а) рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическую композицию, как определено в любом из предыдущих пунктов, и

б) ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC, как определено в любом из предыдущих пунктов.

44. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по любому из п.п. с 33 по 35 в комбинации с ингибитором пути PD-1 или миметиком SMAC.

45. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по п. 44, отличающиеся тем, что рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус

везикулярного стоматита или фармацевтическую композицию вводят одновременно, последовательно или поочередно с ингибитором пути PD-1 или миметиком SMAC.

5 46. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по п.п. 44 или 45, отличающиеся тем, что миметик SMAC является выбранным из группы, которая состоит из любого из соединений с 1 по 26 по п. 41 или фармацевтически приемлемой соли одного из этих соединений.

10 47. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по п.п. 44 или 45, отличающиеся тем, что ингибитор пути PD-1 выбирают из группы, яка состоит из пембролизумаба, ниволумаба, пидилизумаба, атезолизумаба, авелумаба, дурвалумаба, PDR-001, PD1-1, PD1-2, PD1-3, PD1-4 и PD1-5.

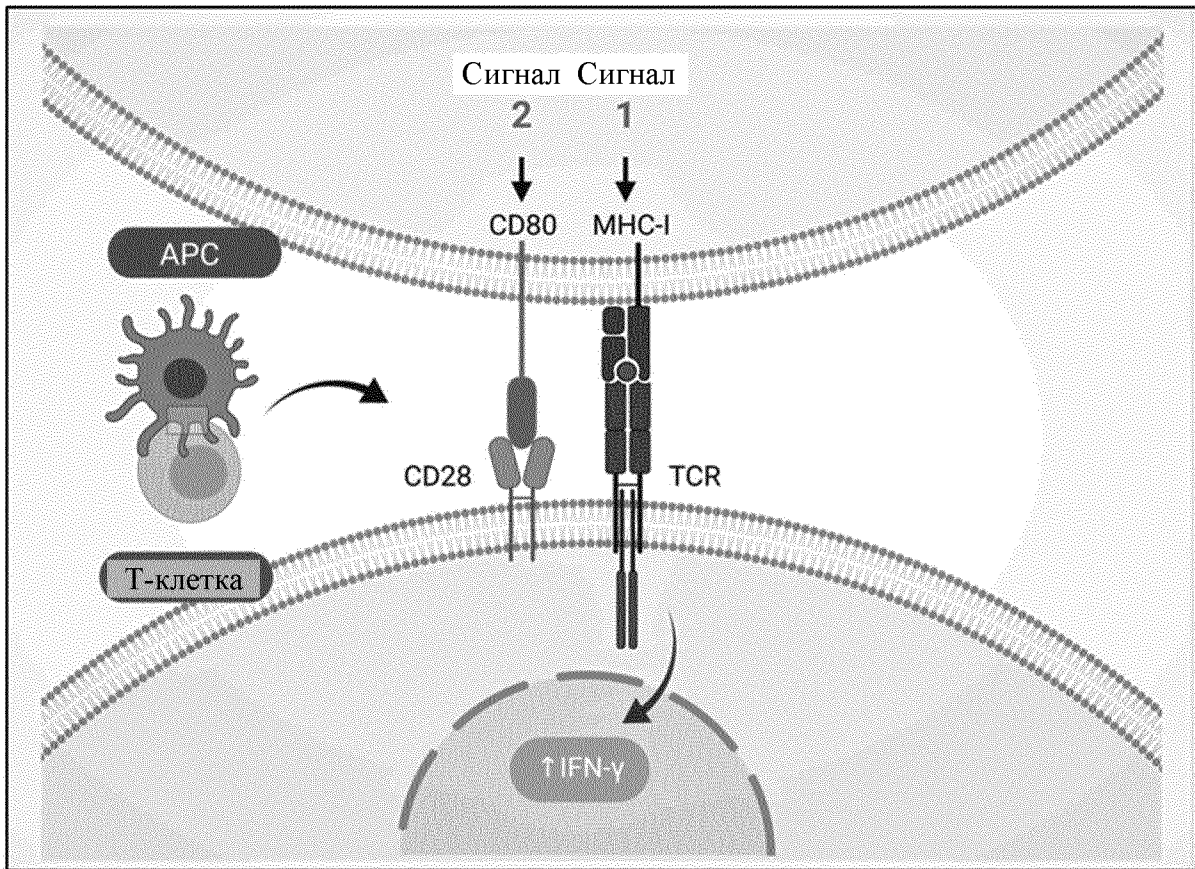
15 48. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическая композиция для применения по любому из пунктов с 44 по 46, отличающиеся тем, что рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическую композицию вводят путем введения, отличным от пути введения ингибитора пути PD-1 или миметика SMAC.

20 49. Рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, или фармацевтическая композиция для применения по любому из пунктов с 44 по 46, отличающиеся тем, что рекомбинантный рабдовирус, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита или фармацевтическую композицию вводят по крайней мере один раз внутриопухолево, а ингибитор пути PD-1 или миметик SMAC вводят внутривенно.

30 50. Продуцирующая вирус клетка, отличающаяся тем, что клетка продуцирует рекомбинантный рабдовирус или рекомбинантный вирус везикулярного стоматита по любому из предыдущих пунктов.

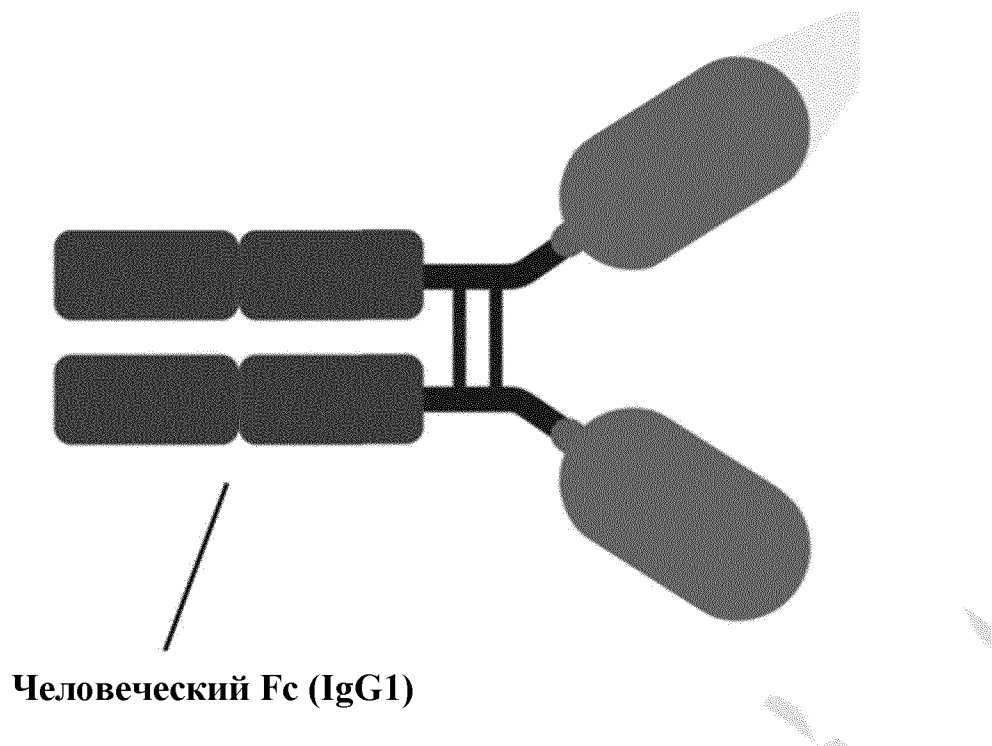
51. Продуцирующая вирус клетка по п. 50, отличающаяся тем, что эта клетка является клеткой Vero, клеткой НЕК, клеткой НЕК293, клеткой яичника китайского хомячка (СНО) или клеткой почки новорожденного хомяка (ВНК).

5 52. Рекомбинантный рабдовирус, который кодирует в его геноме РНК по
крайней мере один Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80 или его
функциональный вариант, причем Fc-слитый белок внеклеточного домена CD80
включает внеклеточный домен CD80 и также включает Fc-домен IgG, причем
10 геном РНК рекомбинантного рабдовируса включает или состоит из кодирующей
последовательности, идентичной или по крайней мере на 75 %, 76 %, 77 %, 78 %,
79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92
%, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % или 99 % идентичной SEQ ID NO: 24.

