

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046706**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.12

(21) Номер заявки
201891904

(22) Дата подачи заявки
2017.02.23

(51) Int. Cl. **A61K 38/05** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

**(54) ТЕРАПИЯ КОМБИНАЦИЕЙ SMC И АТЕЗОЛИЗУМАБА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ**

(31) 62/299,288

(32) 2016.02.24

(33) US

(43) 2019.04.30

(86) PCT/CA2017/050237

(87) WO 2017/143449 2017.08.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЧИЛДРЕН'С ХОСПИТАЛ ОФ
ИСТЕРН ОНТАРИО РИСЕРЧ
ИНСТИТЮТ ИНК. (СА)**

(72) Изобретатель:
**Корнелюк Роберт Г., Лакасс Эрик К.,
Бег Шон Т., Танг Вера А. (СА)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) BEUG, S. T. et al. "Smac Mimetics and Innate Immune Stimuli Synergize to Promote Tumor Death", Nature Biotechnology, February 2014 (02-2014), Vol. 32, pages 182-190, ISSN 1546-1696

BEUG, S. et al. "Smac Mimetics Combined with Innate Immune Stimuli Create the Perfect Cytokine Storm to Kill Tumor Cells", Oncoimmunology, e-published April, 2014 (04-2014), Vol. 3, pages e-28541-1-e-28541-3, ISSN 2162-4011

BEUG, S. et al. "Combinatorial cancer Immunotherapy Strategies with Proapoptotic Small-molecule IAP Antagonists", Int J Dev Biol, 21 May 2015 (21-05-2015), Vol. 59, pages 141-147, ISSN 1696-3547

(57) Настоящее изобретение относится к противоопухолевой композиции, содержащей одновалентное соединение-миметик Smac (SMC) и Атезолизумаб, для применения комбинации для лечения злокачественного новообразования и к способам лечения злокачественного новообразования, используя эту комбинацию.

B1

046706

**046706
B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Смерть клеток путем апоптоза (или путем запрограммированной гибели клеток) и другие пути гибели клеток регулируются различными клеточными механизмами. Белки ингибиторы апоптоза (IAP), такие как X-связанные IAP (XIAP) или клеточные IAP белки 1 и 2 (сIAP1 и 2), являются регуляторами запрограммированной гибели клеток, в том числе (но ими не ограничиваясь) пути апоптоза, например, в злокачественных клетках. Другие формы гибели клеток могут включать, но не ограничиваются ими, некроптоз, некроз, пироптоз и иммуногенную гибель клеток. Кроме того, эти IAP регулируют различные клеточные сигнальные пути через активность E3-убиквитинлигазы, что может быть связано с выживаемостью клеток или не связано с ней. Еще одним регулятором апоптоза является полипептид Smac. Smac является проапоптогенным белком, высвобождаемый из митохондрий в связи с клеточной гибелью. Smac может связываться с IAP и является антагонистом их функции. Соединения-миметики Smac (SMC) представляют собой не эндогенные проапоптотические соединения, способные выполнять одну или несколько функций или действий эндогенного Smac.

Прототипический белок XIAP непосредственно ингибирует основную инициаторную каспазу и исполнительную каспазу в каскадах апоптоза.

Таким образом, XIAP может мешать завершению апоптотических программ. Клеточные белки IAP 1 и 2 представляют собой E3-убиквитинлигазы, которые регулируют пути апоптотической передачи сигналов, привлекаемые иммунными цитокинами. Двойная потеря сIAP1 и 2 может привести к тому, что TNF α , TRAIL и/или IL-1 β становятся токсичными, например, для большинства злокачественных клеток. SMC могут ингибировать XIAP, сIAP1, сIAP2 или другие IAP и/или способствовать другим проапоптотическим механизмам.

Было предложено лечение злокачественного новообразования с помощью SMC. Тем не менее, только SMC могут быть недостаточными для лечения некоторых видов злокачественных опухолей. Существует необходимость в способах лечения злокачественного новообразования, которые повышают эффективность лечения SMC при одном или нескольких типах злокачественных новообразований.

Раскрытие сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к противоопухолевой композиции, содержащей одновалентное соединение-миметик Smac (SMC) и Атезолизумаб.

В одном из аспектов настоящее изобретение представляет собой комбинацию, в которой указанный одновалентный SMC представляет собой AT-406/SM406/Debiol143/D1143.

Кроме того, изобретение относится к применению указанной комбинации 2 для лечения пациента со злокачественным новообразованием. Злокачественное новообразование может быть устойчивым к лечению только миметиком Smac.

В одном из аспектов у пациента диагностирован рак, выбранный из рака надпочечников, базальноклеточной карциномы, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, хориокарциномы, рака толстой кишки, колоректального рака, рака соединительной ткани, рака пищеварительной системы, рака эндометрия, эпифарингиальной карциномы, рака пищевода, рака глаз, рака желчного пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, интраэпителиального новообразования, рака почек, рака гортани, лейкоза, рака печени, метастазов в печени, рака легких, лимфомы, меланомы, множественной миеломы, нейроblastомы, мезотелиомы, нейроглиомы, миелодиспластического синдрома, множественной миеломы, рака полости рта, рака яичников, рака у детей, рака поджелудочной железы, эндокринных опухолей поджелудочной железы, рака полового члена, плазмоклеточных опухолей, аденомы гипофиза, тимомы, рака предстательной железы, карциномы почек, рака дыхательной системы, рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, саркомы, рака кожи, рака тонкой кишки, рака желудка, рака яичек, рака щитовидной железы, рака мочеоточника, и рака мочевой системы.

Кроме того, изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования, где указанный способ включает введение пациенту эффективного количества указанной комбинации, где SMC и Атезолизумаб вводят одновременно или с интервалом 28 дней друг от друга в количествах, которые вместе эффективны для лечения указанного злокачественного новообразования. SMC и Атезолизумаб вводят в диапазоне 14 дней друг от друга или в диапазоне 10 дней друг от друга, или в диапазоне 5 дней друг от друга, или в диапазоне 24 ч друг от друга, или в диапазоне 6 ч друг от друга или, по существу, одновременно. Злокачественное новообразование может быть устойчивым к лечению только миметиком Smac.

Еще в одном варианте осуществления указанный способ также включает введение терапевтического агента, содержащего интерферон, где указанный интерферон предпочтительно является интерфероном 1-го типа. Злокачественное новообразование может быть выбрано из рака надпочечников, базальноклеточной карциномы, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, хориокарциномы, рака толстой кишки, колоректального рака, рака соединительной ткани, рака пищеварительной системы, рака эндометрия, эпифарингиальной карциномы, рака пищевода, рака глаз, рака желчного пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, интраэпителиального новообразования, рака почек, рака гортани,

лейкоза, рака печени, метастазов в печени, рака легких, лимфомы, меланомы, миеломы, множественной миеломы, нейробластомы, мезотелиомы, нейроглиомы, миелодиспластического синдрома, множественной миеломы, рака полости рта, рака яичников, рака у детей, рака поджелудочной железы, эндокринных опухолей поджелудочной железы, рака полового члена, плазмноклеточных опухолей, аденомы гипофиза, тимомы, рака предстательной железы, карциномы почек, рака дыхательной системы, рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, саркомы, рака кожи, рака тонкой кишки, рака желудка, рака яичек, рака щитовидной железы, рака мочеочника, и рака мочевого системы.

"Соседняя" клетка означает клетку, расположенную в достаточной близости от заданной клетки, чтобы напрямую или косвенно получать иммунный, воспалительный или проапоптотический сигнал из заданной клетки.

"Стимулирование апоптоза или гибели клеток" означает увеличение вероятности того, что одна или несколько клеток будут подвергаться апоптозу или погибать. Лечение может усиливать гибель клеток, увеличивая вероятность того, что одна или несколько обработанных клеток будут подвергаться апоптозу, и/или увеличивая вероятность того, что одна или несколько клеток, соседствующих с обработанной клеткой, будут подвергаться апоптозу или погибать.

"Эндогенная активность Smac" означает одну или несколько биологических функций Smac, которые приводят к стимулированию апоптоза, включая по меньшей мере ингибирование cIAP1 и cIAP2. Нет необходимости в том, чтобы биологическая функция возникала или была возможна во всех клетках при любых условиях, только чтобы Smac был способен осуществлять биологическую функцию в некоторых клетках при определенных природных *in vivo* условиях.

"Соединение-миметик Smac" или "SMC" означает композицию из одного или нескольких компонентов, например, низкомолекулярного вещества, соединения, полипептида, белка или любого их комплекса, способную ингибировать cIAP1 и/или ингибировать cIAP2.

Соединения-миметики Smac включают соединения, перечисленные в табл. 1.

"Индукция программы апоптоза" означает вызывать изменение в белках или в белковых профилях одной или нескольких клеток, повышая количество, доступность или активность одного или нескольких белков, способных участвовать в IAP-опосредованном апоптотическом пути, или праймируя один или несколько белков, способных участвовать в IAP-опосредованном апоптотическом пути, для участия в активности такого пути.

Для индукции программы апоптоза не требуется стимулирование гибели клеток *per se*: индукция программы апоптоза способом, который не приводит к гибели клеток, может обладать синергетическим действием наряду с лечением SMC, что стимулирует апоптоз, приводя к гибели клеток.

"Агент" означает композицию из одного или нескольких компонентов, способных индуцировать программу апоптоза или воспаления в одной или нескольких клетках субъекта, и гибель клеток вслед за этой программой ингибируется по меньшей мере cIAP1 и cIAP2. Агентом может быть, например, агонист TLR (например, соединение, указанное в табл. 2), вирус (например, вирус, указанный в табл. 3), такой как онколитический вирус, или ингибитор иммунной контрольной точки (например, один из указанных в табл. 4).

"Лечение злокачественного новообразования" означает индукцию гибели одной или нескольких злокачественных клеток у субъекта или стимуляцию иммунного ответа, который может привести к опухолевой регрессии и к блокированию распространения опухоли (метастазирования).

Лечение злокачественного новообразования может полностью или частично снять некоторые или все признаки и симптомы злокачественного новообразования у субъекта, уменьшить тяжесть одного или нескольких симптомов злокачественного новообразования у субъекта, уменьшить прогрессирование одного или нескольких симптомов злокачественного новообразования у субъекта или опосредовать прогрессирование, или тяжесть одного или нескольких симптомов, развивающихся в дальнейшем.

"Пролекарство" означает терапевтическое средство, которое получают в неактивной форме, которая может быть преобразована в активную форму внутри организма субъекта, например, внутри клеток субъекта, под действием одного или нескольких ферментов, химических веществ или существующих у субъекта условий.

Под "низкой дозой" или "низкой концентрацией" понимают дозу или концентрацию, которая по меньшей мере на 5% ниже (например, по меньшей мере на 10, 20, 50, 80, 90 или даже 95% ниже), чем самая низкая стандартная рекомендуемая доза или наименьшая стандартная рекомендуемая концентрация конкретного соединения, полученная для данного пути введения для лечения любого заболевания или состояния человека.

Под "высокой дозой" понимают дозу, которая по меньшей мере на 5% выше (например, по меньшей мере на 10, 20, 50, 100, 200 или даже 300% выше), чем самая высокая стандартная рекомендуемая доза конкретного соединения для лечения любой болезни или состояния человека.

"Ингибитор иммунной контрольной точки" означает лекарственное средство для лечения злокачественного новообразования, которое предотвращает выключение иммунных клеток злокачественными клетками путем антагонистической блокировки соответствующих рецепторов или связывания с их лигандами, таким образом восстанавливая способность иммунной системы атаковать опухоль.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-1F показан набор графиков и изображений, демонстрирующих, что SMC и онколитические рабдовирусы обладают синергической активностью в отношении индукции гибели злокачественных клеток. Все панели на фиг. 1 представляют данные по меньшей мере трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов ($n=3$). На фиг. 1A представлена пара графиков, демонстрирующих результаты жизнеспособности клеток, обработанных LCL161, при окрашивании Alamar blue, и повышении MOI VSV Δ 51. Шкала ошибок, среднее \pm стандартное отклонение. На фиг. 1B представлен набор микрофотографий клеток, обработанных LCL161 и 0,1 MOI VSV Δ 51-GFP. На фиг. 1C представлена пара графиков, демонстрирующих жизнеспособность (Alamar Blue) клеток, инфицированных VSV Δ 51 (0,1 MOI) в присутствии повышающихся концентраций LCL161. Шкала ошибок, среднее \pm стандартное отклонение. На фиг. 1D представлена пара графиков, демонстрирующих данные, полученные на клетках, инфицированных VSV Δ 51, в течение 24 ч. Супернатант клеточной культуры подвергали действию ультрафиолета, инактивирующего вирус, а затем среду использовали для новых клеток для анализа жизнеспособности (Alamar Blue) в присутствии LCL161. Шкала ошибок, среднее \pm стандартное отклонение. На фиг. 1E представлен график, демонстрирующий жизнеспособность клеток, обработанных одновременно LCL161 и не распространяющимся вирусом VSV Δ 51 Δ G (0,1 MOI). Шкала ошибок, среднее \pm стандартное отклонение. На фиг. 1F представлен график и пара изображений, относящихся к клеткам, на которые наносили агарозную среду, содержащую LCL161, которые инокулировали VSV Δ 51-GFP в середине лунки, и измеряли инфекционность по флуоресценции и цитотоксичность оценивали с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым (изображения наложены; изображения без наложения представлены на фиг. 11). Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение.

На фиг. 2A-2E представлен набор графиков и изображений, демонстрирующих, что обработка SMC не влияет на ответ злокачественных клеток на заражение онколитическим вирусом (OV). Все панели на фиг. 2 представляют данные по меньшей мере трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов. На фиг. 2A представлена пара графиков, демонстрирующих данные, полученные на клетках, которые были предварительно обработаны LCL161 и инфицированы указанным значением MOI VSV Δ 51. Титры вируса оценивали по стандартному анализу бляшек. На фиг. 2B представлена пара графиков и набор микрофотографий, полученных в динамике на клетках, обработанных LCL161 и VSV Δ 51-GFP. Графики отображают количество сигналов GFP в динамике. Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение $n=12$. Фиг. 2C представляет собой пару графиков, демонстрирующих данные эксперимента, в котором супернатанты клеточной культуры клеток, обработанных LCL161 и VSV Δ 51, подвергали исследованию на наличие IFN β с помощью ELISA. Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение $n=3$. На фиг. 2D представлена пара графиков, где показан данные эксперимента, в котором клетки обрабатывали LCL161 и VSV Δ 51 в течение 20 ч и исследовали с помощью ОТ-кПЦР для измерения экспрессии гена интерферона (ISG). Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение $n=3$. На фиг. 2E представлена пара изображений, демонстрирующих иммуноблоты активации пути STAT1, проводимой на клетках, которые предварительно обрабатывали LCL161, а затем стимулировали IFN β .

Фиг. 3A-3H представляют собой набор графиков, демонстрирующих, что обработка OV-инфицированных злокачественных клеток с помощью SMC приводит к продукции интерферона 1 типа (IFN типа 1) и продукции провоспалительных цитокинов, зависимой от нуклеарного фактора каппа В (NF- κ B). Все панели на фиг. 3 представляют данные по меньшей мере трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов ($n=3$). На фиг. 3A представлен график, демонстрирующий жизнеспособность клеток, окрашенных Alamar blue, трансфицированных комбинациями нецелевой миРНК (NT), миРНК TNF-R1 и DR5, и затем обработанных LCL161 и VSV Δ 51 (0,1 MOI) или IFN β . Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение. На фиг. 3B представлен график, демонстрирующий жизнеспособность клеток, трансфицированных миРНК NTP или IFNAR1, и затем обработанных LCL161 и VSV Δ 51 Δ G. На фиг. 3B представлен график, демонстрирующий жизнеспособность клеток, трансфицированных миРНК NT или IFNAR1, а затем обработанных LCL161 и VSV Δ 51 Δ G. Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение. На фиг. 3D представлена диаграмма, показывающая данные, собранные в эксперименте, в котором цитокиновую ELISA осуществляли на клетках, трансфицированных миРНК NTP или IFNAR1, а затем обработанных LCL161 и 0,1 MOI VSV Δ 51. Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение. На фиг. 3E представлен график, демонстрирующий жизнеспособность клеток, обработанных одновременно LCL161 и цитокинами. Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение. На фиг. 3F представлен график, демонстрирующий данные эксперимента, в котором клетки предварительно обрабатывали LCL161, стимулировали IFN β при концентрации 250 Ед/мл (~20 мкг/мл) и определяли уровни мРНК цитокинов с помощью ОТ-кПЦР. Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение. На фиг. 3G представлена пара графиков, демонстрирующих результаты цитокинового ELISA, проведенного на клетках, обработанных LCL161 и 0,1 MOI VSV Δ 51. На фиг. 3H представлен график, демонстрирующий результат цитокиновой ELISA, проведенного на клетках, экспрессирующих ИКК β -DN и обработанных LCL161 и VSV Δ 51 или IFN β . Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение.

На фиг. 4А-4Г представлен набор графиков и изображений, демонстрирующих, что обработка комбинацией SMC и OV эффективна *in vivo* и зависит от цитокинового сигнального пути. На фиг. 4А представлена пара графиков, демонстрирующих данные эксперимента, в котором опухоли EMT6-Fluc обрабатывали 50 мг/кг LCL161 (перорально) и 5×10^8 PFU VSVΔ51 (внутривенно). На левой панели показан рост опухоли. На правой панели представлена кривая Каплана-Мейера, изображающая выживание мышей. Шкалы ошибок, среднее \pm стандартная ошибка среднего $n=5$ для каждой группы. Множественное сравнение лог-рангового критерия и критерия Холма-Сайдака: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Показаны характерные данные двух независимых экспериментов. На фиг. 4В представлена серия характерных изображений IVIS, которые были получены в эксперименте фиг. 4А. На фиг. 4С и 4Д представлены наборы иммунофлюоресцентных изображений инфекции и апоптоза в опухолях при 24 ч обработке с использованием антител против α -VSV или α -с-каспазы-3. На фиг. 4Е представлено изображение, демонстрирующее иммуноблот, на котором белковые лизаты опухолей соответствующих обработанных мышей подвергали иммуноблоттингу с указанными антителами. На фиг. 4Ф представлена пара графиков, демонстрирующих данные эксперимента, в котором мышам с опухолями EMT6-Fluc, вводили нейтрализующие TNF α или изотипически сходные антитела, а затем мышам вводил 50 мг/кг LCL161 (перорально) и 5×10^8 PFU VSVΔ51 (внутривенно). На левой панели показан рост опухоли. На правой панели представлена кривая Каплана-Мейера, изображающая выживание мышей. Шкала погрешности, среднее \pm стандартная ошибка среднего. Носитель α -TNF α , $n=5$; SMC α -TNF α , $n=5$; носитель+VSVΔ51, $n=5$; α -TNF α , $n=5$; SMC+VSVΔ51 α -TNF α , $n=7$; SMC+VSVΔ51 α -IgG, $n=7$. Множественное сравнение лог-рангового критерия и критерия Холма-Сайдака: ***, $p < 0,001$. На фиг. 4Г представлен набор характерных изображений IVIS, которые были получены в эксперименте фиг. 4Ф.

На фиг. 5А-5Е представлена серия графиков и изображений, демонстрирующих, что низкомолекулярные иммунные стимуляторы усиливают терапию SMC на моделях злокачественного новообразования у мышей. На фиг. 5А представлен график, демонстрирующий результаты жизнеспособности при окрашивании Alamar blue клеток EMT6, которые культивировали одновременно со спленоцитами в системе Traswell и в котором выделенные спленоциты обрабатывали LCL161 и указанными агонистами TLR. Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение. Показаны характерные данные по меньшей мере трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов ($n=3$). На фиг. 5В представлена пара графиков, демонстрирующих эксперимент, в котором полученные опухоли EMT6-Fluc обрабатывали SMC (50 мг/кг LCL161, п.о.) и poly(:C) (15 мкг в.о. или 2,5 мг/кг в.б.). На левой панели показан рост опухоли. На правой панели представлена кривая Каплана-Мейера, изображающая выживание мышей. Носитель, носитель+poly(:C) в.б., $n=4$; остальные группы, $n=5$. Шкала ошибок, среднее \pm стандартная ошибка среднего. Множественное сравнение лог-рангового критерия и критерия Холма-Сайдака: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. На фиг. 5С представлена серия характерных изображений IVIS, которые были получены в эксперименте фиг. 5В. На фиг. 5В представлена пара графиков, демонстрирующих результаты эксперимента, в котором опухоли EMT6-Fluc обрабатывали LCL161 или комбинацией 200 мкг (в.о.) и/или 2,5 мг/кг (в.б.) CpG ODN 2216. На левой панели показан рост опухоли. На правой панели представлена кривая Каплана-Мейера, изображающая выживание мышей. Носитель, $n=5$; SMC, $n=5$; носитель+CpG в.б., $n=5$; SMC+CpG в.б., $n=7$; носитель+CpG в.о., $n=5$; SMC+CpG в.о., $n=8$; носитель+CpG в.б.+в.о., $n=5$; SMC+CpG в.б.+в.о., $n=8$. Шкала ошибок, среднее \pm стандартная ошибка среднего. Множественное сравнение лог-рангового критерия и критерия Холма-Сайдака: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. На фиг. 5Е представлена серия характерных изображений IVIS, которые были получены в эксперименте фиг. 5Д.

На фиг. 6 представлен график, демонстрирующий способность к ответу панели злокачественных и нормальных клеток на обработку комбинацией SMC и OV. Указанные линии злокачественных клеток ($n=28$) и незлокачественных клеток человека (первичные клетки скелетных мышц человека (HskM) и фибробласты человека (GM38)) обрабатывали LCL161 и увеличивающимся количеством VSVΔ51 в течение 48 ч. Дозу, необходимую для получения 50% жизнеспособных клеток в присутствии в SMC по сравнению с носителем, определяли с использованием нелинейной регрессии и отображали как сдвиг log EC50 в сторону повышения чувствительности. Показаны характерные данные по меньшей мере двух независимых экспериментов с использованием биологических повторов ($n=3$).

На фиг. 7 показана пара графиков, демонстрирующих, что совместная обработка SMC и OV обладает высокой синергетической активностью в отношении злокачественных клетках. На графиках показаны данные анализа жизнеспособности с окрашиванием Alamar blue клеток, обработанных серийными разведениями комбинации с фиксированным соотношением VSVΔ51 и LCL161 (PFU:mkM LCL161). Показатель аддитивности (CI) рассчитывали с помощью Calcsyn. Графики представляют алгебраическую оценку CI в зависимости от доли вовлеченных клеток (Fa). Шкалы ошибок, среднее \pm стандартная ошибка среднего. Показаны характерные данные трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов ($n=3$).

На фиг. 8 представлена пара графиков, демонстрирующих, что одновалентные и двухвалентные SMC вместе с OV обладают синергетической активностью вызывать гибель злокачественных клеток.

Графики показывают результат анализа жизнеспособности с окрашиванием Alamar blue клеток, обработанных 5 мкМ одновалентных SMC (LCL161, SM-122) или 0,1 мМ двухвалентных SMC (AEG40730, OICR720, SM-164) и VSVΔ51 при различных MOI. Шкалы ошибок, среднее ± стандартное отклонение. Показаны характерные данные трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов (n=3).

На фиг. 9А и 9В представлен набор изображений и графиков, демонстрирующих, что SMC-опосредуемая гибель злокачественных клеток усиливается под действием онколитических вирусов. На фиг. 9А представлена серия изображений, демонстрирующих результаты анализа распространения вируса в клетках, на которые наносили 0,7% агарозу в присутствии носителя или LCL161 и 500 PFU указанных вирусов распределяли в середине лунки. Цитотоксичность оценивали с помощью окрашивания кристаллическим фиолетовым. Стрелка обозначает расширение зоны гибели клеток от точки начала инфекции OV. На фиг. 9В представлен набор графиков, демонстрирующих данные анализа жизнеспособности с окрашиванием Alamar blue клеток, обработанных LCL161, и повышающимся количеством MOI VSVΔ51 или Maraba-MG1. Шкалы ошибок, среднее ± стандартное отклонение. Показаны характерные данные двух независимых экспериментов с использованием биологических повторов (n=3).

На фиг. 10А и 10В представлен набор графиков и изображений, демонстрирующих, что cIAP1, cIAP2 и XIAP совместно защищают злокачественные клетки от OV-индуцированной гибели клеток. На фиг. 10А показаны данные анализа жизнеспособности с окрашиванием Alamar blue клеток, трансфицированных нецелевой (NT) миРНК или миРНК, нацеленной на cIAP1, cIAP2 или XIAP, и затем обрабатывали LCL161 и 0,1 MOI VSVΔ51 в течение 48 ч. Шкалы ошибок, среднее ± стандартное отклонение. Показаны характерные данные трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов (n=3). На фиг. 10В представлены характерные иммуноблоты эффективности миРНК для эксперимента фиг. 10А.

На фиг. 11 представлен набор изображений, используемых для наложенных изображений, изображенных на фиг. 1G. На клетки наносили агарозную среду, содержащую LCL161, инокулированную VSVΔ51-GFP в середине лунки, и инфекционную активность измеряли флуоресценцией, а цитотоксичность показывали окрашиванием кристаллическим фиолетовым (CV). Примечание: шкалы имеют одинаковый размер.

На фиг. 12А и 12В представляют набор изображений и график, демонстрирующий, что обработка SMC не влияет на распространение или репликацию OV *in vivo*. На фиг. 12А представляет собой набор изображений, демонстрирующих изображения эксперимента, в котором мышью с опухолью EMT6 обрабатывали 50 мг/кг LCL161 (п.о.) и 5×10^8 PFU люциферазы светлячка с меткой VSVΔ51 (VSVΔ51-Fluc) посредством в.в. инъекции. Распространение и репликацию вируса визуализировали через 24 и 48 ч, используя IVIS. Контур обозначает область опухолей. Показаны характерные данные двух независимых экспериментов. Стрелка указывает на селезенку, инфицированную VSVΔ51-Fluc. На фиг. 12В представлен график, демонстрирующий данные эксперимента, в котором опухоли и ткани через 48 ч после заражения гомогенизировали, и титрование вируса проводили для каждой группы. Шкала ошибок, среднее ± стандартная ошибка среднего.

На фиг. 13А и 13В представлены изображения, демонстрирующие исследование миРНК-опосредованного нокдауна нецелевой (NT), TNFR1, DR5 и IFNAR1 с помощью иммуноблоттинга. На фиг. 13А показан иммуноблоттинг, демонстрирующий нокдаун в образцах эксперимента фиг. 3А. На фиг. 13В представлен иммуноблоттинг, демонстрирующий нокдаун в образцах эксперимента фиг. 3В.

На фиг. 14А-14G представлены изображения и графики, демонстрирующие, что SMC вместе OV обладают синергетической активностью по индукции каспазы-8- и RIP-1-зависимого апоптоза в злокачественных клетках. Все панели Фиг. 14 представляют характерные данные трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов. На фиг. 14А представлена пара изображений иммуноблотов после проведения иммуноблоттинга на активацию каспазы и PARP на клетках, предварительно обработанных LCL161, и затем обработанных 1 MOI VSVΔ51. На фиг. 14В представлена серия изображений, демонстрирующих микрофотографии активации каспазы, которые были получены на клетках, которые совместно обрабатывали LCL161 и VSVΔ51 в присутствии субстрата каспазы-3/7 DEVD-488. На фиг. 14С показан график, на котором нанесена доля DEVD-488-положительных клеток эксперимента. Фиг. 14В (n=12). Шкалы ошибок, среднее ± стандартное отклонение. На фиг. 14D представлена серия изображений из эксперимента, в котором апоптоз оценивали по микрофотографиям транслоцированного фосфатидилсерина (Annexin V-CF594) и потери целостности плазматической мембраны (YOYO-1) в клетках, обработанных LCL161 и VSVΔ51. На фиг. 14E представлен график, на котором показана доля Annexin V-CF594-положительных и YOYO-1-отрицательных апоптотических клеток из эксперимента на фиг. 14D (n=9). Шкалы ошибок, среднее ± стандартное отклонение. На фиг. 14F представлена пара графиков, демонстрирующих данные анализа жизнеспособности с окрашиванием Alamar blue, трансфицированных нецелевой (NT) миРНК или миРНК, нацеливающейся на каспазу-8 или RIP1, и затем обработанных LCL161 и 0,1 MOI VSVΔ51 (n=3). Шкалы ошибок, среднее ± стандартное отклонение. На фиг. 14G представлено изображение иммуноблота, демонстрирующее характерную эффективность миРНК

для эксперимента на фиг. 14F.

На фиг. 15A и 15B представлен набор графиков, демонстрирующих, что экспрессия трансгена TNF α из OV усиливает SMC-опосредованную смерть злокачественных клеток. На фиг. 15A представлена пара графиков, демонстрирующих жизнеспособность клеток в анализе Alamar, одновременно обработанных 5 мкМ SMC и повышающимися количествами MOI VSV-51-GFP или VSV Δ 51-TNF α в течение 24 ч. Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение На фиг. 15B показан график, демонстрирующий характерные сдвиги EC50 из эксперимента на фиг. 15A. Дозу, необходимую для получения 50% жизнеспособных клеток в присутствии в SMC по сравнению с носителем, определяли с использованием нелинейной регрессии и отображали как сдвиг log EC50. Показаны характерные данные трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов (n=3).

На фиг. 16 представлен набор изображений, демонстрирующих, что инфицирование онколитическим вирусом приводит к усилению экспрессии TNF α при лечении SMC. Клетки EMT6 обрабатывали 5 мкМ SMC и 0,1 MOI VSV Δ 51-GFP в течение 24 ч, и клетки проявляли на наличие внутриклеточного TNF α с помощью проточной цитометрии. Изображения показывают характерные данные четырех независимых экспериментов.

На фиг. 17A-17C представлена пара графиков и изображение, демонстрирующие, что сигнальный путь TNF α требуется для индуцированного IFN типа I синергизма вместе с обработкой SMC. На всех панелях на фиг. 17 показаны данные по меньшей мере трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов (n=3). На фиг. 17A представлен график, демонстрирующий результаты жизнеспособности клеток EMT6 в анализе Alamar blur, трансфицированных нецелевой (NT) миРНК или миРНК TNF-R1, и затем обработанных LCL161 и VSV Δ 51 (0,1 MOI) или IFN β . Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение На фиг. 17B представлена характерная эффективность миРНК из эксперимента на фиг. 17A. На фиг. 17C представлен график, демонстрирующий жизнеспособность клеток EMT6, которые были предварительно обработаны нейтрализующими TNF α антителами и затем обработаны 5 мкМ SMC и VSV Δ 51 или IFN β .

На фиг. 18A и 18B схематически показан OV-индуцированный IFN типа I и SMC синергизм при гибели клеток рака простаты. На фиг. 18A схематически показано, что вирусная инфекция в не подающихся лечению злокачественных клетках приводит к продукции IFN типа I, который затем индуцирует экспрессию IFN-стимулированных генов, таких как TRAIL. Стимуляция IFN типа I также приводит к NF- κ B-зависимой продукции TNF α . Антагонизм IAP при обработке SMC приводит к активации экспрессии TNF α и TRAIL и к апоптозу соседних опухолевых клеток. На фиг. 18B схематически показано, что инфицирование одной опухолевой клетки приводит к активации врожденного противовирусного пути IFN типа I, что приводит к секреции IFN типа I соседними клетками. Соседние клетки также продуцируют провоспалительные цитокины TNF α и TRAIL. Однократно инфицированная клетка подвергается онколизису, а остальная часть опухолевой массы остается нетронутой. С другой стороны, соседние клетки подвергаются неспецифической гибели при обработке SMC в результате SMC-опосредованной активации TNF α /TRAIL и усилению апоптоза при активации провоспалительных цитокинов.

На фиг. 19A и 19B представлен график и блот, демонстрирующие, что обработка SMC вызывает минимальную временную потерю массы и приводит к ингибированию cIAP1/2. На фиг. 19A показан график, демонстрирующий массу мышей BALB/c, обработанных LCL161 (50 мг/кг LCL161, перорально), которые были зарегистрированы после однократного лечения (день 0). n=5 на группу. Шкала ошибок, среднее \pm стандартная ошибка среднего На фиг. 19B представлен блот образцов из эксперимента, в котором мышей с опухолью EMT6 обрабатывали 50 мг/кг LCL161 (перорально). Опухоли собирали в указанное время для проведения вестерн-блоттинга с использованием указанных антител.

На фиг. 20A-20C представлен набор графиков, демонстрирующих, что обработка SMC вызывает временную потерю веса на сингенной мышшиной модели злокачественного новообразования. На фиг. 20A-20C представлены графики, демонстрирующие измерение веса мыши при одновременной обработке SMC и онколитическим VSV (фиг. 20A), poly(C) (фиг. 20B) или CpG (фиг. 20C) у животных с опухолью из экспериментов, изображенных на фиг. 4A, 5B и 5D, соответственно. Шкала ошибок, среднее \pm стандартная ошибка среднего.

На фиг. 21A-21D представлена серия графиков, демонстрирующих, что VSV Δ 51-индуцированная гибель клеток в клетке HT-29 усиливается при обработке SMC *in vitro* и *in vivo*. На фиг. 21A представлен график, демонстрирующий данные из эксперимента, в котором клетки инфицировали VSV Δ 51, на супернатант клеточной культуры воздействовали ультрафиолетовым излучением в течение 1 ч и наносят на новые клетки в указанной дозе в присутствии LCL161. Жизнеспособность устанавливали в анализе Alamar blue. Шкала ошибок, среднее \pm стандартное отклонение На фиг. 21B представлен график, демонстрирующий жизнеспособность клеток в анализе Alamar blue, обработанных одновременно LCL161 и не распространяющимся вирусом VSV Δ 51 Δ G (0,1 MOI). Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение На фиг. 21A и 21B показаны характерные данные трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов (n=3). На фиг. 21C представлена пара графиков, демонстрирующих данные экс-

перимента, в котором голые мышцы CD-1 с укоренившимися опухолями HT-29 обрабатывали 50 мг/кг LCL161 (перорально) и 1×10^8 PFU VSV Δ 51 (в.о.). Носитель, n=5; VSV Δ 51, n=6; SMC, n=6; VSV Δ 51+SMC, n=7. На левой панели изображен рост опухоли относительно 0-го дня после обработки. На правой панели представлена кривая Каплана-Мейера, изображающая выживание мышей. Шкала ошибок, среднее \pm стандартная ошибка среднего Множественное сравнение лог-рангового критерия и критерия Холма-Сайдака: ***, p<0,001. На фиг. 21D представляет собой график, демонстрирующий вес мышцы при совместном лечении SMC и OV у животных с опухолью. Шкала ошибок, среднее \pm стандартная ошибка среднего.

На фиг. 22 представлен блот, на котором показано, что для синергетической активности SMC и OV *in vivo* требуется сигнальный путь IFN типа I. Мыши с опухолью EMT6 вводили носитель или 50 мг/кг LCL161 в течение 4 ч, и затем вводили нейтрализующим IFNAR1 или изотипами антител в течение 20 ч. Затем животным вводили PBS или VSV Δ 51 в течение 18 ч. Опухоли анализировали Вестерн-блоттингом с указанными антителами.

На фиг. 23А и 23В представлена пара графиков, показывающих, что онколитическая инфекция клеток врожденного иммунитета приводит к гибели злокачественных клеток в присутствии SMC. На фиг. 23А представлен график, на котором показаны данные эксперимента, в котором иммунные субпопуляции сортировали из спленоцитов (CD11b+ F4/80+: макрофаг; CD11b+ Gr1+: нейтрофил; CD11b- CD49b+: NK-клетка, CD11b- CD49b-: Т- и В-клетки) и инфицировали 1 MOI VSV Δ 51 в течение 24 ч. Супернатанты клеточной культуры наносили на SMC-обработанные клетки EMT6 в течение 24 ч и жизнеспособность EMT6 оценивали с помощью Alamar Blue. Шкала ошибок, среднее \pm стандартное отклонение На фиг. 23В представлена диаграмма, на которой показаны данные эксперимента, в котором макрофаги, полученные из костного мозга, инфицировали VSV Δ 51, и супернатант наносили на клетки EMT6 в присутствии 5 мкМ SMC, и жизнеспособность измеряли с помощью Alamar Blue. Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение

На фиг. 24А-24Н представлена серия изображений полноразмерных иммуноблотов. Иммуноблоты на фиг. 24А-24Н относятся к (а) фиг. 2Е, (b) фиг. 4Е, (с) фиг. 10В, (d) фиг. 13, (е) фиг. 14А, (е) фиг. 14G, (g) фиг. 19 и (h) фиг. 17, соответственно.

На фиг. 25А и 25В представлен набор графиков, на которых показано, что нереплицируемые частицы, полученные из рабдовируса (NRRP), обладают синергетической активностью вместе SMC вызывать гибель злокачественных клеток. На фиг. 25А представлен набор графиков, на которых показаны данные эксперимента, в котором злокачественные клетки EMT6, DBT и СТ-2А вместе обрабатывали SMC LCL161 (SMC, EMT6: 5 мкМ, DBT и СТ-2А: 15 мкМ) и различными количествами NRRP в течение 48 ч (EMT6) или в течение 72 ч (DBT, СТ-2А) и жизнеспособность клеток оценивали с помощью Alamar Blue. На фиг. 25В представлена пара графиков, на которых показаны данные эксперимента, в котором не фракционированные спленоциты мыши инкубировали с 1 частицей на клетку NRRP или 250 мкМ CpG ODN 2216 в течение 24 ч. Затем супернатант наносили на клетки EMT6 дозозависимым образом и добавляли 5 мкМ LCL161. Жизнеспособность EMT6 оценивали через 48 ч после обработки с помощью Alamar blue.

На фиг. 26А и 26В представлен график и набор изображений, на которых показано, что вакцины обладают синергетической активностью вместе с SMC вызывать гибель злокачественных клеток. На фиг. 26А представлен график, на котором показаны данные эксперимента, в котором клетки EMT6 обрабатывали носителем или 5 мкМ LCL161 (SMC) и 1000 КОЕ/мл BCG или 1 нг/мл TNF α в течение 48 ч, и жизнеспособность оценивали с помощью Alamar blue. На фиг. 26В представлен набор характерных изображений IVIS, на которых показана выживаемость мышей с опухолью жировой ткани молочной железы (EMT6-Fluc), которые дважды получали носитель или 50 мг/кг LCL161 (SMC) и PBS, внутриопухолевое введение (в.о.), BCG (1×10^5 CFU), или BCG (1×10^5 CFU), внутрибрюшинное введение (в.б.) и проводили визуализацию биолюминесценцией в реальном времени с помощью камеры IVIS CCD в различные моменты времени. Масштаб: p/сек/см²/sg.

На фиг. 27А и 26В представлена пара графиков и набор изображений, на которых показано, что SMC обладает синергетической активностью вместе с IFN типа I вызывать регрессию опухоли молочной железы. На фиг. 27А представлена пара графиков, на которых показаны данные эксперимента, в котором мышам вводили опухоли EMT6-Fluc в жировую ткань молочной железы и их обрабатывали в течение восьми дней после имплантации комбинациями носителя или 50 мг/кг LCL161 (SMC), перорально, и бычьего сывороточного альбумина (BSA), 1 мкг IFN α , внутрибрюшинно (в.б.) или 2 мкг IFN α , внутриматочно (в.м.). На левой панели показан рост опухоли. На правой панели представлена кривая Каплана-Мейера, изображающая выживание мышей. Шкала ошибок, среднее \pm стандартная ошибка среднего На фиг. 27В представляет собой серию характерных изображений IVIS из эксперимента, описанного на фиг. 27А. Масштаб: p/сек/см²/sg.

На фиг. 28А-28С представляют собой графики, на которых показано, что VSV-IFN β или VSV обладают синергетической активностью вместе с SMC вызывать гибель злокачественных клеток. На фиг. 28А показаны данные эксперимента, в котором клетки EMT6 совместно обрабатывали носителем или 5 мкМ

LCL161 (SMC) и различными количествами множественности инфекции (MOI) VSVΔ51-GFP, VSV-IFNβ или VSV-NIS-IFNβ. Жизнеспособность клеток оценивали через 48 ч после обработки с помощью Alamar blue. На фиг. 28B представлена пара графиков, на которых мышам с опухолью молочной железы EMT6 дважды вводили носитель или 50 мг/кг LCL161 (SMC), перорально, и PBS или 1×10^8 PFU VSV-IFNβ-NIS, внутримышечно. На фиг. 28C представлена пара графиков, на которых мышам с опухолью EMT6, дважды вводили носитель или 50 мг/кг LCL161, перорально, и 1×10^8 PFU VSV, внутримышечно.

На фиг. 29 представлен график, на котором показано, что невирусные и вирусные триггеры индуцируют активную экспрессию TNFα *in vivo*. Мышам вводили 50 мг poly(:C), внутрибрюшинно или с помощью внутривенных инъекций 5×10^8 PFU VSVΔ51, VSV-mIFNβ или Maraba-MG1. В указанные моменты сыворотку выделяли и анализировали с помощью ELISA для количественного определения уровней TNFα.

На фиг. 30A-30C показан набор графиков и изображения, на которых показано, что вирулентно-экспрессируемые провоспалительные цитокины обладают синергетической активностью вместе с SMC индуцировать регрессию опухоли молочной железы. На фиг. 30A представлена пара графиков, на которых показаны данные эксперимента, в котором мышам вводили в жировую ткань молочной железы опухоль EMT6-Fluc и в течение семи дней после имплантации вводили комбинации носителя или 50 мг/кг LCL161 (SMC), перорально, и PBS, 1×10^8 PFU VSVΔ51-memTNFα (в.в.) или 1×10^8 PFU VSVΔ51-solTNFα (в. в.). На левой панели показан рост опухоли. На правой панели представлена кривая Каплана-Мейера, изображающая выживание мышей. Шкала ошибок, среднее ± стандартная ошибка среднего. На фиг. 30B представлен набор характерных биолюминисцентных изображений IVIS, которые были получены из эксперимента, описанного на фиг. 30A. Масштаб: p/сек/см²/sr. На фиг. 30C представлена пара графиков, на которых показаны данные из эксперимента, в котором мышам вводили опухоль CT-26, подкожно, и через 10 дней после имплантации вводили комбинации носителя или 50 мг/кг LCL161, перорально, и либо PBS, либо 1×10^8 PFU VSVΔ51-solTNFα, внутриопухолевое введение. На левой панели показан рост опухоли. На правой панели представлена кривая Каплана-Мейера, изображающая выживание мышей. Шкала ошибок, среднее ± стандартная ошибка среднего.

На фиг. 31A и 31B представлен набор изображений, на которых показано, что введение SMC приводит к ингибированию белка cIAP1/2 *in vivo* на ортотопической сингенной мышшиной модели глиобластомы. На фиг. 31A представлено изображение, на котором показан иммуноблот из эксперимента, в котором клетки CT-2A имплантировали внутричерепным введением и вводили 50 мг/кг, перорально, LCL161 (SMC), и опухоль иссекали в указанные моменты времени и анализировали вестерн-блоттингом с помощью антител против cIAP1/2, XIAP и β-тубулина. На фиг. 31B представлено изображение, на котором показан иммуноблотт из эксперимента, в котором клетки CT-2A имплантировали внутричерепным введением и вводили 10 мкл 100 мкМ LCL161, внутриматочно, и опухоли иссекали в указанные моменты времени и готовили для вестерн-блоттинга, используя антитела против cIAP1/2, XIAP и β-тубулина.