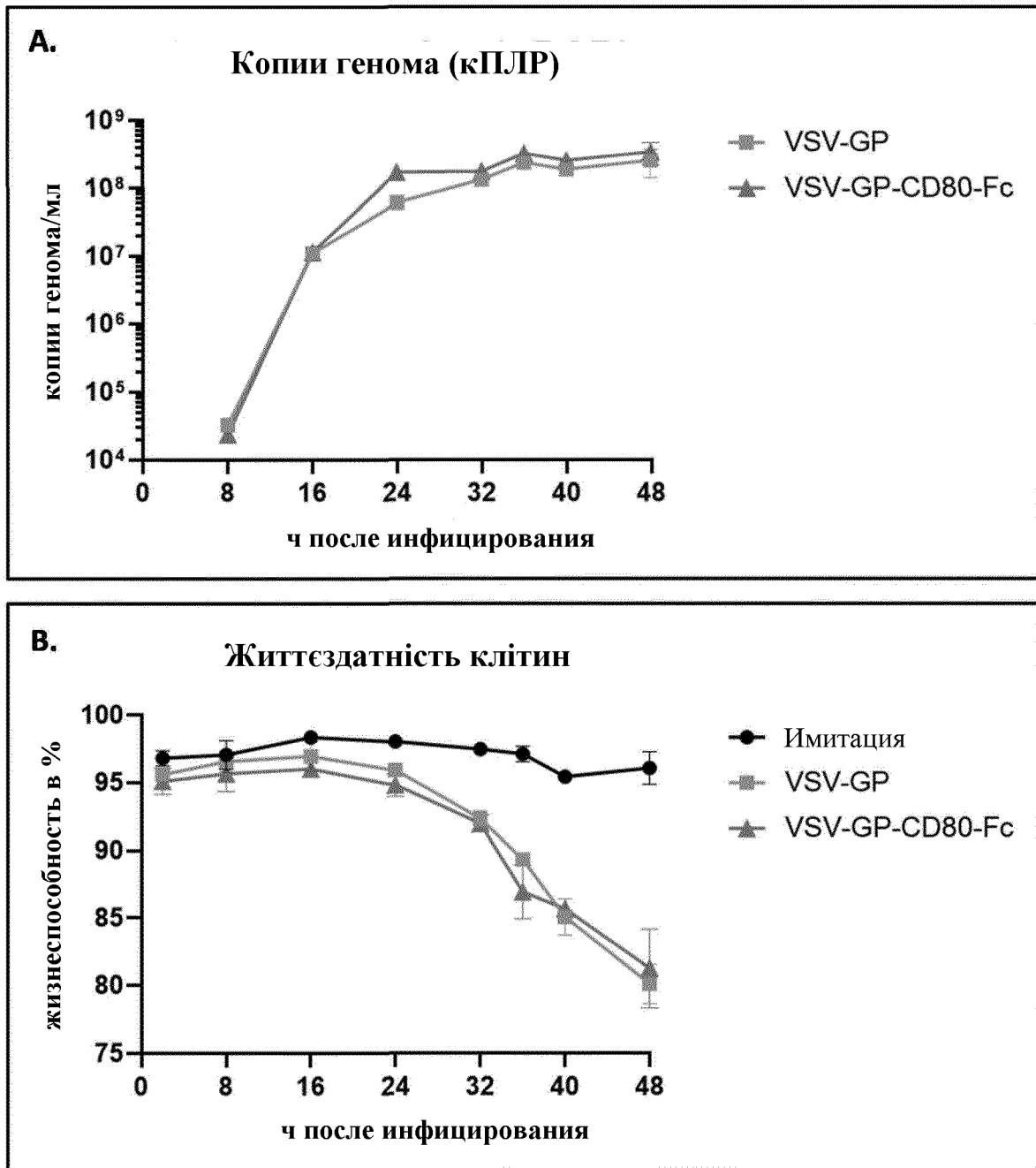


ФИГ. 1

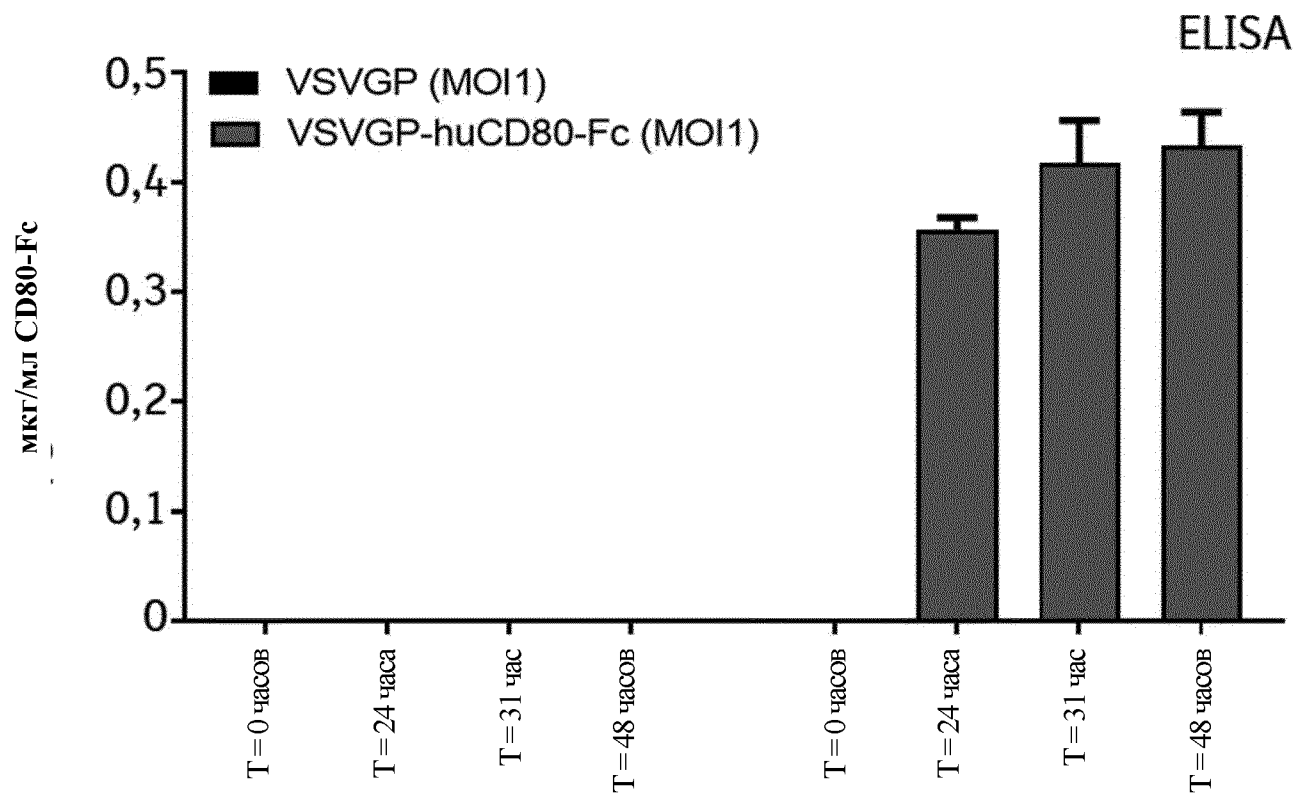
ECD человеческого CD80



ФИГ. 2

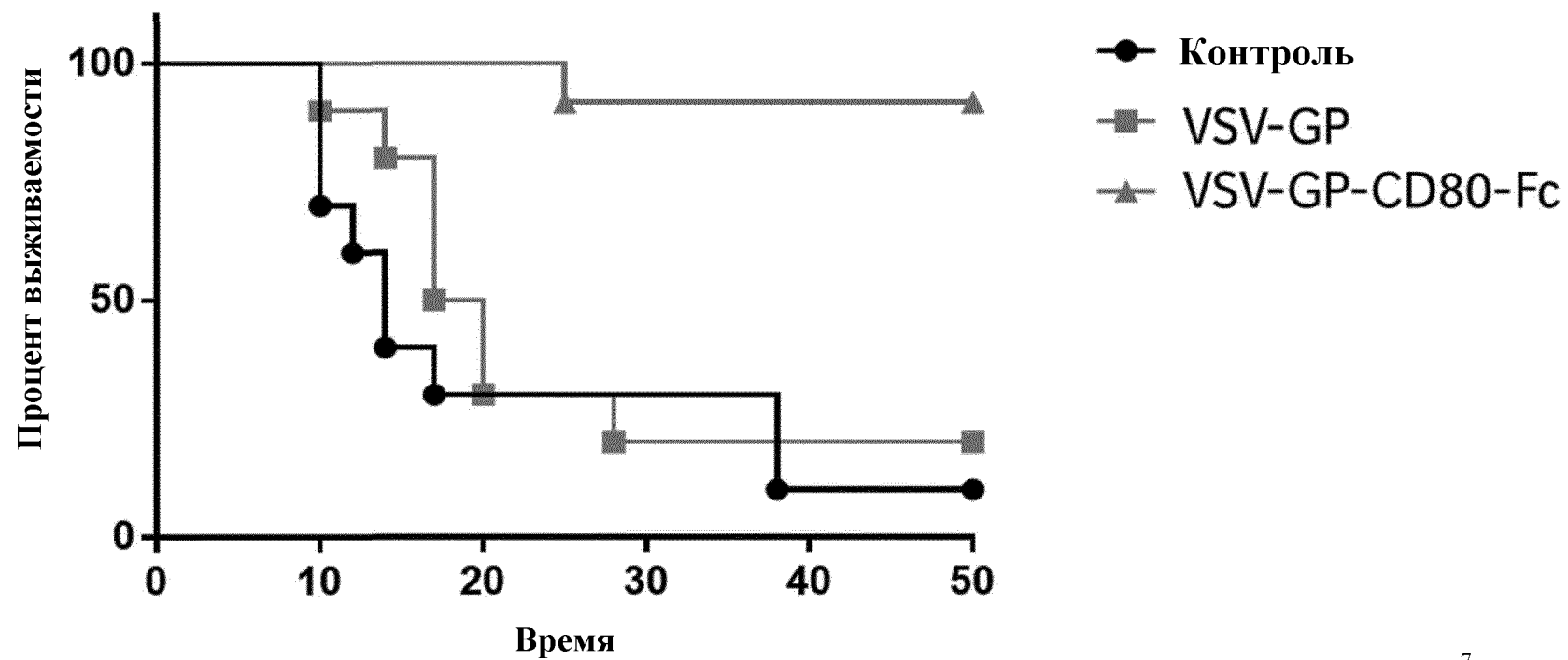


ФИГ. 3А-В

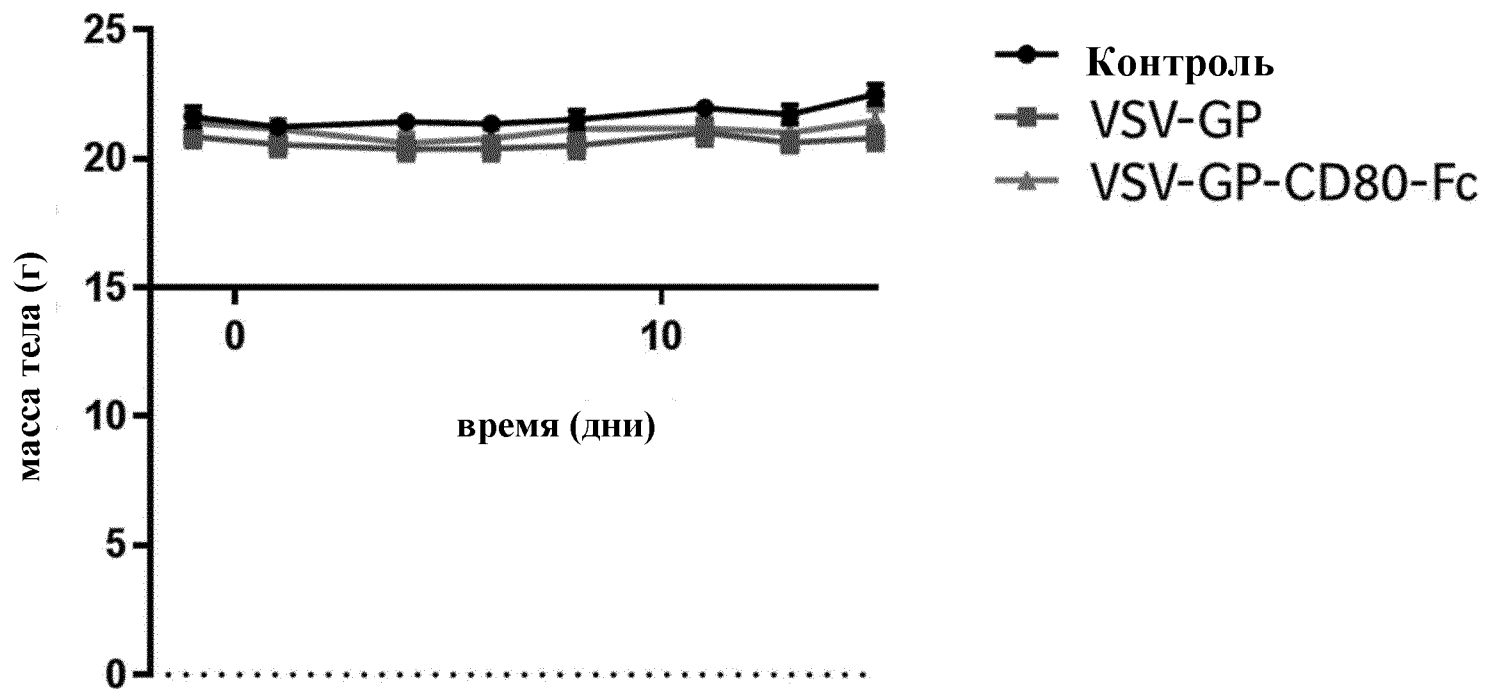