На фиг. 32A-32E представлен набор графиков и изображений, на которых показано, что временный провоспалительный ответ в мозге обладает синергетической активностью вместе с SMC вызывать гибель глиобластомы. На фиг. 32A показан график, на котором представлены данные из эксперимента, в котором проводили ELISA для определения уровней растворимого TNFα из 300 мг сырого экстракта белка головного мозга, который получали у мышей, которым вводили внутривенную (в.в.) инъекцию PBS или 50 мг poly(:C) в течение 12 или 24 ч. Экстракты головного мозга получали путем механической гомогенизации в физиологическом растворе. На фиг. 32B представлен график, на котором показаны данные анализов жизнеспособности по Alamar blue клеток глиобластомы мыши (CT-2A, K1580), которые обрабатывали 70 мг сырого гомогената головного мозга и 5 мкМ LCL161 (SMC) в культуре в течение 48 ч. Гомогенаты головного мозга получали у мышей, которым в течение 12 ч вводили в.б. инъекции poly(:C) или внутривенные инъекции 5×10^8 PFU VSVΔ51 или VSV-mIFNβ. На фиг. 32C представлена кривая Каплана-Мейера, на которой изображена выживаемость мышей, которые получали три внутричерепные инъекции поли (I:C) 50 мг. Введение проводили на 0, 3 и 7 день. На фиг. 32D представлена кривая Каплана-Мейера, на которой показана выживаемость мышей с внутричерепными опухолями CT-2A, которые получали комбинации SMC, VSVΔ51 или poly(:C). Мыши получали комбинации трех введений носителя, трех введений 75 мг/кг LCL161 (перорально), трех введений 5×10^8 PFU VSVΔ51 (iv) или двух введений 50 мг поли (I:C) (внутричерепное введение, в.ч.). Мышей обрабатывали на 7-й, 10-й и 14-й день после имплантации опухолевых клеток при различных условиях, за исключением группы, которой вводили poly(:C), которая получала в.ч. инъекции на 7-й и 15-й день. Цифры в скобках обозначают число мышей на группу. На фиг. 32E представлена серия характерных изображений МРТ черепов мышей из экспериментов, изображенных на фиг. 32D, где показано животное на конечной точке и типичную мышшь из указанных групп на 50 день после имплантации. Пунктирная линия обозначает опухоль головного мозга.

На фиг. 33 представлен график, на котором показано, что SMC обладает синергетической активностью с IFN типа I уничтожать опухоли головного мозга. На графике представлена кривая Каплана-Мейера, на которой показана выживаемость мышей с CT-2A, которые получали внутричерепные инъек-

ции носителя или 100 мкМ LCL161 (SMC) с PBS или 1 мкг IFN α через 7 дней после имплантации.

На фиг. 34 представлена общая схема сигнального пути NF- κ B. При взаимодействии лиганда с рецептором семейства TNF, либо классический, либо альтернативный путь активируется в зависимости от активности cIAP1/2. В классическом пути активации NF- κ B RIP1 получает K63-убиквитиновые связи от cIAP1/2 с образованием сигнального комплекса, что обеспечивает фосфорилирование ингибитора κ B (I κ B) после активации I κ B-индазы (IKK). Фосфорилированный I κ B разрушается, освобождая гетеродимер p50/p65. Альтернативный путь остается неактивным из-за cIAP1/2 K48, связанного с убиквитинированием NF- κ B-индуцирующей киназы (NIK). Если NIK является стабильным, то обеспечивает фосфорилирование IKK и в дальнейшем p100, что приводит к преобразованию p100 в p52. Путь завершается гетеродимерами NF- κ B, транслоцирующими в ядро и действующими как факторы транскрипции для регуляции экспрессии генов-мишеней.

На фиг. 35A-35C описан процесс объединения SMC с моноклональными антителами против PD-1, задерживающими прогрессирование заболевания и увеличивающими выживаемости в мышине MM-модели. На фиг. 35A показаны изображения мышей с клетками Fluc MPC-11, которым вводили 250 мкг ICI и 50 мг/кг три раза в неделю в течение двух недель. Мышам вводили SMC и моноклональные антитела против PD-1 или CTLA-4. Мыши, которым вводили комбинации анти-PD-1 и SMC, практически не показывали опухолевую нагрузку, как определяли по биолюминесцентным изображениям IVIS опухолевой нагрузки в последующие дни после имплантации клеток. На фиг. 35B показан режим лечения с анти-PD-1, анти-CTLA-4 и SMC. На фиг. 35C представлен график, на котором показано количество дней, в течение которых мыши выживали после имплантации клеток Fluc MPC-11, как указано на кривой Каплана-Мейера.

На фиг. 36A-36C представлена серия графиков, на которых показано, что стимуляторы врожденного иммунитета обладают синергетической активностью с SMC вызвать смерть клеток MM. На фиг. 36A представлена серия гистограмм, на которых показана жизнеспособность клеточных линий U266, MM1R и MM1S человека, которые обрабатывали 1 Ед/мл IFN α , IFN β и IFN γ в присутствии либо носителя, либо 5 мкМ SMC. Жизнеспособность определяли по отсутствию трипанового синего через 24 ч. На фиг. 36B и 36C представлены графики, на которых показана жизнеспособность клеточной линии MM мыши MPC-11, которую обрабатывали 5 мкМ SMC и различным количеством множественности инфекций (MOI) VSVD51 и VSVmIFN, соответственно. Жизнеспособность оценивали через 24 ч с помощью Alamar Blue.

На фиг. 37A-37C показано, что IFN и SMC обладают синергетической активностью замедлять прогрессирование заболевания MM у мышей. Мышам, несущим клетки Fluc MPC-11, вводили 1 мкг рекомбинантного IFN α и 50 мг/кг SMC 3 раза. На фиг. 37A представлена серия биолюминесцентных изображений IVIS опухоли, взятой в указанные дни после имплантации клеток MM. На фиг. 37B представлена кривая Каплана-Мейера, показывающая время выживания. На фиг. 37C представлена схема, демонстрирующая режим лечения.

На фиг. 38A-38C показано, что онколитический вирус может задерживать прогрессирование заболевания MM и увеличить выживаемость. На фиг. 38A представляет собой биолюминесцентные изображения IVIS, полученные в указанные дни после имплантации мышей, несущих клетки Fluc MPC-11, которые обрабатывали 4 раза 5×10^8 pfu VSVD51 и 50 мг/кг SMC. На фиг. 38B представлена кривая Каплана-Мейера, показывающая время выживания. На фиг. 38C показан режим лечения.

На фиг. 39A-39C показано, что лиганды глюкокортикоидных рецепторов обладают синергетической активностью с SMC сенсibilизировать устойчивые клеточные линии и опосредовать SMC клеточную гибель. На фиг. 39A приведена схема, на которой показано, что белок был экстрагирован из клеток MM1R и MM1S для вестерн-блоттинга, использовали равные количества белка. На фиг. 39B и 39C представлены графики, на которых показано, что клетки обрабатывали 5 мкМ SMC, 10 мкМ Dex и 10 мкМ RU486 в указанные моменты времени, и мертвые клетки определяли как YOYO-1 позитивные, непроницаемым для клеточной мембраны ДНК-связывающий красителем, и нормировали до конфлюентности клеток внутри лунки.

На фиг. 40A-40C показано, что SMC усиливает сигнальный путь NF- κ B и вызывает апоптоз. MM-клеточные линии человека, MM1R и MM1S, обрабатывали 5 мкМ SMC, затем собирали через 1, 16 или 48 ч. На фиг. 40A показаны вестерн-блоты для различных компонентов пути NF- κ B. На фиг. 40B и 40C показана количественные показатели полос фиг. 40A, выраженные как отношения p-p65 к p65 и p52:p100, соответственно, которые были нормализованы до необработанного контроля.

На фиг. 41 показано, что комбинированная обработка SMC и IFN β повышает активность NF- κ B и вызывает апоптоз. Линии клеток человека U266, MM1R и MM1S и линия клеток мыши MPC-11 и подлинная с тагом Fluc подвергались обработке 5 мкМ SMC и 1 Ед/мл IFN β в течение 1 или 16 ч. Клеточные осадки собирали, и лизаты загружали в одинаковом количестве для проведения вестерн-блоттинга.

На фиг. 42A-42C показано, что онколитический вирус в сочетании с SMC активирует передачу сигналов NF- κ B, приводит к апоптозу клеток MM мыши. Клетки MPC-11 обрабатывали VSVD51 или VSVmIFN в течение 1, 12 или 24 ч. На фиг. 42A представлен вестерн-блоттинг, на котором показано, что

клеточные осадки собирали, и лизаты загружали в одинаковом количестве для проведения вестерн-блоттинга. На фиг. 42В и 42С показаны уровни белка, количественно определенные из полос на фиг. 42А и выраженные как соотношения фосфо-p65 к p65, или p52 к p100, соответственно.

На фиг. 43 показано, что экспрессия PD-L1 и PD-L2 повышается в линиях клеток ММ человека после обработки IFN β . Экспрессия мРНК PD-L1 и PD-L2 повышается в течение 6, 12 и 24 ч после обработки IFN β или IFN β вместе с SMC по сравнению с контролем без обработки.

На фиг. 44А-44D представлены графики, на которых показано, что комбинация SMC и иммуномодулирующих агентов приводит к гибели злокачественных клеток, к которым также относятся CD8⁺ Т-клетки. На фиг. 44А и 44В представлены графики, на которых показаны данные эксперимента, в котором излеченным после двойной обработки мышам проводили повторную инъекцию в жировой слой молочной железы клеток ЕМТ6 (через 180 дней после исходной постимплантационной даты) или делали внутривенную инъекцию клеток СТ-2А (через 190 дней после исходной постимплантационной даты). На фиг. 44С показан график, на котором продемонстрированы данные эксперимента, в котором клетки СТ-2А глиомы или клетки ЕМТ6 рака молочной железы трипсинизировали, поверхностно окрашивали конъюгированным контролем с изотипом IgG или анти-PD-L1 и подвергали проточной цитометрии. На фиг. 44D представлен график, на котором приведены данные эксперимента, в котором CD8⁺ Т-клетки отделяли от спленоцитов (от наивных мышшиных или от мышей, у которых ранее была излечена опухоль ЕМТ6), используя набор для позитивной магнитной селекции CD8 Т-клеток, и на них проводили анализ ELISpot для обнаружения IFN γ и Гранзима В. CD8⁺ Т-клетки совместно культивировали со средой или злокачественными клетками (соотношение злокачественных клеток к CD8⁺ Т-клеткам равно 12:1) и 10 мг контрольного IgG или анти-PD-1 в течение 48 ч. Три мыши использовали в качестве независимых биологических репликатов (ранее у них была излечена опухоль ЕМТ6). Клетки 4Т1 служат отрицательным контролем, поскольку клетки 4Т1 и ЕМТ6 несут одинаковые антигены главного комплекса гистосовместимости.

На фиг. 45А-45D представлены графики, показывающие, что SMC и ингибиторы иммунных контрольных пунктов обладают синергизмом на моделях ортотопической мыши со злокачественной опухолью. На фиг. 45А представлен график, на котором показаны данные эксперимента, в котором мышам с опухолью молочной железы ЕМТ6 однократно внутримышечно вводили PBS или 1×10^8 PFU VSVD51, а через пять дней мышам вводили комбинации носителя или 50 мг/кг LCL161 (SMC), перорально, и 250 мг анти-PD, внутривенно (в.б.). На фиг. 45В и 45С представлены графики, на которых показаны данные эксперимента, в котором мышам с внутривенными опухолями СТ-2А или GL261, вводили четыре раза носитель или 75 мг/кг LCL161 (перорально) и 250 мг (в.б.) контрольный IgG, анти-PD-1 или анти-CTLA-4. На фиг. 45D представлен график, на котором показаны данные эксперимента, в котором атимичным "голым" мышам CD-1 с внутривенной опухолью СТ-2А, вводили 75 мг/кг LCL161 (перорально) и 250 мг (в.б.) анти-PD-1.

На фиг. 46А-46С показаны графики, демонстрирующие, что SMC вызывает гибель клеток глиобластомы в присутствии цитокинов или онколитических вирусов. Оценка жизнеспособности в анализе Alamar blue клеток человека (M059K, SNB75, U118) и мышей (СТ-2А, GL261) глиобластомы, обработанных носителем или 5 мкМ LCL161 (SMC) и 0,1 нг·мл⁻¹ TNF- α или 0,01 MOI VSVA51 в течение 48 ч (фиг. 46А). Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение n=4. Указанные линии первичных клеток мыши NF1-/+p53-/+ обрабатывали носителем или 5 мкМ LCL161 (SMC) и 0,01% BSA, 1 нг·мл⁻¹ TNF- α или указанным количеством MOI нераспространяющегося варианта VSVA51 (VSVA51 Δ G) в течение 48 ч, и жизнеспособность оценивали в анализе Alamar blue (фиг. 46В). Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение n=4. Оценка жизнеспособности в анализе Alamar blue опухоль-иницирующих клеток (BTIC), обработанных носителем или 5 мкМ LCL161 и 0,001 MOI VSVA51 или Maraba-MG1 в течение 48 ч (фиг. 46С). Шкалы ошибок, среднее, стандартное отклонение n=3. На фиг. 46А и 46В представлены характерные данные трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов. Статистическую значимость сравнивали с обработкой носителем и BSA, используя ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. На значимость указывали, если p<0,0001 (*).

На фиг. 47 представлен график, на котором показано, что SMC и TNF- α эффективно синергируют и индуцируют гибель клеток глиобластомы. Жизнеспособность клеток глиобластомы мыши СТ-2А для обработки 0,01% BSA или 0,1 нг·мл⁻¹ TNF- α и носителем или 5 мкМ указанного мономерного или димерного варианта в течение 48 ч. Жизнеспособность оценивали в анализе Alamar blue. Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение n=4. Показаны характерные данные двух независимых экспериментов с использованием биологических повторов. Статистическую значимость сравнивали с обработкой носителем и BSA, используя ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. На значимость указывали, если p<0,0001 (*).

На фиг. 48А и 48В показана серия графиков и изображение, на котором продемонстрировано, что резистентность к комбинациям на основе SMK в клетках глиобластомы вызвана ингибированием cFLIP. Первичные клетки глиобластомы мыши NF1-/+p53-/+ (K5001) или человека (SF539) или нетрансформированные клетки человека (GM38) трансфицировали нецелевой (NT) дцРНК или дцРНК cFLIP в течение 48

ч и затем обрабатывали в течение 48 ч носителем или 5 мкМ LCL161 (SMC) и BSA, 0,1 нг·мл⁻¹ TNF- α или указанным MOI нераспространяющегося варианта VSV Δ 51 (VSV Δ 51 Δ G, фиг. 48А). Жизнеспособность определяли в анализе Alamar blue. Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение n=4. Показаны характерные данные трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов. Статистическую значимость сравнивали с обработкой носителем и BSA, используя ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. На значимость указывали, если p<0,0001 (*). Эффективность NT дцРНК или дцРНК, нацеленной на cFLIP, эксперимента на (фиг. 48В).

На фиг. 49А и 49В показаны изображения, которые демонстрируют получение сингенной ортопической модели мыши с глиобластомой. Показаны МРТ (фиг. 49А) и "зернистые" (фиг. 49В) изображения мыши C57BL/6, которым осуществляли внутрочерепную инъекцию PBS или 5 \times 10⁴ клеток СТ-2А и которых умерщвляли через 35 дней после имплантации. Масштабная линейка, 2 мм. Линейка имеет сантиметровое разделение с разметкой мм.

На фиг. 50А и 50В представлены графики, на которых показано, что SMC и иммуностимуляторы врожденного иммунитета обладают синергизмом в отношении лечения глиобластомы. Масштабная панель, 2 мм. Оценка жизнеспособности в анализе Alamar blue клеток СТ-2А, обработанных носителем или 5 мкМ LCL161 и 0,01% BSA или 1 мкг мл⁻¹ IFN- α B/D. Шкала ошибок, средние значения, стандартное отклонение n=4 (фиг. 50А). Мышами с 7-и дневными внутрочерепными опухолями СТ-2А вводили комбинации 75 мг кг⁻¹ LCL161 (перорально) и BSA или 1 мкг IFN- α B/D (в.б.; фиг. 50В). На фиг. 50В показаны данные, представляющие кривую Каплана-Мейера, изображающую выживаемость мышей. Множественное сравнение лог-рангового критерия и критерия Холма-Сайдака: **, p<0,01; ***, p<0,001. Числа в круглых скобках представляют количество мышей на группу.

На фиг. 51 показано изображение, на котором продемонстрировано, что обработка SMC не вызывает ингибирование IAP в ткани головного мозга мышей с опухолью. Мышам вводили 75 мг кг⁻¹ LCL161 (SMC) в течение указанного времени, и ткани анализировали вестерн-блоттингом, используя указанные антитела. n=2 для каждой временной точки.

На фиг. 52А-52С показаны графики, демонстрирующие, что комбинированная обработка на основе SMC приводит к долговременной иммунологической противоопухолевой памяти. Клетки СТ-2А обрабатывали в течение 24 ч носителем или 5 мкМ LCL161 (SMC) и 0,01% BSA, 1 нг·мл⁻¹ TNF-альфа, 250 Ед мл⁻¹ TNF- α или 0,1 MOI VSV Δ 51, и жизнеспособные клетки (Zombie Green negative) анализировали с помощью проточной цитометрии, используя указанные антитела (фиг. 52А). Показаны характерные данные трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов. Наивным мышам или мышам, ранее излеченным с помощью основанной на SMC обработки жировой ткани молочной железы EMT6 (карцинома молочной железы, фиг. 52В) или внутрочерепной СТ-2А (глиобластома, фиг. 52С), повторно вводили клетки EMT6 или клетки карциномы молочной железы в жировой слой молочной железы или клетки СТ-2А, подкожно (п.к.) или внутрочерепным введением (в.ч.). Клетки имплантировали на 180 дней после имплантации. Данные представляют собой кривую Каплана-Мейера, изображающую выживание мышей. Множественное сравнение лог-рангового критерия и критерия Холма-Сайдака (в сравнении со способом имплантации): **, p<0,01; ***, p<0,001. Числа в круглых скобках представляют количество мышей на группу.

На фиг. 53 представлен график, на котором показано, что обработка SMC не прекращает экспрессию ингибиторных молекул контрольной точки или белков MHC I/II. Клетки SNB72 обрабатывали в течение 24 ч носителем или 5 мкМ LCL161 (SMC) и 1 нг·мл⁻¹ TNF-альфа, 250 Ед мл⁻¹ TNF- α или 0,1 MOI VSV Δ 51, и жизнеспособные клетки (Zombie Green negative) анализировали проточной цитометрией, используя указанные антитела. Показаны характерные данные трех независимых экспериментов.

На фиг. 54А-54Г представлены графики, на которых показано, что SMC и антитела, нацеленные на иммунные контрольные точки, обладают синергизмом на модели глиобластомы мыши. CD8⁺ Т-клетки селезенки выделяли из наивных мышей или из мышей, которые ранее были излечены от опухолей СТ-2А, и подвергали анализу ELISpot для детекции IFN- γ и GrzB. Злокачественные клетки (СТ-2А, LLC) культивировали совместно с клетками CD8⁺ (соотношение 25:1) и 10 мкг мл⁻¹ контрольного IgG или α -PD-1 в течение 48 ч. n=4 мышей на группу (фиг. 55А). Значимость сравнивали с наивными CD8⁺ Т-клетками, которые совместно инкубировали с клетками СТ-2А, как было оценено с помощью ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. *, p<0,05; *, p<0,01; ***, p<0,001. Мыши, несущие внутрочерепные опухоли СТ-2А, обрабатывали 75 мг/кг LCL161 перорально (SMC) на 14, 16, 21 и 23 день после имплантации (фиг. 54В). Жизнеспособные клетки опухолевой массы анализировали проточной цитометрией для детекции CD45 (BV605), CD3 (APC-Cy7), CD8 (PE) и PD-1 (BV421). Статистическое значение для каждой пары оценивали по t-тесту. *, p<0,05; **, p<0,01 (фиг. 54С). Показаны жизнеспособные опухолевые клетки из эксперимента (проанализированы проточной цитометрией, используя антитела CD45 (PE) и PD-L1 (BV421), фиг. 54С). n=6 мышей на группу. FMO, флуоресценция минус один. Статистическую значимость оценивали с помощью t-теста. Мыши с внутрочерепными СТ-2А (фиг. 54D, 54F и 54G) или GL261 (фиг. 54E), получали в указанные моменты комбинации носителя, 75 мг кг⁻¹ LCL161, перорально (фиг. 54D, 54E и 54G) или носителя или 30 мг кг⁻¹ Биринант, внутривенно

(в.б., фиг. 54F) и 250 мкг IgG, α -PD-1 или α -CTLA4 (в.б.) или обе эти комбинации (фиг. 54G). Данные представляют собой кривую Каплана-Мейера, изображающую выживание мышей. Множественное сравнение лог-рангового критерия и критерия Холма-Сайдака: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Числа в круглых скобках представляют количество мышей на группу. На фиг. 54A-54C, кресты указывают среднее, сплошная горизонтальная линия изображает среднее, прямоугольник изображает от 25-го до 75-го перцентиля, а линии указывают минимальный диапазон значений. На фиг. 54D показаны характерные данные двух независимых экспериментов.

На фиг. 55 представлена серия графиков, на которых продемонстрировано, что обработка SMC приводит к активации PD-1 в CD8 Т-клетках. Мышам с внутрочерепными опухолями СТ-2А перорально вводили 75 мг/кг LCL161 (SMC) на 14, 16, 21 и 23 день после имплантации (фиг. 54B). Жизнеспособные клетки опухолей СТ-2А обрабатывали проточной цитометрией, используя антитела CD45 (BV605), CD3 (APC-Cy7), CD8 (PE) и PD-1 (BV421).

На фиг. 56A и 56B показаны графики, демонстрирующие, что SMC и ингибиторы иммунной контрольной точки обладают синергизмом лечения на модели множественной миеломы мыши. Клетки MPC-11 обрабатывали носителем или 5 мкМ LCL161 (SMC) и 0,1 нг·мл⁻¹ TNF-альфа, 250 Ед мл⁻¹ IFN- α или 250 Ед мл⁻¹ TNF- α (фиг. 55A). Жизнеспособность определяли в анализе Alamar blue через 48 ч после обработки. Шкалы ошибок, среднее, стандартное отклонение $n=4$ Статистическую значимость сравнивали с обработкой носителем и BSA, используя ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. На значимость указывали, если $p < 0,0001$ (***)). Показаны характерные данные трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов. Клетки MPC-11 диссоциировали и анализировали проточной цитометрией с PE-Cy7-конъюгированным изотипом IgG или PD-L1 (фиг. 56B).

На фиг. 57A-57C представлены графики, демонстрирующие, что комбинация SMC и антител, нацеленных на ингибиторы иммунной контрольной точки, в модели рака молочной железы у мышей. Анализ жизнеспособности клеток EMT6, обработанных носителем или 5 мкМ LCL161 (SMC) и 0,1 нг·мл⁻¹ TNF- α , 250 Ед мл⁻¹ TNF- α или 0,1 MOI VSV Δ 51 в течение 48 ч (фиг. 57A). Шкалы ошибок, среднее \pm стандартное отклонение $n=4$ Статистическую значимость сравнивали с обработкой носителем и BSA, используя ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. На значимость указывали, если $p < 0,0001$ (***)). Показаны характерные данные трех независимых экспериментов с использованием биологических повторов. Клетки EMT6 диссоциировали и готовили для проведения проточной цитометрии с PE-Cy7-конъюгированным изотипом IgG или PD-L1 (фиг. 57B). Показаны характерные данные трех независимых экспериментов. Мышам с опухолью ~ 100 мм³ EMT6-Fluc в указанное время после имплантации вводили PBS или 5×10^8 PFU VSV Δ 51, внутримышечно, а затем носитель или 50 мг/кг LCL161 (SMC), перорально, и 250 мкг IgG или α -PD-1, внутривентриально (фиг. 57C). На левой панели показан рост опухоли. Шкала ошибок, среднее, стандартная ошибка, среднее значение. На правой панели представлена кривая Каплана-Мейера, изображающая выживание мышей. Множественное сравнение лог-рангового критерия и критерия Холма-Сайдака: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. Числа в круглых скобках представляют количество мышей на группу.

На фиг. 58A и 58B показаны графики, демонстрирующие, что SMC увеличивает иммунный ответ в присутствии клеток глиобластомы. Экспрессия указанных факторов была обнаружена с помощью ELISA на супернатантах клеточной культуры клеток СТ-2А, которые инкубировали в течение 48 ч совместно со спленоцитами, выделенными из наивных мышей или из мышей, ранее излеченных от внутрочерепных опухолей СТ-2А с помощью совместного введения SMC и анти-PD-1 (соотношение клеток СТ-2А к спленоцитам 1:20, фиг. 58A). Кресты указывают среднее, сплошная горизонтальная линия изображает среднее, прямоугольник изображает от 25-го до 75-го перцентиля, а линии указывают минимальный диапазон значений. Статистическую значимость сравнивали с наивными CD8⁺ Т-клетками, которые оценивали с помощью ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Указанные цитокины определяли с помощью ELISA из клеток СТ-2А, которые были сокультивировали вместо со спленоцитами, полученными из наивных мышей или излеченных мышей, и обрабатывали носителем или 5 мкМ LCL161 (SMC) в течение 48 ч (фиг. 58B). Кресты указывают среднее, сплошная горизонтальная линия изображает среднее, прямоугольник изображает от 25-го до 75-го перцентиля, а линии указывают минимальный диапазон значений. Статистическую значимость сравнивали для носителя и для Т-клеток, обработанных IgG, как было оценено с помощью ANOVA при многократном сравнительном тесте Dunnett. ** $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

На фиг. 59A-59E представлены изображения и графики, показывающие, что CD8⁺ Т-клетки необходимы для синергизма SMC и ингибиторов иммунной контрольной точки для лечения глиобластомы. Экспрессия указанных иммунных факторов была обнаружена с помощью ELISA на супернатантах клеточной культуры клеток СТ-2А, которые инкубировали в течение 48 ч совместно со спленоцитами, выделенными из наивных мышей или из мышей, ранее излеченных от внутрочерепных опухолей СТ-2А с помощью совместного введения SMC и анти-PD-1 (соотношение клеток СТ-2А к спленоцитам 1:20, фиг. 59A). Данные строили как карты тепла с использованием нормированного масштабирования. Карты с прямоугольниками и линиями показаны на фиг. 58A. Количественное определение указанных факторов

определяли с помощью ELISA из клеток СТ-2А, которые были культивировали вместе со спленоцитами, полученными из наивных мышей или из излеченных мышей, и обрабатывали носителем или 5 мкМ LCL161 (SMC) в течение 48 ч (фиг. 59B). Спленоциты наивных или излеченных мышей культивировали совместно с клетками СТ-2А, меченными mKate2 (СТ-2А-mKate2) в присутствии 20 мкг мл⁻¹ контрольного IgG или анти-PD1 и 5 мкМ указанного SMC (фиг. 59C). Нумерацию клеток СТ-2А-mKate2 проводили с использованием Incucyte Zoom. Кресты указывают среднее, сплошная горизонтальная линия изображает среднее, прямоугольник изображает от 25-го до 75-го перцентиля, а линии указывают минимальный диапазон значений. Значимость сравнивали с наивными спленоцитами, как оценено с помощью ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. Значимость указывали как *, если <0,0001. n=6 для наивных мышей, и n=6 для излеченных мышей. Масштабная линейка, 100 мкм. Мышам C57BL/6 с внутричерепной опухолью СТ-2А вводили в указанный день комбинации IgG (в.б.) и носителя (перорально) или α -PD-1 (в.б.) и 75 мг кг⁻¹ LCL161 (перорально) и в.б. любой из IgG, α -CD4 или α -CD8 (все антитела составляли 250 мкг, фиг. 59D). Голые мыши CD-1 с внутричерепными опухолями СТ-2А получали в указанное время комбинации носителя или 75 мг кг⁻¹ LCL161, перорально, и PBS или 250 мкг IgG или α -PD-1, внутривбрюшинно (в.б., фиг. 59E). Данные представляют собой кривую Каплана-Мейера, изображающую выживание мышей. Множественное сравнение лог-рангового критерия и критерия Холма-Сайдака: *, p<0,05; **, p<0,01. Числа в круглых скобках представляют количество мышей на группу.

На фиг. 60 показана серия графиков, на которых показано, что комбинированное лечение SMC и ингибитором иммунной контрольной точки приводит к повышению системного присутствия провоспалительных цитокинов. Сыворотку мышей анализировали мультиплексным ELISA для количественного определения указанных белков. Кресты указывают среднее, сплошная горизонтальная линия изображает среднее, прямоугольник изображает от 25-го до 75-го перцентиля, а линии указывают минимальный диапазон значений. Значимость сравнивали у мышей, которым вводили носитель и IgG, как было оценено с помощью ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. *, p<0,05. n=6 для каждой группы лечения.

На фиг. 61А-61G представлены графики, на которых показано, что введение SMC и ингибитора иммунной контрольной точки на моделях глиобластомы у мышей приводит к изменениям инфильтрации иммунными эффекторными клетками. Мыши с внутричерепными опухолями СТ-2А получали в указанное время носитель или 75 мг кг⁻¹ LCL161, перорально (SMC) и 250 мкг IgG или α -PD-1, внутривбрюшинно (фиг. 61А). Мышей умерщвляли на 27 день после имплантации. Жизнеспособные Т-клетки, выделенные из опухолей, анализировали проточной цитометрией, используя следующие антитела: CD45 (PE-Cy5), CD3 (APC), CD4 (PE-Cy7), CD8 (BV786), CD25 (BV605) и PD-1 (BV421, фиг. 61В-61Е). Жизнеспособные клетки эксперимента, описанного в (а), анализировали проточной цитометрией, используя следующие антитела: CD45 (BV605), CD11b (APC-Cy7), Gr1 (BV786), F4/80 (PE) и CD3 (APC; и фиг. 61F и 61G). Все панели: кресты указывают среднее, сплошная горизонтальная линия изображает среднее, прямоугольник изображает от 25-го до 75-го перцентиля, а линии указывают минимальный диапазон значений. Значимость сравнивали у мышей, которым вводили носитель и IgG, как было оценено с помощью ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. *, p<0,05, **, p<0,01. n=6 для каждой группы лечения.

На фиг. 62А-62G представлены графики и изображения, на которых показано, что комбинация SMC и ингибитора иммунной контрольной точки вызывает ответ провоспалительных цитокинов, и эффективность зависит от сигнального пути IFN типа I. Жизнеспособные клетки опухолей головного мозга выделяли и готовили для проведения цитометрии, используя следующие антитела: CD45 (BV605), CD3 (APC-Cy7), Cd4 (PE-Cy7), CD8 (BV786/0), IFN- γ (BV421), TNF- α (PE) and GrzB (AF647; фиг. 62А-62D). Кресты указывают среднее, сплошная горизонтальная линия изображает среднее, прямоугольник изображает от 25-го до 75-го перцентиля, а линии указывают минимальный диапазон значений. Значимость сравнивали у мышей, которым вводили носитель и IgG, как было оценено с помощью ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. *, p<0,05. n=6 для каждой группы лечения. Сыворотку мышей анализировали мультиплексным ELISA для количественного определения указанных белков (фиг. 62Е). Данные строили как карты тепла, используя нормированное масштабирование. n=6 для каждой группы лечения. Мышей обрабатывали, и внутричерепные опухоли СТ-2А подвергали количественному анализу 176 генов цитокинов и хемокинов с помощью ОТ-кПЦР (фиг. 62F). Показаны нормализованные карты тепла двух основных групп, идентифицированных с помощью иерархической кластеризации. n=4 для каждой группы лечения. Мышам с внутричерепными опухолями СТ-2А в указанный день после имплантации вводили носитель или 75 мг кг⁻¹ LCL161 (перорально) или внутривбрюшинно вместе с соответствующим контролем с изотипом IgG или 2,5 мг α -IFNAR1, 350 мкг α -IFN- γ или 250 мкг α -PD-1 (фиг. 62G). Значимость сравнивали у мышей, которым вводили носитель и IgG, как было оценено с помощью ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. *, p<0,05. Цифры в скобках обозначают число мышей на группу.

На фиг. 63 представлено изображение, показывающее, что гены провоспалительных цитокинов и хемоаттрактантных хемокинов активируются комбинированной обработкой SMC и ингибитором иммун-

ной контрольной точки. Внутричерепные опухоли СТ-2А подвергали количественному анализу 176 генов цитокинов и хемокинов с помощью ОТ-кПЦР. Показаны нормализованные карты тепла основных групп, идентифицированных с помощью иерархической кластеризации. $n=4$ для каждой группы лечения.

На фиг. 64 показана серия графиков, на которых продемонстрировано, что SMC усиливают клональное увеличение CD8+ Т-клеток в присутствии мишеневых клеток глиобластомы. Выделенные из селезенки CD8+ Т-клетки, полученные у мышей, ранее излеченных от опухолей СТ-2А, помещали на CFSE и инкубировали вместе с клетками СТ-2А (соотношение 10:1) в течение 96 ч в присутствии носителя или 5 мкМ LCL161 (SMC) или 20 мкг мл⁻¹ контрольного IgG или анти-PD1. Жизнеспособные клетки анализировали проточной цитометрией. Значимость сравнивали у мышей, которым вводили носитель и IgG, как было оценено с помощью ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. *, $p<0,05$, **, $p<0,01$. $n=6$ для каждой группы лечения.

На фиг. 65А-65С представлены графики и изображения, на которых показано, что провоспалительный цитокин TNF- α требуется для гибели клеток глиобластомы, опосредованной Т-клетками, при обработке миметиком S_{mac} и ингибитором иммунной контрольной точки. Выделенные CD8 Т-клетки, полученные из селезенки и лимфатических узлов мышей, ранее излеченных от внутричерепных опухолей СТ-2А, культивировали вместе с клетками СТ-2А в присутствии носителя или 5 мкМ LCL161 и 20 мкг мл⁻¹ изоформа IgG или α -PD-1 в течение 24 ч. Жизнеспособные Т-клетки анализировали проточной цитометрией, используя следующие антитела: CD3 (APC-Cy7), CD8 (BV711), GrzB (AF647) и TNF- α (PE; фиг. 65А). Кресты указывают среднее, сплошная горизонтальная линия изображает среднее, прямоугольник изображает от 25-го до 75-го перцентиля, а линии указывают минимальный диапазон значений. Значимость сравнивали у мышей, которым вводили носитель и IgG, как было оценено с помощью ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. *, $p<0,05$, **, $p<0,01$. $n=6$ для каждой группы лечения. CD8+ Т-клетки культивировали вместе с клетками СТ-2А, меченными тагом mKate (СТ-2А-mKate2) в течение 72 ч в присутствии носителя или 5 мкМ LCL161 и 20 мкг/мл контрольного IgG, α -PD-1 или α -TNF- α (фиг. 65В). Нумерация mKate2-позитивных клеток была получена с помощью программы Incucyte Zoom. Кресты указывают среднее, сплошная горизонтальная линия изображает среднее, прямоугольник изображает от 25-го до 75-го перцентиля, а линии указывают минимальный диапазон значений. Значимость сравнивали у мышей, которым вводили носитель и IgG, как было оценено с помощью ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. $p<0,01$; ***, $p<0,001$. $n=6$ для каждой группы лечения. Масштабная линейка, 100 мкм. Мышам с внутричерепными опухолями СТ-2А в указанный день после имплантации вводили носитель или 75 мг кг⁻¹ LCL161 (перорально) или внутривенно вместе с соответствующим контролем с изоформой IgG или 500 мкг α -PD-1 (фиг. 65С). Значимость сравнивали у мышей, которым вводили носитель и IgG, как было оценено с помощью ANOVA с множественным сравнительным тестом Dunnett. **, $p<0,01$. Числа в круглых скобках представляют количество мышей на группу.

На фиг. 66 схематично показано, что SMC являются иммунорегуляторными препаратами, которые действуют на опухолевые и иммунные клетки, чтобы уничтожить злокачественное новообразование посредством врожденной и адаптивной иммунной системы. Показана модель, изображающая единственный агент и комбинаторное иммуномодулирующее действие миметиков S_{mac} на основе результатов авторов изобретения. Эффект антагонизма IAP на этих иммунных или опухолевых клетках описан ниже: (1) SMC стимулирует продукцию цитокинов и хемокинов различных иммунных клеток, таких как макрофаги или Т-клетки, что приводит к инфильтрации иммунными клетками микроокружения опухоли. (2) обработка SMC снижает популяцию иммуносупрессивных макрофагов M2 и одновременно увеличивает провоспалительную популяцию M1. (3) SMC уменьшают количество cIAP1 и cIAP2 и повышают чувствительность опухоли к гибели под действием иммунных лигандов, таких как TNF- α или TRAIL1. Смерть опухолевых клеток ощущается иммунной системой, что приводит к праймированию цитотоксического Т-клеточного ответа (CTL). (4) SMC стимулируют сигнальный путь CD40L/CD40, представителя семейства TNF/TNFR, на антигенпредставляющих клетках (APC) для ускорения дифференцировки и созревания дендритных клеток (DC) и макрофагов. APC презентуют опухолевые антигены иммунной системе и затем высвобождают цитотоксические воспалительные цитокины. (5) В результате деградации cIAP1 и cIAP2 под действием обработки SMC, SMC активируют альтернативный путь NF- κ B, снимая потребность в лиганде суперсемейства TNF (например, 4-1BB) и, следовательно, давая косимуляторный Т-клеточный сигнал, (6) Было показано, что SMC повышают гибель клеток, опосредованную CTL и природными киллерными клетками. Гибель клеток, опосредованная Гранзимом В, блокируется X-связанным IAP, XIAP, и этот блок можно снять высвобождением S_{mac} из митохондрий или его миметическим препаратом SMC13-15.

На фиг. 67 схематично показаны совместные и дополняющие механизмы для синергитического эффекта SMC и ингибиторов контрольных точек иммунного ответа (ICI). (1) Наличие терапевтических рекомбинантных антител, которые блокируют направление PD-1/PD-L1, обеспечивает сигнальный путь Т-клеточного рецептора (TCR) CD8+ Т-клетки при его связывании с антигеном, презентированным злокачественными клетками посредством молекулы главного комплекса гистосовместимости I (MHC-I). Па-

раллельное истощение IAP при лечении SMP может усилить активацию Т-клеток, вероятно, путем возникновения одновременного стимулирующего ответа суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) (аналогично активации 4-1BB или OX40), что приводит к усиленной активации и увеличению количества опухолеспецифических CD8⁺ Т-клеток. В результате секретируются Гранзим В (GrzB) и Перфорин (Pfn) для уничтожения клеток-мишеней. (2) SMC-опосредованный антагонизм ингибитора casp-3, XIAP, может привести к усиленной гибели опухолевых клеток под действием GrzB. (3) Истощение cIAP1 и cIAP2 под действием SMC приводит к усилению местной продукции TNF- α Т-клетками в микроокружении опухоли, что, вероятно, опосредуется активацией альтернативного пути NF- κ B. (4) В результате исчезновения cIAP1/2, обработанные SMC злокачественные клетки становятся чувствительными к клеточной гибели, вызванной присутствием провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α .

На фиг. 68A-68D показаны изображения, демонстрирующие полноразмерные Вестерн-блоты.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способам и композициям для повышения эффективности соединений-миметиков Smac (SMC) при лечении злокачественного новообразования. В частности, настоящее изобретение относится к способам и композициям для комбинированной терапии, которая включает SMC и второй агент, который стимулирует один или несколько путей клеточной гибели, которые ингибированы cIAP1 и/или cIAP2. Вторым агентом может быть, например, агонист TLR вируса, такого как онколитический вирус, или интерферон или связанный с ним агент.

Представленные в настоящем документе данные демонстрируют, что терапия агентом и SMC приводит к регрессии опухоли и долговременному излечению *in vivo* (см., например, пример 1). Такая комбинированная терапия хорошо переносилась мышами, при этом вес тела возвращался к уровням до лечения вскоре после прекращения терапии. Протестированная комбинированная терапия способна осуществлять лечение на некоторых моделях рефрактерных агрессивных видов злокачественных новообразований у мышей. Специалисту в данной области на основании раскрытия и данных, представленных в настоящем документе, будет понятно, что любой, один или несколько, из множества SMC и любой, один или несколько, из множества агентов, таких как агонист TLR, патоген или миметик патогена, могут быть объединены в одном или нескольких вариантах осуществления настоящего изобретения, таким образом, что происходит стимуляция апоптоза и лечение злокачественного новообразования.

Несмотря на то, что были предприняты другие подходы к усовершенствованию терапии SMC, очень редко отмечали полные ответы, особенно на агрессивных иммунокомпетентных модельных системах. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, включая лечение злокачественного новообразования миметиком патогена, например миметиком патогена с механизмом действия, частично зависящим от TRAIL, могут иметь определенные преимущества. Во-первых, этот подход может вызвать опосредованный TNF-альфа апоптоз и некроптоз: учитывая пластичность и гетерогенность некоторых видов злокачественного новообразования в стадии прогрессирования, способы лечения, которые одновременно вызывают несколько различных механизмов клеточной гибели, могут иметь большую эффективность, чем такие, которые не вызывают такого эффекта. Во-вторых, миметики патогенов могут вызывать интегрированный врожденный иммунный ответ, который включает уровни отрицательной обратной связи. Эти механизмы обратной связи могут воздействовать на реакцию цитокинов способом, который трудно повторить при использовании рекомбинантных белков, и, таким образом, действовать для гарантии подхода к комбинированной терапии.

Множественная миелома (ММ) представляет собой неизлечимое злокачественное новообразование, которое характеризуется быстрым распространением плазматических клеток в костном мозге. ММ является вторым наиболее распространенным гематологическим злокачественным заболеванием, и средняя выживаемость при ней составляет всего три-пять лет после диагностирования. Клетки ММ вызывают резорбцию кости, приводящую к переломам и подавлению иммунитета, когда они захватывают компартмент костного мозга. ММ клетки могут распространяться в другие ткани с образованием плазмочитом, и заболевание может переходить в агрессивную лейкозную стадию. Современная терапия может продлить жизнь и смягчить симптомы, но не является средством излечения. Новые способы лечения крайне необходимы для борьбы с резистентностью к лечению и неизбежным рецидивом.

На ранних стадиях заболевания злокачественные клетки зависят от микроокружения костного мозга, в частности, от TNF α и интерлейкина-6 (IL-6) клеток микроокружения костного мозга. По мере прогрессирования болезни клетки становятся независимыми от своего окружения и выживают при высокой аутокринной продукции TNF α . На всех стадиях клетки имеют высокий уровень сигнального пути NF- κ B, что повышает их выживаемость, частично из-за присущих мутаций в ключевых компонентах пути. Нацеливание на путь NF- κ B в ММ способствует повышению эффективности многих стандартных терапевтических средств, используемых при ММ, таких как ингибитора протеасом бортезомаба, иммуномодулирующего средства (IMiDs) талидомида и леналидомида и синтетического глюкокортикоида дексаметазона.

TNF α -опосредованный сигнальный путь NF- κ B-может быть переключен с предварительного сигнального пути выживания на апоптотический сигнальный путь вместе с удалением клеточных ингибито-

ров апоптоза (сIAP); этот процесс, по-видимому, является селективным для злокачественных клеток. сIAP1 и сIAP2 действуют взаимозаменяемо как E3-лигазы у всех членов суперсемейства рецепторов TNF α , либо убиквитинируя специфические белки с образованием каркаса для сигнальных комплексов, либо нацеливая их на деградацию. Примеры этого можно увидеть в обоих разветвлениях пути NF- κ B: RIP1 убиквитинирован посредством связей K63 с образованием каркаса сигнального комплекса, который необходим для активации классического пути, а NIK получает сигнал на K48-связанное убиквитинирование и деградацию, и сохраняет альтернативный путь неактивным (фиг. 35). SMC являются новым классом противораковых терапевтических препаратов, которые имитируют эндогенный белок Smac, который участвует в активации собственного пути апоптоза. Пептид Smac и SMC связываются с доменом BIR сIAP, что приводит к их авто-убиквитинированию, нацеливая их на протеасомную деградацию. Когда RIP1 больше не убиквитинирован, он становится свободным и образует рипоптосомы, инициируя каскадный каскад и гибель клеток.

Было показано, что SMC и TNF α обладают сильным синергетическим действием и индуцируют опосредованный NF- κ B апоптоз во многих линиях злокачественных клеток. SMC также обладает синергизмом в отношении уничтожения злокачественных клеток в комбинации с другими воспалительными цитокинами, такими как IFN, которые могут быть индуцированы агонистами TLR или онколитическими вирусами. SMC даже могут стандартизировать терапевтические средства, используемые для лечения ММ, на усиление апоптоза злокачественных клеток. Некоторые клинические испытания, которые в настоящее время проводятся для оценки эффективности SMC вместе с химиотерапией при ММ, а также при других видах злокачественных новообразований, показали большой терапевтический потенциал.

Активация иммунной системы увеличивает продукцию цитокинов, что является преимуществом для SMC-опосредованного уничтожения клеток ММ. Однако такая продукция цитокинов может иметь нежелательные последствия для клеток ММ. Было показано, что многие стимуляторы врожденной иммунной системы, такие как IFN и агонисты TLR, активируют лиганды контрольной точки PD-1 иммунного ответа. PD-1 экспрессируется на поверхности Т-клеток и НК-клеток. Когда PD-1 связывается со своими лигандами, PD-L1 и PD-L2, он действует как соингибирующий сигнал для рецептора Т-клеток и подавляет цитотоксическую способность Т-клеток. PD-L1 экспрессируется конститутивно при низких уровнях во многих тканях и может быть активирован, предположительно, для предотвращения аутоиммунных реакций. Однако, PD-L1 активируется на злокачественных клетках, что приводит к ускользанию клеток от распознавания адаптивной иммунной системой. В частности, PD-L1 может быть активирован при ММ в ответ на агонисты IFN γ и TLR, такие как LPS. PD-L2 имеет гораздо более селективную экспрессию по сравнению с PD-L1. Он присутствует в подмножестве В-клеток и активируется на выбранных клетках в ответ на сильный сигнал пути NF- κ B или STAT6.

SMC также могут влиять на функцию Т-клеток у мышей, обработанных SMC, как *in vitro*, так и *in vivo*, например, увеличивая пролиферацию, усиливая продукцию цитокинов активированных Т-клеток, экстрагированных из селезенки мыши после воздействия SMC, и увеличивая продукцию цитокинов НКТ и НК-клеток. Кроме того, мыши, обработанные SMC, демонстрируют наличие гиперреактивных Т-клеток при антигенной стимуляции. Поэтому, комбинированная терапия на основе SMC может не только усилить апоптоз клеток при ММ, но также стимулировать селективный адаптивный ответ. Комбинирование SMC и стимуляторов врожденного иммунного ответа или ингибиторов контрольных точек иммунного ответа (ICI) может быть лучшим подходом для того, чтобы преодолеть сильный сигнальный путь выживания, которые получают клетки ММ.

Злокачественные клетки способны манипулировать многими подходами к выживанию, которые используются здоровыми клетками, что делает их устойчивыми к "сигналам смерти". Клетки ММ, в частности, способны дополнительно усиливать конститутивную передачу сигналов NF- κ B, используемую в плазматических клетках, что делает их устойчивыми к сигналам апоптоза. Это достигается за счет увеличения экспрессии генов-мишеней сигнального пути выживания NF- κ B, таких как IL-6 и TNF α . Кроме того, клетки ММ способны усилить экспрессию ингибиторов контрольных точек, которые, по-видимому, используются для защиты клеток от воспалительного и цитотоксического воздействия среды; что помогает им избегать обнаружения Т-клетками и НК-клетками. Нацеливание одновременно на устойчивость к апоптозу и на ускользание от обнаружения иммунной системой при ММ делает возможным преодолеть два основных аспекта резистентности лечения при этом заболевании.

Блокада PD-1 эффективна для замедления прогрессирования ММ и значительного увеличения времени выживания у мышей, как показано на примере сингенной модели ММ у мышей. Использование моноклонального антитела против PD-1 имеет несколько преимуществ по сравнению с альтернативными подходами к блокаде контрольных точек иммунного ответа. Во-первых, оно способно блокировать связывание обоих лигандов PD-L, PD-L1 и PD-L2. Большое число злокачественных опухолей способны активировать PD-L1 в ответ на лечение интерфероном, а PD-1/PD-L1 активируются у пациентов с ММ после лечения. Кроме того, подмножество незрелых В-клеток, называемых клетками В1, которые секретируют неспецифические антитела, показали высокую экспрессию PD-L2. Более того, экспрессия PD-L2 может повышаться в ответ на определенные стимулы, такие как активация NF- κ B и STAT6, что показы-

важность изучения уровней экспрессии обоих лигандов на клетках ММ. Клетки ММ человека способны активировать оба лиганда PD-1, делая их уникальными по сравнению с солидными раками. Хотя это предполагает, что терапия моноклональными антителами, нацеленными только на PD-L1 (например, BMS-936559/MDX-1105 от Bristol-Myers Squibb, MPDL3280A от Genentech, MEDI4000 от MedImmune и алвелумаб от EMD Serono) будет менее эффективна лечения с нацеливанием на PD-1 (например, ниволумаб от Bristol-Myers Squibb пембролизумаб от Merck и пидилизумаб от Curetech), было показано, что использование анти-PD-1 антител при ММ имеет значение.

Во-вторых, подходы с нацеливанием на PD-1, могут иметь эффект для более сильного ответа против злокачественного новообразования по сравнению с другими IC1, такими как анти-CTLA-4. Отличие в активности могут быть обусловлено особой ролью этих молекул в регуляции Т-клеток. PD-1 часто встречается на CD8+ Т-клетках, и взаимодействие с его лигандом ингибирует цитотоксический ответ, активируемый сигналами TCR. Напротив, CTLA-4 играет более заметную роль в вторичных лимфоидных тканях на регуляторных Т-клетках. Связывание CTLA-4 с его рецептором, CD28, превосходит и даже ингибирует, активирующие лиганды CD28 и вызывает ослабление распространения вторичного клона Т-клеток. Вполне возможно, что отсутствие эффективности лечения анти-CTLA-4 в примере 3 указывает на проникновение ММ во вторичные лимфоидные органы. Это может поставить под угрозу эффективность анти-CTLA4 либо под действием популяции CD4+ Т-клеток, которая пропорционально ниже в зародышевых центрах, либо при затруднении инфильтрации Т-клетками во вторичные лимфоидные органы. В экстрамедуллярной ММ клетки могут образовывать плазмцитомы в селезенке и лимфатических узлах, что часто наблюдается на поздних стадиях ММ на модели мыши, как описано в примере 3. Таким образом, очевидно, что зародышевые центры скомпрометированы клетками MPC-11.

SMC

SMC по настоящему изобретению может быть любой низкомолекулярной молекулой, соединением, полипептидом, белком или любым его комплексом, который способен или который, как предполагается, способен ингибировать cIAP1, cIAP2 и/или XIAP и, необязательно, проявлять одну или несколько дополнительных активностей эндогенных Smac. SMC по настоящему изобретению способен усиливать апоптоз, имитируя одну или несколько активностей эндогенного Smac, включая, но не ограничиваясь этим, ингибирование cIAP1 и ингибирование cIAP2. Эндогенной активностью Smac может быть, например, взаимодействием с конкретным белком, ингибирование функции конкретного белка или ингибирование конкретного IAP. В конкретных вариантах осуществления SMC ингибирует как cIAP1, так и cIAP2. В некоторых вариантах осуществления SMC ингибирует один или несколько других IAP, кроме cIAP1 и cIAP2, таких как XIAP или Livin/ML-IAP, содержащий единичный BIR IAP. В конкретных вариантах осуществления SMC ингибирует cIAP1, cIAP2 и XIAP. В любом варианте осуществления, включающем SMC и иммунный стимулятор, SMC, имеющий определенную активность, может быть выбран для образования комбинации с одним или несколькими конкретными иммунными стимуляторами. В любом варианте осуществления настоящего изобретения SMC может быть способен к действиям, на которые Smac не способен. В некоторых случаях эти дополнительные активности могут повышать эффективность способов или композиций по настоящему изобретению.

Лечение с помощью SMC может истощать клетки cIAP1 и cIAP2, например, путем индукции ауто- или транс-убиквитинирования и протеасомально-опосредованной деградации. SMC могут также подавлять подавление каспазы XASAP. SMC могут в первую очередь функционировать, нацеливаясь на cIAP1 и 2, а также путем преобразования TNF α и других цитокинов или лигандов смерти сигнального пути выживаемости в "сигнал смерти", например, в случае злокачественных клеток.

Некоторые SMC ингибируют по меньшей мере XIAP и cIAP. Такие "pan-IAP" SMC могут вмешиваться в несколько различных, но взаимосвязанных этапов программированной гибели клеток. Эта характеристика сводит к минимуму возможности возникновения резистентности к лечению panIAP SMC злокачественного новообразования, так как такой SMC влияет на большое число путей гибели, что обеспечивает синергетическое взаимодействие с существующими и возникающими средствами лечения злокачественных новообразований, которые активируют различные пути апоптоза, в которые могут быть вовлечены SMC.

Один или несколько воспалительных цитокинов или лигандов смерти, таких как TNF α , TRAIL и IL-1 β , обладают сильным синергетическим действием вместе с терапией SMC на многие клеточные линии, полученных из опухолей. Таким образом, стратегии повышения концентрации лигандов смерти в опухолях, обработанных SMC, в частности используя подходы, которые ограничивают токсичность, обычно связанную с терапией рекомбинантными цитокинами, являются очень привлекательными. TNF α , TRAIL и десятки других цитокинов и хемокинов могут активированы в ответ на распознавание патогена врожденной иммунной системой индивида. Важно отметить, что этот базовый ответ на микробные патогены обычно является самоограничивающим и безопасным для индивида из-за строгой отрицательной регуляции, которая ограничивает силу и продолжительность его активности.

SMC могут быть рационально разработаны на основе Smac. Способность соединения усиливать апоптоз путем имитации одной или нескольких функций или действий эндогенного Smac может быть

предсказана на основе сходства с эндогенными Smac или известными SMC. SMC может представлять собой соединение, полипептид, белок или комплекс из двух или более соединений, полипептидов или белков.

В некоторых случаях SMC представляют собой низкомолекулярные молекулы IAP-антагонистов на основе N-концевой тетрапептидной последовательности (выявленной после обработки) полипептида Smac. В некоторых случаях SMC представляет собой мономер (моновалентный) или димер (двухвалентный). В частности, SMC включает 1 или 2 фрагмента, которые имитируют тетрапептидную последовательность AVPI из Smac/DIABLO, второго митохондриального активатора каспаз, или других подобных IBM (например, IAP-связывающих мотивов других белков, таких как casp9). Димерный SMC по настоящему изобретению может быть гомодимером или гетеродимером. В некоторых вариантах осуществления субъединицы димера связаны различными линкерами. Линкеры могут находиться в одном и том же определенном месте любой субъединицы, а также могут быть расположены в разных точках присоединения (которые могут быть положениями "а.к.", P1, P2, P3 или P4, иногда имеется группа P5). В различных расположениях субъединицы димера могут находиться в разной ориентации, например, "голова-хвост", "голова-голова" или "хвост-хвост". Гетеродимеры могут содержать два разных мономера с различной аффинностью для разных доменов BIR или разных IAP. Альтернативно, гетеродимер может включать мономер Smac и лиганд для другого рецептора или мишени, который не является IAP. В некоторых случаях SMC может быть циклическим. В некоторых случаях SMC может быть тримерным или мультимерным. Мультимеризованный SMC может иметь повышенную в 7000 раз или более активность, например в 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 1000, 5000, 7000 раз или более (измеряется, например, с помощью EC₅₀ in vitro) по сравнению с одним или несколькими соответствующими мономерами. Это может произойти в нескольких случаях, например, связывание усиливает убиквитинирование среди IAP или потому, что двойное связывание BIR повышает стабильность взаимодействия. Хотя мультимеры, такие как димеры, могут проявлять повышенную активность, мономерные могут быть предпочтительными в некоторых вариантах осуществления. Например, в некоторых случаях предпочтительным может быть SMC с низкой молекулярной массой, например, по причинам, связанным с биодоступностью.

В некоторых случаях настоящего изобретения агент, способный ингибировать cIAP1/2, представляет собой аналог бестатина или Me-бестатин. Бестатин или аналоги Me-бестатина могут индуцировать аутоубиквитинирование cIAP1/2, имитируя биологическую активность Smac.

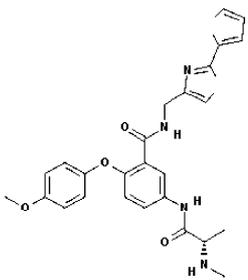
В некоторых вариантах настоящего изобретения, комбинирование лечение на основе SMC включает один или несколько агентов SMC и один или несколько агентов на основе интерферона, таких как интерферон типа 1, интерферон типа 2 и/или интерферон типа 3. Комбинированные методы лечения, включая агент на основе интерферона, могут быть использованы для лечения злокачественного новообразования, такого как множественная миелома.

В некоторых вариантах осуществления в комбинации с SMC используют VSV, экспрессирующий IFN, и, необязательно, экспрессирующий ген, который позволяет получать изображения, такие как NIS, симпортер натрий-йодид. Например, такой VSV может использоваться в комбинации с SMC, например, миметик Smac SM-1387/APG-1387 от Ascentage, миметик Smac LCL161 от Novartis или Биринапант. Такие комбинации могут быть эффективны для лечения злокачественного новообразования, такого как гепатоцеллюлярная карцинома или метастазы в печени.

В данной области известны различные SMC. Неограничивающие примеры SMC приведены в табл. 1. Хотя табл. 1 включает предлагаемые механизмы, с помощью которых могут действовать различные SMC, способы и композиции по настоящему изобретению не ограничены этими механизмами.

Таблица 1
Соединения-миметики Smac

Соединение	Структура или ссылка	Клинический статус	Организация; автор/изобретатель
GDC-0152/RG7419	Baker JE, Boerboom LE, Olinger GN. Cardioplegia-induced damage to ischemic immature myocardium is independent of oxygen availability. <i>Ann Thorac Surg.</i> 1990 Dec;50(6):934-9.	Клинические испытания	Genentech/Roche; W. Fairbrother
GDC-0145		Клинические испытания	Genentech/Roche; W. Fairbrother
AEG40826/HGS1029		Клинические испытания	Aegera/Pharmascience (Canada); J. Jaquith
LCL-161	Chen KF, Lin JP, Shiau CW, Tai WT, Liu CY, Yu HC, Chen PJ, Cheng AL. Inhibition of Bcl-2 improves effect of LCL161, a SMAC mimetic, in hepatocellular carcinoma cells. <i>Biochem Pharmacol.</i> 2012 Aug 1;84(3):268-77. doi: 10.1016/j.bcp.2012.04.023. Epub 2012 May 9.	Клинические испытания	Novartis; L. Zavel
AT-406/SM406/Debio1143/D1143	Cai Q, Sun H, Peng Y, Lu J, Nikolovska-Coleska Z, McEachern D, Liu L, Qiu S, Yang CY, Miller R, Yi H, Zhang T, Sun D, Kang S, Guo M, Leopold L, Yang D, Wang S. A potent and orally active antagonist (SM-406/AT-406) of multiple inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in clinical development for cancer treatment. <i>J Med Chem.</i> 2011 Apr 28;54(8):2714-26. doi: 10.1021/jm101505d. Epub 2011 Mar 28.	Клинические испытания	Ascenta (USA)/DebioPharma (Switzerland); Shaomeng Wang (University of Michigan)
TL32711/Биринапант (раньше TL32711)	Dubreux L, Berthelet J, Glorian V. IAP proteins as targets for drug development in oncology. <i>Onco Targets Ther.</i> 2013 Sep 16;9:1285-1304. eCollection 2013. Review.	Клинические испытания	Tetralogic (USA, formerly Gentara with GTI cpd designations); S. Condon
GDC-0917/CUDC-427	Wong H, Gould SE, Budha N, Darbonne WC, Kadel EE 3rd, La H, Alicke B, Halladay JS, Erickson R, Portera C, Tolcher AW, Infante JR, Mamounas M, Flygare JA, Hop CE, Fairbrother WJ. Learning and confirming with preclinical studies: modeling and simulation in the discovery of GDC-0917, an inhibitor of apoptosis proteins antagonist. <i>Drug Metab Dispos.</i> 2013 Dec;41(12):2104-13. doi: 10.1124/dmd.113.053926. Epub 2013 Sep 16.	Клинические испытания	Curis (Genentech); W. Fairbrother
APG-1387/SM-1387		Клинические испытания	Ascenta (USA)/Ascentage (China); Shaomeng Wang
AZD5582	Hennessy EJ, Adam A, Aquila BM, Castriotta LM, Cook D, Hattersley M, Hird AW, Huntington C, Kamhi VM, Laing NM, Li D, Macintyre T, Omer CA, Oza V, Patterson T, Repik G, Rooney MT, Saeh JC, Sha L, Vasbinder MM, Wang H, Whitston D. Discovery of a Novel Class of Dimeric Smac Mimetics as Potent IAP Antagonists Resulting in a Clinical Candidate for the Treatment of Cancer (AZD5582). <i>J Med Chem.</i> 2013 Dec 27;56(24):9897-919. doi: 10.1021/jm401075x. Epub 2013 Dec 13.	Кандидат для клинических исследований	AstraZeneca; E. Hennessy
T-3256336	Sumi H, Yabuki M, Iwai K, Morimoto M, Hibino R, Inazuka M, Hashimoto K, Kosugi Y, Aoyama K, Yamamoto S, Yoshimatsu M, Yamasaki H, Tozawa R, Ishikawa T, Yoshida S. Antitumor activity and pharmacodynamic biomarkers of a novel and orally	Кандидат для клинических исследований	Takeda (Japan); D. Dougan, T. Ishikawa

	available small-molecule antagonist of inhibitor of apoptosis proteins. Mol Cancer Ther. 2013 Feb;12(2):230-40. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0699. Epub 2012 Dec 12.		
JP1584		Кандидат для клинических исследований	Joyant (GeminX, USA); Xiaodong Wang, Patrick Harran
JP1201		Кандидат для клинических исследований	Joyant (GeminX, USA); Xiaodong Wang, Patrick Harran
GT-A		Кандидат для клинических исследований	Joyant (GeminX, USA); Xiaodong Wang, Patrick Harran
AT-IAP	Gianni Chessari, Ahn Maria, Ildiko Buck, Elisabetta Chiarparin, Joe Coyle, James Day, Martyn Frederickson, Charlotte Griffiths-Jones, Keisha Hearn, Steven Howard, Tom Heightman, Petra Hillmann, Aman Iqbal, Christopher N. Johnson, Jon Lewis, Vanessa Martins, Joanne Munck, Mike Reader, Lee Page, Anna Hopkins, Alessia Millemaggi, Caroline Richardson, Gordon Saxty, Tomoko Smyth, Emiliano Tamanini, Neil Thompson, George Ward, Glyn Williams, Pamela Williams, Nicola Wilsher, and Alison Woolford. Abstract 2944: AT-IAP, a dual cIAP1 and XIAP antagonist with oral antitumor activity in melanoma models. <i>Cancer Research</i> : April 15, 2013; Volume 73, Issue 8, Supplement 1 doi: 10.1158/1538-7445.AM2013-2944 Proceedings: AACR 104th Annual Meeting 2013; Apr 6-10, 2013; Washington, DC	Кандидат для клинических исследований	Astex (UK)/Otsuka (Japan); G. Chessari
inhib1	Park CM, Sun C, Olejniczak ET, Wilson AE, Meadows RP, Betz SF, Elmore SW, Fesik SW. Non-peptidic small molecule inhibitors of XIAP. <i>Bioorg Med Chem Lett</i> . 2005 Feb 1;15(3):771-5.		Pfizer (IDUN acquired cpds from Abbott collaboration); SW Fesik, KJ Tomaselli
inhib2	Park CM, Sun C, Olejniczak ET, Wilson AE, Meadows RP, Betz SF, Elmore SW, Fesik SW. Non-peptidic small molecule inhibitors of XIAP. <i>Bioorg Med Chem Lett</i> . 2005 Feb 1;15(3):771-5.		Pfizer (IDUN acquired cpds from Abbott collaboration); SW Fesik, KJ Tomaselli
BI-75D2	Формула: C ₂₆ H ₂₆ N ₄ O ₄ S ₂	Доклинические испытания	Sanford-Burnham Institute; J. Reed
			
T5TR1	Crisóstomo FR, Feng Y, Zhu X, Welsh K, An J, Reed JC, Huang Z. Design and synthesis of a simplified inhibitor for XIAP-BIR3 domain. <i>Bioorg Med Chem Lett</i> . 2009 Nov 15;19(22):6413-8. doi: 0.1016/j.bmcl.2009.09.058. Epub 2009 Sep 17. PubMed PMID: 19819692; PubMed Central PMCID: PMC3807767.	Доклинические испытания	Sanford-Burnham Institute (NIH?); J. Reed
ML-101	Welsh K, Yuan H, Stonich D, Su Y, Garcia X, Cuddy M, Houghten R, Sergienko E, Reed JC, Ardecky R, Ganji SR, Lopez M, Dad S, Chung TDY, Cosford N. Antagonists of IAP-family anti-apoptotic proteins - Probe 1. 2009 May 18 [updated 2010 Sep 2]. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010-. Available from	Доклинические испытания	Sanford-Burnham Institute (NIH?); J. Reed

	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47341/ ; González-López M, Welsh K, Finlay D, Ardecky RJ, Ganji SR, Su Y, Yuan H, Teriete P, Mace PD, Riedl SJ, Vuori K, Reed JC, Cosford ND. Design, synthesis and evaluation of monovalent Smac mimetics that bind to the BIR2 domain of the anti-apoptotic protein XIAP. <i>Bioorg Med Chem Lett</i> . 2011 Jul 15;21(14):4332-6. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.05.049. Epub 2011 May 24.		
MLS-0390866	Welsh K, Yuan H, Stonich D, Su Y, Garcia X, Cuddy M, Houghten R, Sergienko E, Reed JC, Ardecky R, Ganji SR, Lopez M, Dad S, Chung TDY, Cosford N. Antagonists of IAP-family anti-apoptotic proteins - Probe 1. 2009 May 18 [updated 2010 Sep 2]. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010-. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47341/PubMed	Доклинические испытания	Sanford-Burnham Institute (NIH?); J. Reed
MLS-	Finlay D, Vamos M, González-López M, Ardecky RJ, Ganji SR, Yuan H, Su Y, Cooley TR, Hauser CT, Welsh K, Reed JC, Cosford ND, Vuori K. Small-Molecule IAP Antagonists Sensitize Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis: Roles of XIAP and cIAPs. <i>Mol Cancer Ther</i> . 2014 Jan;13(1):5-15. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0153. Epub 2013 Nov 5.	Доклинические испытания	Sanford-Burnham Institute (NIH?); J. Reed
ML183	Ardecky RJ, Welsh K, Finlay D, Lee PS, González-López M, Ganji SR, Ravanani P, Mace PD, Riedl SJ, Vuori K, Reed JC, Cosford ND. Design, synthesis and evaluation of inhibitor of apoptosis protein (IAP) antagonists that are highly selective for the BIR2 domain of XIAP. <i>Bioorg Med Chem Lett</i> . 2013 Jul 15;23(14):4253-7. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.04.096. Epub 2013 May 14; - Lopez M, Welsh K, Yuan H, Stonich D, Su Y, Garcia X, Cuddy M, Houghten R, Sergienko E, Reed JC, Ardecky R, Reddy S, Finlay D, Vuori K, Dad S, Chung TDY, Cosford NDP. Antagonists of IAP-family anti-apoptotic proteins - Probe 2. 2009 Sep 1 [updated 2011 Feb 10]. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2010-. доступен http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55068/	Доклинические испытания	Sanford-Burnham Institute (NIH?); J. Reed
SM-83	Gatti L, De Cesare M, Ciusani E, Corna E, Arrighetti N, Cominetti D, Belvisi L, Potenza D, Moroni E, Vasile F, Lecis D, Delia D, Castiglioni V, Scanziani E, Seneci P, Zaffaroni N, Perego P. Antitumor Activity of a Novel Homodimeric SMAC Mimetic in Ovarian Carcinoma. <i>Mol Pharm</i> . 2014 Jan 6;11(1):283-93. doi: 10.1021/mp4004578. Epub 2013 Nov 27.	Доклинические испытания	University of Milan; M. Bolognesi
SMAC037/SM37	Mastrangelo E, Cossu F, Milani M, Sorrentino G, Lecis D, Delia D, Manzoni L, Drago C, Seneci P, Scolastico C, Rizzo V, Bolognesi M. Targeting the X-linked inhibitor of apoptosis protein through 4-substituted azabicyclo[5.3.0]alkane smac mimetics. Structure, activity, and	Доклинические испытания	University of Milan; M. Bolognesi

	recognition principles. <i>J Mol Biol.</i> 2008 Dec 19;384(3):673-89. doi: 10.1016/j.jmb.2008.09.064. pub 2008 Oct 7.		
SMAC066	Cossu F, Malvezzi F, Canevari G, Mastrangelo E, Lecis D, Delia D, Seneci P, Scolastico C, Bolognesi M, Milani M. Recognition of Smac-mimetic compounds by the BIR domain of cIAP1. <i>Protein Sci.</i> 2010 ec;19(12):2418-29. doi: 10.1002/pro.523.	Доклинические испытания	University of Milan; M. Bolognesi
SMC9a	Monomer: Seneci P, Bianchi A, Battaglia C, Belvisi L, Bolognesi M, Caprini A, Cossu F, Franco Ed, Matteo Md, Delia D, Drago C, Khaled A, Lecis D, Manzoni L, Marizzoni M, Mastrangelo E, Milani M, Motto I, Moroni E, Potenza D, Rizzo V, Servida F, Turlizzi E, Varrone M, Vasile F, Scolastico C. Rational design, synthesis and characterization of potent, non-peptidic Smac mimics/XIAP inhibitors as proapoptotic agents for cancer therapy. <i>Bioorg Med Chem.</i> 2009 Aug 15;17(16):5834-56. doi: 10.1016/j.bmc.2009.07.009. Epub 2009 Jul 10. Dimer in different configurations: Ferrari V, Cutler DJ. Uptake of chloroquine by human erythrocytes. <i>Biochem Pharmacol.</i> 1990 Feb 15;39(4):753-62. PubMed PMID: 2306282.; Cossu F, Milani M, Vachette P, Malvezzi F, Grassi S, Lecis D, Delia D, Drago C, Seneci P, Bolognesi M, Mastrangelo E. Structural insight into inhibitor of apoptosis proteins recognition by a potent divalent smac-mimetic. <i>PLoS One.</i> 2012;7(11):e49527. doi: 10.1371/journal.pone.0049527. Epub 2012 Nov 15.	Доклинические испытания	University of Milan; M. Bolognesi
OICR-720	Enwere EK, Holbrook J, Lejmi-Mrad R, Vineham J, Timusk K, Sivaraj B, Isaac M, Uehling D, Al-awar R, LaCasse E, Korneluk RG. TWEAK and cIAP1 regulate myoblast fusion through the noncanonical NF- κ B signaling pathway. <i>Sci Signal.</i> 2012 Oct 16;5(246):ra75. doi: 10.1126/scisignal.2003086.	Доклинические испытания	Ontario Institute for Cancer Research; R. Korneluk
SM-164	Sun H, Nikolovska-Coleska Z, Lu J, Meagher JL, Yang CY, Qiu S, Tomita Y, Ueda Y, Jiang S, Krajewski K, Roller PP, Stuckey JA, Wang S. Design, synthesis, and characterization of a potent, nonpeptide, cell-permeable, bivalent Smac mimetic that concurrently targets both the BIR2 and BIR3 domains in XIAP. <i>J Am Chem Soc.</i> 2007 Dec 12;129(49):15279-94. Epub 2007 Nov 14.	Доклинические испытания	Ascenta
SM1200	Sheng R, Sun H, Liu L, Lu J, McEachern D, Wang G, Wen J, Min P, Du Z, Lu H, Kang S, Guo M, Yang D, Wang S. A potent bivalent Smac mimetic (SM-1200) achieving rapid, complete, and durable tumor regression in mice. <i>J Med Chem.</i> 2013 May 23;56(10):3969-79. doi: 10.1021/jm400216d. Epub 2013 May 7.	Доклинические испытания	Ascenta
SM-173	Lu J, Bai L, Sun H, Nikolovska-Coleska Z, McEachern D, Qiu S, Miller RS, Yi H, Shangary S, Sun Y, Meagher JL, Stuckey JA, Wang S. SM-164: a novel, bivalent Smac mimetic that induces apoptosis and tumor regression by concurrent removal of the blockade of cIAP-1/2 and XIAP.	Доклинические испытания	Ascenta

	Cancer Res. 2008 Nov 5;68(22):9384-93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2655.		
Соединение 21	Sun H, Stuckey JA, Nikolovska-Coleska Z, Qin D, Meagher JL, Qiu S, Lu J, Yang CY, Saito NG, Wang S. Structure-based design, synthesis, evaluation, and crystallographic studies of conformationally constrained Smac mimetics as inhibitors of the X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). J Med Chem. 2008 Nov 27;51(22):7169-80. doi: 10.1021/jm8006849.	Доклинические испытания	Ascenta
WS-5	Zhang B, Nikolovska-Coleska Z, Zhang Y, Bai L, Qiu S, Yang CY, Sun H, Wang S, Wu Y. Design, synthesis, and evaluation of tricyclic, conformationally constrained small-molecule mimetics of second mitochondria-derived activator of caspases. J Med Chem. 2008 Dec 11;51(23):7352-5. doi: 0.1021/jm801146d.	Доклинические испытания	Ascenta
SH-130	Dai Y, Liu M, Tang W, DeSano J, Burstein E, Davis M, Pienta K, Lawrence T, Xu L. Molecularly targeted radiosensitization of human prostate cancer by modulating inhibitor of apoptosis. Clin Cancer Res. 2008 Dec 1;14(23):7701-10. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0188.	Доклинические испытания	Ascenta
SM162	Sun H, Liu L, Lu J, Qiu S, Yang CY, Yi H, Wang S. Cyclopeptide Smac mimetics as antagonists of IAP proteins. Bioorg Med Chem Lett. 2010 May 5;20(10):3043-6.	Доклинические испытания	Ascenta
SM163 (соединение 3)	Sun H, Liu L, Lu J, Qiu S, Yang CY, Yi H, Wang S. Cyclopeptide Smac mimetics as antagonists of IAP proteins. Bioorg Med Chem Lett. 2010 May 15;20(10):3043-6.	Доклинические испытания	Ascenta
SM337	Wang S. Design of small-molecule Smac mimetics as IAP antagonists. Curr Top Microbiol Immunol. 2011;348:89-113. doi: 10.1007/82_2010_111.	Доклинические испытания	Ascenta
SM122 (or SH122)	Lu J, Bai L, Sun H, Nikolovska-Coleska Z, McEachern D, Qiu S, Miller RS, Yi H, Shangary S, Sun Y, Meagher JL, Stuckey JA, Wang S. SM-164: a novel, bivalent Smac mimetic that induces apoptosis and tumor regression by concurrent removal of the blockade of cIAP-1/2 and XIAP. Cancer Res. 2008 Nov 15;68(22):9384-93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2655.	Доклинические испытания	Ascenta
AEG40730	Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, Gillard JW, Jaquith JB, Morris SJ, Barker PA. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. Mol Cell. 2008 Jun 20;30(6):689-700. doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.014.	Доклинические испытания	Aegera
LBW242	Keating J, Tsoli M, Hallahan AR, Ingram WJ, Haber M, Ziegler DS. Targeting the inhibitor of apoptosis proteins as a novel therapeutic strategy in medulloblastoma. Mol Cancer Ther. 2012 Dec;11(12):2654-63. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0352. Epub 2012 Sep 25.	Доклинические испытания	Novartis
BV6	Müller-Sienerth N, Dietz L, Holtz P, Kapp M, Grigoleit GU, Schmuck C, Wajant H, Siegmund D. SMAC mimetic BV6 induces cell death in monocytes and maturation of monocyte-derived dendritic cells. PLoS One. 2011;6(6):e21556. doi:	Доклинические испытания	Genentech

	10.1371/journal.pone.0021556. Epub 2011 Jun 30.		
MV1	Monomeric version of BV6: Fulda S, Vucic D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. <i>Nat Rev Drug Discov.</i> 2012 Feb 1;11(2):109-24. doi: 10.1038/nrd3627. Review. Erratum in: <i>Nat Rev Drug Discov.</i> 2012 Apr;11(4):331.	Доклинические испытания	Genentech
ATRA hybrid	Itoh Y, Ishikawa M, Kitaguchi R, Okuhira K, Naito M, Hashimoto Y. Double protein knockdown of cIAP1 and CRABP-II using a hybrid molecule consisting of ATRA and IAPs antagonist. <i>Bioorg Med Chem Lett.</i> 2012 Jul 1;22(13):4453-7. doi: 10.1016/j.bmcl.2012.04.134. Epub 2012 May 23.	Доклинические испытания	Genentech
SNIPER (слитая конструкция бестатина и лиганда рецептора эстрогена)	Okuhira K, Demizu Y, Hattori T, Ohoka N, Shibata N, Nishimaki-Mogami T, Okuda H, Kurihara M, Naito M. Development of hybrid small molecules that induce degradation of estrogen receptor-alpha and necrotic cell death in breast cancer cells. <i>Cancer Sci.</i> 2013 Aug 30. doi: 10.1111/cas.12272. [Онлайн публикация до выхода печатной версии]	Доклинические испытания	
RMT5265	Ramachandiran S, Cain J, Liao A, He Y, Guo X, Boise LH, Fu H, Ratner L, Khoury HJ, Bernal-Mizrachi L. The Smac mimetic RMT5265.2HCL induces apoptosis in EBV and HTLV-I associated lymphoma cells by inhibiting XIAP and promoting the mitochondrial release of cytochrome C and Smac. <i>Leuk Res.</i> 2012 Jun;36(6):784-90. doi: 10.1016/j.leukres.2011.12.024. Epub 2012 Feb 10; Li L, Thomas RM, Suzuki H, De Brabander JK, Wang X, Harran PG. A small molecule Smac mimic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death. <i>Science.</i> 2004 Sep 3;305(5689):1471-4.	Доклинические испытания	Joyant (USA)
JP1010	Probst BL, Liu L, Ramesh V, Li L, Sun H, Minna JD, Wang L. Smac mimetics increase cancer cell response to chemotherapeutics in a TNF- α -dependent manner. <i>Cell Death Differ.</i> 2010 Oct;17(10):1645-54. doi: 10.1038/cdd.2010.44. Epub 2010 Apr 30.	Доклинические испытания	Joyant (USA)
JP1400	Probst BL, Liu L, Ramesh V, Li L, Sun H, Minna JD, Wang L. Smac mimetics increase cancer cell response to chemotherapeutics in a TNF- α -dependent manner. <i>Cell Death Differ.</i> 2010 Oct;17(10):1645-54. doi: 10.1038/cdd.2010.44. Epub 2010 Apr 30.	Доклинические испытания	Joyant (USA)
ABT-10		Доклинические испытания	Abbott
A-410099.1	Oost TK, Sun C, Armstrong RC, Al-Assaad AS, Betz SF, Deckwerth TL, Ding H, Elmore SW, Meadows RP, Olejniczak ET, Oleksijew A, Oltersdorf T, Rosenberg SH, Shoemaker AR, Tomaselli KJ, Zou H, Fesik SW. Discovery of potent antagonists of the antiapoptotic protein XIAP for the treatment of cancer. <i>J Med Chem.</i> 2004 Aug 26;47(18):4417-26.	Доклинические испытания	Abbott
822B	Jae Sik Shin, Seung-Woo Hong, Dong-Hoon Jin, In-Hwan Bae, Maeng-Sup Kim, Young-Soon Na, Jae-Lyun Lee, Yong Sang Hong, and Tae-Won Kim. Abstract 592: Novel IAP antagonist (822B) induces apoptosis through degradation of IAP proteins which have a BIR3 domain in human pancreatic cancer cells. <i>Cancer Research</i> : April 15, 2011; Volume 71, Issue 8, Supplement 1 doi: 10.1158/1538-7445.AM2011-592 Proceedings: AACR 102nd Annual Meeting 2011-- Apr 2-6, 2011; Orlando, FL.	Доклинические испытания	Hanmi (Korea)
GT13402		Доклинические испытания	Tetralogic
SW iii -123 (гибрид лиганда сигма2R)	Zeng C, Vangveravong S, McDunn JE, Hawkins WG, Mach RH. Sigma-2 receptor ligand as a novel method for delivering a SMAC mimetic drug for treating ovarian cancer. <i>Br J Cancer.</i> 2013 Oct 29;109(9):2368-77. doi: 10.1038/bjc.2013.593. Epub 2013 Oct 8.	Доклинические испытания	(RH Mach)
		Доклинические испытания	Apoptos (USA)
		Доклинические испытания	Sanofi-Aventis/Synthelabo (EU)

Агенты

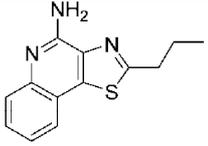
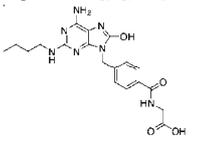
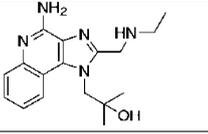
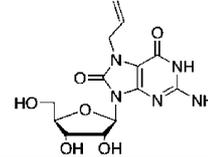
Иммуностимулирующим или иммуномодулирующим агентом по настоящему изобретению может быть любой агент, способный индуцировать рецептор-опосредованную апоптозную программу, которая ингибируется cIAP1 и cIAP2 в одной или более клетках индивида. Иммунный стимулятор по настоящему изобретению может индуцировать апоптозную программу, регулируемую cIAP1 (BIRC2), cIAP2 (BIRC3 или API2) и, необязательно, одним или несколькими дополнительными IAP, например одним или несколькими белками IAP человека NAIP (BIRC1) XIAP (BIRC4), сурвивин (BIRC5), Apollon/Bruce (BIRC6), ML-IAP (BIRC7 или ливин) и ILP-2 (BIRC8). Кроме того, известно, что различные иммуномодуляторы или агенты, такие как антагонисты CpG или IAP, могут изменять контекст иммунных клеток.

В некоторых случаях иммунный стимулятор может быть агонистом TLR, таким как лиганд TLR. Агонист TLR по настоящему изобретению может представлять собой агонист одного или нескольких из TLR-1, TLR-2, TLR-3, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-7, TLR-8, TLR-9 и TLR-10 человека или связанных с ними белков других видов (например, TLR-1-TLR-9 и TLR-11-TLR-13 мыши). TLR могут распознавать высококонсервативные структурные мотивы, известные как патоген-ассоциированные микробные паттерны (PAMP), которые экспрессируются только микробными патогенами, а также дистресс-ассоциированные молекулярные паттерны (DAMP), которые являются эндогенными молекулами, высвобождаемыми некротическими или разрушающимися клетками. PAMP включают различные компоненты клеточной стенки бактерий, такие как липополисахарид (LPS), пептидогликан (PGN) и липопептиды, а также флагеллин, бактериальную ДНК и вирусную двухцепочечную РНК. DAMP включают внутриклеточные белки, такие как белки теплового шока, а также фрагменты белка из внеклеточного матрикса. Агонисты по настоящему изобретению дополнительно включают, например, CpG-олигодезоксинуклеотиды (CpG ODN), такие как ODN, класс А, В и С CpG, базовые аналоги, нуклеиновые кислоты, такие как дцРНК или ДНК патогена, или патогенные или патогеноподобные клетки, или вирионы. В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой агент, который имитирует вирус или бактерии или является синтетическим агонистом TLR.

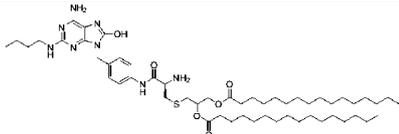
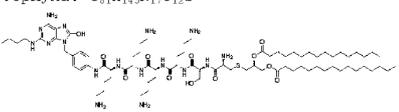
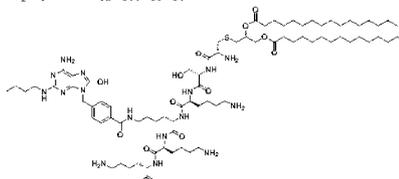
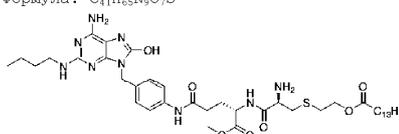
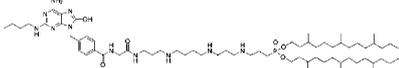
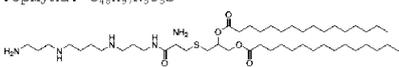
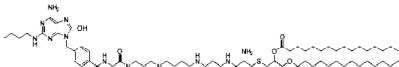
В данной области известны различные агонисты TLR. Неограничивающие примеры агонистов TLR приведены в табл. 2. Хотя табл. 2 включает предлагаемые механизмы, применения или мишени TLR, с помощью которых могут действовать различные агонисты TLR, способы и композиции по настоящему изобретению не ограничены этими механизмами, применениями или мишенями.