ФИГ. 4

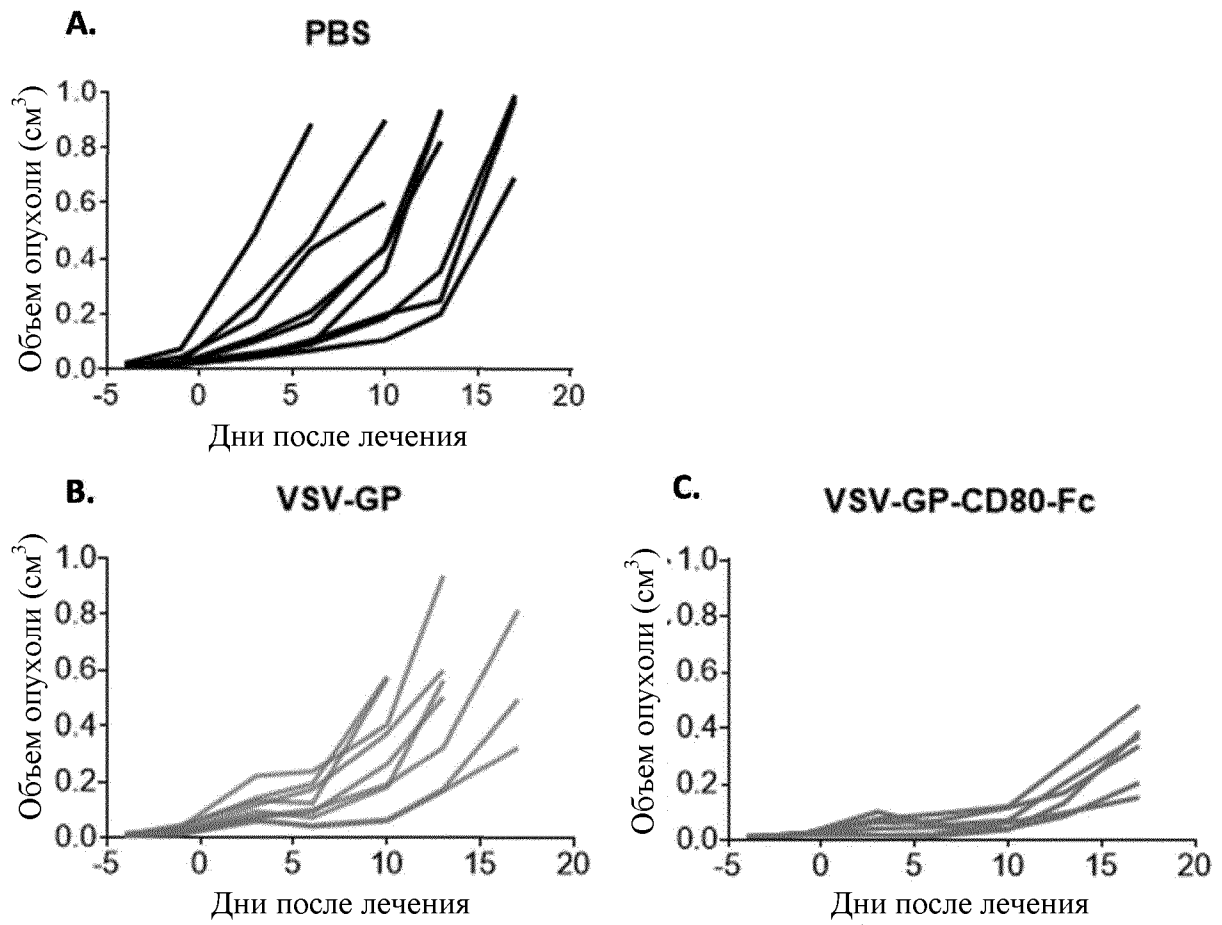
A

Вирусная доза 2×10^7 TCID₅₀

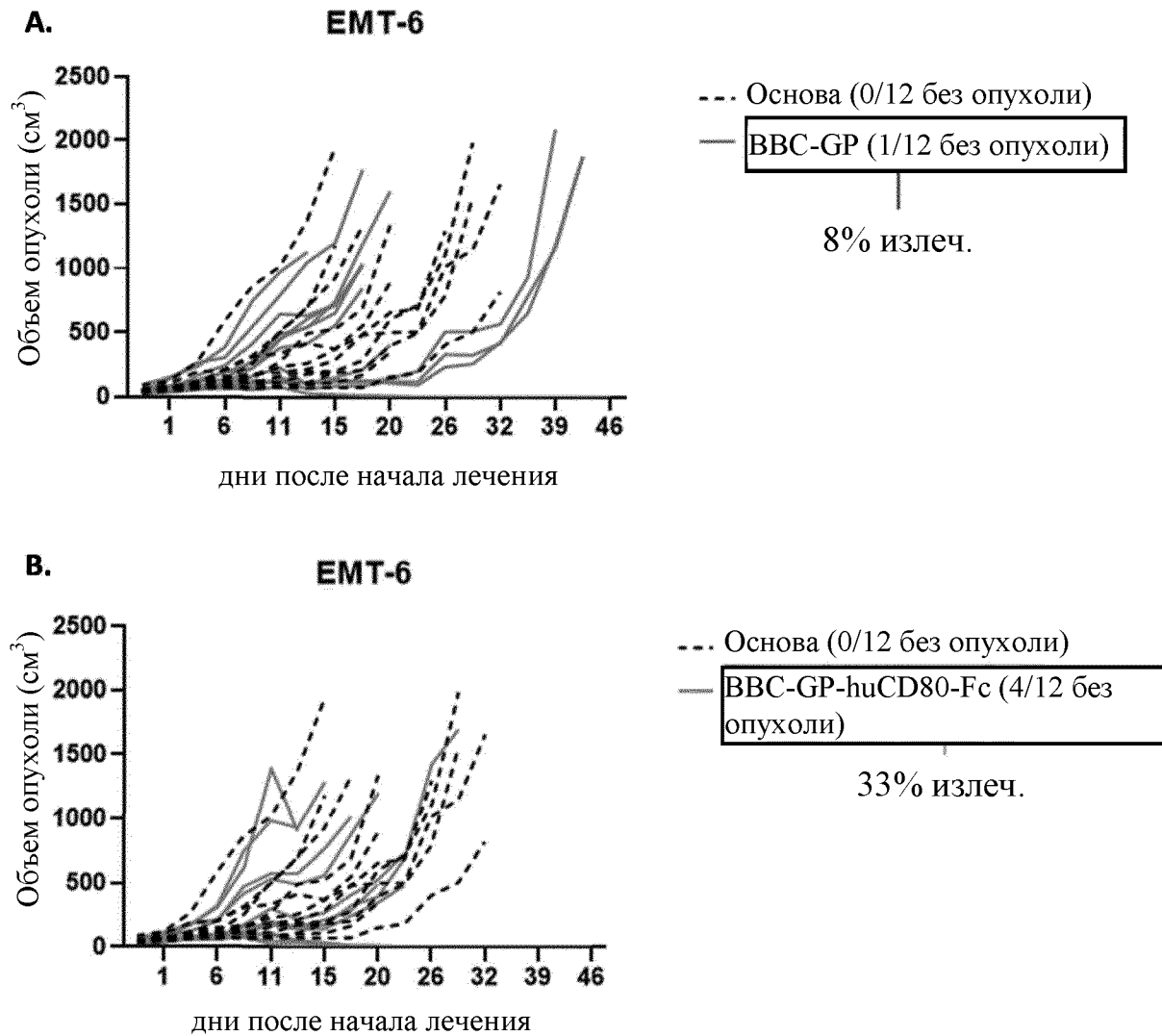
ФИГ. 5А-В

В

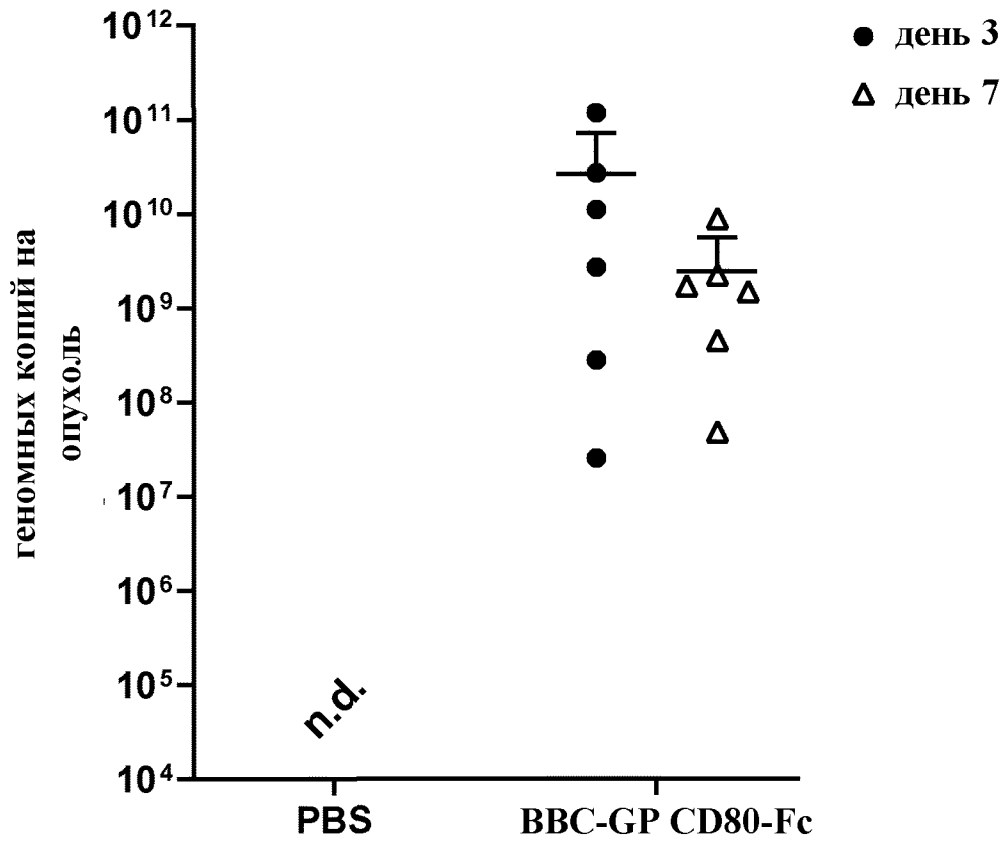
ФИГ. 5А-В (продолжение)



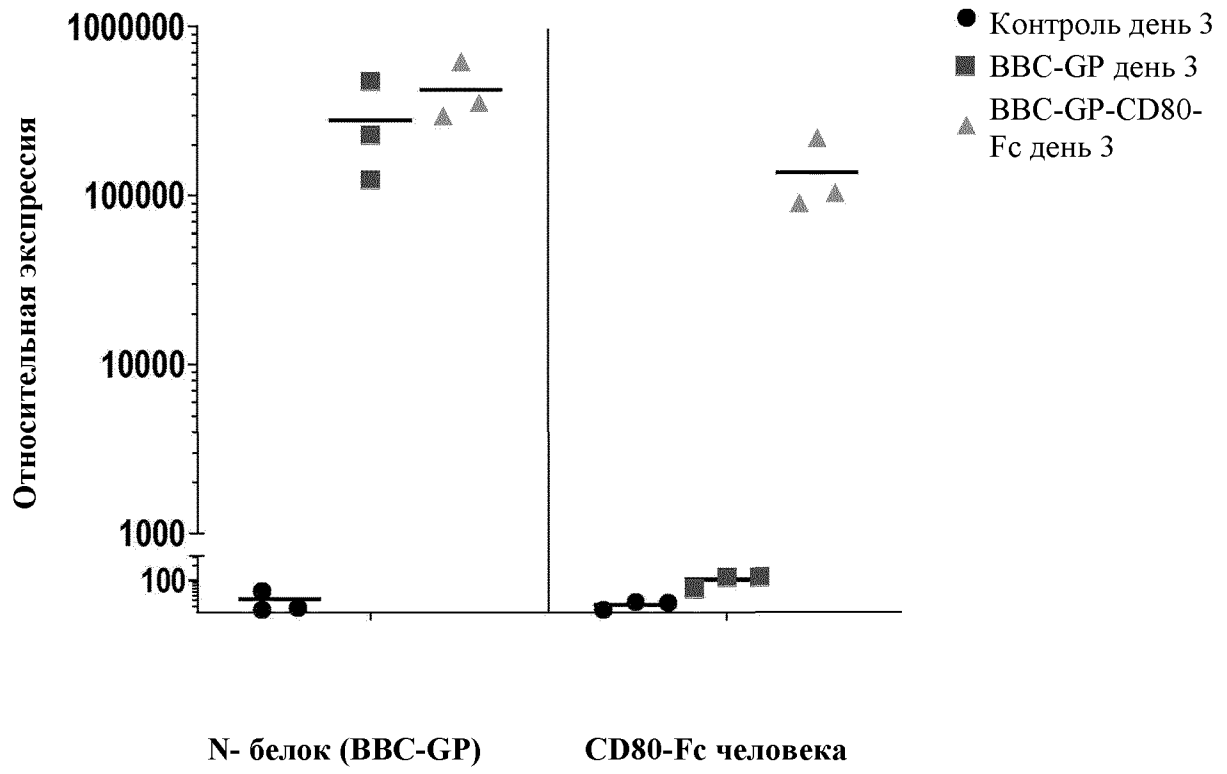
ФИГ. 6А-С



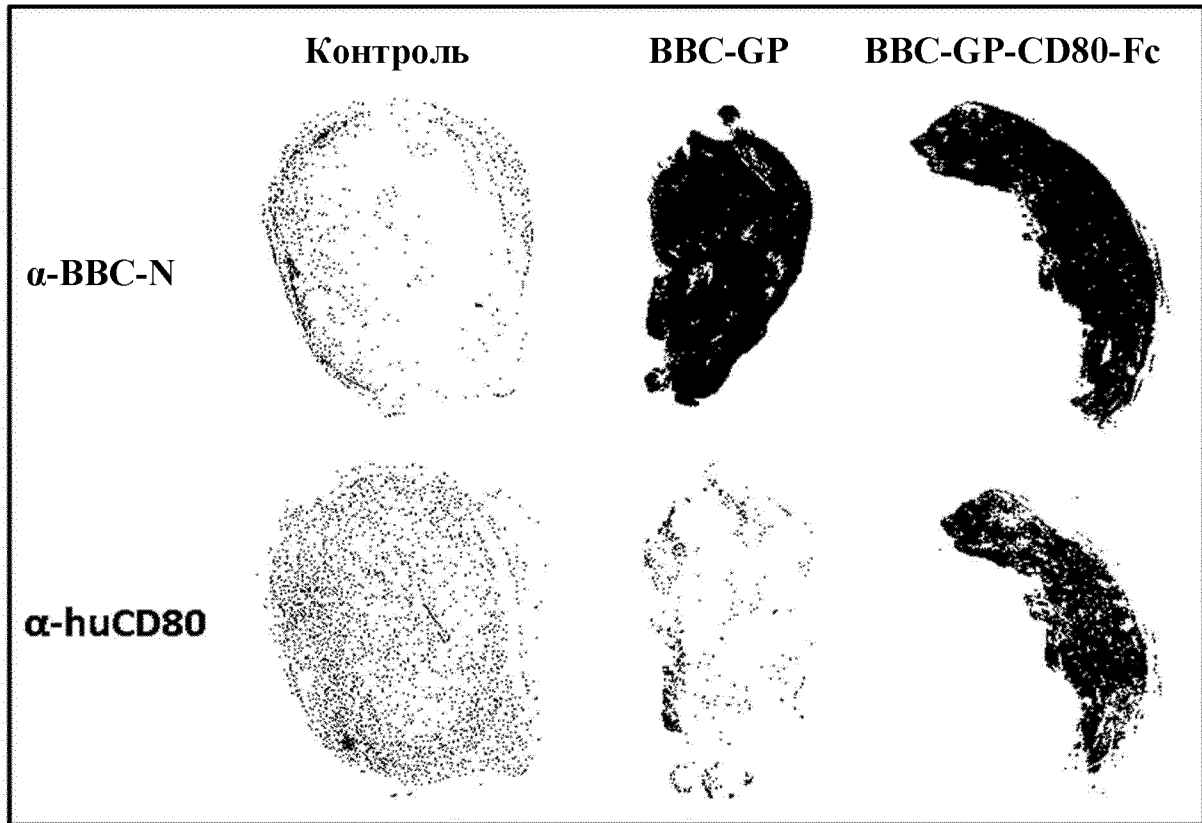
ФИГ. 7А-В



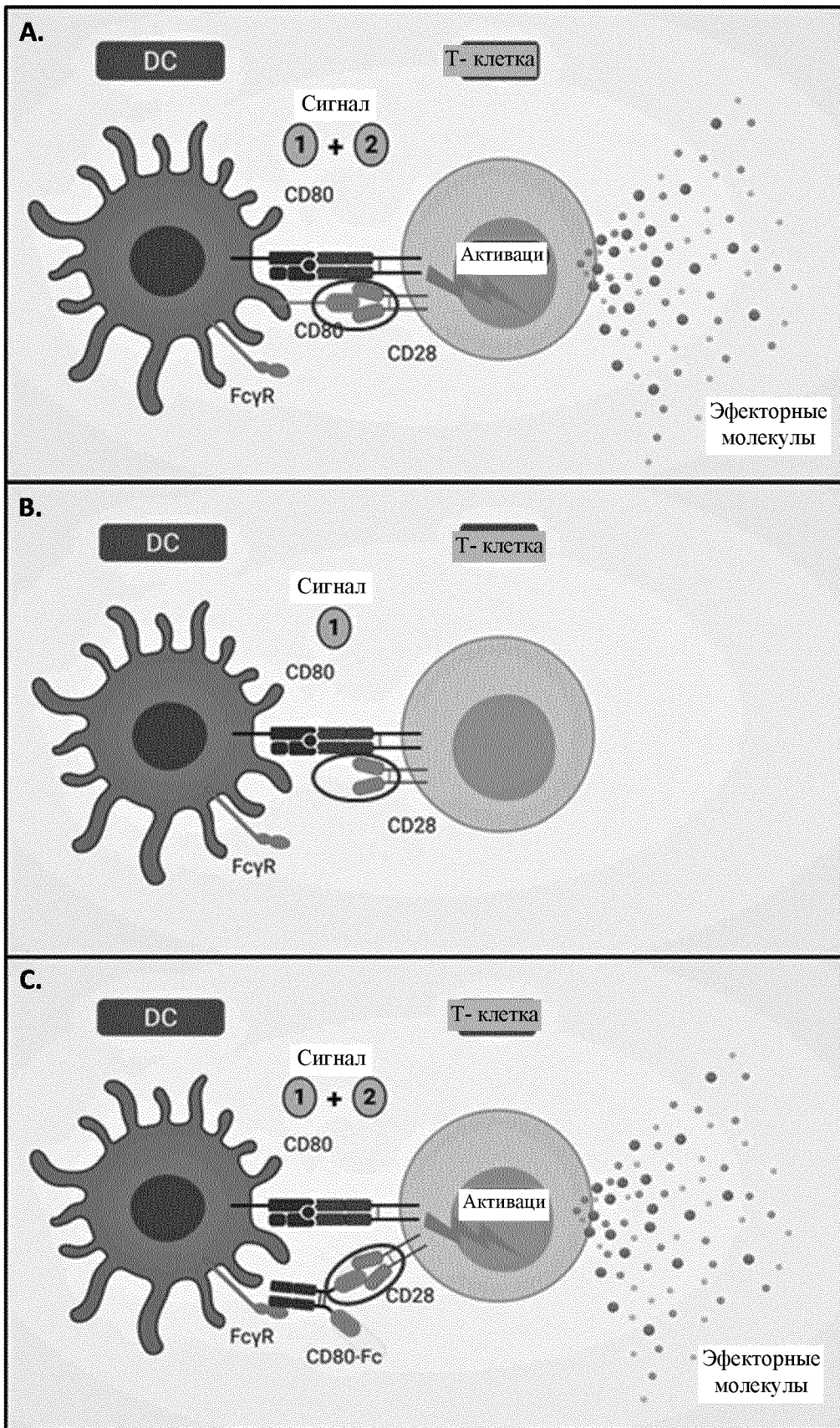
ФИГ. 8