Таблица 2
Агенты: агонисты TLR

Соединение	Структура или ссылка	Тип соединения или применение	Агонист:
Поли-ICLC (полиинозиновая: полицитидиновая кислота, поли (I:C))	Levy HB. Historical overview of the use of polynucleotides in cancer. <i>J Biol Response Mod.</i> 1985;4:475-480. 7. Levy HB. Induction of interferon in vivo by polynucleotides. <i>Tex Rep Biol Med.</i> 1977;35:91-98.	Внутриполостное введение для лечения мезотелиомы (см., например, Currie AJ, Van Der Most RG, Broomfield SA, Prosser AC, Tovey MG, Robinson BW. Targeting the effector site with IFN- $\alpha\beta$ -inducing TLR ligands reactivates tumor-resident CD8 T cell responses to eradicate established solid tumors. <i>J. Immunol.</i> 2008; 180(3):1535-1544.)	Toll-подобный рецептор (TLR)-3
Поли (A:U) полиадениловая-полиуридиловая кислота	Ducret JP, Caillé P, Sancho Garnier H, et al. A phase I clinical tolerance study of polyadenylic-polyuridylic acid in cancer patients. <i>J Biol Response Mod</i> 1985;4:129-133. Polyadenylic.polyuridylic acid in the cotreatment of cancer. <i>Michelson AM, Lacour F, Lacour J. Proc Soc Exp Biol Med.</i> 1985 May;179(1):1-8.	Синтетическая двухспиральная молекула РНК	TLR-3
CL075	Gorden KB. et al., 2005. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. <i>J Immunol.</i> 174(3):1259-68; InvivoGen, InvivoGen Insight (Company Newsletter) Spring 2013: 8 стр. Формула: C ₁₃ H ₁₃ N ₃ S	Триаэоксинолиновое соединение	TRL-7 или TLR-7/8

			
CL097	Salio M. et al., 2007. Modulation of human natural killer T cell ligands on TLR-mediated antigen-presenting cell activation. <i>FNAS</i> 104: 20490-20495. Butchi nJ. et al., 2008. Analysis of the Neuroinflammatory Response to TLR7 Stimulation in the Brain: Comparison of Multiple TLR7 and/or TLR8 Agonists. <i>J Immunol</i> 180: 7604-7612	Соединение имидазохинолина	TRL-7 или TLR-7/8
CL264	Патентная публикация США № 20110077263 Формула: C ₁₉ H ₂₃ N ₇ O ₄	Аналог аденина	TRL-7 или TLR-7/8
			
CL307		Базовый аналог	TRL-7 или TLR-7/8
Gardiquimod™	Патентная публикация США № 20110077263 Формула: C ₁₇ H ₂₃ N ₅ O	Соединение имидазохинолина	TRL-7 или TLR-7/8
			
Локсорибин	Gorden KB. et al., 2005. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. <i>J Immunol.</i> 174(3):1259-68. 2. Schindler U. & Baichwal VR., 1994. Three NF-κB binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. <i>Mol Cell Biol</i> , 14(9):5820-5831. Формула: C ₁₃ H ₁₇ N ₅ O ₆	Аналог гуанозина	TRL-7 или TLR-7/8
			
Поли(dT)	Jurk M. et al., 2006. Modulating responsiveness of human TLR7 and 8 to small molecule ligands with T-rich phosphorothiate oligodeoxynucleotides. <i>Eur J Immunol.</i> 36(7):1815-26. 2. Gorden KKB. et al., 2006. Oligodeoxynucleotides Differentially Modulate Activation of TLR7 and TLR8 by Imidazoquinolines. <i>J. Immunol.</i> 177: 8164-8170. 3. Gorden KKB. et al., 2006. Cutting Edge: Activation of Murine TLR8 by a Combination of	Гомополимер тимидина ODN (17 мер)	TRL-7 или TLR-7/8

	Imidazoquinoline Immune Response Modifiers and PolyT Oligodeoxynucleotides <i>J. Immunol.</i> , 177: 6584-6587.		
R848	<p>Henmi H. et al. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. <i>Nat Immunol</i>, 3(2):196-200. 2. Jurk m. et al. 2002. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R848. <i>Nat Immunol</i>, 3(6):499. 3. Gordon KKB. et al., 2006. Cutting Edge: Activation of Murine TLR8 by a Combination of Imidazoquinoline Immune Response Modifiers and PolyT Oligodeoxynucleotides <i>J. Immunol.</i>, 177: 6584-6587</p> <p>Формула: $C_{17}H_{22}N_4O_2$, HCl</p> 	Соединение имидазохинолина	TRL-7 или TLR-7/8
ODN 1585	Ballas ZK. et al., 2001. Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. <i>J Immunol.</i> 167(9):4878-86	Класс А CpG ODN	TLR-9
ODN 2216		Класс А CpG ODN	TLR-9
ODN 2336	Ballas ZK. et al., 2001. Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. <i>J Immunol.</i> 167(9):4878-86	Класс А CpG ODN	TLR-9
ODN 1668	Heit A. et al., 2004. CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. <i>J Immunol.</i> 172(3):1501-7	Класс В CpG ODN	TLR-9
ODN 1826	Z Moldoveanu, L Love-Homan, W.Q Huang, A.M Krieg CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus Vaccine, 16 (1998), pp. 1216-1224	Класс В CpG ODN	TLR-9
ODN 2006 (ODN 7909 или PF-3512676)	Z Moldoveanu, L Love-Homan, W.Q Huang, A.M Krieg CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus Vaccine, 16 (1998), pp. 1216-1224	Класс В CpG ODN	TLR-9
ODN 2007	Krieg, A; CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. <i>Annu Rev Immunol</i> 2002, 20: 709	Класс В CpG ODN	TLR-9
ODN 2395	Roda JM. et al., 2005. CpG-containing oligodeoxynucleotides act through TLR9 to enhance the NK cell cytokine response to antibodycoated tumor cells. <i>J Immunol.</i> 175(3):1619-27.	Класс С CpG ODN	TLR-9
ODN M362	Hartmann G, Battiany J, Poeck H, et al.: Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. <i>Eur J Immunol</i> 2003, 33:1633-41	Класс С CpG ODN	TLR-9
ODN 1018	Magone, M. T., Chan, C. C., Beck, L., Whitcup, S. M., Raz, E. (2000) Systemic or mucosal administration of immunostimulatory DNA inhibits early and late phases of murine allergic conjunctivitis <i>Eur. J. Immunol.</i> 30,1841-1850	Класс В	TLR-9 agonist
CL401	Формула: $C_5H_9N_5O_4S$	Двойной агонист TLR agonist	TLR-2 и TLR-7

			
Адилиполин™ (CL413;)	Формула: C ₉₁ H ₁₄₅ N ₁₇ O ₁₂ S 	Двойной агонист TLR	TLR-2 и TLR-7
CL531	Формула: C ₉₂ H ₁₄₄ N ₁₆ O ₁₄ S 	Двойной агонист TLR	TLR-2 и TLR-7
CL572	Формула: C ₄₁ H ₆₅ N ₅ O ₇ S 	Двойной агонист TLR	TLR-2 человека, TLR-7 мыши и TLR-7 человека
Адифектин™ (CL347;)	Формула: C ₇₂ H ₁₃₄ N ₁₁ O ₆ P 	Агонист TLR и носитель нуклеиновой кислоты	TLR-7
CL419	Формула: C ₄₉ H ₉₇ N ₅ O ₅ S 	Агонист TLR и носитель нуклеиновой кислоты	TLR-2
PamadiFectin™ (CL553;)	Формула: C ₆₇ H ₁₁₈ N ₁₂ O ₈ S 	Агонист TLR и носитель нуклеиновой кислоты	TLR-2 и TLR-7
Пептидогликан		TLR-лиганд; расположение на поверхности клетки (<i>Expert Rev Clin Pharmacol</i> 4(2): 275-289, 2011)	TLR-1/2; TLR-2/6
Диацилированный липопептид	Bu Witt-Beckmann u. et al., 2005. Toll-like receptor 6-independent signaling by diacylated lipopeptides. <i>Eur J Immunol.</i> 35(1):282-9	TLR-лиганд; расположение на поверхности клеток	TLR-2/6
Триацилированный липопептид	Aliprantis ac et al., 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. <i>Science.</i> 285(5428):736-9. Ozinsky a. et al., 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. <i>PNAS.</i> 97(25):13766-71. 3	TLR-лиганд; расположение на поверхности клеток	TLR-1/2
Липополисахарид (LPS)	Нет данных	TLR лиганд; расположение на поверхности клеток; внутриопухолевое введение для лечения глиомы. (см., например, Mariani CL, Rajon D, Bova FJ, Streit WJ.	TLR-4

		Nonspecific immunotherapy with intratumoral lipopolysaccharide and zymosan A but not GM-CSF leads to an effective anti-tumor response in subcutaneous RG-2 gliomas. J. Neurooncol. 2007; 85(3):231-240.)	
CpG 7909		Внутривенное введение для лечения неходжкинской лимфомы. (см., например, Link BK, Ballas ZK, Weisdorf D, et al. Oligodeoxynucleotide CpG 7909 delivered as intravenous infusion demonstrates immunologic modulation in patients with previously treated non-Hodgkin lymphoma. J. Immunother. 2006; 29(5):558-568.)	TLR-9
852A		Внутривенное введения для лечения меланомы и других злокачественных новообразований [12,55]; (см., например, Dudek AZ, Yunis C, Harrison LI, et al. First in human Phase I trial of 852A, a novel systemic Toll-like receptor 7 agonist, to activate innate immune responses in patients with advanced cancer. Clin. Cancer Res. 2007; 13(23):7119-7125'; Dummer R, Hauschild A, Becker JC, et al. An exploratory study of systemic administration of the Toll-like receptor-7 agonist 852A in patients with refractory metastatic melanoma. Clin. Cancer Res. 2008; 14(3):856-864.	TLR-7
		Внутривенное введение для лечения хронической лимфоцитарного лейкоза (см., например, Spaner DE, Shi Y, White D, et al. A Phase I/II trial of TLR7 agonist immunotherapy in chronic lymphocytic leukemia. Leukemia. 2010; 24(1):222-226.)	
Амплиген		Внутривенное введение для лечения хронического синдрома усталости [60]; внутривенное введение для лечения ВИЧ (см., например, Thompson KA, Strayer DR, Salvato PD, et al. Results of a double-blind placebo-controlled study of the double-stranded RNA drug polyI:polyC12U in the treatment of HIV infection. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996; 15(7):580-	TLR-3

		587. [PubMed: 8874076])	
Резиквимод		Пероральное введение для лечения гепатита С (см., например, Pockros PJ, Guyader D, Patton H, et al. Oral resiquimod in chronic HCV infection: safety and efficacy in 2 placebo-controlled, double-blind Phase IIa studies. J. Hepatol. 2007; 47(2):174-182.); Местное нанесение для лечения вируса простого герпеса 2 (см., например, Mark KE, Corey L, Meng TC, et al. Topical resiquimod 0.01% gel decreases herpes simplex virus type 2 genital shedding: a randomized, controlled trial. J. Infect. Dis. 2007; 195(9):1342-1331.)	TLR-7/8
АНА975		Пероральное введение для лечения гепатита (см., например, Fletcher S, Steffy K, Averett D. Masked oral prodrugs of Toll-like receptor 7 agonists: a new approach for the treatment of infectious disease. Curr. Opin. Investigative Drugs. 2006; 7(8):702-708.)	TLR-7
Имиквимод		Имидазохинолиновое	TLR-7
(InvivoGen)		соединение; местное нанесение для лечения базальной карциномы (см., например, Schulze HJ, Cribier B, Requena L, et al. Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from a randomized vehicle-controlled Phase III study in Europe. Br. J. Dermatol. 2005; 152(5):939-947; Quirk C, Gebauer K, Owens M, Stampone P. Two-year interim results from a 5-year study evaluating clinical recurrence of superficial basal cell carcinoma after treatment with imiquimod 5% cream daily for 6 weeks. Australas. J. Dermatol. 2006; 47(4):258-265.); Местное применение для лечения плоскоклеточного рака (см., например Ondo AL, Mings SM, Pestak RM, Shanler SD. Topical combination therapy for cutaneous squamous cell carcinoma in situ with 5-fluorouracil cream and imiquimod cream in patients who have failed topical monotherapy. J. Am. Acad.	

		<p>Dermatol. 2006; 55(6):1092-1094.) Местное применение для лечения меланомы (см., например, Turza K, Dengel LT, Harris RC, et al. Effectiveness of imiquimod limited to dermal melanoma metastases, with simultaneous resistance of subcutaneous metastasis. J. Cutan. Pathol. 2009 DOI: 10.1111/j.1600-0560.2009.01290.x. (Epub ссылка для печати); (см., например, Green DS, Dalgleish AG, Belonwu N, Fischer MD, Bodman-Smith MD. Topical imiquimod and intralesional interleukin-2 increase activated lymphocytes and restore the Th1/Th2 balance in patients with metastatic melanoma. Br. J. Dermatol. 2008; 159(3):606-614.); Местное применение для лечения внутриэпителиальной неоплазии влагалища (см., например, Van Seters M, Van Beurden M, Ten Kate FJ, et al. Treatment of vulvar intraepithelial neoplasia with topical imiquimod. N. Engl. J. Med. 2008;</p>	
		<p>358(14):1465-1473.); Местное применение для лечения кожных лимфом (см., например, Stavrakoglou A, Brown VL, Coutts I. Successful treatment of primary cutaneous follicle centre lymphoma with topical 5% imiquimod. Br. J. Dermatol. 2007; 157(3):620-622.); Местное применение в качестве вакцины против вируса папилломы человека (HPV) (см., например, Daayana S, Elkord E, Winters U, et al. Phase II trial of imiquimod and HPV therapeutic vaccination in patients with vulval intraepithelial neoplasia. Br. J. Cancer. 2010; 102(7):1129-1136.); Подкожно/внутримышечное введение: New York esophageal squamous cell carcinoma 1 cancer antigen (NY-ESO-1) protein vaccine for melanoma (see, e.g., Adams S, O'Neill DW, Nonaka D, et al. Immunization of malignant melanoma patients with full-length NY-ESO-1 protein using TLR7 agonist imiquimod as</p>	

		vaccine adjuvant. J. Immunol. 2008; 181(1):776-784.)	
Монофосфорильный липид А (MPL)		<p>Подкожное/внутримышечное введение для проведения вакцинации против HPV (см., например, Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, et al. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomized control trial. Lancet. 2006; 367(9518):1247-1255.);</p> <p>Подкожное/внутримышечное введение для проведения вакцинации против немелкоклеточного рака легкого (см., например, Butts C, Murray N, Maksymiuk A, et al. Randomized Phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIB and IV non-small-cell lung cancer. J. Clin. Oncol. 2005; 23(27):6674-6681.)</p>	TLR-4
СрG 7909 (по есть, PF-3512676)		<p>Подкожное/внутримышечное введение для лечения немелкоклеточного рака легких (см., например, Manegold C, Gravenor D, Woytowicz D, et al. Randomized Phase II trial</p>	TLR-9
		<p>of a Toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer. J. Clin. Oncol. 2008; 26(24):3979- 3986; Readett, D.; Denis, L.; Krieg, A.; Benner, R.; Hanson, D. PF-3512676 (CPG 7909) a Toll-like receptor 9 agonist - status of development for non-small cell lung cancer (NSCLC). Presented at: 12th World Congress on Lung Cancer; Seoul, Korea. 2-6 сентября 2007);</p> <p>Подкожное/внутримышечное введение для лечения метастатической меланомы (см., например, Pashenkov M, Goess G, Wagner C, et al. Phase II trial of a Toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. J. Clin. Oncol. 2006; 24(36):5716-5724.;</p> <p>Подкожное/внутримышечное введение; Мелан А-пептидная вакцина против меланомы (см.,</p>	

		например, Speiser DE, Lienard D, Rufer N, et al. Rapid and strong human CD8+ T cell responses to vaccination with peptide, IFA, and CpG oligodeoxynucleotide 7909. J. Clin. Invest. 2005; 115(3): 739-746; Appay V, Jandus C, Voelter V, et al. New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site. J. Immunol. 2006; 177(3):1670-1678.); Подкожное/внутримышечное введение; NY-ESO-1 белковая вакцина (см., например, Valmori D, Souleimanian NE, Tosello V, et al. Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007; 104(21):8947-8952.)	
CpG 1018 ISS		Подкожное/внутримышечное введение для лечения лимфомы (см., например, Friedberg JW, Kim H, McCauley M, et al. Combination immunotherapy with a CpG oligonucleotide	TLR-9
		(1018 ISS) and rituximab in patients with non-Hodgkin lymphoma: increased interferon- α/β -inducible gene expression, without significant toxicity. Blood. 2005; 105(2):489-495; Friedberg JW, Kelly JL, Neuberger D, et al. Phase II study of a TLR-9 agonist (1018 ISS) with rituximab in patients with relapsed or refractory follicular lymphoma. Br. J. Haematol. 2009; 146(3):282-291.)	
Бацилла Кальметта-Герена (BCG)	Нет данных	Внутрипухоловое введение для лечения рака мочевого пузыря (см., например, Simons MP, O'Donnell MA, Griffith TS. Role of neutrophils in BCG immunotherapy for bladder cancer. Urol. Oncol. 2008; 26(4):341-345.)	TLR-2
Зимосан А		Внутрипухоловое введение для лечения глиомы (см., например, Mariani CL, Rajon D, Bova FJ, Streit WJ. Nonspecific immunotherapy with intratumoral lipopolysaccharide and zymosan A but not GM-CSF leads to an effective anti-tumor response in	TLR-2
		subcutaneous RG-2 gliomas. J. Neurooncol. 2007; 85(3):231-240.)	

В других случаях иммунный стимулятор может представлять собой вирус, например, онколитический вирус. Онколитический вирус представляет собой вирус, который избирательно заражает, реплицирует и/или избирательно убивает раковые клетки. Вирусы по настоящему изобретению включают, без ограничения, аденовирусы, вирусы простого герпеса, вирусы кори, вирусы болезни Ньюкасла, парвовирусы, полиовирусы, реовирусы, вирусы долины Сенеки, ретровирусы, вирусы осповакцины, вирусы вецикулярного стоматита, лентивирусы, рабдовирусы, вирусы sindvis, вирусы Коксаки, поксвирусы и другие. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения агент представляет собой рабдовирус, например, VSV. Рабдовирусы могут быстро реплицироваться с высоким содержанием IFN. В других конкретных вариантах осуществления агент является диким представителем, таким как вирус Мараба, с двойной мутацией MG1, вирус Фармингтона, вирус Караджас. Вирусные агенты по настоящему изобретению включают мутантные вирусы (например, VSV с мутацией A51 в матрице или M, белок), трансгенномодифицированные вирусы (например, VSV-hIFN β), вирусы, несущие -TNF α , -LT α /TNF β , -TRAIL, FasL, -TL1 α , химерные вирусы (например, бешенства) или псевдотипированные вирусы (например, вирусы, псевдотипированные G-белками из LCMV или других вирусов). В некоторых случаях вирус по настоя-

щему изобретению будет выбран для снижения нейротоксичности. Вирусы в целом и, в частности, онколитические вирусы известны в данной области.

В некоторых вариантах осуществления агент представляет собой убитую частицу NRRP VSV или противоопухолевую вакцину прайм-буст. NRRP представляют собой VSV дикого типа, которые были модифицированы для получения инфекционного вектора, который больше не может реплицироваться или распространяться, но сохраняет онколитические и иммуностимулирующие свойства. NRRP могут быть получены с использованием гамма-облучения, УФ-излучения или бусульфана. Конкретные комбинированные терапии включают прайм-буст с адено-MAGE3 (антиген меланомы) и/или Maraba-MG1-MAGE3. Другие специфические комбинированные методы лечения включают в себя УФ-убитые или гамма-облученные убитые VSR NRRP дикого типа. NRRP могут демонстрировать низкую или отсутствующую нейротоксичность. NRRP могут быть использованы, например, при лечении глиомы, гематологических (жидких) опухолей или множественной миеломы.

В некоторых случаях агент по настоящему изобретению представляет собой штамм вакцины, ослабленный вирус, или микроорганизм, или убитый вирус, или микроорганизм. В некоторых случаях агентом могут быть, например, BCG, живые или мертвые вакцины против бешенства или вакцина против гриппа.

Неограничивающие примеры вирусов по настоящему изобретению, например, онколитических вирусов, приведены в табл. 3. Хотя табл. 3 включает предлагаемые механизмы или применения для предложенных вирусов, способы и композиции по настоящему изобретению не ограничены этими механизмами или их применением.

Таблица 3
Агенты

Штамм	Модификация/Описание	Вирус	Клиническое испытание; Показание; Путь; Статус; Ссылка
Онкорин (H101)	E1B-55k-	Аденовирус	Фаза 2; SCCHN; внутриопухолевый (IT); завершено; Xu RH, Yuan ZY, Guan ZZ, Cao Y, Wang HQ, Hu XH, Feng JF, Zhang Y, Li F, Chen ZT, Wang JJ, Huang JJ, Zhou QH, Song ST. [Phase II clinical study of intratumoral H101, an E1B deleted adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with cancer]. Ai Zheng. 2003 Dec;22(12):1307-10. Chinese.
Онкорин (H101)	E3-	Аденовирус	Фаза 3; SCCHN; B.O.; завершено; Xia ZJ, Chang JH, Zhang L, Jiang WQ, Guan ZZ, Liu JW, Zhang Y, Hu XH, Wu GH, Wang HQ, Chen ZC, Chen JC, Zhou QH, Lu JW, Fan QX, Huang JJ, Zheng X. [Phase III randomized clinical trial of intratumoral injection of E1B gene-deleted adenovirus (H101) combined with cisplatin-based chemotherapy in treating squamous cell cancer of head and neck or esophagus]. Ai Zheng. 2004 Dec;23(12):1666-70. Chinese.
Опух-015	E1B-55k-	Аденовирус	Фаза 1; Метастазы в легких; внутривенный (IV); Завершено; Nemunaitis J, Cunningham C, Buchanan A, Blackburn A, Edelman G, Maples P, Netto G, Tong A, Randlev B, Olson S, Kirn D. Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus

			(ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. Gene Ther. 2001 May;8(10):746-59.
Onyx-015	ЕЗВ-	Аденовирус	<p>Фаза 1; Глиома; Внутривенной; Завершено; Chiocca EA, Abbed KM, Tatter S, Louis DN, Hochberg FH, Barker F, Kracher J, Grossman SA, Fisher JD, Carson K, Rosenblum M, Mikkelsen T, Olson J, Markert J, Rosenfeld S, Nabors LB, Brem S, Phuphanich S, Freeman S, Kaplan R, Zwiebel J. A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1B-Attenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. Mol Ther. 2004 Nov;10(5):958-66.</p> <p>Фаза 1; Рак яичников; внутривенный (IV); Завершено; Vasey PA, Shulman LN, Campos S, Davis J, Gore M, Johnston S, Kirn DH, O'Neill V, Siddiqui N, Seiden MV, Kaye SB. Phase I trial of intraperitoneal injection of the E1B-55-kd-gene-deleted adenovirus ONYX-015 (dl1520) given on days 1 through 5 every 3 weeks in patients with recurrent/refractory epithelial ovarian cancer. J Clin Oncol. 2002 Mar 15;20(6):1562-9.</p> <p>Фаза 1; SCCHN; В.О.; Завершено; Ganly I, Kirn D, Eckhardt G, Rodriguez GI, Soutar DS, Otto R, Robertson AG, Park O, Gulley ML, Heise C, Von Hoff DD, Kaye SB. A phase I study of Onyx-015, an E1B attenuated adenovirus, administered intratumorally to patients with recurrent head and neck cancer. Clin Cancer Res. 2000 Mar;6(3):798-806. Erratum in: Clin Cancer Res 2000 May;6(5):2120. Clin Cancer Res 2001 Mar;7(3):754. Eckhardt SG [исправлено на Eckhardt G].</p> <p>Фаза 1; Твердые опухоли; В.В.; Завершено; Nemunaitis J, Senzer N, Sarmiento S, Zhang YA, Arzaga R, Sands B, Maples P, Tong AW. A phase I trial of intravenous infusion of ONYX-015 and enbrel in solid tumor patients. Cancer Gene Ther. 2007 Nov;14(11):885-93. Epub 2007 Aug 17.</p> <p>Фаза 1; Саркома; В.О.; Завершено; Galanis E, Okuno SH, Nascimento AG, Lewis BD, Lee RA, Oliveira AM, Sloan JA, Atherton P, Edmonson JH, Erlichman C, Randlev B, Wang Q, Freeman S, Rubin J. Phase I-II trial of ONYX-015 in combination with MAP chemotherapy in patients with advanced sarcomas. Gene Ther. 2005 Mar;12(5):437-45.</p> <p>Фаза 1/2; ПанCa; В.О.; Завершено;</p>

		<p>Hecht JR, Bedford R, Abbruzzese JL, Lahoti S, Reid TR, Soetikno RM, Kirn DH, Freeman SM. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. Clin Cancer Res. 2003 Feb;9(2):555-61.</p> <p>Фаза 2; CRC; B.B.; Завершено; Hamid O, Varterasian ML, Wadler S, Hecht JR, Benson A 3rd, Galanis E, Uprichard M, Omer C, Bycott P, Hackman RC, Shields AF. Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2003 Apr 15;21(8):1498-504.</p> <p>Фаза 2; Гепатобилиарный; B.B.; Завершено; Makower D, Rozenblit A, Kaufman H, Edelman M, Lane ME, Zwiebel J, Haynes H, Wadler S. Phase II clinical trial of intralesional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in patients with hepatobiliary tumors with correlative p53 studies. Clin Cancer Res. 2003 Feb;9(2):693-702.</p> <p>Фаза 2; CRC, PanCa; внутриаартериальный (IA); Завершено; Reid T, Galanis E, Abbruzzese J, Sze D, Wein LM, Andrews J, Randlev B, Heise C, Uprichard M, Hatfield M, Rome L, Rubin J, Kirn D. Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase II viral, immunologic, and clinical endpoints. Cancer Res. 2002 Nov 1;62(21):6070-9.</p> <p>Фаза 2; SCCHN; B.O.; Завершено; Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner M, Vokes E, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Blackburn A, Romel L, Randlev B, Kaye S, Kirn D. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. J Clin Oncol. 2001 Jan 15;19(2):289-98.</p> <p>Фаза 2; SCCHN; B.O.; Завершено; Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Brusio P, Kaye SB, Hong WK, Kirn DH. a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. Nat Med. 2000 Aug;6(8):879-85.</p> <p>Фаза 2; CRC; B.B.; Завершено; Reid TR, Freeman S, Post L, McCormick F,</p>
		<p>Hecht JR, Bedford R, Abbruzzese JL, Lahoti S, Reid TR, Soetikno RM, Kirn DH, Freeman SM. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. Clin Cancer Res. 2003 Feb;9(2):555-61.</p> <p>Фаза 2; CRC; B.B.; Завершено; Hamid O, Varterasian ML, Wadler S, Hecht JR, Benson A 3rd, Galanis E, Uprichard M, Omer C, Bycott P, Hackman RC, Shields AF. Phase II trial of intravenous CI-1042 in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol. 2003 Apr 15;21(8):1498-504.</p> <p>Фаза 2; Гепатобилиарный; B.B.; Завершено; Makower D, Rozenblit A, Kaufman H, Edelman M, Lane ME, Zwiebel J, Haynes H, Wadler S. Phase II clinical trial of intralesional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in patients with hepatobiliary tumors with correlative p53 studies. Clin Cancer Res. 2003 Feb;9(2):693-702.</p> <p>Фаза 2; CRC, PanCa; внутриаартериальный (IA); Завершено; Reid T, Galanis E, Abbruzzese J, Sze D, Wein LM, Andrews J, Randlev B, Heise C, Uprichard M, Hatfield M, Rome L, Rubin J, Kirn D. Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase II viral, immunologic, and clinical endpoints. Cancer Res. 2002 Nov 1;62(21):6070-9.</p> <p>Фаза 2; SCCHN; B.O.; Завершено; Nemunaitis J, Khuri F, Ganly I, Arseneau J, Posner M, Vokes E, Kuhn J, McCarty T, Landers S, Blackburn A, Romel L, Randlev B, Kaye S, Kirn D. Phase II trial of intratumoral administration of ONYX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. J Clin Oncol. 2001 Jan 15;19(2):289-98.</p> <p>Фаза 2; SCCHN; B.O.; Завершено; Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Brusio P, Kaye SB, Hong WK, Kirn DH. a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. Nat Med. 2000 Aug;6(8):879-85.</p> <p>Фаза 2; CRC; B.B.; Завершено; Reid TR, Freeman S, Post L, McCormick F,</p>

			Sze DY. Effects of Onyx-015 among metastatic colorectal cancer patients that have failed prior treatment with 5-FU/leucovorin. Cancer Gene Ther. 2005 Aug;12(8):673-81.
CG7060	контроль PSA	Аденовирус	Фаза 1; Рак простаты; В.О.; Завершено; DeWeese TL, van der Poel H, Li S, Mikhak B, Drew R, Goemann M, Hamper U, DeJong R, Detorie N, Rodriguez R, Haulk T, DeMarzo AM, Piantadosi S, Yu DC, Chen Y, Henderson DR, Carducci MA, Nelson WG, Simons JW. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. Cancer Res. 2001 Oct 15;61(20):7464-72.
CG7870/CV787	Пробасин-Е1А крысы	Аденовирус	Фаза 1/2; Рак простаты; В.В.; Завершено; Small EJ, Carducci MA, Burke JM, Rodriguez R, Fong L, van Ummersen L, Yu DC, Aimi J, Ando D, Working P, Kirn D, Wilding G. A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer. Mol Ther. 2006 Jul;14(1):107-17. Epub 2006 May 9.
CG7870/CV787	hPSA-E1B, E3+	Аденовирус	Фаза 1/2; Рак простаты; В.В.; Прекращено в 2005 году
CG0070	E2F-1, GM-CSF	Аденовирус	Фаза 2/3; Рак мочевого пузыря; Внутриполостной; Еще не начато; Ramesh N, Ge Y, Ennist DL, Zhu M, Mina M, Ganesh S, Reddy PS, Yu DC. CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer. Clin Cancer Res. 2006 Jan 1;12(1):305-13.
Теломелизин	hTERT	Аденовирус	Фаза 1; Твердые опухоли; В.О.; Завершено; Nemunaitis J, Tong AW, Nemunaitis M, Senzer N, Phadke AP, Bedell C, Adams N, Zhang YA, Maples PB, Chen S, Pappen B, Burke J, Ichimaru D, Urata Y, Fujiwara T. A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors. Mol Ther. 2010 Feb;18(2):429-34. doi: 10.1038/mt.2009.262. Epub 2009 Nov 24.
Ad5-CD/TKrep	CD/TK	Аденовирус	Фаза 1; Рак простаты; В.О.; завершено; Freytag SO, Khil M, Stricker H, Peabody J, Menon M, DePeralta-Venturina M, Nafziger D, Pegg J, Paielli D, Brown S, Barton K, Lu M, Aguilar-Cordova E, Kim JH. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the

			treatment of locally recurrent prostate cancer. Cancer Res. 2002 Sep 1;62(17):4968-76. Фаза 1; Рак простаты; В.О.; Завершено; Freytag SO, Stricker H, Fegg J, Paielli D, Pradhan DC, Peabody J, DePeralta-Venturina M, Xia X, Brown S, Lu M, Kim JH. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly diagnosed, intermediate- to high-risk prostate cancer. Cancer Res. 2003 Nov 1;63(21):7497-506.
Ad5-D24-RGD	RGD, Delta-24	Аденовирус	Фаза 1; рак яичника; В.Б.; завершено; Kimball KJ, Preuss MA, Barnes MN, Wang M, Siegal GP, Wan W, Kuo H, Saddekni S, Stockard CR, Grizzle WE, Harris RD, Aurigemma R, Curriel DT, Alvarez RD. A phase I study of a tropism-modified conditionally replicative adenovirus for recurrent malignant gynecologic diseases. Clin Cancer Res. 2010 Nov 1;16(21):5277-87. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0791. Epub 2010 Oct 26. Фаза 1; Глиома; В.О.; Идет набор Фаза 1/2; Глиома; В.О.; Идет набор
Ad5-SSTR/TK-RGD	SSTR, TK, RGD	Аденовирус	Фаза 1; Рак яичника; В.Б.; Активно; Ramesh N, Ge Y, Ennist DL, Zhu M,
			Mina M, Ganesh S, Reddy PS, Yu DC. CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer. Clin Cancer Res. 2006 Jan 1;12(1):305-13.
CGTG-102	Ad5/3, GM-CSF	Аденовирус	Фаза 1/2; Солидные опухоли; В.О.; Не открыто; Koski A, Kangasniemi L, Escutenaire S, Pesonen S, Cerullo V, Diaconu I, Nokisalmi P, Raki M, Rajecski M, Guse K, Ranki T, Oksanen M, Holm SL, Haavisto E, Karioja-Kallio A, Laasonen L, Partanen K, Ugolini M, Helminen A, Karli E, Hannuksela P, Pesonen S, Joensuu T, Kanerva A, Nieminki A. Treatment of cancer patients with a serotype 5/3 chimeric oncolytic adenovirus expressing GMCSF. Mol Ther. 2010 Oct;18(10):1874-84. doi: 10.1038/mt.2010.161. Epub 2010 Jul 27.
CGTG-102	Дельта-24	Аденовирус	Фаза 1; Солидные опухоли; IT/В.В.; Идет набор
INGN-007 (VRX-007)	wtE1a, ADP	Аденовирус	Фаза 1; Солидные опухоли; В.О.; не открыто; Lichtenstein DL, Spencer JF, Doronin K, Patra D, Meyer JM, Shashkova EV, Kuppuswamy M, Dhar D, Thomas MA, Tollefson AE, Zumstein LA, Wold WS, Toth K. An acute toxicology study with INGN 007, an oncolytic adenovirus vector, in mice

			and permissive Syrian hamsters; comparisons with wild-type Ad5 and a replication-defective adenovirus vector. <i>Cancer Gene Ther.</i> 2009 Aug;16(8):644-54. doi: 10.1038/cgt.2009.5. Epub 2009 Feb 6.
ColoAd1	Ad3/11p	Аденовирус	Фаза 1/2; CRC, HCC; ; Не открыто; Kuhn I, Harden P, Bauzon M, Chartier C, Nye J, Thorne S, Reid T, Ni S, Lieber A, Fisher K, Seymour L, Rubanyi GM, Harkins RN, Hermiston TW. Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer. <i>PLoS One.</i> 2008 Jun 18;3(6):e2409. doi: 10.1371/journal.pone.0002409.
CAVATAK	-	Вирус Коксаки (CVA21)	Фаза 1; Меланома; В.О.; Завершено Фаза 2; Меланома; В.О.; Идет набор Фаза 1; SCCHN; В.О.; Завершено Фаза 1; Сплитные опухоли; В.В.; Идет набор
Талимоген лагерпарепвек (OncoVEX)	GM-CSF	Вирус простого герпеса	Фаза 1; Твердые опухоли; В.О.; Завершено; Hu JC, Coffin RS, Davis CJ, Graham NJ, Groves N, Guest PJ, Harrington KJ, James ND, Love CA, McNeish I, Medley LC, Michael A, Nutting CM, Pandha HS, Shorrock CA, Simpson J, Steiner J, Steven NM, Wright D, Coombes RC. A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. <i>Clin Cancer Res.</i> 2006 Nov 15;12(22):6737-47.
Талимоген лагерпарепвек (OncoVEX)	ICP34.5 (-)	Вирус простого герпеса	Фаза 2; Меланома; В.О.; Завершено; Kaufman HL, Kim DW, DeRaffele G, Mitcham J, Coffin RS, Kim-Schulze S. Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. <i>Ann Surg Oncol.</i> 2010 Mar;17(3):718-30. doi: 10.1245/s10434-009-0809-6; Senzer NN, Kaufman HL, Amatruda T, Nemunaitis M, Reid T, Daniels G, Gonzalez R, Glaspy J, Whitman E, Harrington K, Goldsweig H, Marshall T, Love C, Coffin R, Nemunaitis JJ. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. <i>J Clin Oncol.</i> 2009 Dec 1;27(34):5763-71. doi: 0.1200/JCO.2009.24.3675. Epub 2009 Nov 2.
Талимоген лагерпарепвек (OncoVEX)	ICP47 (-)	Вирус простого герпеса	Фаза 3; Меланома; В.О.; Активно
Талимоген лагерпарепвек (OncoVEX)	Us11 ↑	Вирус простого герпеса	Фаза 1/2; SCCHN; В.О.; Завершено; Harrington KJ, Hingorani M, Tanay MA, Hickey J, Bhide SA, Clarke PM, Renouf LC, Thway K, Sibtain A,

			McNeish IA, Newbold KL, Goldsweig H, Coffin R, Nutting CM. Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. Clin Cancer Res. 2010 Aug 1;16(15):4005-15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0196.
G207	ICP34.5(-), ICP6(-)	Вирус простого герпеса	Фаза 1/2; Глиома; В.О.; Завершена; Markert JM, Liechty PG, Wang W, Gaston S, Braz E, Karrasch M, Nabors LB, Markiewicz M, Lakeman AD, Palmer CA, Parker JN, Whitley RJ, Gillespie GY. Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated pre- and post-tumor resection for recurrent GBM. Mol Ther. 2009 Jan;17(1):199-207. doi: 10.1038/mt.2008.228. Epub 2008 Oct 28; Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, Gillespie GY, Todo T, Hunter WD, Palmer CA, Feigenbaum F, Tornatore C, Tufaro F, Martuza RL. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. Gene Ther. 2000 May;7(10):867-74.
G207	LacZ(+)	Вирус простого герпеса	Фаза 1; Глиома; В.О.; Завершено
G47Delta	From G207, ICP47-	Вирус простого герпеса	Фаза 1; Глиома; В.О.; Идет набор; Todo T, Martuza RL, Rabkin SD,
			Johnson PA. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 May 22;98(11):6396-401. Epub 2001 May 15. PubMed PMID: 11353831; PubMed Central PMCID: PMC33479.
HSV 1716 (Sepehvir)	ICP34.5(-)	Вирус простого герпеса	Фаза 1; Солидные опухоли, исключая ЦНС; В.О.; Идет набор Фаза 1; SCCHN; В.О.; Завершено; Mace AT, Ganly I, Soutar DS, Brown SM. Potential for efficacy of the oncolytic Herpes simplex virus 1716 in patients with oral squamous cell carcinoma. Head Neck. 2008 Aug;30(8):1045-51. doi: 10.1002/hed.20840. Фаза 1; Глиома; В.О.; Завершено; Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, Mabbs R, Petty R, Fraser M, Hadley D, Patterson J, Brown SM, Rampling R. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumor following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. Gene Ther. 2004 Nov;11(22):1648-58; Papanastassiou V, Rampling R, Fraser M, Petty R, Hadley D, Nicoll J, Harland J, Mabbs R, Brown M. The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5(-)) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoral injection

			<p>into human malignant glioma: a proof of principle study. <i>Gene Ther.</i> 2002 Mar;9(6):398-406.</p> <p>Фаза 1; Меланомы; В.О.; MacKie RM, Stewart B, Brown SM. Intralesional injection of herpes simplex virus 1716 in metastatic melanoma. <i>Lancet.</i> 2001 Feb 17;357(9255):525-6.</p> <p>Фаза 1; Мезотелиома; В.Б.; не активно</p>
HF10	штамм HSV-1 HF	Вирус простого герпеса	<p>Фаза 1; Силидные опухоли; В.О.; идет набор</p> <p>Фаза 1; Рак поджелудочной железы; В.О.; Завершено; Nakao A, Kasuya H, Sahin TT, Nomura N, Kanzaki A, Misawa M, Shiota T, Yamada S, Fujii T, Sugimoto H, Shikano T, Nomoto S, Takeda S, Kodera Y, Nishiyama Y. A phase I dose-escalation clinical trial of intraoperative direct intratumoral injection of HF10 oncolytic virus in non-resectable patients with advanced pancreatic cancer. <i>Cancer Gene Ther.</i> 2011 Mar;18(3):167-75. doi: 10.1038/cgt.2010.65. Epub 2010 Nov 19.</p> <p>Фаза 1; Рак молочной железы; В.О.; Завершено; Kimata H, Imai T, Kikumori T, Teshigahara O, Nagasaka T, Goshima F, Nishiyama Y, Nakao A. Pilot study of oncolytic viral therapy using mutant herpes simplex virus (HF10) against recurrent metastatic breast cancer. <i>Ann Surg Oncol.</i> 2006 Aug;13(8):1078-84. Epub 2006 Jul 24.</p> <p>Фаза 1; SCCHN; В.О.; Завершено; Fujimoto Y, Mizuno T, Sugiura S, Goshima F, Kohno S, Nakashima T, Nishiyama Y. Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent head and neck squamous cell carcinoma. <i>Acta Otolaryngol.</i> 2006 Oct;126(10):1115-7.</p>
NV1020		Вирус простого герпеса	<p>Фаза 1; метастазы в печени CRC; IA; Завершено; Fong Y, Kim T, Bhargava A, Schwartz L, Brown K, Brody L, Covey A, Karrasch M, Getrajdman G, Mescheder A, Jarnagin W, Kemeny N. A herpes oncolytic virus can be delivered via the vasculature to produce biologic changes in human colorectal cancer. <i>Mol Ther.</i> 2009 Feb;17(2):389-94. doi: 10.1038/mt.2008.240. Epub 2008 Nov 18.</p>
MV-CEA	CEA	Вирус кори (Edmonston)	<p>Фаза 1; Рак яичника; В.Б.; Завершено; Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, Long HJ, Peethambaram PP, Barrette BA, Kaur JS, Haluska PJ Jr, Aderca I, Zollman PJ, Sloan JA, Keeney G, Atherton PJ, Podratz KC, Dowdy SC, Stanhope CR, Wilson TO, Federspiel MJ, Peng KW, Russell SJ. Phase I trial of intraperitoneal</p>

			administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. <i>Cancer Res.</i> 2010 Feb 1;70(3):875-82. doi: 10.1158/0008-5472.CCR-09-2762. Epub 2010 Jan 26. Фаза 1; Глиома; В.О.; Идет набор
MV-NIS	NIS	Вирус кори (Edmonston)	Фаза 1; Миелома; В.В.; Идет набор Фаза 1; Рак яичника; В.В.; Идет набор Фаза 1; Мезотелиома; В.В.; Идет набор Фаза 1; SCCHN; В.О.; не начато
NDV-HUJ	-	Вирус болезни Ньюкасла	Фаза 1/2; Глиома; В.В.; Завершено; Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, Linetsky E, Rasooly L, Greenbaum E, Rozenman-Yair S, Panet A, Libson E, Irving CS, Galun E, Siegal T. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. <i>Mol Ther.</i> 2006 Jan;13(1):221-8. Epub 2005 Oct 28; Pecora AL, Rizvi N, Cohen GI, Meropol NJ, Sterman D, Marshall JL, Goldberg S, Gross P, O'Neil JD, Groene WS, Roberts MS, Rabin H, Bamat MK, Lorence RM. Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers. <i>J Clin Oncol.</i> 2002 May 1;20(9):2251-66.
PV701	-	Вирус болезни Ньюкасла	Фаза 1; Силидные опухоли; В.В.; Завершено; Laurie SA, Bell JC, Atkins HL, Roach J, Bamat MK, O'Neil JD, Roberts MS, Groene WS, Lorence RM. A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization. <i>Clin Cancer Res.</i> 2006 Apr 15;12(8):2555-62.
MTH-68/H	-	Вирус болезни Ньюкасла	Фаза 2; Силидные опухоли; Ингаляционный; Завершено; Csatory LK, Eckhardt S, Bukosza I, Czegledi F, Fenyvesi C, Gergely P, Bodey B, Csatory CM. Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. <i>Cancer Detect Prev.</i> 1993;17(6):619-27.
H-1PV	-	Парвовирус	Фаза 1/2; Глиома; IT/В.В.; Идет набор; Geletneky K, Kiprianova I, Ayache A, Koch R, Herrero Y Calle M, Deleu L, Sommer C, Thomas N, Rommelaere J, Schlehofer JR. Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models. <i>Neuro Oncol.</i> 2010 Aug;12(8):804-14. doi: 10.1093/neuonc/noq023. Epub 2010 Mar 18.
PVS-RIPO	IRES	Полиовирус (Sabin)	Фаза 1; Глиома; В.О.; Идет набор; Goetz C, Gromeier M. Preparing an oncolytic poliovirus recombinant for clinical application against

			glioblastoma multiforme. Cytokine Growth Factor Rev. 2010 Apr-Jun;21(2-3):197-203. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.02.005. Epub 2010 Mar 17. Review.
Реолизин		Реовирус (Dearing)	Фаза 1/2; Глиома; В.О.; Завершено; Forsyth P, Roldán G, George D, Wallace C, Palmer CA, Morris D, Cairncross G, Matthews MV, Markert J, Gillespie Y, Coffey M, Thompson B, Hamilton M. A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas. Mol Ther. 2008 Mar;16(3):627-32. doi: 10.1038/sj.mt.6300403. Epub 2008 Feb 5. Фаза 1; Перитонеальный рак; В.В.; Идет набор Фаза 1; Сolidные опухоли; В.В.; Завершено; Vidal L, Pandha HS, Yap TA, White CL, Twigger K, Vile RG, Melcher A, Coffey M, Harrington KJ, DeBono JS. A phase I study of intravenous oncolytic reovirus type 3 Dearing in patients with advanced cancer. Clin Cancer Res. 2008 Nov 1;14(21):7127-37. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0524. Фаза 1; Сolidные опухоли; В.В.; Идет набор Фаза 1; CRC; В.В.; Идет набор
			Фаза 2; Саркома; В.В.; Завершено Фаза 2; Меланома; В.В.; Отложено Фаза 2; Перитонеальный рак, яичника; В.В.; Идет набор Фаза 2; Рак поджелудочной железы; В.В.; Идет набор Фаза 2; SCCHN; В.В.; Нет набор Фаза 2; Меланома; В.В.; Идет набор Фаза 2; Рак поджелудочной железы; В.В.; Идет набор Фаза 2; Рак легкого; В.В.; Идет набор Фаза 3; SCCHN; В.В.; Идет набор
NTX-010		Вирус долины Сенека	Фаза 2; мелкоклеточный рак легких; В.В.; идет набор; PMID: 17971529
Тоса 511	CD	Ретровирус	Фаза 1/2; Глиома; В.О.; Идет набор; Tai CK, Wang WJ, Chen TC, Kasahara N. Single-shot, multicycle suicide gene therapy by replication-competent retrovirus vectors achieves long-term survival benefit in experimental glioma. Mol Ther. 2005 Nov;12(5):842-51.
ЖХ-594	GM-CSF	Вирус осповакцины (штамм Wyeth)	Фаза 1; CRC; В.В.; Идет набор
ЖХ-594	TK(-)	Вирус осповакцины (штамм Wyeth)	Фаза 1; Сolidные опухоли; В.В.; Завершено Фаза 1; HCC; В.О.; Завершено; Park BH, Hwang T, Liu TC, Sze DY, Kim JS, Kwon HC, Oh SY, Han SY, Yoon JH, Hong SH, Moon A, Speth K, Park C, Ahn YJ, Daneshmand M, Rhee BG,