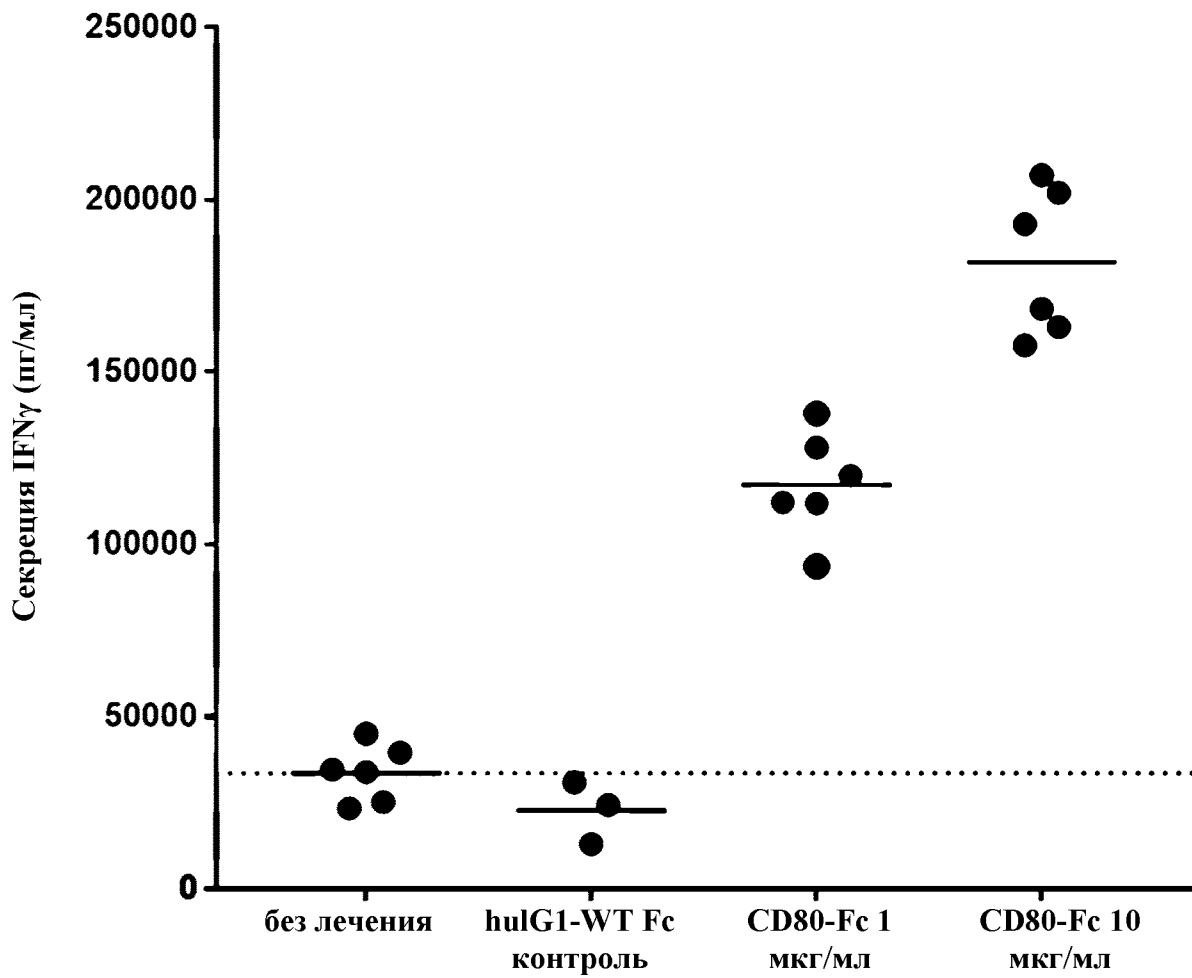
ФИГ. 9



ФИГ. 10

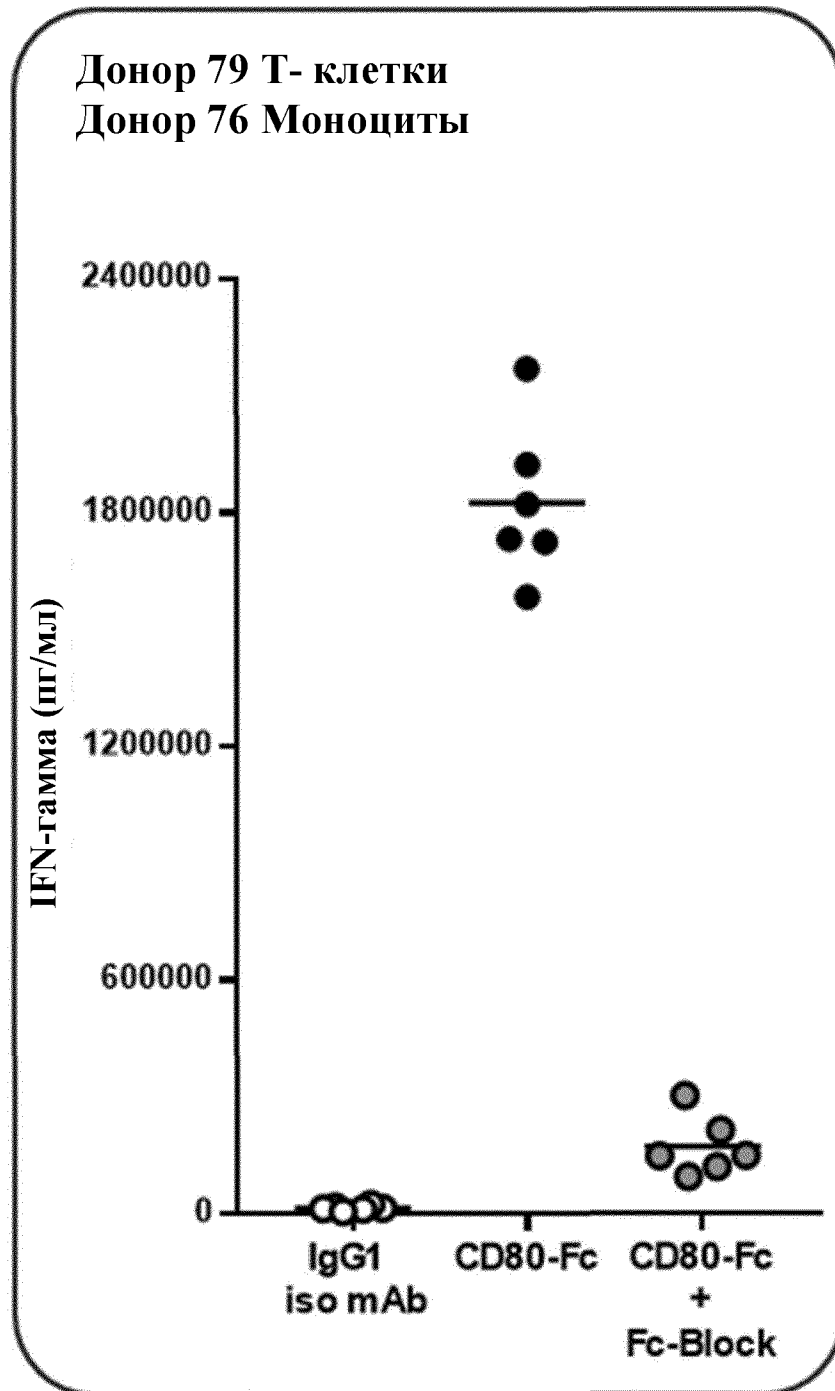


ФИГ. 11А-С



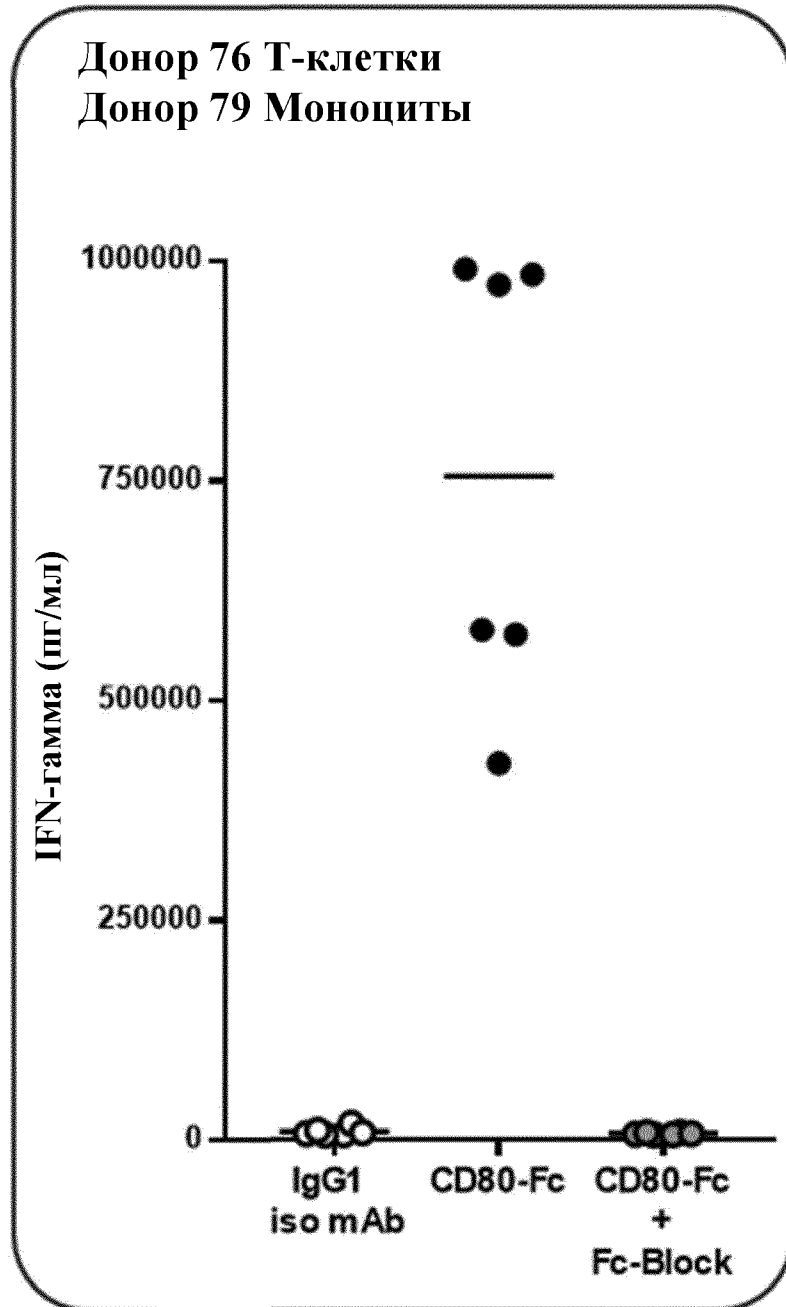
ФИГ. 12

A



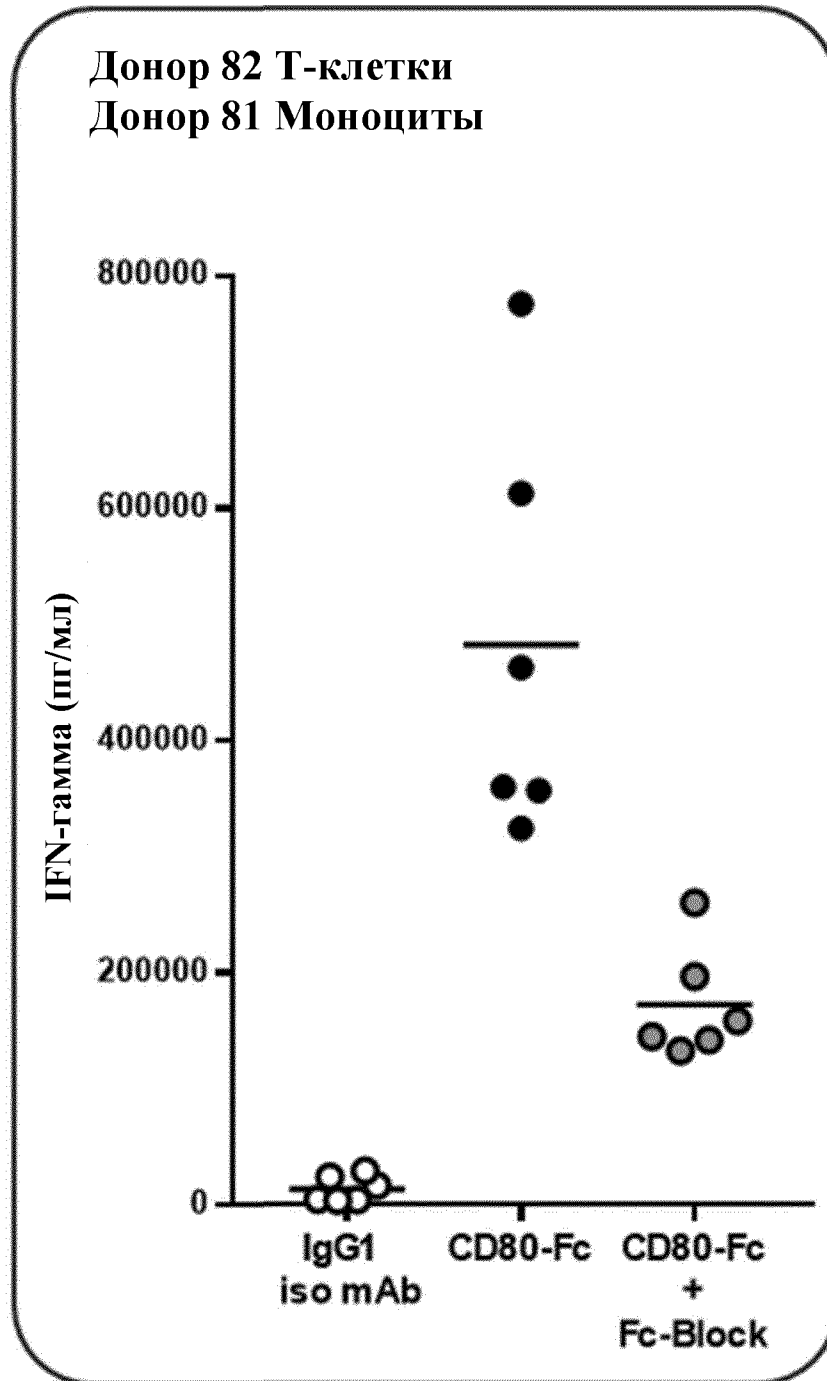