			<p>Pinedo HM, Bell JC, Kirn DH. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. <i>Lancet Oncol.</i> 2008 Jun;9(6):533-42. doi: 10.1016/S1470-2045(08)70107-4. Epub 2008 May 19. Erratum in: <i>Lancet Oncol.</i> 2008 Jul;9(7):613.</p> <p>Фаза 1; Детские солидные опухоли ; В.О.; Идет набор</p> <p>Фаза 1; Меланома; В.О.; Завершено; Hwang TH, Moon A, Burke J, Ribas A, Stephenson J, Breitbart CJ, Daneshmand M, De Silva N, Parato K, Diallo JS, Lee YS, Liu TC, Bell JC, Kirn DH. A mechanistic proof-of-concept clinical trial with JX-594, a targeted multi-mechanistic oncolytic poxvirus, in patients with metastatic melanoma. <i>Mol Ther.</i> 2011 Oct;19(10):1913-22. doi: 10.1038/mt.2011.132. Epub 2011 Jul 19.</p> <p>Фаза 1/2; Меланома; В.О.; Завершено; Mastrangelo MJ, Maguire HC Jr, Eisenlohr LC, Laughlin CE, Monken CE, McCue PA, Kovatich AJ, Lattime EC. Intratumoral recombinant GM-CSF-encoding virus as gene therapy in patients with cutaneous melanoma. <i>Cancer Gene Ther.</i> 1999 Sep-Oct;6(5):409-22.</p>
			<p>Фаза 2; HCC; В.О.; Нет набор, анализ данных</p> <p>Фаза 2B; HCC; В.В.; Идет набор</p> <p>Фаза 1/2; CRC; IV/В.О.; Идет набор</p> <p>Фаза 2; CRC; В.О.; Набора пока нет</p>
vvDD-CDSR	TK-, VGF-, LacZ, CD, Соматостатин R	Вирус осповакцины (Western Reserve)	<p>Фаза 1; Солидные опухоли; IT/В.В.; Идет набор; McCart JA, Mehta N, Scollard D, Reilly RM, Carrasquillo JA, Tang N, Deng H, Miller M, Xu H, Libutti SK, Alexander HR, Bartlett DL. Oncolytic vaccinia virus expressing the human somatostatin receptor SSTR2: molecular imaging after systemic delivery using ¹¹¹In-pentetreotide. <i>Mol Ther.</i> 2004 Sep;10(3):553-61.</p>
GL-ONC1	люцифераза Renilla	Вирус осповакцины	<p>Фаза 1; Солидные опухоли; В.В.; Идет набор; Gentschev I, Müller M, Adelfinger M, Weibel S, Grummt F, Zimmermann M, Bitzer M, Heisig M, Zhang Q, Yu YA, Chen NG, Stritzker J, Lauer UM, Szalay AA. Efficient colonization and therapy of human hepatocellular carcinoma (HCC) using the oncolytic vaccinia virus strain GLV-h68. <i>PLoS One.</i> 2011;6(7):e22069. doi: 10.1371/journal.pone.0022069. Epub 2011 Jul 11.</p>
(GLV-h68)	GFP, β -gal	Вирус осповакцины	<p>Фаза 1/2; Перитонеальный карциноматоз; В.В.; Идет набор</p>
Lister	β -glucoronidase	Вирус осповакцины	<p>Фаза 1/2; SCCHN; В.В.; Идет набор</p>

VSV-hIFN β	IFN- β	Вирус везикулярного стоматита (Indiana)	Фаза 1; HCC; B.O.; Идет набор
DNX-2401	DNatrix	Аденовирус	См., например, <i>Molecular Therapy</i> 21(10): 1814-1818, 2013 и <i>Journal of Vascular and Interventional Radiology</i> 24(8): 1115-1122, 2013
Toca511	Tocagen	Лентивирус	См., например, <i>Molecular Therapy</i> 21(10): 1814-1818, 2013 и <i>Journal of Vascular and Interventional Radiology</i> 24(8): 1115-1122, 2013
HSV T-VEC		HSV	См., например, <i>Molecular Therapy</i> 21(10): 1814-1818, 2013 и <i>Journal of Vascular and Interventional Radiology</i> 24(8): 1115-1122, 2013
H-1 ParvOryx		Парвовирус	См., например, <i>Molecular Therapy</i> 21(10): 1814-1818, 2013 и <i>Journal of Vascular and Interventional Radiology</i> 24(8): 1115-1122, 2013
VACV-TRAIL	(см. работу Karolina Autio и Suvi Parvainen, Хельсинки)	Вирус осповакцины	См., например, <i>Molecular Therapy</i> 21(10): 1814-1818, 2013 и <i>Journal of Vascular and Interventional Radiology</i> 24(8): 1115-1122, 2013
VACV-CD40L	(см. работу Karolina Autio и Suvi Parvainen, Хельсинки)	Вирус осповакцины	См., например, <i>Molecular Therapy</i> 21(10): 1814-1818, 2013 и <i>Journal of Vascular and Interventional Radiology</i> 24(8): 1115-1122, 2013
Maraba	(см. работу Dave Stojdl и John Bell)	Рабдовирус	Кандидаты для доклинических/клинических исследований
Maraba-MG1	(см. работу Dave Stojdl и John Bell)	Рабдовирус	
Maraba MG1-hMAGE-A3	(см. работу Dave Stojdl, Brian Litchy и John Bell)	Рабдовирус	Кандидаты для доклинических/клинических исследований
		Синдбис вирус	Кандидаты для доклинических/клинических исследований
		Вирус Коксаки A21	Кандидаты для доклинических/клинических исследований
MYXV		Поксвирус	Кандидат для доклинического/клинического исследования Chan WM, Rahman MM, McFadden G. Oncolytic myxoma virus: the path to clinic. <i>Vaccine</i> . 2013 Sep 6;31(39):4252-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.056. Epub 2013 May 29.
WT VSV ('Rose lab')	Родительский rWT VSV для большинства VSV-основанных OV. Ген L и 49 остатков на N-конце гена N получены из штамма Mudd-Summers, остальные из штамма San Juan (оба являются серотипами Indiana)		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, <i>J Gen Virol</i> 93(12): 2529-2545, 2012; Lawson ND, Stillman EA, Whitt MA, Rose JK. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> . 1995 May 9;92(10):4477-81. Erratum in: <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i> 1995 Sep 12;92(19):9009.)
VSV-WT-XN2 (или XN1)	Производное rWT VSV ('Rose lab'). Получен с использованием pVSV-XN2 (или pVSV-XN1), полноразмерной плазмиды VSV, содержащей сайты		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a

	uniqueXhoI и NheI, фланкированные транскрипционными стартом и стоп сигналами VSV между генами G и L. pVSV-XN2 (или pVSV-XN1) обычно использовали для получения рекомбинантных VSV, кодирующих экстремальный ген		flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10.; Schnell MJ, Buonocore L, Kretzschmar E, Johnson E, Rose JK. Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 15;93(21):11359-65.)
WT VSV ('Wertz lab')	Альтернативный rWT VSV. Гены N, P, M и L происходят из штамма San Juan; ген G - из штамма Orsay (оба являются серотипом Indiana). Редко используется в исследованиях OV		Рекомбинантный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Whelan SP, Ball LA, Barr JN, Wertz GT. Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Aug 29;92(18):8388-92.)
VSV-WT-GFP, -RFP, -Luc, -LacZ	WT VSV, кодирующий репортерные гены (между G и L) для отслеживания вирусной инфекции. На основе pVSV-XN2. Токсичность сходна VSV-WT		Рекомбинантный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic
			virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Fernandez et al., "Genetically Engineered Vesicular Stomatitis Virus in Gene Therapy: Application for Treatment of Malignant Disease", J Virol 76:895-904 (2002); Lan Wu, Tian-gui Huang, Marcia Meseck, Jennifer Altomonte, Oliver Ebert, Katsunori Shinzaki, Adolfo Garcia-Sastre, John Fallon, John Mandeli, and Savio L.C. Woo. Human Gene Therapy. June 2008, 19(6): 635-647)
VSV-G/GFP	Последовательность GFP, слитая с геном G VSV, введена между генами G и L WT (в дополнение к G WT). Токсичность сходна VSV-WT		Рекомбинантный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Dalton, K. P. & Rose, J. K. (2001). Vesicular stomatitis virus glycoprotein containing the entire green fluorescent protein on its cytoplasmic domain is incorporated efficiently into virus particles. Virology 279, 414-421)
VSV-rp30	Производное VSV-G/GFP. Получено при позитивной		Рекомбинантный VSV использовали в качестве онколитического

	селекции на клетках глиобластомы и содержит две "молчащие" мутации и две миссенс-мутации, одну в Р и одну в L. 'rp30' указывает на 30 повторов пассажей		противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Wollmann, G., Tattersall, P. & van den Pol, A. N. (2005). Targeting human glioblastoma cells: comparison of nine viruses with oncolytic potential. J Virol 79, 6005-6022.)
VSV-p1-GFP, VSV-p1-RFP	VSV, экспрессирующий GFP, или красный флуоресцентный белок (RFP или dsRed) reporter gene at position 1. Attenuated because all VSV genes are moved downward, to positions 2-6. Безопасный и по-прежнему эффективный как OV		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Wollmann, G., Rogulin, V., Simon, I., Rose, J. K. & van den Pol, A. N. (2010). Some attenuated variants of vesicular stomatitis virus show enhanced oncolytic activity against human glioblastoma cells relative to normal brain cells. J Virol 84, 1563-1573.)
VSV-dG-GFP (или RFP) (с дефектами репликации)	Аналогично VSV-p1-GFP или VSV-p1-RFP, как описано выше, но с делецией гена G. Не удается		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см.,
	провести второй раунд инфицирования. Низкая способность убивать злокачественные клетки		например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Wollmann, G., Rogulin, V., Simon, I., Rose, J. K. & van den Pol, A. N. (2010). Some attenuated variants of vesicular stomatitis virus show enhanced oncolytic activity against human glioblastoma cells relative to normal brain cells. J Virol 84, 1563-1573.)
VSV-ΔP, -ΔL, -ΔG (полурепликационно-компетентный)	Сам по себе вирус не может реплицироваться в виду того, что один ген VSV удален, но при одновременном заражении вирусами происходит эффективная репликация, безопасность и онколизис (особенно комбинация VSVΔG/VSVΔL). VSVΔP и VSVΔL содержат dsRed вместо соответствующего вирусного гена. VSVΔG содержит ген GFP вместо G		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Muik, A., Dold, C., Geiß, Y., Volk, A., Werbizki, M., Dietrich, U. & von Laer, D. (2012). Semireplication-competent vesicular stomatitis virus as a novel platform for oncolytic virotherapy. J Mol Med (Berl) 90, 959-970.)
VSV-M51R	Ммутант; мутация M51R введена в M		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см.,

			<p>например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol</i>. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Kopecky, S. A., Willingham, M. C. & Lyles, D. S. (2001). Matrix protein and another viral component contribute to induction of apoptosis in cells infected with vesicular stomatitis virus. <i>J Virol</i> 75, 12169-12181.)</p>
VSV-ΔM51, VSV-ΔM51-GFP, -RFP, -FLuc, -Luc, -LacZ	М-мутант; мутация ΔM51 введена в М. Кроме того, некоторые рекомбинанты кодируют репортерный ген между G and L		<p>Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol</i>. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Stojdl, D. F., Lichty, B. D., tenOever, B. R., Paterson, J. M., Power, A. T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L. & other authors (2003). VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. <i>Cancer Cell</i> 4, 263-275.; Power, A. T. & Bell, J. C. (2007). Cell-based delivery of oncolytic</p>
			<p>viruses: a new strategic alliance for a biological strike against cancer. <i>Mol Ther</i> 15, 660-665.; Wu, L., Huang, T. G., Meseck, M., Altomonte, J., Ebert, O., Shinozaki, K., Garcia-Sastre, A., Fallon, J., Mandeli, J. & Woo, S. L. (2008). rVSV(MD51)-M3 is an effective and safe oncolytic virus for cancer therapy. <i>Hum Gene Ther</i> 19, 635-647.)</p>
VSV-*Mmut	М мутант; VSV в который введена одна мутация или комбинация мутаций в следующие положения М: M33A, M51R, V221F и S226R		<p>Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol</i>. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Hoffmann, M., Wu, Y. J., Gerber, M., Berger-Rentsch, M., Heimrich, B., Schwemle, M. & Zimmer, G. (2010). Fusion-active glycoprotein G mediates the cytotoxicity of vesicular stomatitis virus M mutants lacking host shut-off activity. <i>J Gen Virol</i> 91, 2782-2793.)</p>
VSV-M6PY >A4-R34E and other M mutants	М-мутант; мутация M51R введена в ген М, и, кроме того, мутации в мотив PSAP (остатки 37-40) М		<p>Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a</p>

			flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Irie, T., Carnero, E., Okumura, A., Garcí'a-Sastre, A. & Harty, R. N. (2007). Modifications of the PSAP region of the matrix protein lead to attenuation of vesicular stomatitis virus in vitro and in vivo. J Gen Virol 88, 2559-2567.)
VSV-M(mut)	M мутант; VSV M остатки 52-54 мутированы от DTY до AAA. M(мут) не может блокировать экспорт ядерной мРНК		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Heiber, J. F. & Barber, G. N. (2011). Vesicular stomatitis virus expressing tumor suppressor p53 is a highly attenuated, potent oncolytic agent. J Virol 85, 10440-10450.)
VSV-G5, -G5R, -G6, -G6R	G мутант; VSV-экспрессирующий мутант G с аминокислотными заменами в различных положениях (между остатками 100 и 471). Запускает секрецию IFN типа I в качестве M51R, но		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic
	ингибирует клеточную транскрипцию и трансляцию белков хозяина, таких как WT		virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Janelle, V., Brassard, F., Lapierre, P., Lamarre, A. & Poliquin, L. (2011). Mutations in the glycoprotein of vesicular stomatitis virus affect cytopathogenicity: potential for oncolytic virotherapy. J Virol 85, 6513-6520.)
VSV-CT1	G мутант; цитоплазматический хвост G-белка усечен с 29 по 1 а.к. Уменьшение нейропатологии, но высокий онколитический эффект		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Ozduman, K., Wollmann, G., Ahmadi, S. A. & van den Pol, A. N. (2009). Peripheral immunization blocks lethal actions of vesicular stomatitis virus within the brain. J Virol 83, 11540-11549.; Wollmann, G., Rogulin, V., Simon, I., Rose, J. K. & van den Pol, A. N. (2010). Some attenuated variants of vesicular stomatitis virus show enhanced oncolytic activity against human glioblastoma cells relative to normal brain cells. J Virol 84,

VSV-CT9-M51	G-мутант, цитоплазматический хвост VSV-G был урезан с 29 до 9 а.к., также имеется мутация ΔM51. Ослабленная нейротоксичность и хорошие способности OV		1563-1573.) Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Ozduman, K., Wollmann, G., Ahmadi, S. A. & van den Pol, A. N. (2009). Peripheral immunization blocks lethal actions of vesicular stomatitis virus within the brain. J Virol 83, 11540-11549.; Wollmann, G., Rogulin, V., Simon, I., Rose, J. K. & van den Pol, A. N. (2010). Some attenuated variants of vesicular stomatitis virus show enhanced oncolytic activity against human glioblastoma cells relative to normal brain cells. J Virol 84, 1563-1573.)
VSV-DV/F(L289A) (same as rVSV-F)	Чужеродный гликопротеин; VSV-экспрессия гена слитого белка NDV между G и L. Мутация L289A в этом белке позволяет индуцировать только синцитий (без белка NDV HN)		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Ebert, O., Shinozaki, K., Kournioti, C., Park, M. S., Garcí'a-Sastre, A. & Woo, S. L. (2004). Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. Cancer Res 64, 3265-3270.)
VSV-S-GP	Чужеродные гликопротеин; VSV с нативным геном G удален и заменен на модифицированный гликопротеиновый белок (GP) вируса Sindbis (SV). Также экспрессия GM-CSF и GFP мыши (между SV GP и VSV L). Модифицированный белок GP распознает рецептор Her2, который сверхэкспрессирован на большом числе клеток рака молочной железы		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Bergman, I., Griffin, J. A., Gao, Y. & Whitaker-Dowling, P. (2007). Treatment of implanted mammary tumors with recombinant vesicular stomatitis virus targeted to Her2/neu. Int J Cancer 121, 425-430.)
VSV-ΔG-SV5-F	Чужеродный гликопротеин; ген G VSV заменен на ген слитого белка обезьяньего вируса парагриппа 5 (SV5-F)		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Chang, G., Xu, S.,

			Watanabe, M., Jayakar, H. R., Whitt, M. A. & Gingrich, J. R. (2010). Enhanced oncolytic activity of vesicular stomatitis virus encoding SV5-F protein against prostate cancer. <i>J Urol</i> 183, 1611-1618.)
VSV-FAST, VSV-(ΔM51)-FAST	Чужеродный гликопротеин; VSV или VSV-MA51 экспрессирующий p14 FAST белок реовируса рептилий (между G и L VSV)		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol</i> . 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Brown, C. W., Stephenson, K. B., Hanson, S., Kucharczyk, M., Duncan, R., Bell, J. C. & Lichty, B. D. (2009). The p14 FAST protein of reptilian reovirus increases vesicular stomatitis virus neuropathogenesis. <i>J Virol</i> 83, 552-561.)
VSV-LCMV-GP (replication-defective)	Чужеродный гликопротеин; VSV без гена G псевдотипировали с нейротрофическим гликопротеином LCMV		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol</i> . 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Muik, A., Kneiske, I.,
			Werbizki, M., Wilflingseder, D., Giroglou, T., Ebert, O., Kraft, A., Dietrich, U., Zimmer, G. & other authors (2011). Pseudotyping vesicular stomatitis virus with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins enhances infectivity for glioma cells and minimizes neurotropism. <i>J Virol</i> 85, 5679-5684.)
VSV-H/F, -αEGFR, -αFR, -αPSMA (replication-defective)	Чужеродные гликопротеины; VSV без гена G псевдотипировали F and H MV с дисплеем одноцепочечных антител (scFv), специфических для рецептора эпидермального фактора роста, фолатного рецептора или антигена, специфического для мембран клеток предстательной железы Перенацеленные VSV на клетки, экспрессирующие рецептор-мишень		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol</i> . 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Ayala-Breton, C., Barber, G. N., Russell, S. J. & Peng, K. W. (2012). Retargeting vesicular stomatitis virus using measles virus envelope glycoproteins. <i>Hum Gene Ther</i> 23, 484-491.)
VSV-let-7wt	микроРНК-мишень; let-7 микроРНК встраивают в 3'-UTR M VSV		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen</i>

			Virology. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Edge, R. E., Falls, T. J., Brown, C. W., Lichty, B. D., Atkins, H. & Bell, J. C. (2008). A let-7 microRNA-sensitive vesicular stomatitis virus demonstrates tumor-specific replication. Mol Ther 16, 1437-1443.)
VSV-124, -125, -128, -134 (M or L mRNA)	микроРНК-мишени; VSV рекомбинанты с нейрон-специфическими микроРНК (miРНК-124, 125, 128 или 134) мишенями встраивали в 3'-UTR M или L VSV мРНК		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Kelly, E. J., Nace, R., Barber, G. N. & Russell, S. J. (2010). Attenuation of vesicular stomatitis virus encephalitis through microRNA targeting. J Virol 84, 1550-1562.)
VSV-mp53, VSV-M(mut)-mp53	Супрессор злокачественного новообразования; VSV [WT или M(мут)] экспрессирующий ген p53 мыши. M(мут) с остатками 52-54 белка M, измененными с DTY на AAA		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Heiber, J. F. & Barber, G. N. (2011). Vesicular stomatitis virus expressing tumor suppressor p53 is a highly attenuated, potent oncolytic agent. J Virol 85, 10440-10450.)
VSV-C : U	Ген самоубийства; VSV, экспрессирующий CD/UPRT E.coli, катализирующий модификацию 5-фторцитозина на химиотерапевтический 5-FU		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Porosnicu, M., Mian, A. & Barber, G. N. (2003). The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene. Cancer Res 63, 8366-8376.)
VSV-C	Ген самоубийства; VSV-MA51, экспрессирующий CD/UPRT		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Leveille, S., Samuel,

			S., Goulet, M. L. & Hiscott, J. (2011). Enhancing VSV oncolytic activity with an improved cytosine deaminase suicide gene strategy. <i>Cancer Gene Ther</i> 18, 435-443.)
VSV-(MA51)-NIS	Ген самоубийства; VSV-MA51, экспрессирующий ген NIS человека (для радиовирусной терапии с ¹³¹ I)		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol</i> . 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Goel, A., Carlson, S. K., Classic, K. L., Greiner, S., Naik, S., Power, A. T., Bell, J. C. & Russell, S. J. (2007). Radioiodide imaging and radiovirotherapy of multiple myeloma using VSV(D51)-NIS, an attenuated vesicular stomatitis virus encoding the sodium iodide symporter gene. <i>Blood</i> 110, 2342-2350.)
VSV-TK	Ген самоубийства; VSV, экспрессирующий ТК; может улучшить онколизис при использовании нетоксичного пролекарства ганцикловира		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol</i> . 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Fernandez, M., Porosnicu, M., Markovic, D. & Barber, G. N. (2002). Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. <i>J Virol</i> 76, 895-904.)
VSV-mIFN β , -hIFN β , VSV-rIFN β	Иммуномодуляция; VSV, экспрессирующий ген IFN-- β мыши (m), человека (h) или крыс (r)		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol</i> . 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Jenks, N., Myers, R., Greiner, S. M., Thompson, J., Mader, E. K., Greenslade, A., Griesmann, G. E., Federspiel, M. J., Rakela, J. & other authors (2010). Safety studies on intrahepatic or intratumoral injection of oncolytic vesicular stomatitis virus expressing interferon β in rodents and nonhuman primates. <i>Hum Gene Ther</i> 21, 451-462.; Obuchi, M., Fernandez, M. & Barber, G. N. (2003). Development of recombinant vesicular stomatitis viruses that exploit defects in host defense to augment specific oncolytic activity. <i>J Virol</i> 77, 8843-8856.)

VSV-IL4	Иммуномодуляция; VSV, экспрессирующий IL-4		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Fernandez, M., Porosnicu, M., Markovic, D. & Barber, G. N. (2002). Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease. J Virol 76, 895-904.)
VSV-IFN-NIS	VSV, экспрессирующий IFN β и тироидальный симпортер йодид натрия		Naik S, Nace R, Federspiel MJ, Barber GN, Peng KW, Russell SJ. Curative one-shot systemic virotherapy in murine myeloma. Лейкоз. 2012 Aug;26(8):1870-8. doi: 10.1038/leu.2012.70. Epub 2012 Mar 19.
VSV-IL12	Иммуномодуляция; VSV, экспрессирующий IL-12		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Shin, E. J., Wanna, G. B., Choi, B., Aquila, D., III, Ebert, O., Genden, E. M. & Woo, S. L. (2007a). Interleukin-12 expression enhances vesicular stomatitis virus oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma. Laryngoscope 117, 210-214.)
VSV-IL23	Иммуномодуляция; VSV, экспрессирующий IL-23 Значительно ослабленный в ЦНС, но эффективный OV		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Miller, J. M., Bidula, S. M., Jensen, T. M. & Reiss, C. S. (2010). Vesicular stomatitis virus modified with single chain IL-23 exhibits oncolytic activity against tumor cells in vitro and in vivo. Int J Inference Cytokine Mediator Res 2010, 63-72.)
VSV-IL28	Иммуномодуляция; VSV, экспрессирующий IL-28, представитель семейства IFN типа III (IFN- λ)		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzlishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub

			2012 Oct 10; Wongthida, P., Diaz, R. M., Galivo, F., Kottke, T., Thompson, J., Pulido, J., Pavelko, K., Pease, L., Melcher, A. & Vile, R. (2010). Type III IFN interleukin-28 mediates the antitumor efficacy of oncolytic virus VSV in immunocompetent mouse models of cancer. <i>Cancer Res</i> 70, 4539-4549.)
VSV-opt.hIL-15	Иммуномодуляция; VSV-МΔ51, экспрессирующий секретлируемый на высоком уровне вариант IL-15 человека		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol</i> . 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Stephenson, K. B., Barra, N. G., Davies, E., Ashkar, A. A. & Lichty, B. D. (2012). Expressing human interleukin-15 from oncolytic vesicular stomatitis virus improves survival in a murine metastatic colon adenocarcinoma model through the enhancement of antitumor immunity. <i>Cancer Gene Ther</i> 19, 238-246.)
VSV-CD40L	Иммуномодуляция; VSV, экспрессирующий CD40L, представитель семейства фактора некроза опухоли (TNF)		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a
			flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol</i> . 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Galivo, F., Diaz, R. M., Thanarajasingam, U., Jevremovic, D., Wongthida, P., Thompson, J., Kottke, T., Barber, G. N., Melcher, A. & Vile, R. G. (2010). Interference of CD40L-mediated tumor immunotherapy by oncolytic vesicular stomatitis virus. <i>Hum Gene Ther</i> 21, 439-450.)
VSV-Flt3L	Иммуномодуляция; VSV-МΔ51, экспрессирующий растворимую форму Flt3L, фактор роста, активирующий DC		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol</i> . 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Leveille, S., Goulet, M. L., Lichty, B. D. & Hiscott, J. (2011). Vesicular stomatitis virus oncolytic treatment interferes with tumor-associated dendritic cell functions and abrogates tumor antigen presentation. <i>J Virol</i> 85, 12160-12169.)
VSV/hDCT	Иммуномодуляция; VSV-МΔ51, экспрессирующий hDCT		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см.,

			<p>например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Boudreau, J. E., Bridle, B. W., Stephenson, K. B., Jenkins, K. M., Brunellie` re, J., Bramson, J. L., Lichty, B. D. & Wan, Y. (2009). Recombinant vesicular stomatitis virus transduction of dendritic cells enhances their ability to prime innate and adaptive antitumor immunity. Mol Ther 17, 1465-1472.)</p>
VSV-hgp100	Иммуномодуляция; VSV, экспрессирующий hgp100, измененный само-ТАА агонист, чья толерантность установлена на мышах C57BL/6		<p>Рекombинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Wongthida, P., Diaz, R. M., Galivo, F., Kottke, T., Thompson, J., Melcher, A. & Vile, R. (2011). VSV oncolytic virotherapy in the B16 model depends upon intact MyD88 signaling. Mol Ther 19, 150-158.)</p>
VSV-ova	Иммуномодуляция; VSV, экспрессирующий куриный овальбумин (на модели рака B16ova)		<p>Рекombинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Diaz, R. M., Galivo, F., Kottke, T., Wongthida, P., Qiao, J., Thompson, J., Valdes, M., Barber, G. & Vile, R. G. (2007). Oncolytic immunovirotherapy for melanoma using vesicular stomatitis virus. Cancer Res 67, 2840-2848.)</p>
VSV-gG	Иммуномодуляция; VSV, экспрессирующий гликопротеин G EHV-1, широкий спектр вирусных хемокин-связывающих белков		<p>Рекombинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. J Gen Virol. 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Altomonte, J., Wu, L., Chen, L., Meseck, M., Ebert, O., Garcí'a-Sastre, A., Fallon, J. & Woo, S. L. (2008). Exponential enhancement of oncolytic vesicular stomatitis virus potency by vector-mediated suppression of inflammatory responses in vivo. Mol Ther 16, 146-153.)</p>

VSV-UL141	Иммуномодуляция; VSV, экспрессирующий секретрируемую форму белка цитомегаловируса UL141 человека, как известно, ингибирует функцию NK-клеток, блокируя лиганд NK клетки-активирующих рецепторов		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol.</i> 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Altomonte, J., Wu, L., Meseck, M., Chen, L., Ebert, O., Garcia-Sastre, A., Fallon, J., Mandeli, J. & Woo, S. L. (2009). Enhanced oncolytic potency of vesicular stomatitis virus through vector-mediated inhibition of NK and NKT cells. <i>Cancer Gene Ther</i> 16, 266-278.)
VSV-(Δ51)-M3	Иммуномодуляция; VSV-ΔM51, экспрессирующий гамма-герпесвирус-68 хемокин-связывающий белок M3		Рекомбинатный VSV использовали в качестве онколитического противоракового агента (см., например, Hastie E, Grdzelishvili VZ. Vesicular stomatitis virus as a flexible platform for oncolytic virotherapy against cancer. <i>J Gen Virol.</i> 2012 Dec;93(Pt 12):2529-45. doi: 10.1099/vir.0.046672-0. Epub 2012 Oct 10; Wu, L., Huang, T. G., Meseck, M., Altomonte, J., Ebert, O., Shinozaki, K., Garcia-Sastre, A., Fallon, J., Mandeli, J. & Woo, S. L. (2008). rVSV(ΔM51)-M3 is an effective and safe oncolytic virus for cancer therapy. <i>Hum Gene Ther</i> 19, 635-647.)
HSV-1	Геном и Структура: дцДНК; оболочечный Характерный хозяин: Человек	Герпесвирусы	Клиническая фаза I/II; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
NDV	Геном и структура: дц (-) РНК; оболочечный Характерный хозяин: Птицы	Парамиксовирусы	Клиническая фаза I/II; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
Adeno	Геном и Структура: дцДНК; голый Характерный хозяин: Человек	Аденовирусы	Клиническая фаза I; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
Reo	Геном и Структура: дцДНК; голый Характерный хозяин: Млекопитающие	Реовирусы	Клиническая фаза I; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
Вирус осповакцины	Геном и Структура: дцДНК; оболочечный Характерный хозяин: Коровы/лошади, другие	Поксвирусы	Доклинический in vivo; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
Polio	Геном и структура: дц (+) РНК; голый Характерный хозяин: Человек	Пикорнавирусы	Клиническая фаза I; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
VSV	Геном и структура: дц (-)	Рабдовирусы	Доклинический in vivo; Глиома;

	РНК; оболочечный Характерный хозяин: Скот/москиты		Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
MVM	Геном и Структура: дцДНК; голый Характерный хозяин: Мышь	Парвовирусы	Доклинический in vitro; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
Sindbis	Геном и структура: дц (+) РНК; оболочечный Характерный хозяин: Млекопитающие/москиты	Тогавирусы	Доклинический in vitro; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
PRV	Геном и Структура: дцДНК; оболочечный Характерный хозяин: Свинья	Герпесвирусы	Доклинический in vitro; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
Measles	Геном и структура: дц (-) РНК; оболочечный Характерный хозяин: Человек	Парамиксовирусы	Клиническая фаза I; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
Мухома	Геном и Структура: дцДНК; оболочечный Характерный хозяин: Кролик	Поксвирусы	Доклинический in vivo; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
H1PV	Геном и Структура: дцДНК; голый Характерный хозяин: Крыса	Парвовирусы	Клиническая фаза I; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
SVV	Геном и структура: дц (+) РНК; голый Характерный хозяин: Свинья	Пикорнавирусы	Доклинический in vitro; Глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
HSV (G207) I			Фаза I; Злокачественная глиома; В.О. введение; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81; Markert JM, Medlock MD, Rabkin SD, et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. <i>Canc Ther.</i> 2000;7:867Y874. Фаза I; Злокачественная глиома; В.О. введение; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81; Markert JM, Liechty PG, Wang W, et al. Phase Ib trial of mutant herpes simplex virus G207 inoculated pre- and post-tumor resection for recurrent GBM. <i>Mol Ther.</i> 2009;17:199Y207. Фаза I; Злокачественная глиома; В.О. введение; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81

HSV (1716)		<p>Фаза II; Злокачественная глиома; В.О. введение; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81; Rampling R, Cruickshank G, Papanastassiou V, et al. Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP 34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma. <i>Gene Ther.</i> 2000;7:859Y866.</p> <p>Фаза I; Злокачественная глиома; В.О. введение; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81; Papanastassiou V, Rampling R, Fraser M, et al. The potential for efficacy of the modified (ICP 34.5(j)) herpes simplex virus HSV1716 following intratumoral injection into human malignant glioma: a proof of principle study. <i>Gene Ther.</i> 2002;9:398Y406.</p> <p>Фаза I; Злокачественная глиома; В.О. введение; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81; Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, et al. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumor following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. <i>Gene Ther.</i> 2004;11:1648Y1658.</p> <p>Фаза II; Злокачественная глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81</p>
HSV (G47.4)		<p>Фаза I; Злокачественная глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81</p>
HSV (M032)		<p>Фаза I; Злокачественная глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81</p>
Adv (ONYX-015)		<p>Фаза I; Злокачественная глиома; injection to tumor resection cavity; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81; Chiocca EA, Abbed KM, Tatter S, et al. A phase I open-label, dose-escalation, multi-institutional trial of injection with an E1BAttenuated adenovirus, ONYX-015, into the peritumoral region of recurrent malignant gliomas, in the adjuvant setting. <i>Mol Ther.</i> 2004;</p>

			10:958Y966.
Adv (Delta24-RGD)			Фаза I; Злокачественная глиома; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
RecV			Фаза I; Злокачественная глиома; В.О. введение; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81; Forsyth P, Roldan G, George D, et al. A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas. <i>Mol Ther.</i> 2008;16:627Y632. Фаза I; Злокачественная глиома; Convection enhanced; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
NDV (HUJ)			Фаза I/II; Злокачественная глиома; В.В.; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81; Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, et al. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. <i>Mol Ther.</i> 2006;13:221Y228.
			Фаза I/II; Злокачественная глиома; В.В.; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
NDV (MTH-68)			Ситуационное исследование/Серии; Злокачественная глиома; В.В.; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81; Csatory LK, Bakacs T. Use of Newcastle disease virus vaccine (MTH- 68/H) in a patient with high-grade glioblastoma. <i>JAMA.</i> 1999;281:1588Y1589. Ситуационное исследование/Серии; Злокачественная глиома; В.В.; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81; Csatory LK, Gosztonyi G, Szeberenyi J, et al. MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. <i>J Neurooncol.</i> 2004;67:83Y93. Ситуационное исследование/Серии; Злокачественная глиома; В.В.; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81; Wagner S, Csatory CM, Gosztonyi G, et al. Combined treatment of pediatric high-grade glioma with the oncolytic viral strain MTH-68/H and oral valproic acid. <i>APMIS.</i> 2006;114:731Y743.
Measles (MV-CEA)			Фаза I; Злокачественная глиома; В.О. введение; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
H1 H1PV			Фаза I; Злокачественная глиома; В.О. введение; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81
Polio (PVS-RIPO)			Фаза I; Злокачественная глиома; convection-enhanced В.О. введение; Wollmann et al. Oncolytic virus therapy for glioblastoma multiforme: concepts and candidates. <i>Cancer J.</i> 2012 Jan-Feb;18(1):69-81

Таблица 4

Список биологических ингибиторов контрольных точек, одобренных Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США, или находящихся в процессе клинических испытаний

Мишеневой рецептор или класс лиганда		Общее название или название лекарственного биологического препарата (псевдоним или описание)	Компания
1	CTLA4	Ипилимумаб (MDX-010, 10D1)	BMS
2	CTLA4	Тремелимумаб (CP-675,206, тицилимумаб)	Pfizer
1	PD1	Пембролизумаб (ламбролизумаб, MK-3475)	Merck
2	PD1	Ниволюмаб (MDX-1106, BMS-936558, ONO-4538)	BMS
3	PD1	Пидилизумаб (CT-011, MDV9300)	Medivation (Curetech)
4	PD1	AMP-224 (слитый белок)	GSK/ Amplimmune
5	PD1	AMP-514 (MEDI0680)	GSK/ Amplimmune
6	PD1	AUNP 12 (а пептид)	Aurigene/ Pierre Fabre
7	PD1	PDR001	Novartis
8	PD1	BGB-A317	BeiGene
9	PD1	REGN2810	Regeneron
10	PD-L1	Авелумаб (MSB0010718C)	Pfizer/Merck Serono
11	PD-L1	BMS-935559 (MDX-1105)	BMS/Medarex
12	PD-L1	Атезолизумаб (MPDL3280A, RG7446)	Roche- Genentech
13	PD-L1	Дурвалумаб (MEDI4736)	AZ/Medimmune
14	PD-L1		Novartis (CoStim)
1	LAG3	BMS-986016	BMS
2	LAG3	LAG525	Novartis
3	LAG3	IMP321	ImmuTep
1	TIM3	MBG453	Novartis
1	KIRs	Лирилумаб (IPH2102/BMS-986015)	BMS
1	B7H3/ CD276	MGA271	Macrogenics

Злокачественная опухоль

Способы и композиции по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения широкого спектра различных типов злокачественных новообразований. Специалисту в данной области будет понятно, что, поскольку клетки многих, если не всех видов рака, способны к апоптозу, опосредованному рецептором, способы и композиции по настоящему изобретению широко применимы ко многим, если не всем злокачественным заболеваниям. Комбинаторный подход по настоящему изобретению эффективен при различных агрессивных, рефрактерных опухолевых моделях. В конкретных вариантах осуществления, например, злокачественное новообразование, лечение которого можно осуществлять способом по настоящему изобретению, может представлять собой рак надпочечников, базально-клеточную карциному, рак желчных путей, рак мочевого пузыря, рак кости, рак головного мозга и другие виды рака центральной нервной системы (ЦНС) рак молочной железы, рак шейки матки, хориокарцинома, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак соединительной ткани, рак пищеварительной системы, рак эндометрия, эпифарингеальную карциному, рак пищевода, рак глаз, рак желчного пузыря, рак желудка, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярную карциному, интраэпителиальное новообразование, рак почки, рак гортани, лейкоз, рак печени, метастазы в печени, рак легких, лимфомы, включая лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, меланому, миелому, множественную миелому, нейробластому, мезотелиому, нейроглиому, миелодиспластический синдром, множественную миелому, рак полости рта (например рак губы, языка и глотки), рак яичников, рак у детей, рак поджелудочной железы, панкреатические эндокринные опухоли, рак полового члена, опухоли плазматических клеток, аденоматомоу гипофиза, рак предстательной железы, карциному почек, рак дыхательной системы, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, саркому, рак кожи, рак тонкой кишки, рак желудка, рак яичек, рак щитовидной железы, рак мочеочника, рак мочевой системы и другие карциномы и саркомы. Другие виды злокачественных новообразований известны в данной области.

Злокачественное новообразование может быть злокачественным новообразованием, которое не подходит для лечения только SMC. Способы и композиции по настоящему изобретению могут быть особенно эффективны при злокачественных заболеваниях, которые не поддаются лечению только SMC. Как правило, злокачественное новообразование, резистентное к лечению только с помощью SMC, может быть злокачественным новообразованием, в котором апоптотические пути, опосредованные IAP, значительно не индуцированы. В конкретных вариантах осуществления злокачественное новообразование по настоящему изобретению представляет собой злокачественное новообразование, в котором один или несколько апоптотических путей значительно не индуцированы, то есть не активированы таким образом, чтобы лечение только SMC было достаточным для эффективного лечения злокачественного новообразования. Например, злокачественное новообразование по настоящему изобретению может быть злокачественным новообразованием, в котором апоптотический путь, опосредованный cIAP1/2, значительно не индуцирован.

Злокачественное новообразование по настоящему изобретению может быть рефрактерным злокачественным новообразованием в отношении лечения одним или несколькими агентами. В конкретных вариантах осуществления злокачественное новообразование по настоящему изобретению может быть злокачественным новообразованием, рефрактерным в отношении лечения одним или несколькими агентами (не SMC), а также рефрактерным в отношении лечения одним или несколькими SMC (не другого агента).

Составы и введение

В некоторых случаях доставка "голой", то есть нативной формы, SMC и/или агента может быть достаточной для усиления апоптоза и/или лечения рака. SMC и/или агенты могут вводиться в форме солей, сложных эфиров, амидов, пролекарств, производных и тому подобного, при условии, что соль, сложный эфир, амид, пролекарство или производное являются подходящими фармакологически эффективными, например, способными к усилению апоптоза и/или лечения злокачественного новообразования.

Соли, сложные эфиры, амиды, пролекарства и другие производные SMC или агента могут быть получены с использованием стандартных процедур, известных в области синтетической органической химии. Например, кислая соль SMC и/или агентов может быть получена из формы свободного основания SMC или агента, используя обычную методику, которая обычно предусматривает взаимодействие с подходящей кислотой. Обычно основную форму SMC или агента растворяют в полярном органическом растворителе, таком как метанол или этанол, и к нему добавляют кислоту. Полученная соль либо выпадает в осадок, либо может выводиться из раствора путем добавления менее полярного растворителя. Подходящие кислоты для получения кислотно-аддитивных солей включают, но не ограничиваются ими, как органические кислоты, например уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, яблочную кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, п-толуолсульфоновую кислоту, салициловую кислоту и тому подобное, так и неорганические кислоты, например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и тому подобное.

Кислотно-аддитивную соль можно преобразовать в свободное основание путем обработки подходящим основанием. Некоторые типичные кислотно-аддитивные соли SMC и/или агентов, например галогенные соли, как таковые могут быть получены с использованием хлористоводородной кислоты или бромистоводородной кислоты. И наоборот, получение основных солей SMC и/или агентов по настоящему изобретению может быть осуществлено аналогичным образом с использованием фармацевтически приемлемого основания, такого как гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид аммония, гидроксид кальция, триметиламин или тому подобное. Некоторые характерные основные соли включают, но не ограничиваются ими, соли щелочных металлов, например натриевую соль и соль меди.

Получение сложных эфиров может включать функционализацию, например, гидроксильных и/или карбоксильных групп, которые присутствуют в молекулярной структуре SMC и/или агентов. В некоторых вариантах осуществления сложные эфиры представляют собой ацилзамещенные производные свободных спиртовых групп, то есть фрагменты, полученные из карбоновых кислот формулы RCOOH, где R является алкилом и предпочтительно представляет собой низший алкил. При необходимости эфиры могут быть преобразованы в свободные кислоты, используя обычные процедуры гидрогенолиза или гидролиза.

Также могут быть получены амиды, используя способы, известные в данной области. Например, амид может быть получен из сложного эфира с использованием подходящих аминных реагентов или получен из ангидрида или хлорангидрида кислоты путем взаимодействия с аммиаком или низшим алкиламином.

SMC или агент по настоящему изобретению могут быть объединены с фармацевтически приемлемым носителем (эксципиентом) с образованием фармакологической композиции. Фармацевтически приемлемые носители могут содержать одно или несколько физиологически приемлемых соединений, которые действуют, например, стабилизируя композицию, увеличения или уменьшения абсорбцию SMC или агента или улучшая проникновение через гематоэнцефалический барьер (если необходимо). Физиологи-

чески приемлемые соединения могут включать, например, углеводы (например, глюкозу, сахарозу или декстраны), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту или глутатион), хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки, защитные агенты и усилители захвата (например, липиды), композиции, которые уменьшают клиренс или гидролиз активных агентов или эксципиентов или других стабилизаторов и/или буферов. Другие физиологически приемлемые соединения, в частности, при использовании таблеток, капсул, гелевых капсул и тому подобное, включают, но не ограничиваются ими, связующие вещества, разбавители/наполнители, разрыхлители, смазывающие вещества, суспендирующие агенты и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может усиливать доставку или эффективность SMC или агента.

В различных вариантах осуществления SMC или агент по настоящему изобретению могут быть получены для парентерального, местного, перорального, назального (или иного), ректального или местного введения. Введение может происходить, например, трансдермально, профилактически или с помощью аэрозоля.

Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить в различных стандартных лекарственных формах в зависимости от способа введения. Подходящие стандартные лекарственные формы включают, но не ограничиваются ими, порошки, таблетки, пилюли, капсулы, лепешки, суппозитории, пластыри, назальные спреи, составы для инъекций, имплантируемые составы с замедленным высвобождением и липидные комплексы.

В некоторых вариантах осуществления эксципиент (например, лактоза, сахароза, крахмал, маннит и тому подобное), необязательный разрыхлитель (например, карбонат кальция, карбоксиметилцеллюлоза кальция, натрий крахмал гликолат, кросповидон и тому подобное), связующий агент (например, альфа-крахмал, гуммиарабик, микрокристаллическая целлюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, гидроксипропилцеллюлоза, циклодекстрин и тому подобное) или необязательно смазывающие вещества (например, тальк, магний стеарат, полиэтиленгликоль 6000 и тому подобное) могут быть добавлены к SMC или агенту, и полученная композиция может быть спрессована с получением лекарственной формы для перорального приема (например, таблетки). В конкретных вариантах осуществления спрессованный продукт может быть покрыт, например, для маскировки вкуса спрессованного продукта, для улучшения кишечного растворения спрессованного продукта или для способствования пролонгированного высвобождения SMC или агента. Подходящие вещества для покрытия включают, но не ограничиваются ими, этилцеллюлозу, гидроксиметилцеллюлозу, полиоксиэтиленгликоль, ацетатфталат целлюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы и Eudragit (Rohm & Haas, Germany; метакриловый-акриловый сополимер).

Другие физиологически приемлемые соединения, которые могут быть включены в фармацевтическую композицию, содержащую SMC или агент, могут включать смазывающие агенты, эмульгаторы, диспергирующие агенты или консерванты, которые особенно эффективны для предотвращения роста или действия микроорганизмов. Различные консерванты хорошо известны и включают, например, фенол и аскорбиновую кислоту. Выбор фармацевтически приемлемого носителя (ов), включая физиологически приемлемое соединение, зависит, например, от способа введения SMC или агента и от конкретных физикохимических характеристик SMC или агента.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько эксципиентов для использования в фармацевтической композиции, содержащей SMC или агент, могут быть стерильными и/или по существу свободными от нежелательных веществ. Такие композиции можно стерилизовать обычными способами, известными в данной области. Для различных наполнителей для пероральной дозированной формы, таких как таблетки и капсулы, стерильность не требуется. Стандарты известны в данной области техники, например, стандарт USP/NF.

Фармацевтическая композиция SMC или агента по настоящему изобретению может вводиться как однократное или множественное введение в зависимости от дозировки, требуемой частоты введения и известной или ожидаемой толерантности индивида к фармацевтической композиции с точки зрения дозы и частоты введения. В различных вариантах осуществления композиция может предоставить достаточное количество SMC или агента по настоящему изобретению для эффективного лечения рака.

Количество и/или концентрация SMC или агента, подлежащего введению индивиду, могут широко изменяться и обычно их выбирают на основе активности SMC или агента и особенностей индивида, например вида и веса тела, а также конкретного способа введения и потребности индивида, например, для типа злокачественного новообразования. Дозировка может изменяться для оптимизации терапевтического и/или профилактического режима у конкретного индивида или группы испытуемых.

В некоторых вариантах осуществления SMC или агент по настоящему изобретению вводят в полость рта, например, с помощью лепешки, аэрозольного спрея, полоскания для рта, тампона с покрытием или другого механизма, известного в данной области.

В некоторых вариантах осуществления SMC или агент по настоящему изобретению вводят с помощью твердой пластины-импланта с замедленным высвобождением, вводимой в полость мозга после резекции опухоли во время операции. Пластина-имплант может быть биodeградируемым имплантом из полиангирида, содержащим SMC или поли (I:C). Количество размещаемых капсул-имплантов может зави-

сеть от размера полости резекции после хирургического удаления первичной опухоли головного мозга. Доставка лекарственного препарата из импланта с медленным высвобождением непосредственно в ткань головного мозга исключает проблему системной доставки через гематоэнцефалический барьер. Полимерная матрица может состоять из сополимера 1,3-бис-(*p*- карбоксифеноксипропана и себациновой кислоты (PCPP-SA, молярное отношение 80:20), который растворяется в органическом растворителе вместе с лекарственным средством, высушенным распылением на микрочастицы в диапазоне от 1 до 20 мкм и прессованием в импланты. В некоторых вариантах осуществления жесткие импланты деградируют в двухстадийном процессе, в котором проникновение воды гидролизует ангидридные связи в течение первых 10 ч с последующей разрушением сополимера в окружающую водную среду.

В некоторых вариантах осуществления SMC или агент по настоящему изобретению можно вводить системно (например, перорально или в виде инъекций) в соответствии со стандартными способами, известными в данной области. В некоторых вариантах осуществления SMC или агент могут быть доставлены через кожу с использованием трансдермальных систем доставки лекарств, то есть трансдермального "пластыря", в котором SMC или агенты обычно находятся в ламинарной структуре, которая служит в качестве устройства доставки лекарственного средства, которое должно быть прикреплено к коже. В такой структуре композиция лекарственного средства обычно содержится в слое или резервуаре, лежащем под верхним опорным слоем. Резервуар трансдермального пластыря включает в себя количество SMC или агента, которое в конечном счете доступно для доставки на поверхность кожи. Таким образом, резервуар может включать в себя, например, SMC или агент по настоящему изобретению, в качестве клея на защитном слое пластыря или в любом из множества различных составов матриц, известных в данной области техники. Пластырь может содержать один резервуар или несколько резервуаров.

В конкретных вариантах осуществления чрескожного пластыря, резервуар может содержать полимерную матрицу фармацевтически приемлемого контактного адгезивного материала, который служит для прикрепления системы к коже во время доставки лекарственного средства. Примеры подходящих адгезионных материалов для контакта с кожей включают, но не ограничиваются ими, полиэтилены, полисилоксаны, полиизобутилены, полиакрилаты и полиуретаны. Альтернативно, содержащий SMC и/или агент резервуар и клей для контакта с кожей присутствует в виде отдельных и разделенных слоев, с клеем, лежащим под резервуаром, который, в этом случае, может быть либо полимерной матрицей, как описано выше, жидким или гидрогелевым резервуаром, или иметь другую форму, известную в данной области. Защитный слой в этих ламинатах, который служит верхней поверхностью устройства, предпочтительно действует как основной структурный элемент пластыря и придает устройству значительную гибкость. Вещество, выбранное для защитного слоя, предпочтительно по существу непроницаемо для SMC и/или агента и любых других материалов, которые присутствуют.

Дополнительные составы для местной доставки включают, но не ограничиваются ими, мази, гели, спреи, жидкости и кремы. Мази представляют собой полутвердые препараты, которые обычно основаны на вазелине или других нефтепродуктах. Кремы, включающие SMC или агент, обычно представляют собой вязкие жидкости или полутвердые эмульсии, например эмульсии типа масло-в-воде или вода-в-масле. Основа крема обычно отмывается водой и включают масляную фазу, эмульгатор и водную фазу. Масляная фаза, также иногда называемая "внутренней" фазой, основы крема, как правило, состоит из вазелина и жирного спирта, например цетилового спирта или стеарилового спирта; водная фаза обычно, хотя и не обязательно, превышает объем масляной фазы и обычно содержит увлажнитель. Эмульгатор в составе крема обычно представляет собой неионное, анионное, катионное или амфотерное поверхностно-активное вещество. Конкретную мазь или кремную основу, которую следует использовать, можно выбрать для обеспечения оптимальной доставки лекарственного средства в соответствии с уровнем техники. Как и в случае с другими носителями, основание мази может быть инертным, стабильным, не раздражающим и не сенсибилизирующим.

Также рассматриваются различные буккальные и сублингвальные препараты.

В некоторых вариантах осуществления введение SMC или агента по настоящему изобретению может быть парентеральным. Парентеральное введение может включать внутриспинальное, эпидуральное, интратекальное, подкожное или внутривенное введение. Средства парентерального введения известны в данной области. В конкретных вариантах осуществления парентеральное введение может включать подкожно имплантируемое устройство.

В некоторых вариантах осуществления может быть желательным доставить SMC или агент в мозг. В вариантах осуществления, включая системное введение, для этого может потребоваться прохождение SMC или агента через гематоэнцефалический барьер. В различных вариантах осуществления этому может способствовать совместное введение SMC или агента с молекулами-носителями, такими как катионные дендримеры или богатые аргинином пептиды, которые могут переносить SMC или агент через гематоэнцефалический барьер.

В некоторых вариантах осуществления SMC или агент могут быть доставлены непосредственно в мозг путем введения посредством имплантации биосовместимой системы высвобождения (например, резервуара) путем непосредственного введения через имплантированную канюлю путем введения через имплантированный или частично имплантированный лекарственный насос, или посредством механизмов

аналогичной функции, известных в данной области. В некоторых вариантах осуществления SMC или агент могут быть системно введены (например, введены в вену). В некоторых вариантах осуществления ожидается, что SMC или агент будут транспортироваться через гематоэнцефалический барьер без использования дополнительных соединений, включенных в фармацевтическую композицию, для усиления переноса через гематоэнцефалический барьер.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько SMC или агентов по настоящему изобретению могут быть представлены в виде концентрата, например, в контейнере для хранения или растворимой капсуле, готовой для разбавления или добавления в объем воды, спирта, перекиси водорода или другого разбавителя. Концентрат по настоящему изобретению может быть представлен в определенном количестве SMC или агента и/или конкретного общего объема. Концентрат может быть получен для разбавления в конкретном объеме разбавителей перед введением.

SMC или агент можно вводить перорально в виде таблеток, капсул, эликсиров или сиропов или ректально в форме суппозитория. Соединение также можно вводить местно в виде пены, лосьона, капли, кремов, мазей, смягчающих средств или гелей. Парентеральное введение соединения целесообразно проводить, например, в форме солевых растворов или вместе с соединением, введенным в липосому. В тех случаях, когда соединение само по себе недостаточно растворимо, чтобы быть растворенным, может быть применен солюбилизатор, такой как этанол. Другие подходящие композиции и способы введения известны или могут быть взяты из уровня техники.

SMC или агент по настоящему изобретению можно вводить млекопитающему, нуждающемуся в этом, например млекопитающему с диагнозом "злокачественное новообразование". SMC или агент по настоящему изобретению можно вводить для усиления апоптоза и/или лечения злокачественного новообразования.

Терапевтически эффективная доза фармацевтической композиции по настоящему изобретению может зависеть от возраста индивида, пола индивида, вида индивида, конкретной патологии, тяжести симптомов и общего состояния здоровья индивида.

Настоящее изобретение включает композиции и способы лечения человека, например человека с диагнозом злокачественное новообразование. Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может подходить для введения животному, например, для ветеринарного использования. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения могут включать введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению не человеку, например, приматам, собакам, лошадям, кошкам, свиньям, копытным или лагоморфным организмам или другим видам позвоночных.

Терапия в соответствии с изобретением может проводиться самостоятельно или в сочетании с другой терапией, например, другой терапией злокачественного новообразования, и может осуществляться на дому, в кабинете врача, в клинике, в амбулаторном отделении больницы или в больнице. Лечение обязательно начинается в больнице, чтобы врач мог внимательно наблюдать за последствиями терапии и вносить какие-либо корректировки, которые необходимы или оно может быть начало в амбулаторных условиях. Продолжительность терапии зависит от типа заболевания или расстройства, в отношении которого проводят лечение, возраста и состояния индивида, стадии и типа заболевания индивида и того, как пациент реагирует на лечение.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия по настоящему изобретению дополнительно включает лечение рекомбинантным интерфероном, таким как IFN- α , IFN- β , IFN- γ , пегилированный IFN или липосомальный интерферон. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия по настоящему изобретению дополнительно включает лечение рекомбинантным TNF- α , например, для изолированной перфузии конечности. В конкретных вариантах осуществления комбинированная терапия по настоящему изобретению дополнительно включает в себя лечение одним или несколькими соединениями, индуцирующими TNF- α или IFN, такими как DMXAA, Рибавирин или тому подобное. Дополнительная противораковая иммунотерапия, которая может быть использована в комбинации с настоящим изобретением, включает антитела, например моноклональные антитела, нацеленные на CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2 или другие ингибиторы контрольных точек. Циклические динуклеотиды (CDN) [циклический ди-GMP (гуанозин 5'-монофосфат) (CDG), циклический ди-AMP (аденозин-5'-монофосфат) (CDA) и циклический GMP-AMP (сGAMP)] являются патоген-ассоциированными молекулами (PAMP), которые активируют часть сигнального пути TKB1/фактор регуляции интерферона 3 (IRF3)/интерферон типа 1 посредством стимулирования цитоплазматического домена распознавания рецептора интерферона (STING). В некоторых вариантах осуществления агонисты STING могут быть комбинированы с SMC для лечения злокачественного новообразования.

Пути введения для различных вариантов осуществления включают, но не ограничиваются ими, местное, трансдермальное, назальное и системное введение (такое как внутривенное, внутримышечное, подкожное, ингаляционное, ректальное, буккальное, вагинальное, внутрибрюшинное, внутрисуставное, офтальмологическое или пероральное введение). Как используется в настоящем документе термин "системное введение" относится ко всем недермальным путям введения и, в частности, исключает местный и трансдермальный пути введения.

В любом из вышеприведенных вариантов осуществления способ введения может быть оптимизирован на основе характеристик SMC или агента. В некоторых случаях SMC или агент представляют собой низкомолекулярную молекулу или соединение. В других случаях SMC или агент представляет собой нуклеиновую кислоту. В других случаях агент может быть клеткой или вирусом. В любом из этих или других вариантов осуществления соответствующие композиции и пути введения будут выбраны в соответствии с областью техники.

В вариантах осуществления настоящего изобретения SMC и агент вводят индивиду, нуждающемуся в этом, например, пациенту со злокачественным новообразованием. В некоторых случаях SMC и агент вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления SMC и агент могут присутствовать в одной терапевтической лекарственной форме. В других вариантах осуществления SMC и агент могут вводиться отдельно нуждающемуся индивиду. При введении отдельно, SMC и агент могут вводиться одновременно или в разное время. В некоторых случаях индивид получает единичную дозу SMC и одну дозу агента. В некоторых вариантах осуществления один или несколько SMC и агентов вводятся индивиду в двух или более дозах. В некоторых вариантах осуществления частота введения SMC и частота введения агента не идентичны, то есть SMC вводят с первой частотой, а агент вводят со второй частотой.

В некоторых вариантах осуществления SMC вводят в течение одной недели введения агента. В конкретных вариантах осуществления SMC вводят в течение 3 дней (72 ч) введения агента. В еще более конкретных вариантах осуществления SMC вводят в течение 1 дня (24 ч) введения агента.

В конкретных вариантах осуществления любого из способов настоящего изобретения SMC и агент вводят в течение 28 дней друг от друга или менее, например, в течение 14 дней друг от друга. В некоторых вариантах осуществления любого из способов настоящего изобретения SMC и агент вводят, например, одновременно или в течение 1, 5, 10, 15, 30 мин, 1, 2, 4, 6, 12, 18, 24, 36 ч, 2, 4, 8, 10, 12, 16, 20, 24 или 28 дней друг у друга. В любом из этих вариантов осуществления первое введение SMC по настоящему изобретению может предшествовать первому введению агента по настоящему изобретению. Альтернативно, в любом из этих вариантов осуществления первое введение SMC по настоящему изобретению может следовать за первым введением агента по настоящему изобретению. Поскольку SMC и/или агент по настоящему изобретению могут вводиться индивиду в двух дополнительных дозах и потому, что в таких случаях дозы SMC и агента по настоящему изобретению могут вводиться на разных частотах, не требуется чтобы период времени между введением SMC и введением агента сохранялся постоянным в течение данного курса лечения или для данного индивида.

Один или оба SMC и агент могут вводиться в малой дозе или в высокой дозе. В вариантах осуществления, в которых SMC и агент находятся в составе отдельно, фармакокинетические профили для каждого агента могут быть соответствующим образом сопоставлены с составом, дозировкой и способом введения и тому подобное. В некоторых случаях SMC вводят в стандартной или высокой дозе, и агент вводят при низкой дозе. В некоторых случаях SMC вводят при низкой дозе и агент вводят в стандартной или высокой дозе. В некоторых случаях как SMC, так и агент вводят в стандартной или высокой дозе. В некоторых случаях как SMC, так и агент вводят при низкой дозе.

Дозировка и частота введения каждого компонента комбинации могут контролироваться независимо. Например, один компонент можно вводить три раза в день, тогда как второй компонент можно вводить один раз в день или один компонент можно вводить один раз в неделю, тогда как второй компонент можно вводить один раз в две недели. Комбинированную терапию можно проводить в циклах "включено-выключено", которые включают периоды отдыха, так что организм индивида имеет возможность оправиться от последствий лечения.

Наборы

В общем, наборы по изобретению содержат один или несколько SMC и один или несколько агентов. Они могут быть представлены в наборе в виде отдельных композиций или объединены в одну композицию, как описано выше. Наборы по изобретению могут также содержать инструкции для введения одного или нескольких SMC и одного или нескольких агентов.

Наборы по изобретению могут также содержать инструкции для введения дополнительного фармакологически приемлемого вещества, такого как агент, который известен для лечения злокачественного новообразования, который не является SMC или агентом по настоящему изобретению.

Индивидуально или отдельно составленные агенты могут быть упакованы вместе в виде набора. Неограничивающие примеры включают в себя наборы, которые содержат, например, две таблетки, таблетку и порошок, суппозиторий и жидкость во флаконе, два крема для местного применения, мази, пену и тому подобное. Набор может включать необязательные компоненты, которые способствуют введению единичной дозы пациентам, например, флаконы для восстановления порошкообразных форм, шприцы для инъекций, индивидуальные системы доставки, ингаляторы и тому подобное. Кроме того, набор стандартной дозы может содержать инструкции для приготовления и введения композиций. Набор может быть получен как одноразовая доза для одного индивида, несколько применений для конкретного индивида (в режиме постоянной дозировки или когда отдельные соединения могут изменяться в зависимости от эффективности при прогрессировании терапии); или набор может содержать несколько доз, подходящих для введения нескольким индивидам ("массовая упаковка"). Компоненты набора могут быть собра-

ны в картонные коробки, блистерные упаковки, бутылки, пробирки и тому подобное.

Доза каждого соединения заявленных комбинаций зависит от нескольких факторов, включая: способ введения, заболевание (например, тип злокачественного новообразования), подлежащее лечению, тяжесть заболевания и возраст, вес и общее состояние пациента, в отношении которого проводят лечение. Кроме того, фармакогеномная (эффект генотипа на фармакокинетический, фармакодинамический или эффективный профиль терапевтического средства) информация о конкретном индивиде может влиять на режим дозирования или другие аспекты введения.

Примеры

Пример 1. Миметики Smac праймируют опухоли на деструкцию за счет врожденной иммунной системы.

Миметические соединения Smac представляют собой класс препаратов, сенсibiliзирующих к апоптозу, которые доказали свою безопасность для лечения злокачественных новообразований в исследованиях фазы I. Стимулирование врожденного антипатогенного ответа может вызвать мощный, но безопасный воспалительный "цитокиновый шторм", который может привести к гибели опухолей, обработанных миметиком Smac. В настоящем примере показано, что активация врожденных иммунных ответов посредством онколитических вирусов и адъюванты, таких как poly(:C) и CpG, индуцирует неспецифическую гибель злокачественных клеток, обработанных миметиками Smac, способом, опосредованным IFN β , TNF α или TRAIL. Эта терапевтическая стратегия может привести к долговременному излечению, например, на нескольких моделях агрессивного злокачественного новообразования у мышей. С этими и другими стимуляторами врожденного иммунитета, показавших безопасность в клинических испытаниях человека, данные, представленные в настоящем документе, указывают четко на их комбинированное применение с миметиками Smac для лечения злокачественного новообразования.

В настоящем примере рассматривается, является ли стимулирование врожденной иммунной системы, используя миметики патогенов, безопасной и эффективной стратегией для создания среды цитокинов, необходимой для инициирования апоптоза в опухолях, обработанных SMC. Авторы утверждают в данном случае, что непатогенные онколитические вирусы, а также миметики микробной РНК или ДНК, такие как поли (I:C) и CpG, индуцируют неспецифическое уничтожение злокачественных клеток, обработанных SMC, которое зависит либо от IFN β , TNF α , или TRAIL. Важно отметить, что эта терапевтическая стратегия была приемлемой *in vivo* и приводила к длительному излечению на нескольких моделях агрессивного злокачественного новообразования у мыши.

Терапия SMC сенсibiliзирует злокачественные клетки на неспецифическую гибель клеток при онколитической вирусной инфекции.

Онколитические вирусы (OV) представляют собой новые биотерапевтические агенты для лечения злокачественного новообразования, которые в настоящее время находятся на I-III стадии клинических испытаний. Одним из барьеров для терапии OV может быть индукция цитокинов IFN- типа I и NF κ B хозяином, которые организуют противовирусное состояние в опухолях. Было рассмотрено, можно ли использовать эти врожденные иммунные цитокины для индукции апоптоза в злокачественных клетках, предварительно обработанных SMC. Для начала была отобрана небольшая группа опухолевых и нормальных клеточных линий (n=30) для скрининга на ответ на SMC LCL161 и онколитический рабдовирус VSV Δ 51. Авторы выбрали LCL161, потому что это соединение находится на последних стадиях клинических испытаний в классе SMC, а VSV Δ 51, поскольку известно, что он индуцирует устойчивый ответ противовирусного цитокина. В 15 из 28 тестируемых клеточных линий (54%) обработка SMC повышала чувствительность EC₅₀ к VSV Δ 51 в 10-10000 раз (фиг. 6 и примеры на фиг. 1A и 1B). Аналогично, низкая доза VSV Δ 51 уменьшала EC50 терапии SMC с неопределенных уровней (>2500 нМ) до 4,5 и 21,9 нМ в двух характерных клеточных линиях: карцинома молочной железы мыши EMT6 и клетки SNB75 глиобластомы человека, соответственно (фиг. 1C). Анализ комбинированного индекса показал, что взаимодействие между терапией SMC и VSV Δ 51 является синергетическим (фиг. 7). Эксперименты с использованием четырех других SMC и пяти других онколитических вирусов показали, что спектр моновалентных и двухвалентных SMC обладает синергизмом с VSV Δ 51 (фиг. 8). Авторы обнаружили, что онколитические рабдовирусы VSV Δ 51 и Maraba-MG1 крайне эффективны для индукции неспецифической гибели в синергизме с SMC, по сравнению с HSV, реовирусами, вакцинами и VSV-платформами дикого типа, каждый из которых имеет сложные механизмы обезоруживания сигнальных путей врожденного иммунитета (фиг. 9A и 9B). Генетические эксперименты с использованием РНКi-опосредованного сайленсинга показали, что как XIAP, так и CIAP должны быть ингибированы для получения синергизма с VSV Δ 51 (фиг. 10A, 10B и 24C). Резко контрастируя с результатами, полученными на клеточных линиях, полученных из опухолей, комбинированная терапия VSV Δ 51 и SMC не влияла на незлокачественные первичные фибробласты кожи человека GM38 и скелетные миобласты человека HSKM (фиг. 6). В совокупности эти данные указывают на то, что онколитический VSV обладает синергизмом с терапией SMC в опухолеселективном режиме.

Для того, чтобы определить, вызывает ли VSV Δ 51 неспецифическую гибель IAP-обедненных соседних клеток, не зараженных вирусом, клетки обрабатывали SMC перед заражением низкой дозой

VSVΔ51 (MOI=0,01 инфекционных частиц на клетку). Авторы оценивали, могла ли кондиционированная среда, полученная из клеток, инфицированных VSVΔ51 (которые впоследствии были инактивированы ультрафиолетовым излучением) вызвать гибель при переносе на слой злокачественных клеток наивных в отношении вируса, обработанных SMC. Кондиционированная среда индуцировала гибель клеток только тогда, когда клетки были совместно обработаны SMC (фиг. 1D). Авторы также обнаружили, что низкая доза псевдотипированного штамма VSVΔ51 с уменьшенным содержанием G гена (MOI=0,1), содержащая делецию гена, кодирующего его гликопротеин (VSVΔ51ΔG), который ограничивает вирус до одного раунда инфекции, токсичен для всего слоя злокачественных клеток, обработанного SMC (фиг. 1E). Наконец, авторы провели анализ цитотоксичности в клетках с наложением агарозы, используемого для замедления распространения VSVΔ51, экспрессирующего флуоресцентную метку, и наблюдали значительную гибель клеток в обработанных SMC клетках вне зоны вирусной инфекции (фиг. 1F и 1I). В целом, эти результаты показывают, что инфекция VSVΔ51 приводит к высвобождению по меньшей мере одного растворимого фактора, который может активно индуцировать смерть соседних клеток в пограничной области, неинфицированных злокачественных клеток, обработанных SMC.

Терапия SMC не нарушает врожденный клеточный иммунный ответ на онколитический VSV.

Врожденный клеточный иммунный ответ на инфекцию РНК-вируса в опухолевых клетках млекопитающих можно активировать представителями семейства цитозольных (RIG-I-подобных рецепторов, RLR) и эндосомальных (toll-подобные рецепторы, TLR) вирусных РНК-сенсоров. После запуска, эти рецепторы могут вызывать параллельный фактор IFN-ответа (IRF) 3/7 и каскады сигнальных путей клеток ядерного фактора каппа В (NF-κB). Эти сигналы могут достигать высшей точки при продукции IFN и их чувствительных генов, а также ряда воспалительных хемокинов и цитокинов. Это указывает соседним клеткам предупреждающим образом экспрессировать вооружение противовирусных генов, а также помогает осуществлять набор и активацию клеток врожденной и адаптивной иммунной системы, чтобы в конечном счете уничтожить вирусную инфекцию. Не так давно стало известно, что белки cIAP вовлечены в многочисленные пути передачи сигналов после обнаружения патогенов, включая те, которые происходят от RLR и TLR. Соответственно, было рассмотрено, влияет ли терапия SMC на противовирусную реакцию онколитической инфекции VSV в опухолевых клетках и у мышей. Для начала оценивали влияние терапии SMC на продуктивность и распространение VSVΔ51. Одноступенчатые и многоступенчатые кривые роста производительности VSVΔ51 показали, что обработка SMC не влияет на кинетику роста VSVΔ51 в клетках EMT6 или SNB75 *in vitro* (фиг. 2A). Более того, анализ с помощью временной микроскопии показал, что обработка SMC не изменяет инфекционную активность VSVΔ51 или распространение на опухолевые клетки (фиг. 2B). Кроме того, вирусная репликация и распространение *in vivo* анализировали с помощью определения опухолевой нагрузки, используя визуализацию IVIS и титрование вирусных тканей. Никаких различий в вирусной кинетике не обнаружено при терапии SMC у мышей, несущих опухоль EMT6 (фиг. 12A и 12B). Поскольку клетки EMT6 и SNB75 обладают функциональными ответами IF типа I, которые регулируют жизненный цикл VSV, эти данные обеспечивают сильное, хотя и косвенное, доказательство тому, что терапия SMC не влияет на противовирусные каскады сигнальных путей в злокачественных клетках.

Для более детального исследования, продукцию IFNβ измеряли в клетках EMT6 и SNB75, обработанных VSVΔ51 и SMC. Этот эксперимент показал, что обработанные SMC злокачественные клетки реагируют на VSVΔ51 за счет секреции IFNβ (фиг. 2C), хотя и на несколько более низких уровнях по сравнению с VSVΔ51. Было задан вопрос, влияет ли ослабленная секреция IFNβ соответствующих клеток, обработанных SMC, на индукцию генов стимулирующих генов IFN, расположенных ниже в каскаде (ISG). Количественные анализы RT-ПЦР небольшой группы ISG в клетках, обработанных VSVΔ51 и SMC, показали, что ингибирование IAP не влияет на экспрессию гена ISG в ответ на онколитическую VSV-инфекцию (фиг. 2D). С этим согласуются данные анализа вестерн-блоттинга, которые показали, что SMC не изменяют активацию сигнальных путей Jak/Stat, находящихся после IFNβ в сигнальном пути (фиг. 2E и 24A). Вместе эти данные свидетельствуют о том, что SMC не препятствуют способности опухолевых клеток быть чувствительными и реагировать на инфекцию VSVΔ51.

IFNβ ограничивает неспецифическую клеточную смерть при терапии SMC и обработке онколитическим вирусом VSV.

SMC сенсбилизируют ряд линий злокачественных клеток на апоптоз, зависимый от каспазы 8, индуцированный TNFα, TRAIL и IL-1β. Поскольку РНК-вирусы могут инициировать продукцию этих цитокинов как часть клеточного противовирусного ответа, было исследовано вовлечение цитокинового сигнального пути в SMC и OV-индуцированной клеточной гибели. Для начала рецептор TNF (TNF-R1) и/или рецептор TRAIL (DR5) подвергали сайленсингу, и анализировали синергию между SMC и VSVΔ51. Этот эксперимент показал, что TNFα и TRAIL не только участвуют, но и вместе являются необходимыми для неспецифической гибели клеток (фиг. 3A-3H, 13A и 24D). С этим данными согласуются данные экспериментов вестерн-блоттинга и иммунофлуоресценции, которые показали сильную активацию внешнего пути апоптоза, и эксперименты с нокаутом РНКi, которые показали потребность как в

каспазе-8, так и в Rip1 в синергическом ответе (фиг. 14A-14G, 24E и 24F). Кроме того, сконструированный TNF α в VSV Δ 51 улучшал синергию с терапией SMC на порядок (фиг. 15A и 15B).

Затем рецептор IFN типа I (IFNAR1) подвергали сайленсингу, и неожиданно было обнаружено, что нокдаун IFNAR1 не обеспечивает синергическое взаимодействие терапии SMC и онколитического VSV (фиг. 3B, 13B и 24D). Было спрогнозировано, что нокдаун IFNAR1 ослабит, но полностью не подавит неспецифическую гибель, поскольку TRAIL является хорошо известным ISG, который отвечает на IFN28 типа I. TNF α и IL-1 β считаются независимыми от сигнального пути IFN, но тем не менее они отвечают на конечные стадии сигнального пути NF- κ B после обнаружения вируса. Этот результат указывает на возможность осуществления неканонического пути типа I IFN- для продукции TNF α и/или IL-1 β . Действительно, если экспрессию мРНК IFN β , TRAIL, TNF α и IL-1 β исследовали во время онколитической инфекции VSV, между индукцией IFN β и TRAIL и TNF α (фиг. 3C) было обнаружено значительное временное отставание. Эти данные также свидетельствуют о том, что TNF α - подобный TRAIL - может быть индуцирован как вторичный по отношению к IFN β . Чтобы доказать эту концепцию, IFNAR1 подвергали сайленсингу перед обработкой клеток VSV Δ 51. Нокдаун IFNAR1 полностью прекращал индукцию как TRAIL, так и TNF α под действием онколитического VSV (фиг. 3D). Более того, синергизм с SMC был повторен с использованием IFN (IFN α/β) и IFN типа II (IFN γ), но не IFN типа III (IL28/29) (фиг. 3E). Взятые вместе, эти данные показывают, что IFN типа I требуется для индукции TNF α и TRAIL во время инфицирования VSV Δ 51 опухолевых клеток. Более того, продукция этих цитокинов отвечает за неспецифическую гибель окружающих, неинфицированных SMC-обработанных клеток.

Для исследования неканонической индукции TNF α в дальнейшем измеряли уровни экспрессии мРНК TRAIL и TNF α в клетках SNB75, обработанных рекомбинантным IFN β . Оба цитокина были индуцированы при обработке IFN β (фиг. 3F), и эксперименты ELISA подтвердили получение их соответствующих белковых продуктов в среде для культивирования клеток (фиг. 3G). Интересно, что между индукцией TRAIL и TNF α наблюдалось значительное временное отставание. Поскольку TRAIL является полноценным ISG, а TNF α - нет, то этот результат дает возможность того, чтобы TNF α не индуцировался IFN β напрямую, а в ответ на последующие стадии сигнального пути ISG, активированные IFN β . Таким образом, количественную ОТ-ПЦР проводили на 176 цитокинах в клетках SNB75 и идентифицировали 70, которые были значительно активированы IFN β (табл. 5). В настоящее время изучается роль этих ISG в индукции TNF α под действием IFN β . Также вызывает интерес тот факт, что обработка SMC усиливала индукцию как TRAIL, так и TNF α IFN β в клетках SNB75 (фиг. 3F и 3G). Кроме того, с помощью доминантно-отрицательной конструкции IKK было обнаружено, что продукция этих воспалительных цитокинов в последующих стадиях сигнального пути IFN β зависело, по меньшей мере частично, от классического сигнального пути NF- κ B (фиг. 3H). Было обнаружено, что в клетках EMT6 обработка SMC усиливает продукцию клеток TNF α (5-7-кратное процентное увеличение) при инфицировании VSV (фиг. 16). Наконец, также было показано, что блокирование передачи сигналов TNF-R1 (с помощью антител или дцРНК) предотвращает гибель клеток EMT6 в присутствии SMC и VSV Δ 51 или IFN β (фиг. 17A-17C и 24H). Взаимосвязь между IFN I типа и TNF α является сложной, имеющей либо комплементарные, либо ингибирующие эффекты в зависимости от биологического контекста. Однако, не ограничивая настоящее изобретение каким-либо конкретным механизмом действия, можно предложить простую рабочую модель следующим образом: опухолевые клетки, инфицированные РНК онколитического вируса активируют IFN типа I, и на этот процесс не влияет антагонизм SMC белков IAP. Эти IFN, в свою очередь, дают сигнал соседним неинфицированным злокачественным клеткам экспрессировать и секретировать TNF α и TRAIL, процесс, который усиливается обработкой SMC, что, следовательно, индуцирует аутокринную и паракринную запрограммированную гибель клеток в неинфицированных опухолевых клетках, подвергнутых воздействию SMC (фиг. 18A и 18B).

Таблица 5

VSV	IFN β	Название гена	Идентификация гена
25465,4	1017,8	CCL8	Хемокин (мотиф C-C) лиганд 8
13388,9	44,9	IL29	Интерлейкин 29 (интерферон, лямбда 1)
5629,3	24,3	IFNB1	Интерферон, бета 1, фибробласт
1526,8	16,2	TNFSF15	Суперсемейство факторов (лигандов)

			некроза опухоли, член 15
847	24,6	CCL5	Хемокин (мотив С-С), лиганд 5
747,7	17,2	CCL3	Хемокин (мотив С-С), лиганд 3
650,9	60,6	TNFSF10	Суперсемейство факторов (лигандов) некроза опухоли, член 10
421,3	296,1	IL12A	Интерлейкин 12A
289,3	10,7	TNFSF18	Суперсемейство факторов (лигандов) некроза опухоли, член 18
255,3	18,8	CCL7	Хемокин (мотив С-С), лиганд 7
154,2	19,2	IL6	Интерлейкин 6 (интерферон, бета 2)
150,8	12,9	IL1RN	Антагонист рецептора интерлейкина 1
108,1	25,5	CCL20	Хемокин (мотив С-С), лиганд 20
78,6	6,2	CXCL1	Хемокин (мотив С-Х-С), лиганд 1
64,7	14,8	CCL2	Хемокин (мотив С-С), лиганд 2
62,5	14,5	CCL4	Хемокин (мотив С-С), лиганд 4
55,6	1,2	CXCL3	Хемокин (мотив С-Х-С), лиганд 3
55,2	4,3	TNF	Фактор некроза опухоли (суперсемейство TNF, член 2)
48,8	4,3	IGF1	Инсулиноподобный фактор роста 1 (соматомедин С)
48,4	2,8	CXCL2	Хемокин (мотив С-Х-С), лиганд 2
38,5	3,8	CCL11	Хемокин (мотив С-С), лиганд 11
37,5	3,8	HGF	Фактор роста гепатоцитов
36,5	75,1	NGFB	Фактор роста нервов, бета-полипептид
32,9	4	FGF14	Фактор роста фибробластов 14
24,7	25,6	FGF20	Фактор роста фибробластов 20
21,5	16,4	IL1B	Интерлейкин 1, бета
20	36,3	CSF2	Колонистимулирующий фактор 2 (гранулоцит-макрофаг)
18,3	2,6	GDF3	Фактор дифференциации роста 3
17,2	2	CCL28	Хемокин (мотив С-С), лиганд 28
12	2,1	CCL22	Хемокин (мотив С-С), лиганд 22
11,3	2,5	CCL17	Хемокин (мотив С-С), лиганд 17
10,5	2	CCL13	Хемокин (мотив С-С), лиганд 13

10,5	15,3	IL20	Интерлейкин 20
9,7	22,8	FGF16	Фактор роста фибробластов 16
8,8	3,6	TNFSF14	Суперсемейство факторов (лигандов) некроза опухоли, член 14
8,2	2,7	FGF2	Фактор роста фибробластов 2 (основной)
7,1	8,1	BDNF	Нейротрофический фактор мозгового происхождения
7,1	9,7	IL1A	Интерлейкин 1, альфа
7,1	10,9	ANGPT4	Ангиопоэтин 4
7	1,5	TGFB3	Фактор трансформации роста, бета 3
7	5,8	IL22	Интерлейкин 22
6,9	9,7	IL1F5	Суперсемейство интерлейкина 1, член 5 (дельта)
6,7	2,4	IFNW1	Интерферон, омега 1
6,6	12,6	IL11	Интерлейкин 11
6,6	25,1	IL1F8	Суперсемейство интерлейкина 1, член 8 (эта)
6,3	-1,3	EDA	Эктодисплазин А
5,9	8	FGF5	Фактор роста фибробластов 5
5,8	5	VEGFC	Фактор С роста эндотелия сосудов
5,2	4,9	LIF	Фактор ингибирования лейкоза
5	1,3	CCL25	Хемокин (мотив С-С), лиганд 25
4,9	8,3	BMP3	Морфогенетический белок кости 3
4,9	1,6	IL17C	Интерлейкин 17C
4,8	-2,3	TNFSF7	молекула CD70
4,3	2,5	TNFSF8	Суперсемейство факторов (лигандов) некроза опухоли, член 8
4,3	2,5	FASLG	Fas-лиганд (суперсемейство TNF, член 6)
4,2	2,7	BMP8B	Морфогенетический белок кости 8b
4,2	6	IL7	Интерлейкин 7
4,1	5,2	CCL24	Хемокин (мотив С-С), лиганд 24
4	-2,2	INHBE	Ингибин, бета Е
4	5,8	IL23A	Интерлейкин 23, альфа-субъединица

			p19
3,8	-1,1	IL17F	Интерлейкин 17F
3,7	2,9	CCL21	Хемокин (мотив С-С), лиганд 21
3,5	8,5	CSF1	Колонiestимулирующий фактор 1 (макрофаг)
3,5	3	IL15	Интерлейкин 15
3,4	5,7	NRG2	Нейрегулин 2
3,3	Нет данны х	INHBB	Ингибин, бета В
3,3	Нет данны х	LTB	Лимфотоксин бета (суперсемейство TNF, член 3)
3,3	Нет данны х	BMP7	Морфогенетический белок кости 7
3	-3,8	IL1F9	Семейство интерлейкинов 1, член 9
2,9	6,1	IL12B	Интерлейкин 12B
2,8	6,2	FLT3LG	Fms-связанный лиганд тирозинкиназы
2,7	3	FGF1	Фактор роста фибробластов 1 (кислотный)
2,5	-2	CXCL13	Хемокин (мотив С-Х-С), лиганд 13
2,4	2,2	IL17B	Интерлейкин 17B
2,3	7,8	GDNF	Нейротрофический фактор глиальных клеток
2,3	-1,7	GDF7	Фактор дифференциации роста 7
2,3	-2,4	LTA	Лимфотоксин альфа (суперсемейство TNF, член 1)
2,2	1,7	LEFTY2	Фактор определения лево-право 2
2,1	5	FGF19	Фактор роста фибробластов 19
2,1	9,8	FGF23	Фактор роста фибробластов 23
2,1	4,8	CLC	Кардиотрофиноподобный цитокиновый фактор 1
2,1	3	ANGPT1	Ангиопэтин 1
2	10,6	TPO	Тиреопероксидаза

2	2,1	EFNA5	Эфрин-А5
1,9	6,4	IL1F10	Семейство интерлейкина 1, член 10 (тета)
1,9	7,6	LEP	Лептин (гомолог ожирения, мышь)
1,8	3	IL5	Интерлейкин 5 (колониестимулирующий фактор, эозинофил)
1,8	5,7	IFNE1	Интерферон эпсилон 1
1,8	2,7	EGF	Эпидермальный фактор роста (бета-урогастрон)
1,7	3,4	CTF1	Кардиотрофин 1
1,7	-1,9	BMP2	Морофогенетический белок кости 2
1,7	3	EFNB2	Эфрин-В2
1,6	1	FGF8	Фактор роста фибробластов 8 (андроген-индуцированный)
1,6	-2	TGFB2	Фактор трансформации роста, бета 2
1,5	-1,6	BMP8A	Морфогенетический белок кости 8a
1,5	3,3	NTF5	Нейротрофин 5 (нейротрофин 4/5)
1,5	1	GDF10	Фактор дифференциации роста 7
1,5	1,5	TNFSF13 В	Суперсемейство факторов (лигандов) некроза опухоли, член 13b
1,5	2,5	IFNA1	Интерферон, альфа 1
1,4	-1,3	INHBC	Ингибин, бета С
1,4	2,8	FGF7	Галактокиназа 2
1,4	3,3	IL24	Интерлейкин 24
1,4	-1,1	CCL27	Хемокин (мотив С-С), лиганд 27
1,3	1,9	FGF13	Фактор роста фибробластов 13
1,3	1,4	IFNK	Интерферон, каппа
1,3	2	ANGPT2	Ангиопэтин 2
1,3	7,6	IL18	Интерлейкин 18 (интерферон-гамма-индуцирующий фактор)
1,3	7	NRG1	Нейрегулин-1
1,3	4,9	NTF3	Нейротрофин 3
1,2	15	FGF10	Фактор роста фибробластов 10
1,2	1,9	KITLG	Лиганд КИТ

1,2	-1,3	IL17D	Интерлейкин 17D
1,2	1,1	TNFSF4	Суперсемейство факторов (лигандов) некроза опухоли, член 4
1,2	1,3	VEGFA	Фактор роста эндотелия сосудов
1,1	2,4	FGF11	Фактор роста фибробластов 11
1,1	-1,4	IL17E	Интерлейкин 17E
1,1	-2,1	TGFB1	Трансформирующий фактор роста, бета 1
1	3,1	GH1	Гормон роста 1
-1	6,1	IL9	Интерлейкин 9
-1	-2,5	EFNB3	Эфрин-В3
-1	1,8	VEGFB	Фактор роста эндотелия сосудов В
-1	-1,2	IL17F	Семейство интерлейкинов 1, член 7 (дзета)
-1	-2,1	GDF11	Фактор дифференциации роста 11
-1,1	1,3	ZFP91	Гомолог белка цинкового пальца 91 (мышь)
-1,2	-1,1	BMP6	Морфогенетический белок кости 6
-1,2	-1,2	AMH	Антимюллерный гормон
-1,3	-1	LEFTY1	Фактор определения лево-право 1
-1,3	2,4	EFNA3	Эфрин-А3
-1,3	-1,3	LASS1	Гомолог долголетия LAG1 1
-1,5	1	EFNA4	Эфрин-А4
-1,8	1,3	PDGFD	Белок 1, индуцирующий разрушение ДНК
-1,8	1,8	IL10	Интерлейкин 10
-1,9	1,6	GDF5	Фактор дифференциации роста 5
-1,9	1,3	EFNA2	Эфрин-А2
-1,9	-1,5	EFNB1	Эфрин-В1
-1,9	-1,4	GDF8	Фактор дифференциации роста 8
-1,9	1,6	PDGFC	Фактор роста тромбоцитов С
-2,2	2,4	TSLP	Тимический стромальный лимфопоэтин
-2,3	-1,5	BMP10	Морфогенетический белок кости 10
-2,4	-4,6	CXCL12	Хемокин (мотив С-Х-С), лиганд 12
-2,5	4	IFNG	Интерферон, гамма

-2,6	1,2	EPO	Эритропоэтин
-2,7	-2,1	GAS6	Специфический фактор, блокирующий рост 6
-2,9	2,9	PRL	Пролактин
-2,9	-2,1	BMP4	Морфогенетический белок кости 4
-2,9	-5,7	INHА	Ингибин, альфа
-3	-1,3	GDF9	Фактор дифференциации роста 9
-3,1	-1,5	FGF18	Фактор роста фибробластов 18
-3,2	Нет данны х	IL17	Интерлейкин 17
-3,2	-1,1	IL26	Интерлейкин 26
-3,4	1,2	EFNA1	Эфрин-А1
-3,8	-1,1	FGF12	Фактор роста фибробластов 12
-4	-2,3	FGF9	Фактор роста фибробластов 9 (глия-активирующий фактор)
-4,5	1,4	CCL26	Хемокин (мотив С-С), лиганд 26
-8	9,7	CCL19	Хемокин (мотив С-С), лиганд 27
Нет данных	Нет данны х	BMP15	Морфогенетический белок кости 15
Нет данных	Нет данны х	CCL15	Хемокин (мотив С-С), лиганд 14
Нет данных	Нет данны х	CCL16	Хемокин (мотив С-С), лиганд 16
Нет данных	Нет данны х	CCL18	Хемокин (мотив С-С), лиганд 18
Нет данных	Нет данны х	CCL23	Хемокин (мотив С-С), лиганд 24
Нет данных	Нет данны	CD40LG	CD40-лиганд (суперсемейство TNF)

	x		
Нет данных	Нет данны x	CSF3	Колониестимулирующий фактор 3 (гранулоцит)
Нет данных	Нет данны x	CXCL5	Хемокин (мотив C-X-C), лиганд 5
Нет данных	Нет данны x	FGF4	Фактор роста фибробластов 4
Нет данных	Нет данны x	FGF6	Фактор роста фибробластов 6
Нет данных	Нет данны x	GH2	Гормон роста 2
Нет данных	Нет данны x	IL2	Интерлейкин 2
Нет данных	Нет данны x	IL21	Интерлейкин 21
Нет данных	Нет данны x	IL28A	Интерлейкин 28A (интерферон, лямбда 2)
Нет данных	Нет данны x	INHBA	Ингибин, бета A
Нет данных	Нет данны x	NRG3	Нейрегулин 3
Нет данных	Нет данны x	TNFSF11	Суперсемейство факторов (лигандов) некроза опухоли, член 11
Нет данных	Нет данны x	TNFSF13	Суперсемейство факторов (лигандов) некроза опухоли, член 13
Нет данных	6, 5	NRG4	Нейрегулин 4
Нет данных	6, 1	IL3	Интерлейкин 3 (колониестимулирующий фактор, множественный)
Нет данных	1, 8	TNFSF9	Суперсемейство факторов (лигандов) некроза опухоли, член 9

Онколитический VSV потенцирует терапию SMC в доклинических моделях злокачественного новообразования у животных.