ФИГ. 13А-D

B



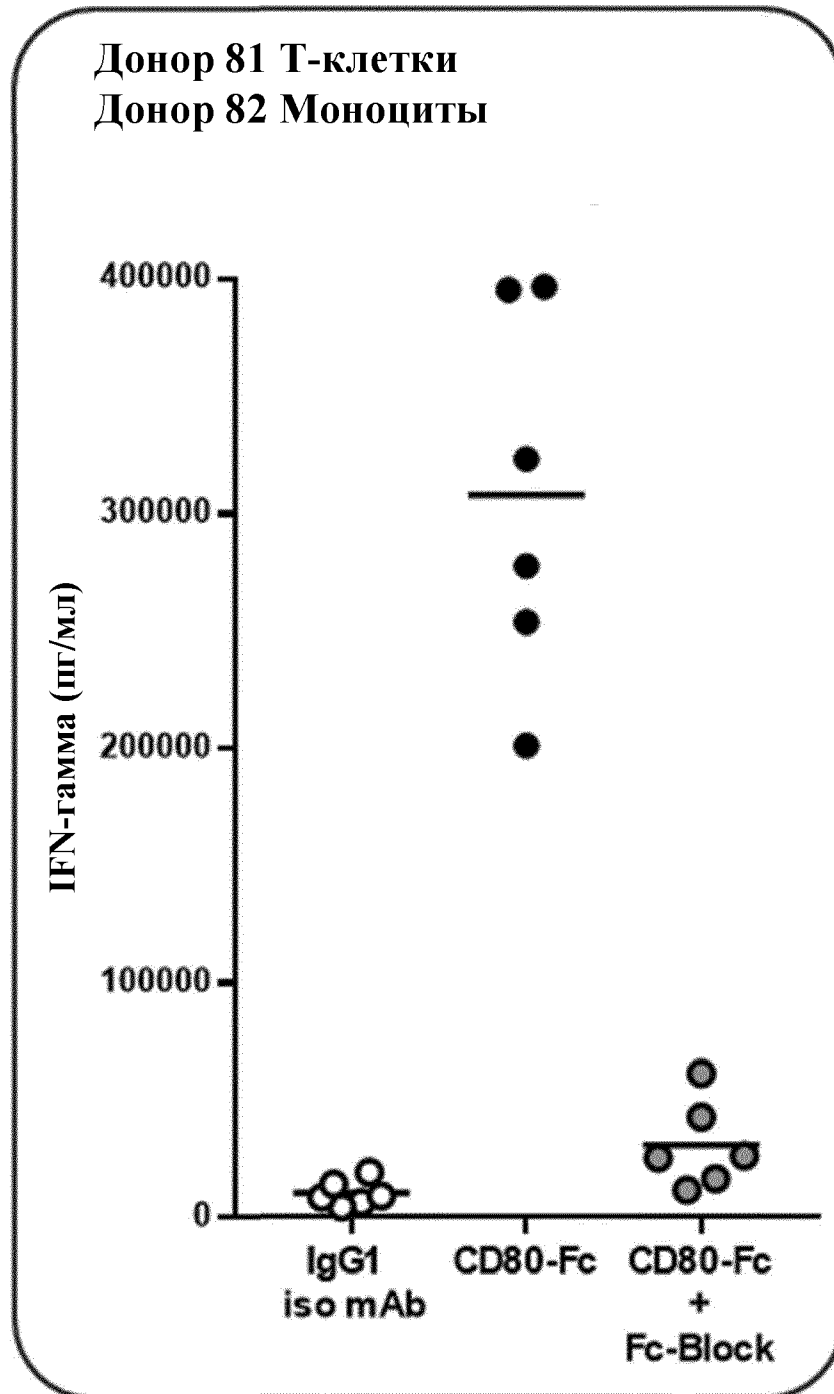
ФИГ. 13А-D (продолжение)

C

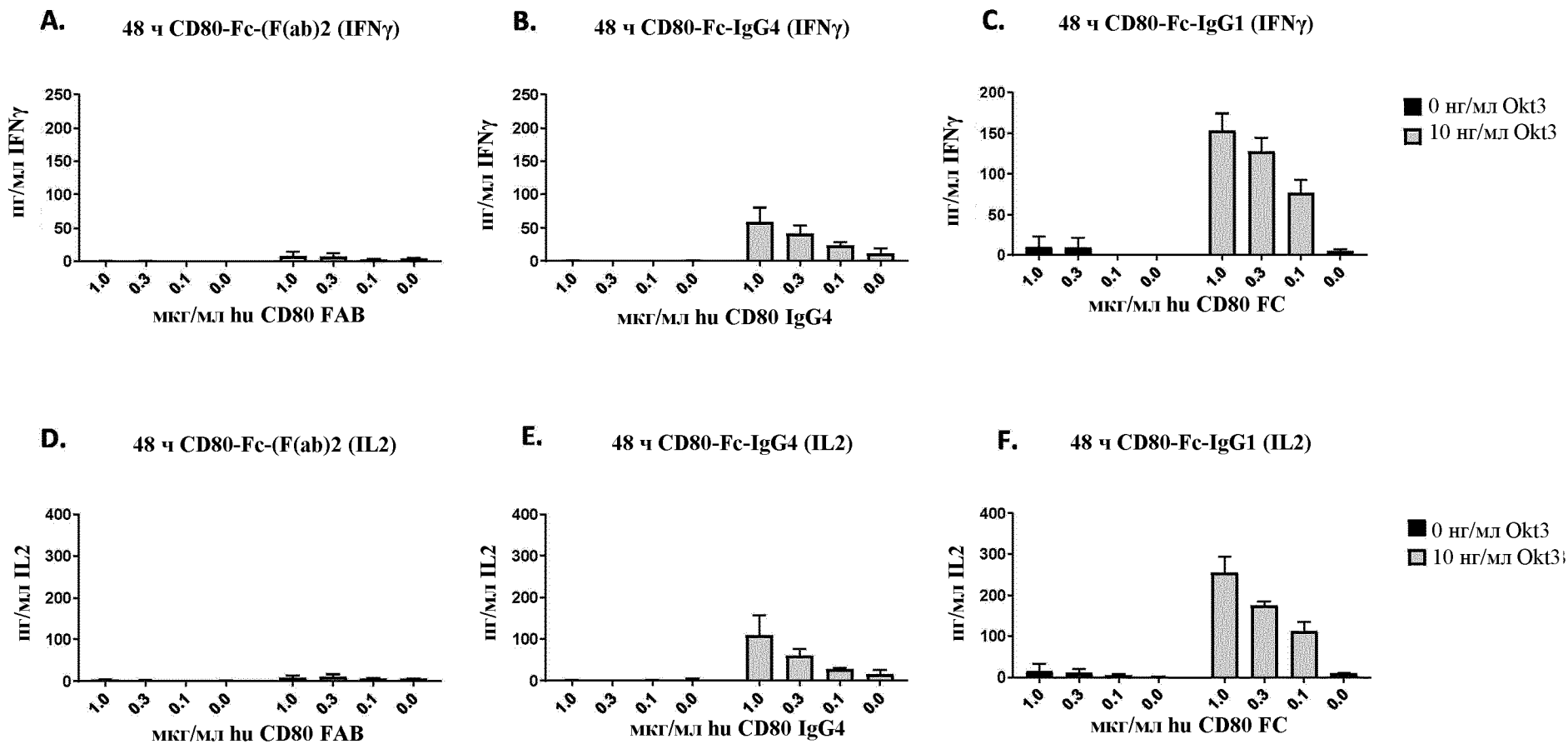


ФИГ. 13А-D (продолжение)