Для оценки SMC и совместной онколитической терапии VSV in vivo, в качестве сингенной ортотопической модели использовали карциному молочной железы EMT6. Предварительные безопасные и

фармакодинамические эксперименты показали, что доза 50 мг/кг LCL161, полученная перорально через желудочный зонд, хорошо переносится и индуцирует нокдаун cIAP1/2 в опухолях в течение по меньшей мере 24 ч и вплоть до 48-72 ч в некоторых случаях (фиг. 19A, 19B и 24G). Когда объем опухоли достигал $\sim 100 \text{ мм}^3$, авторы начали вводить мышам два раза в неделю SMC и VSV Δ 51, системно. В качестве самостоятельных агентов терапия SMC приводила к уменьшению скорости роста опухоли и умеренному увеличению выживаемости, тогда как лечение VSV Δ 51 не влияло на размер опухоли или выживаемость (фиг. 4A и 4B). В полную противоположность, комбинированная обработка SMC и VSV Δ 51 вызывала резкую регрессию опухолей и приводила к долговременному излечению 40% обработанных мышей. В соответствии с выясненным механизмом неспецифической гибели *in vitro*, анализ иммунофлуоресценции показал, что инфекционность VSV Δ 51 была временной и была ограничена небольшими очагами внутри опухоли (фиг. 4C), тогда как активация каспазы-3 была широко распространена в совместно обработанных SMC и VSV Δ 51 опухолях (фиг. 4D). Кроме того, иммуноблоты с лизатами опухолей показали активацию каспазы-8 и -3 в двукратно обработанных опухолях (фиг. 4E, 24B и 24G). Несмотря на то, что животные в когорте комбинированной терапии испытывали потерю веса, мыши полностью восстанавливались после последнего лечения (фиг. 20A).

Чтобы подтвердить эти *in vivo* данных на другой модельной системе, модель ксенотрансплантата колоректальной аденокарциномы человека HT-29 протестирована у "голых" (бестимусных) мышей. HT-29 представляет собой клеточную линию, которая очень чувствительна к уничтожению под действием SMC и VSV Δ 51 *in vitro* (фиг. 21A и 21B). Подобно полученным результатам, в модельной системе EMT6, комбинированная терапия с SMC и VSV Δ 51 индуцировала регрессию опухоли и значительно увеличивала выживаемости мышей (фиг. 21C). Напротив, монотерапия не влияла на опухоли HT-29. Кроме того, не отмечалась дополнительная потеря веса у двойных обработанных мышей по сравнению с мышами, обработанными SMC (фиг. 21D). Эти результаты указывают на то, что синергитический эффект очень эффективен в модели рефрактерного ксенотрансплантата и что адаптивный иммунный ответ не играет главной роли в эффективности совместной терапии SMC и OV.

Роль врожденных противовирусных реакций и иммунных эффекторов в синергитическом эффекте совместного лечения.

Затем определяли, приводит ли инфекция онколитическим VSV в сочетании с обработкой SMC к опосредованной TNF α - или IFN β -клеточной гибели *in vivo*. Было исследовано, влияет ли блокирование сигнального пути TNF α посредством нейтрализующих антител на симуляцию SMC и VSV Δ 51 в модели опухоли EMT6. По сравнению с контрольными антителами, совместимыми с изотипом, применение нейтрализующих антитела TNF нейтрализует регрессию опухоли и снижает выживаемость до значений, близких к контрольным и группам с монотерапией (фиг. 4F и 4G). Это демонстрирует, что требуется TNF α *in vivo* для эффективности противоопухолевой комбинации SMC и онколитического VSV.

Чтобы исследовать роль сигнального пути IFN β в парадигме комбинации SMC и OV, мышам Balb/c с опухолью EMT6 вводили блокирующие антитела IFNAR1. Мыши, которым вводили блокирующие антитела IFNAR1, погибали от виремии в течение 24-48 ч после инфицирования. Перед смертью опухоли собирали через 18-20 ч после инфицирования вирусом, и опухоли анализировали на активность каспазы. Несмотря на то, что эти животные с дефектным сигнальным путем IFN типа I были больны в виду высокой вирусной нагрузки, иссеченные опухоли не проявляли признаков активности каспазы-8 и демонстрировали минимальные признаки активности каспазы-3 (фиг. 22) в отличие от контрольной группы, в которой была обнаружена ожидаемая активация каспаз в опухоли (фиг. 22). Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что интактный сигнальный путь IFN типа I необходим для опосредования противоопухолевых эффектов при комбинированном подходе.

Чтобы оценить вклад клеток врожденной иммунной системы или других иммунных медиаторов в эффективность комбинированной терапии OV/SMC, обработку опухоль EMT6 сначала предприняли у иммунодефицитной NOD-scid или NSG (NOD-scid-IL2R γ ^{ноль}) мыши. Однако, как и при исследованиях по истощению IFNAR1, эти мыши также быстро погибали из-за виремии. Таким образом, вклад клеток врожденной иммунной системы рассматривался с помощью системы культивирования спленоцитов *ex vivo* в качестве суррогатной модели. Популяции клеток врожденной иммунной системы, обладающие способностью продуцировать TNF α , позитивно селектировали и дополнительно отсортированы по наивным спленоцитам. Макрофаги (CD11b+ F4/8+), нейтрофилы (CD11b+ Gr1+), NK-клетки (CD11b-CD49b+) и миелоид-негативная (лимфоидная) популяция (CD11b-CD49-) стимулировали VSV Δ 51 и кондиционированную среду переносили в клетки EMT6 для измерения цитотоксичности в присутствии SMC. Эти результаты показывают, что VSV Δ 51-стимулированные макрофаги и нейтрофилы, а не NK-клетки, способны продуцировать факторы, которые приводят к гибели злокачественных клеток в присутствии SMC (фиг. 23A). Также были выделены первичные макрофаги из костного мозга, и эти макрофаги также отвечали на инфекцию онколитическим VSV дозозависимым образом, продуцируя факторы, которые уничтожали клетки EMT6 (фиг. 23B). В целом, эти данные показывают, что многочисленные популяции клеток врожденного иммунного ответа могут реагировать и опосредовать наблюдаемые противоопухолевые эффекты и что макрофаги являются наиболее вероятными эффекторами этого ответа.

Иммунные адьюванты поли (I:C) и CpG потенцируют терапию SMC *in vivo*.

Затем исследовали, будут ли синтетические агонисты TLR, которые, как известно, индуцировать врожденный провоспалительный ответ, обладать синергитической активностью с терапией SMC. Клетки EMT6 совместно культивировали со спленоцитами мыши в системе *tranwell insert*, и спленоциты обрабатывали SMC и агонистами TLR 3, 4, 7 или 9. Было обнаружено, что все протестированные агонисты TLR индуцируют неспецифическую смерть клеток EMT6, обработанных SMC (фиг. 5A). Агонисты TLR4, 7 и 9 LPS, имиквимод и CpG, соответственно, требовались спленоцитоам для неспецифической гибели клеток EMT6, по-видимому, потому, что их мишеневые рецепторы TLR не экспрессируются в клетках EMT6. Однако, агонист TLR3 poly (I:C) приводил к гибели клеток EMT6 непосредственно в присутствии SMC. Поли (I:C) и CpG затем тестировали в комбинации с терапией SMC *in vivo*. Эти агонисты выбраны таким образом, чтобы они были безопасными для человека и они в настоящее время проходят многочисленные клинических испытания на ранних стадиях для лечения злокачественных новообразований. Опухоли EMT6 получали и обрабатывали, как описано выше. Несмотря на то, что обработка поли (I:C) не влияла на рост опухоли при монотерапии, комбинация с SMC приводила к существенной регрессии опухоли, а при внутрибрюшинном введении приводила к долговременному излечению 60% обработанных мышей (фиг. 5B и 5C). Аналогично, монотерапия CpG не влияла на размер опухоли или на выживаемость, но в сочетании с терапией SMC приводили к регрессии опухоли и длительному излечению у 88% обработанных мышей (фиг. 5D и 5E). Важно отметить, что комбинированная терапия хорошо переносилась мышами, и их вес возвращался к уровням до лечения вскоре после прекращения терапии (фиг. 20D и 20C). Данные, полученные вместе с результатами онколитического VSV, показывают, что серия активно исследуемых адьювантов врожденной иммунной системы сильно и безопасно взаимодействует с терапией SMC *in vivo*, индуцируя регрессию опухоли и длительное излечение на нескольких моделях рефрактерных агрессивных злокачественных опухолей у мыши.

Пример 2. Инактивированные вирусные частицы, противораковые вакцины и стимулирующие цитокины обладают синергитическим взаимодействием с SMC для уничтожения опухолей.

Применение современных противораковых иммунотерапевтических препаратов, таких как BCG (*Bacillus Calmette-Guerin*), рекомбинантный интерферон (например, IFN α) и рекомбинантный фактор некроза опухоли (например, TNF α , используемый при изолированной перфузии конечностей), и недавнее клиническое использование биологических препаратов (например, блокирующие антитела) вместе с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа, которые преодолевают опосредованное опухолью подавление иммунной системы (например, моноклональные антитела против CTLA-4 и анти-PD-1 или PDL-1), указывают на потенциал "иммунотерапии рака" в качестве эффективного лечения. Как показано в примере 1, авторы продемонстрировали устойчивый потенциал невирусных иммунных стимуляторов для синергитического взаимодействия с SMC (фиг. 5). Чтобы расширить эти исследования, авторы также исследовали возможность взаимодействия SMC с нереплицирующимися частицами рабдовируса (называемыми NRRP), которые представляют собой частицы VSV облученные УФ, которые сохраняют свои инфекционные и иммуностимулирующие свойства без возможности репликации и распространения. Для того, чтобы оценить, могут ли NRRP непосредственно взаимодействовать с SMC, авторы проводили одновременную обработку различных линий раковых злокачественных клеток, EMT6, DBT и CT-2A, с SMC и оценивали жизнеспособность клеток с помощью *Alamar blue*. Авторы наблюдали, что NRRP обладают синергитической активностью вместе SMC в этих линиях злокачественных клеток (фиг. 25A). Чтобы оценить, могут ли NRRPs вызывать сильный провоспалительный ответ, авторы провели обработку фракционированных спленоцитов мыши NRRP (или синтетическим CpG ODN 2216 в качестве положительного контроля), осуществили перенос супернатантов клеточной культуры в клетки EMT6 в культуре способом "доза-ответ" и обрабатывали клетки носителем или SMC. Было отмечено, что иммуногенность NRRP находится на уровне, аналогичном уровню CpG, так как был значительный провоспалительный ответ, который приводил к высокой степени гибели клеток EMT6 в присутствии SMC (фиг. 25B). Поскольку обработка CpG и SMC на модели с опухолью EMT6 приводила к 88% степени излечения (фиг. 5D), эти данные показывают, что комбинация SMC и NRRP может иметь сильный синергитический эффект *in vivo*.

Успех авторов связан с обнаружением синергитической активности между SMC и живыми или инактивированными онколитическими рабдовирусами с одноцепочечной РНК (например, VSV Δ 51, Maraba-MG1 и NRRP), что предполагает, что клинически одобренная аттенуированная вакцина может обладать синергитической активностью с SMC. Чтобы проверить эту возможность, авторы оценили способность синергитического взаимодействия с SMC вакцины туберкулезной микобактерии, БЦЖ, которую обычно используют для лечения рака мочевого пузыря *in situ* в виду высокой локальной продукции TNF α . Действительно, комбинация SMC и БЦЖ обладает значительным синергитическим взаимодействием в отношении уничтожения клеток EMT6 *in vitro* (фиг. 26A). Эти результаты были аналогичным образом оценены *in vivo*; авторы наблюдали значительную регрессию опухоли при комбинированной обработке пероральным SMC и БЦЖ, вводимым место или системно (то есть, либо внутриопухолевым путем, либо внутрибрюшинным, соответственно) (фиг. 26B). Эти данные свидетельствуют о применимости

одобрённых вакцин в комбинированной противораковой иммунотерапии с SMC.

IFN типа I обладает синергетической активностью с SMC in vivo

Эффекты вирусов и, вероятно, других агонистов TLR и вакцин, по-видимому, опосредуются, в частности, продукцией IFN типа I, которая контролируется различными сигнальными механизмами, включая трансляцию мРНК. Данные авторов настоящего изобретения показали четкую возможность сочетания терапии SMC и существующими вариантами иммунотерапии, такими как рекомбинантный IFN, в качестве эффективного подхода к лечению злокачественного новообразования. Для исследования потенциала этой комбинации, авторы провели две схемы лечения SMC и либо внутрибрюшинные, либо внутриопухолевые инъекции рекомбинантного IFN α на сингенной ортотопической модели карциномы молочной железы EMT6. Несмотря на то, что лечение IFN α не влияло на рост опухоли EMT6 или на общую выживаемость, терапия SMC слегка увеличивала выживаемость мыши и имела уровень излечения 17% (фиг. 27). Однако комбинированная терапия SMC и внутрибрюшинные или внутриопухолевые инъекции IFN α значительно задержали рост опухоли и увеличивали выживаемость мышей с опухолями, что приводило к уровням излечения 57 и 86%, соответственно (фиг. 27). Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что прямая стимуляция IFN типа I может обладать синергетической активностью с SMC для уничтожения опухолей in vivo.

Оценка дополнительных онколитических рабдовирусов для возможного синергетического взаимодействия с SMC.

Хотя VSV Δ 51 является доклиническим кандидатом, в настоящее время клинические испытания у больных со злокачественными новообразованиями проходят онколитические рабдовирусы VSV-IFN β и Maraba-MG1. Как показано в примере 1, авторы показали, что Maraba-MG1 обладает синергетической активностью с SMC in vitro (фиг. 9). Авторы также подтвердили, что SMC обладает синергетической активностью с клиническими кандидатами, VSV-IFN β и VSV-NIS-IFNP (то есть несущими визуализируемый ген, NIS, натрий йодид симпортер) в клетках EMT6 (фиг. 28). Для того, чтобы оценить могут ли эти вирусы индуцировать провоспалительное состояние in vivo, авторы обрабатывали инфицированных мышей в.в. 5×10^8 PFU VSV Δ 51, VSV-IFN β и Maraba-MG1 и измеряли уровень TNF α в сыворотке инфицированных мышей. Во всех случаях наблюдалось временное, но надежное повышение TNF α инфицированием онколитическим вирусом через 12 ч после инфицирования, которое едва обнаруживали через 24 ч (фиг. 29). Это логично, так как инфекция самоограничивается в иммунокомпетентных хозяевах. Эти результаты свидетельствуют о том, что клинические кандидатные онколитические рабдовирусы могут обладать синергизмом с SMC аналогично VSV Δ 51.

Как показано в примере 1, авторы задокументировали, что форма VSV Δ 51, которая была сконструирована для экспрессии полноразмерного TNF α , может усиливать гибель, вызванную онколитическим вирусом, в присутствии SMC (фиг. 15). Для подтверждения эти результаты, авторы также разработали VSV Δ 51 для экспрессии TNF α , имеющий форму при которой ее внутриклеточные и трансмембранные компоненты заменены секреторным сигнальным фрагментом сывороточного альбумина человека (VSV Δ 51-solTNF α). По сравнению с полноразмерным TNF α (memTNF α) solTNF α конститутивно секретуруется клетками-хозяевами, а форма memTNF α может быть закорена на плазматической мембране (но сохраняет способность индуцировать гибель клеток юкстакринным образом) или высвободиться в силу эндогенного процессирования металлопротеазами (например, ADAM17) для уничтожения клеток паракринным способом. Авторы оценивали, будут ли обе формы TNF α клеток, инфицированных онколитическим VSV, обладать синергетической активностью с SMC на модели ортотопического сингенного рака молочной железы EMT6. Как и ожидалось, обработка SMC слегка задержало скорость роста опухоли EMT6 и немного повышали выживаемость опухолевых мышей, а комбинация носителя и VSV-51-memTNF α или VSV Δ 51-solTNF α не оказала влияния на общую выживаемость или темпы роста опухоли (фиг. 30A и 30B). С другой стороны, экспрессируемый вирусом TNF α значительно замедлял темпы роста опухоли и приводил к увеличению выживаемости на 30 и 70%, соответственно. Примечательно, что 40% уровень опухолевого излечения при комбинированной обработке SMC и VSV Δ 51 (фиг. 4A) требовал четырех разовую обработку и дозу 5×10^8 PFU VSV Δ 51. Однако комбинация онколитического VSV с экспрессией TNF-альфа и SMC приводила к повышению уровня излечения и проведению двух схем лечения при дозе вируса 1×10^8 PFU. Для того, чтобы оценить можно ли применить эту стратегию лечения в отношении других рефрактерных сингенных моделей, авторы оценивали обладает ли VSV Δ 51-solTNF α синергизмом с SMC на подкожной модели клеточной линии карциномы толстой кишки CT-26. Как и ожидалось, авторы не наблюдали влияния на скорость роста опухоли или выживаемость при VSV Δ 51-solTNF α и наблюдали умеренное снижение скорости роста опухоли и небольшое увеличение выживаемости (фиг. 30C). Тем не менее, авторы смогли усилить задержку роста опухоли и повысить выживаемость мышей с опухолями в случае комбинированной обработки SMC и VSV Δ 51-solTNF α .

Следовательно, включение трансгена TNF α в онколитический вирус является значительным преимуществом для комбинирования с SMC. Можно было легко предположить включение других трансгенов лигандов смерти, таких как TRAIL, FasL или лимфотоксин, в вирусы для синергетической активно-

сти с SMC.

Изучение потенциала SMC в отношении уничтожения опухолей головного мозга.

Комбинация SMC с иммунными стимулирующими агентами может быть использована в отношении многих различных типов злокачественных новообразований, включая злокачественные новообразования головного мозга, для которых отсутствуют эффективные методы лечения, а иммунотерапия является обещающим методом лечения. В качестве первого шага авторы определили, могут ли SMC проникать сквозь гематоэнцефалический барьер (BBB) в модели опухолей головного мозга у мышей, так как BBB является значительным барьером для проникновения в мозг. Авторы наблюдали индуцированную SMC деградацию белков cIAP1/2 во внутричерепных опухолях CT-2A через несколько часов после введения лекарственного средства, что указывает на то, что SMC способны проходить через BBB и обладают антагонистической активностью в отношении cIAP1/2 и, возможно, XIAP в опухолях головного мозга (фиг. 31A). Авторы также показали, что прямая инъекция SMC (10 мкл 100 мкМ раствора) внутричерепным путем может приводить к мощному ингибированию как белков cIAP1/2, так и XIAP (фиг. 31B), что является прямым следствием SMC-индуцированного аутоубиквитинирования белков IAP или результатом индукции гибели опухолевых клеток в случае исчезновения XIAP. В качестве второго авторы хотели определить, может ли системная стимуляция иммунных стимуляторов приводить к провоспалительному ответу в мозге наивных мышей. Действительно, авторы наблюдали выраженную активацию уровней TNF α головного мозга мышей, которые вводили внутрибрюшенно вместе с агонистом TLR3, поли (I:C), миметиком вируса (фиг. 32A). Авторы на основании этих данных, экстрагировали сырые белковые лизаты из мозга мышей, которые получали поли (I:C) или клинические кандидаты онколитических рабдовирусов VSVA51, VSV-IFN β или Maraba-MG1, а затем наносили эти лизаты на клетки глиобластомы CT-2A или K1580 в присутствии SMC. Авторы наблюдали, что стимуляция врожденного иммунного ответа этими невирусными синтетическими или биологическими вирусными агентами приводила к повышенной гибели клеток в присутствии SMC у этих двух клеточных линий глиобластомы (фиг. 32B). В качестве третьего шага авторы также подтвердили, что поли (I:C) можно вводить непосредственно внутричерепным путем без явных токсических эффектов, что может обеспечить еще более усиленную индукцию цитокинов месте локализации опухолей (фиг. 32C). Наконец, авторы оценили, будет ли непосредственная стимуляция иммунной системы в мозге или системная стимуляция приводить к длительному излечению на моделях опухоли мозга у мышей, обработанных SMC. Комбинация перорального SMC и поли (I:C), внутричерепной путь введения, или VSVA51, в.в., приводит к почти полному выживанию мыши с глиомой CT-2A (фиг. 32D и 32E) при ожидаемой выживаемости 86 и 100%, соответственно. Как следствие наблюдаемого синергизма между SMC и внутричерепной обработкой поли (I:C), авторы также оценивали возможность лечения глиомы CT-2A непосредственными одновременными внутричерепными инъекциями SMC и рекомбинантного IFN α человека (B/D). Действительно, авторы наблюдали заметное положительное влияние выживаемости мышей при комбинированном лечении с частотой излечения 50% (фиг. 33). Важно отметить, что однократная или комбинированная обработка SMC или IFN α не приводила к какой-либо явной нейротоксичности у мышей с опухолью. В целом, эти результаты показали, что различные способы лечения SMC могут обладать синергетической активностью с множеством локально или системно вводимых стимуляторов врожденной иммунной системы для гибели злокачественных клеток *in vitro* и уничтожения опухолей на моделях злокачественных новообразований у животных. СПОСОБЫ Реагенты LCL161 от Novartis (Houghton, P. J. et al. Initial testing (stage 1) of LCL161, a SMAC mimetic, by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatr Blood Cancer* 58: 636-639 (2012); Chen, K. F. et al. Inhibition of Bcl-2 improves effect of LCL161, a SMAC mimetic, in hepatocellular carcinoma cells. *Biochemical Pharmacology* 84: 268-277 (2012)). SM-122 и SM-164 от Dr. Shaomeng Wang (University of Michigan, USA) (Sun, H. et al. Design, synthesis, and characterization of a potent, nonpeptide, cellpermeable, bivalent Smac mimetic that concurrently targets both the BIR2 and BIR3 domains in XIAP. *J Am Chem Soc* 129: 15279-15294 (2007)). AEG40730 (Bertrand, M. J. et al. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell* 30: 689-700 (2008)) синтезировала Vibrant Pharma Inc (Brantford, Canada). OICR720 синтезировал Ontario Institute for Cancer Research (Toronto, Canada) (Enwere, E. K. et al. TWEAK and cIAP1 regulate myoblast fusion through the noncanonical NF-kappaB signalling pathway. *Sci Signal* 5: ra75 (2013)). IFN α , IFN β , IL28 and IL29 получали от PBL Interferonsource (Piscataway, USA). Все дцРНК получали от Dharmacon (Ottawa, Canada; ON TARGETplus SMARTpool). CpG-ODN 2216 синтезировали с помощью IDT (5'-gggGGACGATCGTCgggggg-3' (SEQ ID NO: 1), нижний регистр указывает на фосфоротиоатные связи между указанными нуклеотидами, а курсив указывает на три мотива CpG с фосфодиэфирными связями). Имиквимод приобретали у BioVision Inc. (Milpitas, USA). Poly(:C) получали от InvivoGen (San Diego, USA). LPS был от Sigma (Oakville, Canada). Культура клеток

Клетки поддерживали при 37°C и 5% CO $_2$ в среде DMEM с добавлением 10% инактивированной сыворотки эмбрионального теленка, пенициллина, стрептомицина и 1% незаменимых аминокислот (Invitrogen, Burlington, США). Все клеточные линии получали из ATCC, кроме следующих: SNB75 (Dr. D. Stojdl, Children's Hospital of Eastern Ontario Research Institut e) и SF539 (UCSF Brain Tumor Bank). Клеточные линии постоянно тестировали на заражение микоплазмой. Для трансфекций дцРНК

проводили обратную трансфекцию клеток с помощью RNAiMAX Lipofectamine (Invitrogen) или DharmaFECT I (Dharmacon) в течение 48 ч в соответствии с протоколом производителя.

Вирусы

Серотип Indiana VSVΔ51 (Stojdl, DF et al. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 4(4), 263-275 (2003)) использовали в этом исследовании и увеличивали их количество в клетках Vero. VSVΔ51-GFP является рекомбинантным производным VSVΔ51, экспрессирующим зеленый флуоресцентный белок медузы. VSVΔ51-Fluc экспрессирует люциферазу светлячков. Количество VSVΔ51 с делецией гена, кодирующего гликопротеин (VSVΔ51ΔG), увеличивали в клетках HEK293T, которые трансфицировали pMD2-G, используя Lipofectamine2000 (Invitrogen). Для создания конструкции VSVΔ51-TNFα полноразмерный ген TNFα встраивали между вирусными генами G и L. Все вирусы VSVΔ51 очищали на сахарозной подушке. Maraba-MG1, WDD-B18R-, реовирус и HSV1 ICP34.5 получали, как описано ранее (Brun, J. et al. Identification of genetically modified Maraba virus as an oncolytic rhabdovirus. *Mol Ther* 18, 1440-1449 (2010); Le Boeuf, F. et al. Синергическое взаимодействие между онколитическими вирусами усиливает гибель клеток. *Mol Ther* 18, 888-895 (2011); Lun, X. et al. Efficacy and safety/toxicity study of recombinant vaccinia virus JX-594 in two immunocompetent animal models of glioma. *Mol Ther* 18, 1927-1936 (2010)). Получение аденовирусных векторов, экспрессирующих GFP или экспрессирующих GFP вместе с доминантным негативным ИККβ, проводили как описано ранее 16.

Анализ жизнеспособности in vitro

Клеточные линии высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи. Клетки обрабатывали носителем (0,05% ДМСО) или 5 мкМ LCL161 и инфицировали указанным MOI OV или обрабатывали 250 Ед/мл IFNβ, 500 Ед/мл IFNα, 500 Ед/мл IFNγ, 10 нг/мл IL28 или 10 нг/мл IL29 в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью Alamar blue (натриевая соль резазурина (Sigma)), и данные нормировали с обработкой носителем. Выбранный размер образца согласуется с предыдущими отчетами, в которых использовался аналогичный анализ для анализов жизнеспособности. Для комбинационных индексов клетки высевали в течение ночи, обрабатывали серийными разведениями фиксированной смеси VSVΔ51 и LCL161 (соотношения 5000:1, 1000:1 и 400:1 PFU VSVΔ51: мМ LCL161) в течение 48 ч, и оценивали жизнеспособность клеток с помощью Alamar blue. Комбинированные индексы (CI) рассчитаны по методу Чжоу и Талалая, используя Calcsyn (Chou, T. C. & Talalay, P. A simple generalized equation for the analysis of multiple inhibitions of Michaelis-Menten kinetic systems. *J Biol Chem* 252, 6438-6442 (1977)). Для определения статистических показателей (среднее значение со стандартным отклонением или стандартной ошибкой) использовали n=3 биологических повторов.

Анализ распространения

Конфлюентный монослой клеток 786-0 покрывали 0,7% агарозой в полной среде. Небольшое отверстие было сделано пипеткой в агарозном слое в середине лунки, и введено 5×10^3 PFU VSVΔ51-GFP. Сверху слоя наносили среду, содержащую носитель или 5 мкМ LCL161, клетки инкубировали в течение 4 дней, делали флуоресцентную визуализацию, и клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым.

Совместная культура спленоцитов

EMT6 клетки культивировали в мультилуночных планшетах и сверху помещали вставки культурыми клеток, содержащие нефракционированные спленоциты. Кратко, одноклеточные суспензии получены путем пассирования селезенки мыши через нейлоновую сетку с размером ячеек 70 мкм, и эритроциты лизировали буфером для лизиса АСК. Спленоциты обрабатывали в течение 24 ч либо 0,1 MOI VSVΔ51ΔG, 1 мкг/мл поли (I:C), 1 мкг/мл LPS, 2 мкМ имиквимода, либо перед этим 0,25 мкМ CpG в присутствии 1 мкМ LCL161. Жизнеспособность клеток EMT6 определяли окрашиванием кристаллическим фиолетовым. Для определения статистических показателей (среднее значение, стандартное отклонение) использовали n=3 биологических повторов.

Биоанализ на цитокиновые ответы

Клетки инфицировали указанным MOI VSVΔ51 в течение 24 ч, и супернатант клеточной культуры подвергали воздействию УФ-излучения в течение 1 ч для инактивации частиц VSVΔ51. Затем инактивированный ультрафиолетом супернатант наносили на наивные клетки в присутствии 5 мкМ LCL161 в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток оценивали по Alamar blue. Для определения статистических показателей (среднее значение, стандартное отклонение) использовали n=3 биологических повторов.

Микроскопия

Для измерения активации каспазы-3/7, к клеткам добавляли 5 мкМ LCL161, указанное количество MOI VSVΔ51 и 5 мкМ реагента CellPlayer Apoptosis Caspase-3/7 (Essen Bioscience, Ann Arbor, USA). Клетки помещали в инкубатор, оснащенный микроскопом IncuCyte Zoom с объективом 10X, и получали фазово-контрастные и флуоресцентные изображения в течение 48 ч. Альтернативно, клетки обрабатывали 5 мкМ LCL161 и 0,1 MOI VSV-51-GFP и SMC в течение 36 ч и метили с помощью набора для анализа Magic Red Caspase-3/7 (ImmunoChemistry Technologies, Bloomington, США). Для измерения доли апоптотических клеток добавляли 1 мкг/мл Appin V-CF594 (Biotium, Hayward, США) и 0,2 мкМ YOYO-1 (Invitrogen) в клетки, обработанные SMC и VSVΔ51. Изображения получали в течение 24 ч после обработки,

используя IncuCyte Zoom. Нумерацию сигналов флуоресценции осуществляли с помощью алгоритма подсчета, интегрированного в программное обеспечение IncuCyte Zoom. Для определения статистических показателей (среднее значение, стандартное отклонение) использовали $n=2$ (каспаза-3/7) или $n=9$ (Аннексин V, YOYO-1) биологических повторов.

Мультистадийные кривые роста

Клетки обрабатывали носителем или 5 мкМ LCL161 в течение 2 ч и затем инфицировали при указанном MOI VSV Δ 51 в течение 1 часа. Клетки промывали PBS и пополняли носитель или 5 мкМ LCL161 и инкубировали при 37°C. Аликвоты получали в указанные моменты времени, и титры вируса оценивали стандартным анализом бляшек, используя клетки VERO африканских зеленых обезьян.

Вестерн-иммуноблоттинг

Клетки соскабливали, собирали путем центрифугирования и лизировали в буфере для лизиса RIPA, содержащем коктейль ингибиторов протеазы (Roche, Laval, Canada). Равные количества растворимого белка разделяли на полиакриламидных гелях с последующим переносом на нитроцеллюлозные мембраны. Отдельные белки обнаруживали с помощью вестерн-иммуноблоттинга с использованием следующих антител: pSTAT1 (9171), каспазы-3 (9661), каспазы-8 (9746), каспазы-9 (9508), DR5 (3696), TNF-R1 (3736) cFLIP (3210) и PARP (9541) от Cell Signaling Technology (Danvers, США); каспазы-8 (1612) от Enzo Life Sciences (Farmingdale, USA); IFNAR1 (EP899) и TNF-R1 (19139) от Abcam (Cambridge, USA); каспазы-8 (AHZ0502) от Invitrogen; cFLIP (клон NF6) от Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland); RIP1 (клон 38) от BD Biosciences (Franklin Lakes, USA); и E7 от Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, USA). Поликлональные антитела кролика против крысы, IAP1 и IAP3, использовали для обнаружения cIAP1/2 и XIAP человека и мыши, соответственно. Для обнаружения первичных антител использовали AlexaFluor680 (Invitrogen) или IRDye800 (Li-Cor, Линкольн, США), а инфракрасные флуоресцентные сигналы обнаруживали с помощью инфракрасной системы визуализации Odyssey (Li-Cor).

ОТ-кПЦР

Общую РНК выделяли из клеток, используя набор RNeasy Mini Plus (Qiagen, Toronto, Canada). Двухступенчатый ОТ-кПЦР осуществляли с помощью Superscript III (Invitrogen) и SsoAdvanced SYBR Green supermix (BioRad, Mississauga, Канада) на Mastercycler ep realplex (Eppendorf, Mississauga, Canada). Все праймеры получали от realtimeprimers.com. Для определения статистических показателей (среднее значение, стандартное отклонение) использовали $n=3$ биологических повторов.

ELISA

Клетки инфицировали вирусом в указанном количестве MOI или обрабатывали IFN β в течение 24 ч, а супернатанты осветленных клеточных культур концентрировали с использованием фильтрующих единиц Amicon Ultra. Цитокины измеряли с помощью наборов для анализа TNF α Quantikine высокой чувствительности, TNF α DuoSet, TRAIL DuoSet (R & D Systems, Minneapolis, USA) и VeriKine IFN β (PBL Interferonsource). Для статистического анализа использовали $n=3$ биологических повторов.

Модель опухоли молочной железы EMT6

Опухоли молочной железы получали путем инъекции 1×10^5 клеток нативных EMT6 или EMT6, меченных люциферазой светлячка (EMT6-Fluc) в слой жировой ткани молочной железы 6-недельных самок мышей BALB/c. Мыши с пальпируемыми опухолями (~ 100 мм³) обрабатывали одновременно либо носителем (30% 0,1M HCl, 70% 0,1 M NaOAc, pH 4,63), либо 50 мг/кг LCL161 per os, и либо в.в. инъекцией либо PBS, либо 5×10^8 PFU VSV Δ 51 два раза в неделю в течение двух недель. Для обработки poly(:C) 25 и SMC, животным вводили LCL161 два раза в неделю и либо BSA (в.о.), либо 20 мкг поли (I:C), либо 2,5 мг/кг poly(:C) в.б. четыре раза в неделю. Группе SMC и CpG вводили 2 мг/кг CpG (в.б.), а на следующий день вводили CpG и SMC. Введение CpG и SMC повторяли через 4 дня. Группы лечения были назначены по клетками, и каждая группа имела $\min n=4-8$ для статистических измерений (среднее значение, стандартная ошибка, анализ Каплан-Мейер с log-ранк). Размер выборки согласуется с предыдущими записями, в которых изучался рост опухоли и выживаемость мышей после лечения рака. Слепой анализ был невозможен. Животных подвергали эвтаназии, когда опухоль давала внутрибрюшинные метастазы или когда опухолевая нагрузка превышала 2000 мм³. Объем опухоли рассчитывали с использованием $(\pi) (W)^2(L)/4$, где W=ширина опухоли и L=длина опухоли. Опухолевую биолюминесценцию визуализировали с помощью системы рентгеновского излучения Xenogen 2000 IVIS CCD (Caliper Life Sciences Massachusetts, США) после инъекции 4 мг люциферина (Gold Biotechnology, Сент-Луис, США).

Модель подкожной опухоли HT-29

Подкожные опухоли получали путем инъекции 3×10^6 HT-29 в правую фалангу 6-недельных самок "голых" мышей CD-1. Пальпируемые опухоли (~ 200 мм³) обрабатывали пятью внутриутробными инъекциями PBS или 1×10^8 PFU VSV Δ 51. Через четыре часа мышам вводили носитель или 50 мг/кг LCL161 per os. Группы лечения были назначены по клетками, и каждая группа имела $\min n=5-7$ для статистических измерений (среднее значение, стандартная ошибка, анализ Каплан-Мейер с log-ранк). Размер выборки согласуется с предыдущими записями, в которых изучался рост опухоли и выживаемость мышей после лечения рака. Слепой анализ был невозможен. Животных подвергали эвтаназии, когда опухолевая нагрузка превышала 2000 мм³. Объем опухоли рассчитывали с использованием $(\pi) (W)^2(L)/4$, где

W=ширина опухоли и L=длина опухоли.

Все эксперименты на животных проводились с одобрения the University of Ottawa Animal Care and Veterinary Service в соответствии с принятыми принципами, утвержденными the Canadian Council on Animal Care.

Антитело-опосредованная нейтрализация цитокинов

Для нейтрализации сигнального пути TNF α in vitro, к клеткам EMT6 добавляли 25 мкг/мл α -TNF α (XT3.11) или контроль с изотипом (HRPN) в течение 1 ч перед совместной обработкой LCL161 и VSV Δ 51 или IFN β в течение 48 ч. Жизнеспособность оценивали с помощью Alamar blue. Для нейтрализации TNF α в модели с опухолью EMT6-Fluc, вводили 0,5 мг α -TNF α или α -HRPN через 8, 10 и 12 дней после имплантации. Мышей обрабатывали 50 мг/кг LCL161 (п.о.) через 8, 10 и 12 дней после имплантации и инфицировали 5×10^8 PFU VSV Δ 51 в.в. на 9, 11 и 13 день. Для нейтрализации сигнального пути IFN типа I, мышам с опухолью EMT6 вводили путем инъекции 2,5 мг α -IFNAR1 (MAR1-5A3) или изотипического контроля (MOPC-21), и обрабатывали 50 мг/кг LCL161 (п.о.) в течение 20 ч. Мышей инфицировали 5×10^8 PFU VSV Δ 51 (в.в.) в течение 18-20 ч, и опухоли анализировали Вестерн-блоттингом. Все антитела были получены от BioXCell (West Lebanon, USA).

Проточная цитометрия и сортинг

Клетки EMT6 обрабатывали одновременно 0,1 MOI VSV Δ 51-GFP и 5 мкМ LCL161 в течение 20 ч. Клетки трипсинизировали, пермеабелизировали с помощью набор CytoFix/CytoPerm (BD Biosciences) и окрашивали APC-TNF α (MP6-XT22) (BD Biosciences). Клетки анализировали на проточном цитометре Cyan ADP 9 (Beckman Coulter, Mississauga, Canada), и данные анализировали с помощью FlowJo (Tree Star, Ashland, USA).

Спленциты были обогащены на CD11b, используя набор позитивной селекции EasySep CD11b (StemCell Technologies, Ванкувер, Канада). Клетки CD49+ обогащали с помощью набора для позитивной селекции EasySep CD49b (StemCell Technologies) из фракции CD11b-. Клетки CD11b+ окрашивали F4/80-PE-Cy5 (BM8, eBioscience) и Gr1-FITC (RB6-8C5, BD Biosciences) и затем сортировали с помощью MoFlo Astrios (Beckman Coulter). Данные проточной цитометрии анализировали с помощью Kaluza (Beckman Coulter). Выделенные клетки инфицировали VSV Δ 51 в течение 24 ч, а супернатанты очищенных клеточных культур добавляли к клеткам EMT6 в течение 24 ч в присутствии 5 мкМ LCL161.

Макрофаги, полученные из костного мозга

Бедренную и лучевую кость мыши получали и промывали для удаления костного мозга. Клетки культивировали в RPMI с 8% FBS и 5 нг/мл M-CSF в течение 7 дней. Для подтверждения чистоты макрофагов использовали проточную цитометрию (F4/80+ CD11b+).

Иммуногистохимия

Иссеченные опухоли фиксировали в 4% PFA, помещали в смесь 1:1 соединения OCT и 30% сахаразы и секционировали на криостате при 12 мкм. Срезы делали проницаемыми с помощью 0,1% Triton X-100 в блокирующем растворе (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM L-лизина, 145 mM NaCl и 1% BSA, 10% козьей сыворотки). α -расщепленную каспазу 3 (C92-605, BD Pharmingen, Mississauga, Canada) и поликлональную антисыворотку VSV (Dr. Earl Brown, University of Ottawa, Canada) инкубировали в течение ночи, а затем повторно инкубировали вместе со вторичными антителами, связанными с AlexaFluor (Invitrogen).

Статистический анализ

Сравнение графиков выживания Каплана-Мейера с помощью анализа логарифмического ранжирования и последующими парными множественными сравнениями проводили с использованием метода Холма-Сидака (SigmaPlot, Сан-Хосе, США). Расчет значения EC₅₀ осуществляли в GraphPad Prism с использованием нормированного нелинейного регрессионного анализа. Сдвиг EC₅₀ рассчитывали путем вычитания log₁₀ EC₅₀ клеток, обработанных SMC и инфицированных VSV Δ 51, из log₁₀ EC₅₀ клеток, обработанных носителем и инфицированных VSV Δ 51. Чтобы нормализации степени синергии SMC, значение EC₅₀ нормировали до 100% для того, чтобы компенсировать гибель клеток, вызванную только обработкой SMC.

Пример 3. Иммунотерапия, содержащая SMC, показала противомиеломную активность.

Блокада контрольных точек иммунной системы обладает синергитической активностью с обработкой SMC и замедляет прогрессирование заболевания при MM.

Клетки MPC-11, стабильно экспрессирующие трансген люциферазы, имплантировали путем внутривенной инъекции мышам BALB/c. Эта модель MM in vivo эффективно имитирует заболевание человека и последующий прогноз прогрессирования заболевания. Клетки MPC-11 получали из плазмодитомы мыши. После двух раундов обработки SMC и моноклональными антителами против PD-1 или CTLA-4, монотерапия на основе анти-PD-1 показала ответ с точки зрения задержки прогрессирования заболевания. Мыши, которым вводили комбинацию анти-PD-1 и SMC, показали лучший ответ, при этом практически не было опухолевой нагрузки, определяемой сигналом люминесценции (фиг. 35). Эта комбинация также значительно продлевала выживаемость мышей по сравнению с контрольной группой (p=0,01) и была сравнима с монотерапией PD-1 (p=0,0163).

Интерфероны 1 типа обладают синергической активностью с SMC и вызывают смерть клеток MM.

В исследовании *in vitro*, в котором проводили анализ эффектов различных цитокинов в комбинации с SMC, внимание было сосредоточено на IFN типа 1. В частности, IFN α и IFN β показали очень сильную синергическую активность в отношении уничтожения клеток MM вместе SMC в большинстве тестируемых клеточных линий (фиг. 36A). Используя ту же модель мыши MPC-11, мышам вводили рекомбинантный IFN α и SMC в трех разных временных точках (фиг. 37).