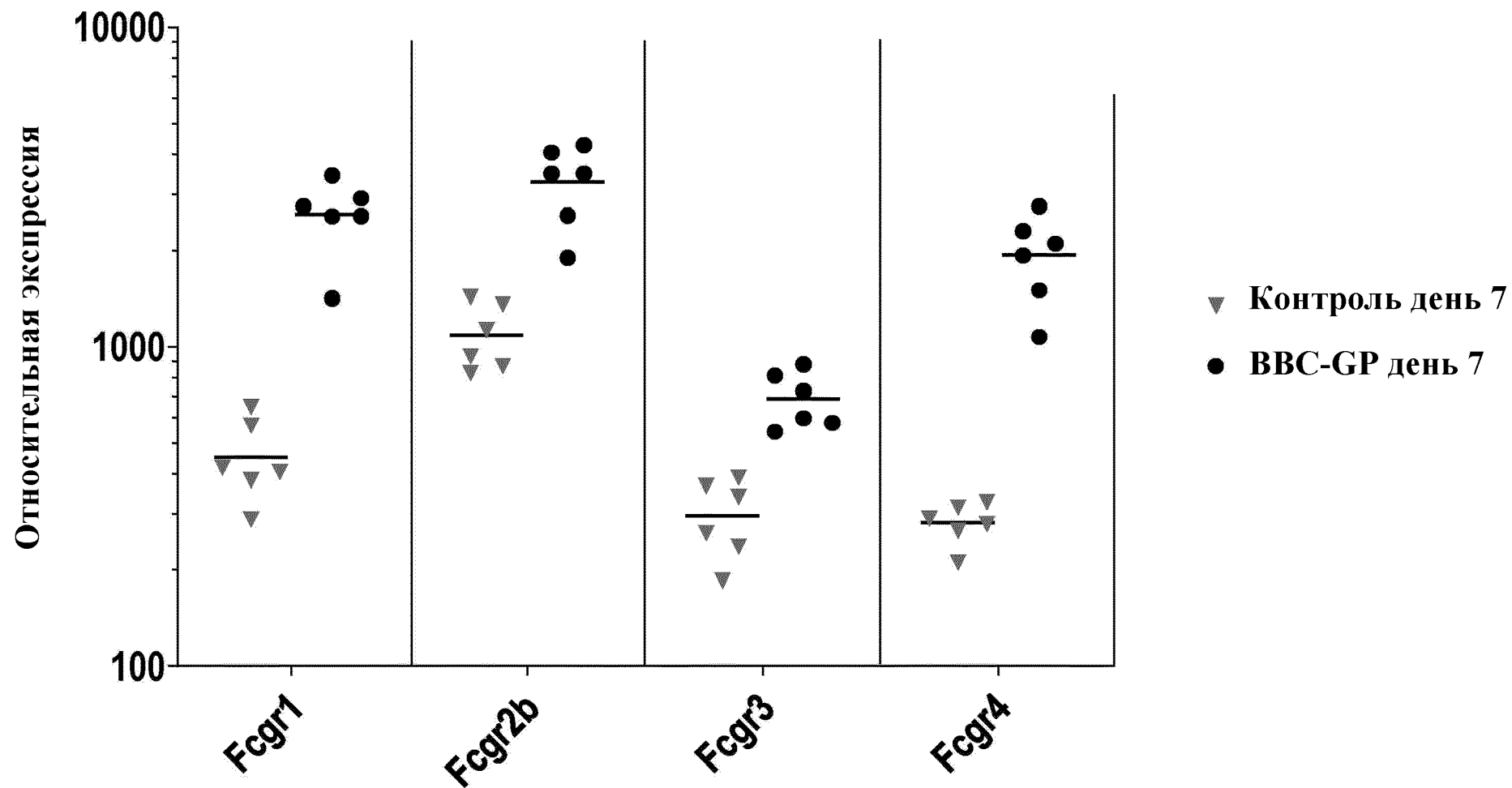
D



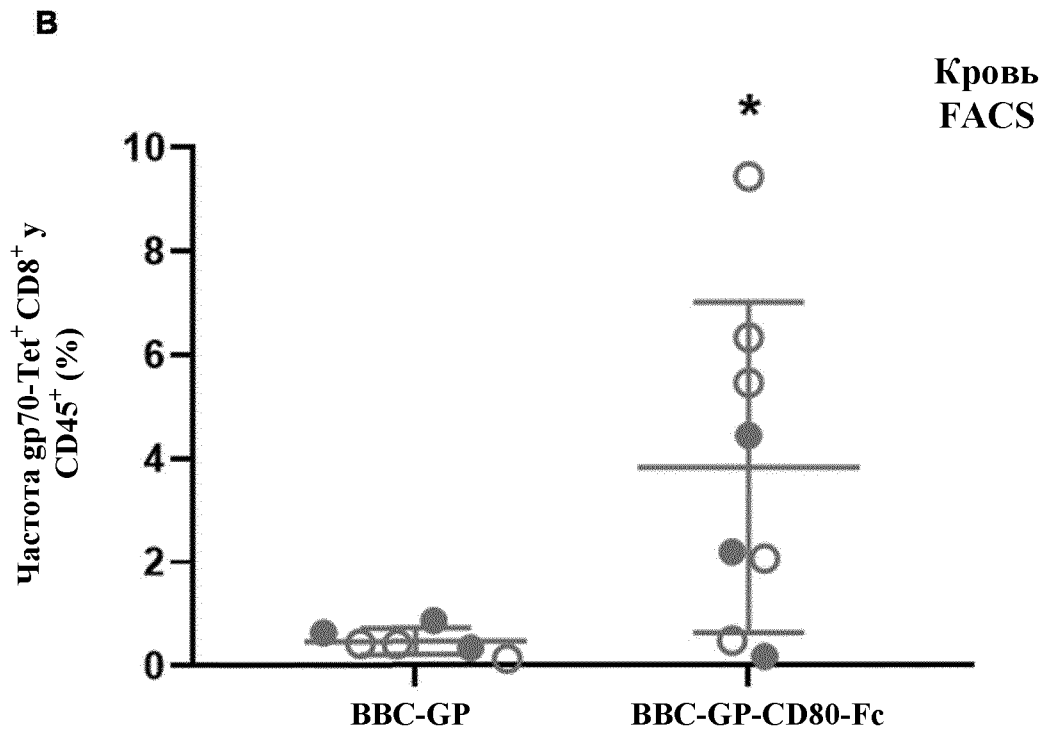
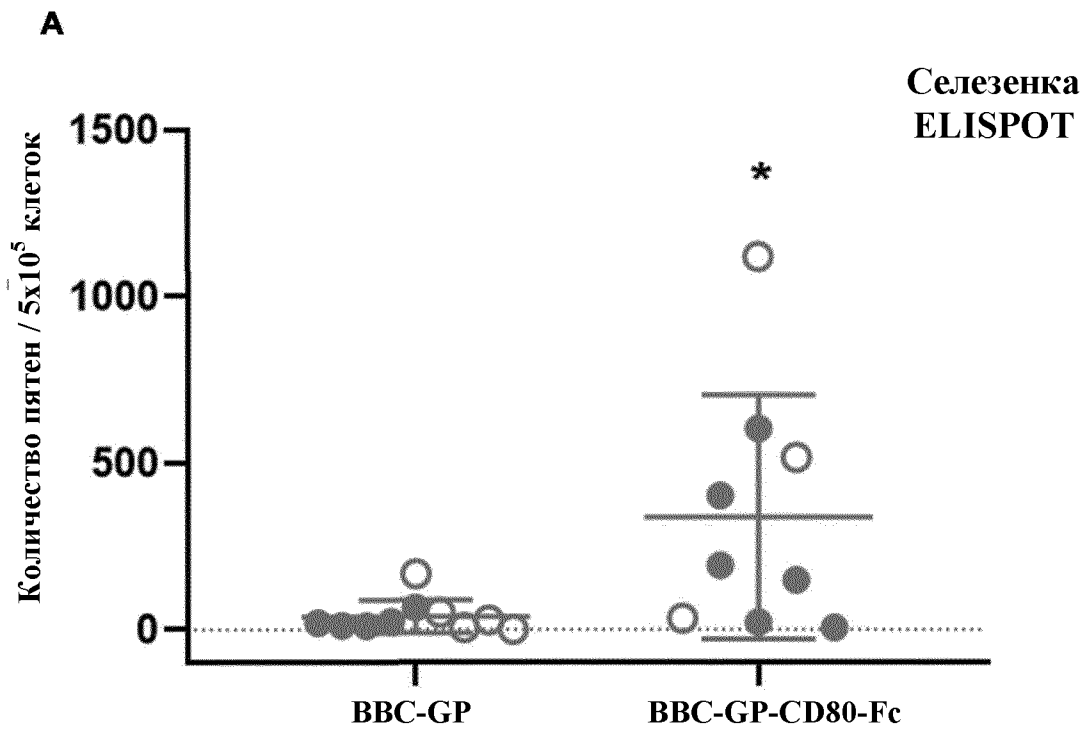
ФИГ. 13А-D (продолжение)



ФИГ. 14А-Ф

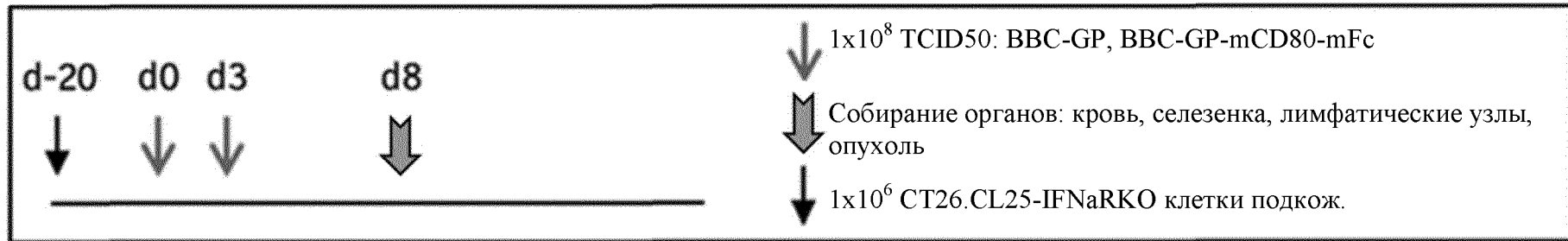


ФИГ. 15

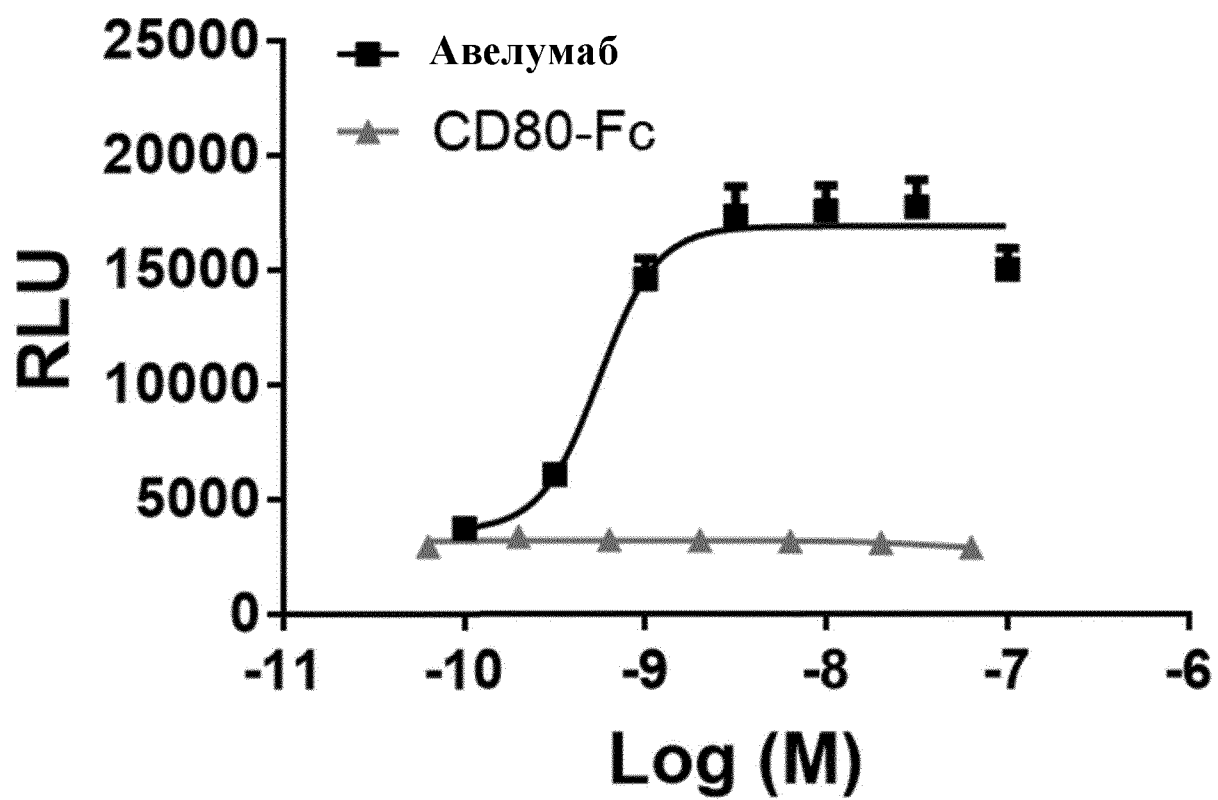


ФИГ. 16А-С

C

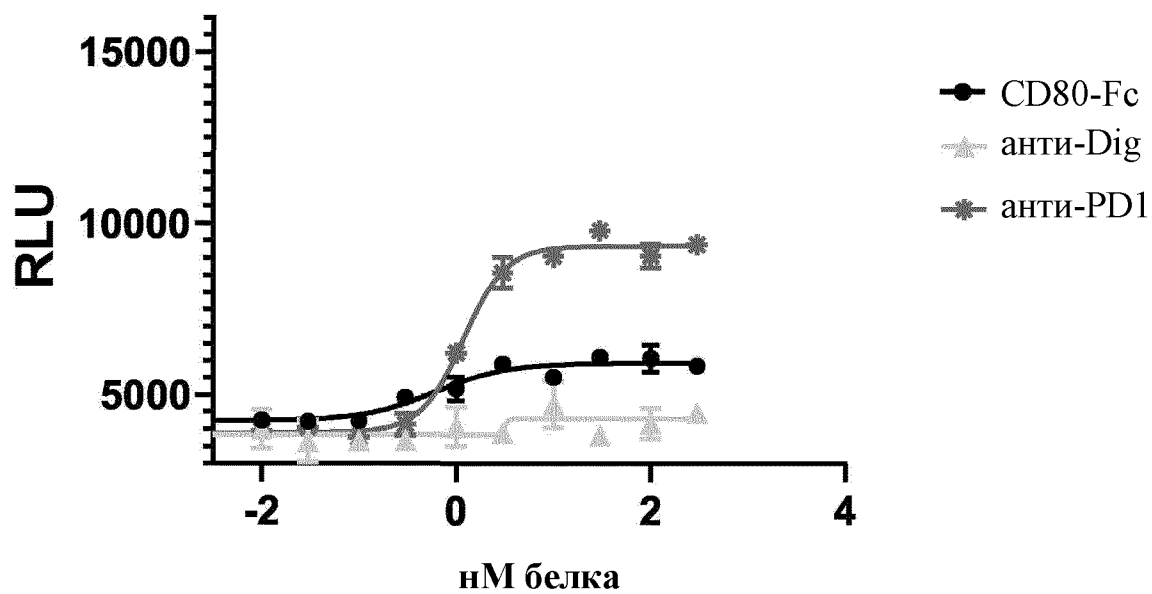


ФИГ. 16А-С (продолжение)

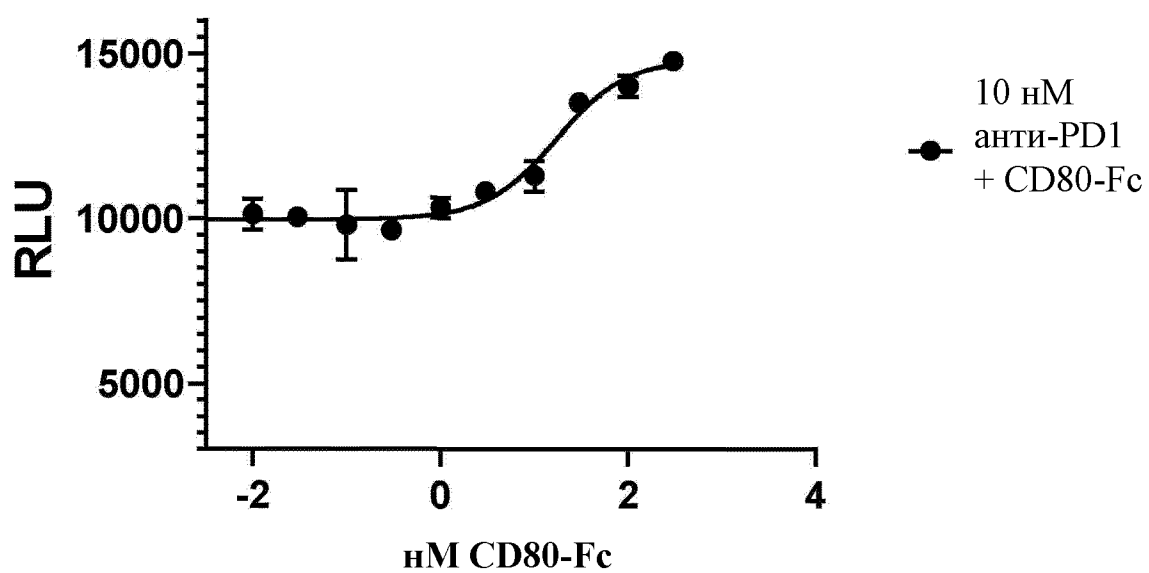


ФИГ. 17

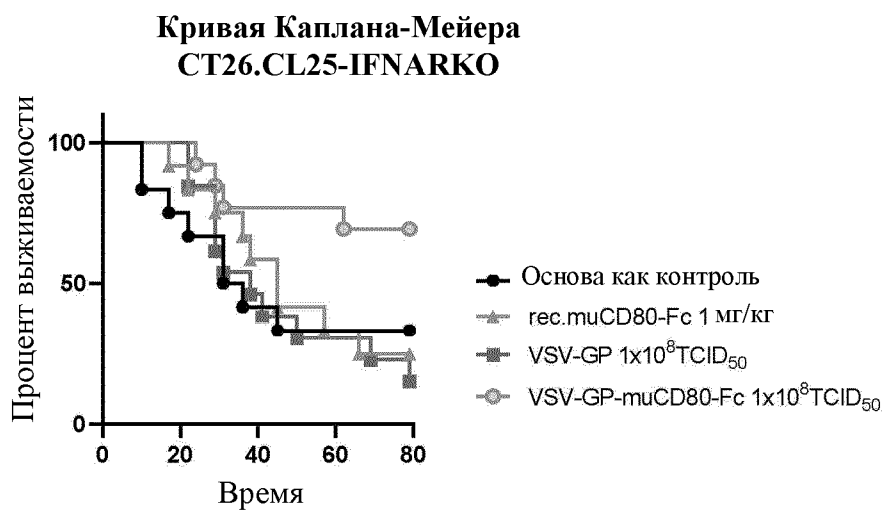
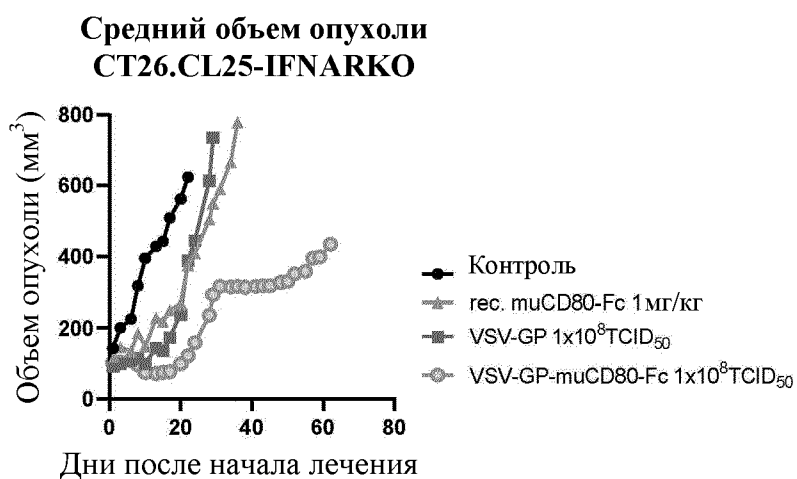
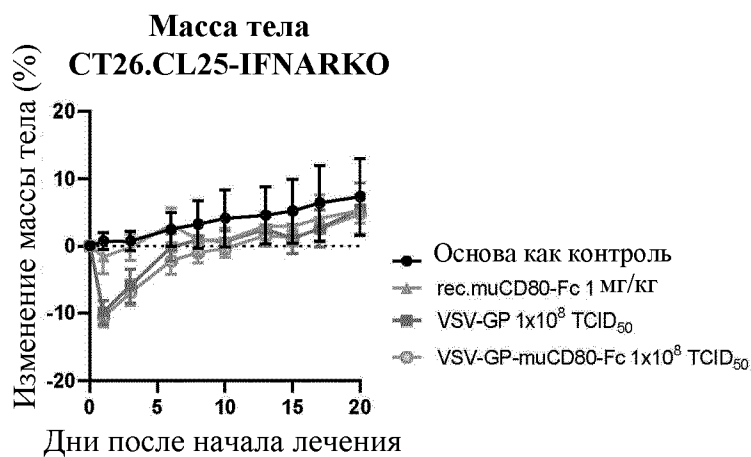
A



B



ФИГ. 18А-В

A**B****C**

ФИГ. 19А-С