Онколитические вирусы обладают синергической активностью с SMC и вызывают гибель клеток MM.

Онколитический вирус, полученный из везикулярного соматического вируса, VSV Δ 51, обладает синергической активностью с SMC *in vitro* и вызывает клеточную гибель клеток MPC-11 (фиг. 36B и 36C). Комбинации, содержащие SMC, также тестировали в модели сингенных MPC-11 мыши. Комбинированное лечение не снижало опухолевую нагрузку так же эффективно, как VSV Δ 51, и плохо переносилось мышами. Однако монотерапия VSV Δ 51 задерживала прогрессирование заболевания, и повышение выживаемости было значительным по сравнению с необработанной контрольной группой ($p=0,0379$, анализ логарифмического рангового критерия) (фиг. 38).

SMC обладает синергической активностью со стандартными видами терапии при MM.

Анализ жизнеспособности *in vitro* показали синергическую гибель клеток MM в комбинации на основе SMC с синтетическим глюкокортикоидным дексаметазоном (Dex) (фиг. 39B). Когда SMC объединяли с антагонистом глюкокортикоидного рецептора RU486, уровни клеточной гибели были сравнимы, что предполагает, что синергическая активность может быть вызвана не активацией GCR, а ее ингибированием действием на NF- κ B.

Комбинированное лечение на основе SMC активирует сигнализацию NF- κ B и вызывает апоптоз клеток MM.

Обработка SMC эффективно вызвала быструю деградацию cIAP1 и cIAP2 (фиг. 40A). При монотерапии, обработка SMC увеличивала передачу сигналов NF- κ B; начиная с небольшого кратковременного повышения в классическом пути, о чем свидетельствует более высокое соотношение фосфорилированного-r65 к r65, а затем оно уменьшалось (фиг. 40B). По мере ослабления активации классического пути альтернативный начинал очень сильно активироваться путь NF- κ B, что было показано увеличением соотношения p52 к p100 (фиг. 40C). Апоптоз в клетках подтверждали наличием расщепленной поли(ADP-рибозной)полимеразы (PARP). Расщепление PARP часто используют в качестве апоптотического маркера, поскольку оно является субстратом каспаз на ранних стадиях апоптоза.

Сочетание SMC либо с IFN β (фиг. 41), либо с VSV Δ 5, либо с VSVmIFN (содержащим встроенный ген IFN β мыши) (фиг. 42) имеет многие из тех же характеристик, что и монотерапия SMC. For instance, the classical pathway was eventually down-regulated and the alternative pathway was upregulated. Апоптоз также присутствовал, о чем свидетельствует расщепление PARP и расщепление каспазы 8. Рецептор IFN, IFNAR1, также был ингибирован обработкой IFN, что представляет особый интерес, поскольку этот факт является необходимым для продолжительного ответа. Вместе с обработкой VSV, RIP1 был почти полностью деградирован в поздние временные точки; это еще один сигнал апоптоза, так как он разрушается каспазой 8 после образования рипоптосомы.

Чувствительность к SMC в MM1R и MM1S связана с экспрессией глюкокортикоидного рецептора.

Ответ на опосредованную SMC клеточную гибель сильно изменяться в зависимости от клеточных линий MM1R и MM1S человека, которые получены из одной и той же родительской линии, и отличаются только экспрессией GCR. MM1R, в которой не обнаруживается экспрессия GCR (фиг. 39A), очень чувствительна к SMC (фиг. 39C), при этом MM1S, которая имеет высокий уровень экспрессии GCR, является резистентной. MM1S может стать чувствительной к обработке SMC при обработке либо Dex, либо антагонистом GCR RU486 (фиг. 39B).

Стимуляторы врожденного иммунного ответа активируют ингибиторы адаптивного иммунного ответа.

Клеточные линии MM человека, U266, MM1R и MM1S, активно активировали PD-L1 в ответ на обработку IFN β . Сопоставимое повышение активности было также замечено для комбинации SMC и IFN β . Другой лиганд для PD-1, PD-L2 аналогичным образом регулировался обработкой на основе IFN β . Этот эффект был заметен как в ранние, так и в поздние временные точки для обоих белков (фиг. 43). Это говорит о том, что любые стимуляторы иммунной системы, которые активируют IFN типа 1, приведут к усилению коингибирующих молекул T-клеток.

Комбинация SMC и иммуномодулирующих агентов приводит к гибели злокачественных клеток, к которым также относятся CD8⁺ T-клетки.

На фиг. 44A и 44B представлены графики, на которых показаны данные эксперимента, в котором излеченным после двойной обработки мышам проводили повторную инъекцию в жировой слой молочной железы клеток EMT6 (через 180 дней после исходной постимплантационной даты) или делали внутривенную инъекцию клеток CT-2A (через 190 дней после исходной постимплантационной даты).

На фиг. 44C показан график, на котором продемонстрированы данные эксперимента, в котором

клетки СТ-2А глиомы или клетки ЕМТ6 рака молочной железы трипсинизировали, поверхностно окрашивали конъюгированным контролем с изотипом IgG или анти-PD-L1 и подвергали проточной цитометрии.

На фиг. 44D представлен график, на котором приведены данные эксперимента, в котором CD8⁺ Т-клетки отделяли от спленоцитов (от наивных мышинных или от мышей, у которых ранее была излечена опухоль ЕМТ6), используя набор для позитивной магнитной селекции CD8 Т-клеток, и на них проводили анализ ELISpot для обнаружения IFN γ и Гранзима В. CD8⁺ Т-клетки совместно культивировали со средней или злокачественными клетками (соотношение злокачественных клеток к CD8⁺ Т-клеткам равно 12:1) и 10 мг контрольного IgG или анти-PD-1 в течение 48 ч. Три мыши использовали в качестве независимых биологических репликатов (ранее у них была излечена опухоль ЕМТ6). Клетки 4Т1 служат отрицательным контролем, поскольку клетки 4Т1 и ЕМТ6 несут одинаковые антигены главного комплекса гистосовместимости.

SMC и ингибиторы контрольных точек иммунного ответа обладают синергизмом на моделях ортотопической мыши со злокачественной опухолью.

На фиг. 45А представлен график, на котором показаны данные эксперимента, в котором мышам с опухолью молочной железы ЕМТ6 однократно внутримышечно вводили PBS или 1×10^8 PFU VSVD51, а через пять дней мышам вводили комбинации носителя или 50 мг/кг LCL161 (SMC), перорально, и 250 мг анти-PD, внутривентриально (в.б.). На фиг. 45В и 45С представлены графики, на которых показаны данные эксперимента, в котором мышам с внутривентриальными опухолями СТ-2А или GL261, вводили четыре раза носитель или 75 мг/кг LCL161 (перорально) и 250 мг (в.б.) контрольный IgG, анти-PD-1 или анти-CTLA-4.

На фиг. 45D представлен график, на котором показаны данные эксперимента, в котором атипичным "голым" мышам CD-1 с внутривентриальной опухолью СТ-2А, вводили 75 мг/кг LCL161 (перорально) и 250 мг (в.б.) анти-PD-1.

Пример 4. Миметики Smac обладают синергетической активностью с ингибиторами контрольных точек иммунного ответа и способствуют иммунитету опухоли.

Культура клеток

Клеточные линии RPMI-8226, U266, MM1R, MM1S, MPC-11 приобретали в ATCC. MPC-11 культивировали в DMEM (Hyclone) с 10% FBS (Hyclone), U266 культивировали в RPMI-1640 (Hyclone) с 15% FBS, все другие линии культивировали в RPMI-1640 с 10% FBS.

Клетки поддерживали при 37°C и 5% CO₂ в среде DMEM с добавлением 10% инактивированной сыворотки эмбрионального теленка и 1% незаменимых аминокислот (Invitrogen). Все клеточные линии получали из ATCC, кроме следующих: SNB75 (Dr. D. Stojdl, Children's Hospital of Eastern Ontario Research Institute) и SF539 (UCSF Brain Tumor Bank). Первичные клетки NF1^{-/+}p53^{-/+} получали у мышей C57B1/6J p53^{-/-}/NF1^{+/-}. Клеточные линии постоянно тестировали на заражение микоплазмой. ВТIC культивировали в бессывороточной культуральной среде, с добавлением EGF и FGF-250. Для трансфекции дцРНК, проводили обратную трансфекцию клеток с помощью RNAiMAX Lipofectamine (Invitrogen) или DharmaFECT I (Dharmacon) в течение 48 ч в соответствии с протоколом производителя. Клеточные линии постоянно тестировали на заражение микоплазмой. ВТIC культивировали в бессывороточной культуральной среде, с добавлением EGF и FGF-2. Для трансфекции дцРНК, проводили обратную трансфекцию клеток с помощью RNAiMAX Lipofectamine (Invitrogen) или DharmaFECT I (Dharmacon) в течение 48 ч в соответствии с протоколом производителя. Антитела и реагенты In vivo: LCL161 был щедрым подарком от Novartis. Анти-PD-1 (клон J43) приобретали у BioXcell. Poly(:C) (степень чистоты вакцины HMW, Invivogen). IFN α (для использования in vivo) был щедрым подарком от д-ра Peter Staeheli, Германия. Tetralogic Pharmaceuticals получали от Birinapant.

In vitro: IFN получали из анализа PBL; Дексаметазон и RU486 приобретали в Sigma Aldrich.

Используемые антитела включают RIAP1 (имеется в распоряжении), PD-L1 (Abcam), PD-L2 (R & D Systems), GCR (Snata Cruz), P100 (Cell Signalling), P65 (Cell signalling), p-P65 (Cell signalling), IFNAR1 (Abcam), PARP (Cell Signalling), тубулин (Developmental Studies Hybridoma Bank), RIP1 (R&D Systems), каспаза 8 (R&D Systems).

AT-406, GDC-0917 и AZD-5582 приобретали в Active Biochem.

TNF- α приобретали в Enzo. TNF- α получали из PBL Assay Science. Широкий диапазон хозяев IFN- α /B/D получали на дрожжах и очищали аффинной иммунохроматографией. Немишеневую дцРНК или дцдРНК, нацеленную на cFLIP, получали от Dharmacon (ON-TARGETplus SMARTpool). Высокомолекулярный poly(:C) получали от Invivogen.

Работа с животными

4-5-недельных мышей BALB/c покупали в Charles River и им в.в. вводили 1×10^6 клеток MPC-11 Fluc, стабильно экспрессирующих трансген лоциферазы светлячка (Fluc). Обработка включает 50 мг/кг LCL161, 250 мкг анти-PD-1, 250 мкг анти-CTLA4, 25 мкг poly(:C), 5×10^8 pfu VSVD51, 1 мкг IFN α . Визуализацию мышей проводили с помощью системы визуализации in vivo IVIS после в.в. инъекции 200 мкл люциферина для измерения люминесценции.

Вирусы

В данном исследовании использовали серотип Indiana VSV. VSV-EGFP, VSVΔ51 (без аминокислоты 51 в гене М) и Maraba-MG1 увеличивали в количестве в клетках Vero и очищали на градиенте Opti-Prep. Количество VSVΔ51 с делецией гена, кодирующего гликопротеин (VSVΔ51ΔG), увеличивали в клетках HEK293T, которые трансфицировали pMD2-G, используя Lipofectamine2000 (Invitrogen), и очищали на сахарозной подушке. NRRP получали путем обработки VSV-EGFP ультрафиолетом (250 мДж/см²), используя сшивающий агент XL-1000 UV (Spectrolinker).

Анализ жизнеспособности *in vitro*

Клеточные линии высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи. Клетки обрабатывали носителем (0,05% ДМСО) или LCL161 и инфицировали указанным количеством MOI вируса или обрабатывали 1 мкг мл⁻¹ IFN-αB/D, 0,1 нг·мл⁻¹ TNF-α, или указанным количеством NRRP в течение 48 ч. Жизнеспособность клеток определяли с помощью Alamar blue (натриевая соль резазурина (Sigma)), и данные нормировали с обработкой носителем. Выбранный размер образца согласуется с предыдущими отчетами, в которых использовался аналогичный анализ для анализов жизнеспособности, но для определения размера не использовали статистические методы.

Вестерн-блоттинг

Клетки соскабливали, собирали путем центрифугирования и лизировали в буфере для лизиса RIPA, содержащем коктейль ингибиторов протеазы (Roche). Опухоли иссекали, измельчали и лизировали, как указано выше. Равные количества растворимого белка разделяли на полиакриламидных гелях с последующим переносом на нитроцеллюлозные мембраны. Отдельные белки обнаруживали с помощью Вестерн-блоттинга, используемого для cFLIP (7F10, 1:500, Alexis Biochemicals) и β-тубулина (1:1000, E7 от Hybridoma Bank Developmental Studies). Поликлональные антитела кролика против крысы, IAP1 и IAP3, использовали для обнаружения cIAP1/2 и XIAP человека и мыши, соответственно (1:5000; Cyclex Co.). Для обнаружения первичных антител использовали AlexaFluor680 (Invitrogen) или IRDye800 (Li-Cor) (1:2500), а инфракрасные флуоресцентные сигналы обнаруживали с помощью инфракрасной системы визуализации Odyssey (Li-Cor). Полноразмерные блоты показаны на фиг. 68A-68D.

ELISA

Для обнаружения TNF-α *in vivo*, мышей обрабатывали 50 мкг poly(C) внутрибрюшинно (в.б.) или 5×10⁸ PFU VSVΔ51 внутривенно (в.в.). Мозги гомогенизировали в 20 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 150 mM NaCl, 10% глицерина и 1 mM MgCl₂, с добавлением коктейля ингибиторов протеаз, не содержащим EDTA (Roche). NP-40 добавляли до конечной концентрации 0,1% и осветляли путем центрифугирования. Равные количества обрабатывали для обнаружения TNF-α с помощью наборов для анализа QuantKine TNF-α (R&D Systems).

Чтобы оценить специфичность адаптивного иммунного ответа, мышам, вылеченным от опухолей CT-2A обработкой SMC и анти-PD-1, и контрольным (наивным) C57BL/6 самкам того же возраста, вводили подкожно 1×10⁶ клетки CT-2A. Спустя семь дней спленоциты выделяли и культивировали вместе с клетками CT-2A в течение 48 ч (соотношение спленоцитов и злокачественных клеток 20:1) в присутствии носителя или 5 мкМ SMC или 20 мкг мл⁻¹ указанных антител. Секрецию IFN-γ, GrzB, TNF-α, IL-17, IL-6 и IL-10 определяли с помощью ELISA (наборы от R&D Systems). Модели опухолей головного мозга CT-2A и GL261 5-недельные самки "голых" мышей C57BL/6 или CD-1 анестезировали изофлуораном, и хирургический участок выбривали и обрабатывали 70% этанолом. 5×10⁴ клетки были стереотаксически вводили в объеме 10 мкл в левое полосатое тело в течение 1 мин в следующие координаты: 0,5 мм спереди, 2 мм латерально от теменной кости и 3,5 мм в глубину. Кожу закрывали хирургическим клеем. Мышам вводили либо носитель (30% 0,1 M HCl, 70% 0,1 M NaOAc, pH 4,63), либо 75 мг кг⁻¹ LCL161 перорально и внутриопухолевым путем (в.о.), в 10 мкл с 50 мкг poly(C) внутривенно (в.в.), с 5×10⁸ VSVΔ51 или внутрибрюшинно (в.б.) с 250 мкг анти-CD4 (GK1.5), анти-CD8 (YTS169.4), анти-PD1 (J43) или CTLA-4 (9H10).

В случае введения биринпатина, мышам вводили носитель (12,5% Captisol) или 30 мг кг⁻¹ биринпанта (в.б.). В некоторых случаях животным вводили анти-IFNAR1 (MAR1-5A3), анти-IFN-γ (R4-6A2) или анти-TNF-α (XT3.11). Контроль с изотипическим IgG антителом использовали следующим образом: BE0091, BE0087, BP0090, MOPC-21 или HPRN. Все нейтрализующие и контрольные антитела получали от BioXCell. Для внутричерепного введения SMC и IFN типа I мышам вводили по 10 мкл комбинации носителя (0,5% ДМСО), 100 мкМ LCL161, 0,01% BSA или 1 мкг IFN-αB/D. Альтернативно, мышам перорально вводили носитель или 75 мг кг⁻¹ LCL161 и 1 мкг IFN-α B/D (в.б.). Животных подвергали эвтаназии, когда они проявляли заранее определенные признаки неврологического дефицита (неспособность перемещаться, потерю веса >20% массы тела, летаргический сон, сгорбленную позу). Группы лечения были назначены по клетками, и каждая группа имела от 5 до 9 мышей для статистических измерений (анализ Каплан-Мейер с логарифмическим ранговым критерием). Рандомизации не было, и ведущий исследователь не знал как распределены группы.

Размер выборки согласуется с предыдущими записями, в которых изучался рост опухоли и выживаемость мышей после лечения злокачественного новообразования, но для определения размера выборки

статистических анализов не проводили.

МРТ

МРТ головного мозга живых мышей проводили в доклиническом отделении для визуализации the University of Ottawa, используя 7 Tesla GE/Agilent MR 901. Мышей анестезировали для проведения МРТ с использованием изофлурана. Для формирования изображения использовали последовательность импульсов двойной быстрой эхо- последовательности (FSE) для получения 2D-изображения со следующими параметрами: 15 заданных срезов, толщина среза=0,7 мм, расстояние=0 мм, поле зрения=2 см, матрица=256×256, время эха=25 мс, время повторения=3000 мс, длина эхо- последовательности=8, полоса пропускания=16 кГц, 1 средняя и насыщение сигнала от жира. Последовательность FSE выполняли как в поперечной, так и в корональной плоскостях, при общем времени формирования изображения около 5 мин.

Модель опухоли молочной железы EMT6

Опухоли молочной железы получали путем инъекции 1×10^5 клеток EMT6 в жировую ткань молочной железы 5-и недельным самкам мышей BALB/c. Мышам с пальпируемыми опухолями (~100 мм³) вводили одновременно либо носитель (30% 0,1 М HCl, 70% 0,1 М NaOAc, pH 4,63), либо 50 мг/кг LCL161 перорально, и либо делали в.о. инъекцию 5×10^8 PFU VSVΔ51 или в.б. инъекции контрольного IgG (BE0091) или антиPD-1 (O43). Животных подвергали эвтаназии, когда опухоль давала внутрибрюшинные метастазы или когда опухолевая нагрузка превышала 2000 мм³. Объем опухоли рассчитывали с использованием (π) (W)²(L)/4, где W=ширина опухоли и L=длина опухоли. Группы лечения были назначены по клеткам, и каждая группа имела от 4 до 5 мышей для статистических измерений (среднее значение, стандартная ошибка, анализ Каплан-Мейер с log-ранк). Рандомизации не было, и ведущий исследователь не знал как распределены группы.

Модель множественной миеломы MPC-11

Модель множественной миеломы и плазмцитомы у мышей получали путем инъекции 1×10^6 клеток MPC-11, меченных люциферазой MPC, (в.в.)самкам мышей BALB/c в возрасте 4-5 недель. Мышам вводили носитель (30% 0,1 М HCl, 70% 0,1 М NaOAc pH 4,63) или 75 мг кг⁻¹ LCL161 перорально и 250 мкг контрольных IgG или α -PD-1 антител (в.б.). Биоллюминесценцию визуализировали с помощью системы рентгеновского излучения Xenogen 2000 IVIS CCD (Caliper Life Sciences) после инъекции 4 мг люциферина (Gold Biotechnology). Группы лечения были назначены по клеткам, и каждая группа имела от 3 до 4 мышей для статистических измерений (анализ Каплан-Мейер с логарифмическим ранговым критерием). Рандомизации не было, и ведущий исследователь не знал как распределены группы.

Повторная опухолевая нагрузка

Наивным самкам C57BL/6 мышей или мышей, ранее излеченных от внутрочерепных опухолей CT-2A, с помощью комбинированной терапии на основе SMC с иммуностимуляторами (минимум 180 дней после имплантации), того же возраста повторно инъецировали клетки CT-2A в.ч., как описано выше, или 5×10^5 клеток, подкожно. Наивным BALB/c или мышам, ранее излеченные от опухоли молочной железы, меченной люциферазой EMT6, комбинированной обработкой SMC и VSVΔ51 (от 90 до 120 дней после имплантации), повторно инъецировали 5×10^5 немаркированных клеток EMT6 в жировой слой. Животные подвергали эвтаназии, как описано выше. Слепой анализ или рандомизация были невозможны.

Все эксперименты на животных проводились с одобрения the University of Ottawa Animal Care and Veterinary Service в соответствии с принятыми принципами, утвержденными the Canadian Council on Animal Care.

Проточная цитометрия

Для анализа in vitro клетки обрабатывали носителем (0,01% ДМСО) или 5 мкМ LCL161 и 0,01% BSA, 1 нг·мл⁻¹ TNF-, 250 Ед mL-1 IFN- β или 0,1 MOI VSVΔ51 в течение 24 ч. Клетки отделяли от планшетов с помощью безферментного буфера для диссоциации (Gibco) и окрашивали Zombie Green и указанными антителами. Для анализа иммунных инфильтратов в опухоли, внутрочерепные опухоли CT-2A механически диссоциированы, эритроциты лизировали в буфере для лизиса АСК и окрашивали Zombie Green и указанными антителами. В некоторых случаях клетки стимулировали 5 мкг/мл PMA и 500 нг/мл ионимидина в присутствии Brefeldина А в течение 5 ч, а внутриклеточные антигены обрабатывали с использованием набора BD Cytofix/Сytoperm. Антитела включают Fc блок (101319, 1:500), PD-L1 (10F.9G2, 1:250), PD-L2 (TY25, 1:100), I-A/I-E (M5/114.15.2, 1:200) и H-2Kd/H-2Dd- (34-1-2S, 1:200), CD45 (30-F11, 1:300), CD3 (17A2, 1:500), CD4 (GK1.5, 1:500), CD8 (53-6.7,1:500), PD-1 (29.1A12, 1:200), CD25 (PC61, 1:150), Gr1 (RB6-AC5, 1:200), F4/80 (BM8, 1:200), GrzB (GB11, 1:150) и IFN- γ (XMG1.2, 1:200). Все антитела были от BioLegend, за исключением TNF- α (MP6-XT22, 1:200) и CD11b (M1/70, 1:100), которые были от BD Biosciences. Клетки анализировали на Cyan ADP 9 (Beckman Coulter) или BD Fortessa (BD Biosciences), и данные анализировали с помощью FlowJo (Tree Star).

Микроскопия

Обнаружение клеток mKate2-CT-2A проводили в инкубаторе, оснащенном микроскопом Incucyte Zoom, оснащенным объективом 10X. Нумерацию сигналов флуоресценции от Incucyte Zoom осуществляли с помощью алгоритма подсчета, интегрированного в программное обеспечение IncuCyte Zoom.

Мультиплексный ELISA

Обнаружение белков сыворотки после обработки комбинацией SMC и анти-PD-1 анализировали с помощью мультиплексного набора на основе проточной цитометрии (LEGENDplex inflammation panel from Biolegend). Иерархический анализ определяли с помощью Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

ОТ-кПЦР

Общую РНК экстрагировали из клеток с использованием набора RNeasy mini prep (Qiagen). Двух-ступенчатый ОТ-кПЦР осуществляли с помощью iScript и SsoAdvanced SYBR Green supermix (BioRad) на Mastercycler ep realplex (Eppendorf). кПЦР проводили с использованием праймеров PD-L1 и PD-L2 (Qiagen) и зеленого реактива SIBR (Bio-Rad). Относительную экспрессию рассчитывали как ААС с использованием RPL13A в качестве контроля.

Библиотечную панель генов цитокинов и хемокинов получали на realtimeprimers.com. Каждую обработку проводили $n=4$, и данные нормировали на восемь различных эталонных генов и сравнивали с каждым образцом и образцом IgG. Данные анализировались с помощью иерархического анализа с использованием Morpheus.

ELISpot

CD8⁺ Т-клетки получали из спленцитов самок наивных мышей подходящего возраста или мышей, ранее излеченных от внутримозговой опухоли СТ-2А (180 дней после имплантации) или опухолей молочной железы EMT6 (120 дней после имплантации) с использованием набора для определения магнитного поля CD8 (Stemcell технологии). Клетки CD8⁺ совместно культивированы со злокачественными клетками (1:20 для СТ-2А, LLC и 1:12,5 для клеток EMT6 или 4Т1) и с 10 мкг мл⁻¹ IgG (BE0091) или анти-PD-1 (J43) в течение 48 ч с использованием наборов ELISpot IFN- γ или Granzyme B (R & D Systems).

Статистика

Для всех исследований на животных выживаемость рассчитывали по количеству дней после имплантации клеток ММ и наносили на график как кривые Каплана-Мейера. На их основании логарифмический ранговый критерий использовали для определения значимости. Для анализов жизнеспособности *in vitro* показана ошибка при стандартном отклонении. Последовательные парные множественные сравнения были выполнены с использованием метода Холма-Сидака (SigmaPlot). Сравнение нескольких групп лечения анализировали с использованием однонаправленного ANOVA с последующим пост-аналитическим анализом с использованием множественного сравнительного теста Dunnett с коррекциями для множественного сравнения (GraphPad). Оценку вариации анализировали с помощью GraphPad. Сравнение пар лечения анализировали с помощью двухсторонних t-тестов (GraphPad).

Пример 5. Объединение иммуностимулирующих агентов для лечения глиобластомы.

Авторы показали, что культивированные клеточные линии первичной глиобластомы погибают под действием SMC в сочетании с экзогенным TNF- α , онколитическим вирусом VSV Δ 51 или с инфекцией VSV Δ 51 Δ G, который является нереплицирующимся (фиг. 46А и 46В). Авторы подтвердили, что синергетические эффекты SMC, LCL161 и TNF- α являются общим явлением в этом классе лекарственных средств, поскольку авторы наблюдали смерть клеток глиобластомы под действием комбинации TNF- α с различными SMC (фиг. 47). Кроме того, авторы также наблюдали усиление эффективности SMC с онколитическими рабдовирусами VSV Δ 51 или Maraba-MG1 для клеток, инициирующих опухоль человека (BTIC) (фиг. 46С). Было обнаружено, что нереплицирующиеся частицы рабдовируса (NRRP), которые сохраняют свои инфекционные и иммуностимулирующие свойства, но не способны реплицироваться, аналогичным образом взаимодействуют с SMC и индуцируют гибель клеток глиобластомы. Примечательно, только приблизительно 50% определенных линий злокачественных клеток сенсibilизированы на действие комбинации SMC и TNF- α или TNF-родственного апоптоза-индуцирующего лиганда (TRAIL) с последующей гибелью; большинство резистентных клеточных линий дополнительно сенсibilизированы на ингибирование ингибитора каспазы-8, cFLIP (клеточный FLICE-подобный ингибирующий белок), с последующей гибелью. В соответствии с предыдущими результатами, две линии глиобластомы, которые не рефрактерны к комбинированной обработке SMC и TNF- α или VSV Δ 51 Δ G, были уничтожены при проведении сайленсинга cFLIP (фиг. 48А и 48В). Напротив, нормальные диплоидные фибробласты человека не были сенсibilизированы на ингибирование cFLIP и комбинированное лечение с последующей гибелью. Эти данные свидетельствуют о том, что ответ IFN и/или цитокинов, а не прямой вирус-индуцированный цитолиз, ответственны за SMC-индуцированную гибель клеток глиобластомы.

Поскольку VSV Δ 51 является нейротоксичным, и поскольку остаются трудности в отношении микросреды мозга с иммунной защитой и в отношении проникновения лекарств через гематоэнцефалический барьер (BBB), авторы решили проверить влияние системной доставки и внутримозгового пути введения иммунотерапевтического агента. После получения внутримозговых опухолей СТ-2А (фиг. 49А и 49В), авторы проверили, может ли системное введение путем перорального зонда для SMC, LCL161 вызвать временную деградацию белков первичных мишеней, cIAP1 и cIAP2, внутри внутримозговых опухолей мыши. При этом, авторы не наблюдали ингибирование cIAP в соседних неопухолевых тканях го-

ловного мозга, а также в коре или мозжечке у мышей без опухолей (фиг. 51). Таким образом, SMC способны проникать в опухоли мозга с дефектным BBB. Системное введение иммуностимулирующих агентов, таких как синтетический агонист TLR3 poly(:C), инъецируемый внутривенно (в.в.) или онколитический вирус VSVΔ51, вводимый внутривенно (в.в.), индуцировали продукцию цитокина TNF-α в сыроворотке и мозге мышей без опухолей.

Если мышам с внутричерепной глиобластомой CT-2A однократно вводили SMC (пероральный зонд), VSVΔ51 (в.в.) или поли (I:C) (внутричерепной путь, в.ч.), повышение выживаемости у мышей было минимально при этом агрессивной злокачественной опухоли (17% уровень выживаемости) (фиг. 55C). Однако комбинация системного SMC и иммуностимулирующего триггера, VSVΔ51 или poly(:C), значительно продлевала выживаемость и приводила к длительному излечению у 71% или 86% мышей, соответственно. Опухоли (которые не были помечены чужеродным белком, чтобы усилить иммунитет) визуализировали на 40 день после имплантации с помощью MPT, чтобы подтвердить наблюдаемые результаты лечения.

Вирус-индуцированные иммунные эффекты частично опосредуются IFN типа I. Авторы показали, что клетки CT-2A частично чувствительны к комбинированному SMC и рекомбинантному IFN-α *in vitro* (фиг. 50A). Авторы обнаружили, что внутричерепное введение SMC приводило к еще более глубокой деградации белков IAP в опухолях головного мозга CT-2A (фиг. 33). Для исследований *in vivo*, авторы использовали форму рекомбинантного IFN-α, которая состоит из гибрида изоформы IFN-α B и IFN-α D человека, который проявляет сильную противовирусную активность в отношении широкого круга видов. Однократное совместное введение SMC и IFN-α значительно повышало выживаемость мышей и приводило к 50%-ой длительности лечения. Выжившие не проявляли явных физических или поведенческих дефектов для однократного или комбинированного внутричерепного введения SMC, poly(:C) или IFN-α (фиг. 54). Кроме того, поскольку авторы наблюдали переходное повышение внутричерепного TNF-α в головном мозге при системной инфекции VSVΔ51 или при лечении poly(:C), авторы стремились определить, будет ли системное введение рекомбинантного IFN-α наряду с обработкой SMC эффективным на модели глиобластомы CT-2A. Аналогично комбинации SMC и VSVΔ51, комбинация вводимого в.в. IFN-α вместе с пероральным зондом SMC приводила к длительному излечению у 55% мышей (фиг. 50B). Эти результаты показывают, что наличие переходной воспалительной среды в головном мозге является допустимой и указывает на возможность проведения непрямого и других прямых (внутричерепные) путей комбинированной терапии.

Пример 6. Получение длительного иммунитета к опухоли у излеченных мышей.

Врожденная иммунная система играет ключевую роль в SMC-опосредованной гибели опухолевых клеток. Тем не менее, остаются фундаментальные вопросы относительно роли адаптивной иммунной системы в этом подходе комбинированной SMC. Кроме того, потенциальной ловушкой предлагаемого использования онколитических вирусов или других иммуностимулирующих агентов в сочетании с обработкой SMC может быть повышение экспрессии ингибиторов лигандов контрольных точек злокачественных клеток, тем самым сводя к нулю опосредованную CTL атаку опухоли. Анализ проточной цитометрии показал, что обработка клеток глиомы рекомбинантным IFN типа I или инфицирование VSVΔ51, а не лечение TNF-α, привело к увеличению поверхностной экспрессии PD-L1 и маркеров главного комплекса гистосовместимости (MHC) I. Кроме того, влияния на экспрессию этих молекул на поверхности опухоли при обработке SMC не отмечалось (фиг. 25A и 56).

Интересно, что мыши, ранее излеченные от ортотопической карциномы молочной железы EMT6 комбинированной терапией SMC, были полностью устойчивы к приживлению опухоли при повторной нагрузке опухолевыми клетками EMT6 (фиг. 52B). Однако другая сингенная клеточная линия 4T1, которая также использует белки главного комплекса гистосовместимости, не отторгалась у этих излеченных мышей. Мы обнаружили, что мыши, излеченные от внутричерепных опухолей CT-2A, также устойчивы к приживлению опухолевых клеток CT-2A, инъецированных либо подкожно, либо внутричерепным введением (фиг. 52C). Затем авторы оценили цитотоксический потенциал CD8 T-клеток излеченных мышей с помощью анализа ELISpot. Стимуляция CD8+ T-клеток излеченных мышей, но не клеток, выделенных у наивных мышей, клетками CT-2A показала наличие специфических реакционноспособных T-клеток, как показано по усилению продукции IFN-γ и Гранзима B (GrzB) (фиг. 54A). Участие анти-PD-1 блокирующих антител дополнительно увеличивало экспрессию IFN-γ и GrzB. Аналогичные результаты наблюдались у мышей, излеченных от опухолей EMT6 (фиг. 44D). В совокупности эти результаты предполагают создание надежного и специфического долгосрочного иммунитета опухолей с использованием комбинированной терапии SMC.

Пример 7. Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа обладают синергитической активностью с антагонистами IAP.

Затем авторы исследовали, может ли существующий класс иммунотерапевтических средств против злокачественных новообразований, известный как ингибиторы контрольных точек иммунного ответа, или ICI, повышать эффективность SMC. Недавно было сделано сообщение о том, что лечение ICI глиобластомы у мышей приводит, по крайней мере, к частичному выживанию. Сначала авторы попыта-

лись определить, влияет ли лечение SMC на экспрессию PD-1 в подмножестве инфильтрирующих иммунных клеток в опухолях головного мозга CT-2A. Хотя не было статистической разницы между уровнями инфильтрирующих CD3+ или CD3+ CD8+ клеток внутри внутричерепных опухолей CT-2A, авторы наблюдали активное увеличение CD3+ и CD3+ CD8+ клеток, экспрессирующих контрольную точку иммунного ответа, PD-1 (фиг. 54B и 55). Несмотря на общее увеличение экспрессии PD-L1 в CD25- клетках, которые являются преимущественно клетками CT-2A, эта тенденция не достигала статистической значимости (фиг. 55C).

Чтобы определить, могут ли повышенные уровни PD-1+ CD8 T-клеток быть отрицательным модулятором для эффективности SMC, авторы оценили блокировку мишени контрольной точки PD-1, а также CTLA-4 в комбинации с SMC, используя две модели глиобластомы у мышей. Системное введение антител против PD-1 или антител против CTLA4 не показало их самостоятельной активности (фиг. 54D и 54E). Напротив, комбинация анти-PD-1 и SMC значительно продлевала выживаемость и, соответственно, обеспечивала 71 и 33% уровни длительного излечения на моделях CT-2A и GL261. Кроме того, в сочетании с SMC биологическая активность анти-PD-1 превосходила биологическую устойчивость против CTLA-4 на модели CT-2A (71% против 43%, фиг. 54D).

Существует два структурных класса SMC: мономеры и димеры. Мономерные SMC состоят из единственной химической молекулы, которая связывается с доменами BIR IAP, тогда как димерные SMC состоят из двух молекул SMC, соединенных линкером, что обеспечивает совместное связывание и/или прикрепление к IAP. SMC, находящиеся на заключительных стадиях исследования, LCL161, находится в центре внимания большинства исследований авторов и является мощным мономером. Авторы затем попытались оценить, аналогичным ли образом другой димерный SMC, находящийся на заключительных стадиях исследования, взаимодействует с ICI для лечения глиобластомы. Авторы отметили значительное повышение выживаемости мышей с внутричерепными опухолями CT-2A при лечении с помощью анти-PD-1 и димера SMC, биринапант (фиг. 54F). Поскольку комбинированная блокада PD-1 или CTLA-4 эффективна для пациентов с меланомой, авторы попытались определить, будет ли комбинация PD-1 и CTLA-4 также значимо улучшать терапию SMC. Комбинация антител, нацеленных на PD-1 и CTLA-4, была эффективной при индукции длительного терапевтического эффекта на моделях злокачественного новообразования у мыши, авторы наблюдали общую выживаемость, равную 67% (фиг. 54G). Поразительно, что введение терапии SMC вместе с анти-PD-1 и анти-CTLA-4 вместе приводило к устойчивой частоте выздоровления, равной 100%.

Синергетический эффект SMC и ICI не ограничивается опухолями головного мозга. Авторы также наблюдали значительное увеличение выживаемости на модели высокоагрессивной и рефрактерной множественной миеломы у мышей, используя клетки MPC-11 (фиг. 56A и 56B). Устойчивая скорость излечения, равная 75%, была также получена у мышей с опухолью молочной железы EMT6, которая дополнительно повышалась до 100% при введении стимулятора иммунного ответа (фиг. 57A-57C).

Пример 8. CD8+ T-клетки необходимы для эффективности SMC и ICI.

Для того, чтобы понять первоначальные принципы клеточного механизма действия, авторы смодулировали продукцию иммунных факторов из клеток CT-2A, которые совместно культивировали вместо со спленоцитами, полученными у мышей, излеченных от внутричерепных опухолей CT-2A, с помощью комбинированных SMC и анти-PD-1 терапии. Авторы наблюдали значительное повышение продукции IFN- γ и GrzB из клеток CT-2A, инкубированных вместе со спленоцитами, полученными от выживших мышей (фиг. 58A и 59A). Примечательно, что отмечалось увеличение продукции интерлейкина 17 (IL-17). Авторы также наблюдали снижение экспрессии провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α , что было неожиданным, учитывая, что ранее было обнаружено, что IL-17 стимулирует сигнальный путь NF- κ B.

Однако экспрессия IFN- γ и IL-17 из спленоцитов, выделенных из излеченных мышей, значительно увеличивалась при лечении анти-PD-1 или PD-L1, что указывает на то, что иммунный ответ на основе T-клеток может быть усилен при ингибировании контрольных точек сигнальной оси PD-1. Затем авторы попытались определить, влияет ли на этот генный ответ обработка SMC. Среди ранее проанализированных цитокинов включение SMC в эти сокультуры наряду с блокадой анти-PD-1 повышало секрецию IFN- γ , GrzB, IL-17 и TNF- α (фиг. 59B и 59B). Примечательно, что уровень IL-6 в супернатанте не влиял на обработку SMC. Кроме того, иммуносупрессивный цитокин IL-10 имел общую тенденцию к снижению секреции с комбинированным лечением SMC и анти-PD-1.

В связи с повышением уровня GrzB, цитотоксического фактора, который частично блокируется XIAP31-33 и TNF- α , авторы затем оценивали приводит ли одновременное культивирование клеток глиобластомы и спленоцитов у наивных мышей или мышей, ранее излеченных от внутричерепных опухолей CT-2A, к гибели клеток CT-2A. Используя различные структурированные SMC, авторы наблюдали статистически значимое увеличение гибели клеток CT-2A в присутствии SMC, и этот ответ повышался при включении анти-PD-1 антител (фиг. 59C).

В совокупности эти результаты показывают, что надежный ответ эффекторных T-клеток вызван комбинированной обработкой ICI и SMC. Для дальнейшего выяснения клеточного механизма авторы

уменьшили количество иммунных клеток с помощью специфических CD4 или CD8-нацеливающих антител. Было обнаружено, что 71% степень излечения под действием комбинированной терапии полностью исчезает при уменьшении количества CD8+ Т-клеток (фиг. 59D). Интересно, что уменьшение количества CD4+ Т-клеток приводило к 100% частоте выздоровления в случае комбинации SMC и анти-PD-1 и 17% частоте выздоровления в контрольной группе. Эти результаты показывают, что удаление CD4+ иммуносупрессивных клеток (таких как регуляторные Т-клетки) способствует индукции опухолевой регрессии и что CD4+ клетки не требуются для эффективности комбинированного подхода к лечению. При втором подходе у "голых" мышей CD1, у которых отсутствовали функциональные Т-клетки, формировали внутричерепные опухоли СТ-2А, а затем им вводили комбинацию анти-PD-1 антитела с носителем или SMC. Преимущественное выживанием, обеспечиваемое благодаря комбинации SMC и анти-PD-1, пропадало у таких мышей с дефицитом Т-клеток (фиг. 59E). В целом, синергетический эффект SMC и анти-PD-1 зависит от функционального адаптивного иммунного ответа и, таким образом, подразумевает CD8+ Т-клетки в качестве первичных медиаторов иммунных клеток для эффективности *in vivo*.

Пример 9. Обработка SMC влияет на внутриопухолевую инфильтрацию иммунными клетками.

Для понимания аспекта иммунного клеточного ответа при синергизме SMC и ICI, авторы оценивали профили инфильтрирующих CD45+ иммунных клеток мышей с глиобластомой. В этих исследованиях авторы оценивали инфильтрирующие иммунные клетки на поздних стадиях глиобластомы после комбинированной терапии PD-1 и SMC (фиг. 61А). Анализ проточной цитометрией инфильтрирующих опухолей Т-клеток показал статистически незначительную тенденцию в отношении доли CD4+ и CD8+ Т-клеток между группой, получавшей носитель и IgG-контрольной группой, и всеми однократно и двукратно обработанными мышами (фиг. 66В). Однако анализ CD4+ и CD25+ Т-клеток, свидетельствующий о популяции регуляторных Т-клеток (Treg), выявил значительное снижение этой клеточной популяции при терапии только SMC или комбинации SMC и ICI (фиг. 61С).

Затем авторы охарактеризовали поверхностную презентацию PD-1 в Т-клетках после обработки только SMC или комбинацией. Авторы отметили значительное повышение CD8+ Т-клеток, экспрессирующих PD-1 у мышей, обработанных только SMC, и обработка анти-PD-1 или комбинированная обработка SMC и анти-PD-1 в меньшей степени проводила к обнаруживаемой клеточной презентации PD-1 (фиг. 61D). Кроме того, авторы наблюдали тенденцию к уменьшению презентации PD-1 в CD4+ Т-клетках в группах, обработанных SMC или анти-PD-1. Однако обнаруживаемый уровень поверхностного PD-1 исчезал при комбинаторной обработке SMC и анти-PD-1 (фиг. 61E).

В дополнение к наблюдаемой Т-клеточной инфильтрации внутричерепных опухолей глиобластомы, авторы также охарактеризовали наличие супрессорных клеток, полученных из миелоидов (MDSC) и астроцитов/микроглии. В отличие от предыдущего отчета, авторы не обнаружили различий в популяции MDSC (CD11b+ Gr1+) в любых когортах лечения (фиг. 61F). Однако авторы обнаружили, что популяция астроцитов/микроглии была значительно уменьшена в когортах лечения, которые включали анти-PD-1 (фиг. 61G). В целом, эти результаты показывают, что результатом комбинированного лечения является уменьшение популяции иммуносупрессивных CD4- Т-клеток с одновременным уменьшением презентации PD-1 в Т-клетках и уменьшением количества астроцитов и/или микроглии.

Пример 10. Синергетическая активность SMC и ICI зависит от TNF- α .

Затем авторы охарактеризовали профили опухолевых клеточных цитокинов и хемокинов у мышей с внутричерепными глиобластомами, обработанными комбинациями SMC и анти-PD-1. Анализ проточной цитометрией показал на увеличение CD8+ клеток, экспрессирующих GrzB, при введении анти-PD-1 антител. Соотношение цитотоксических CD8+ (фиг. 62А) и CD4+ Treg также было повышено в когортах лечения анти-PD-1 и SMC и анти-PD-1 (фиг. 62В). Кроме оценки экспрессии GrzB, авторы проанализировали уровни IFN- γ и TNF- α в Т-клетках. Неожиданно авторы обнаружили уменьшение пропорции CD4+ клеток, экспрессирующих IFN- γ , при обработке SMC (даже при добавлении антител, нацеленных на PD-1), но не обнаружили изменения уровня экспрессии IFN- γ в любой когорте лечения CD8+ клетками (фиг. 62С). Затем авторы проанализировали уровень экспрессии TNF- α в Т-клетках. В этом контексте авторы отметили значительное повышение CD4+ и CD8+ Т-клеток, экспрессирующих TNF- α (фиг. 69D), что указывает на то, что эти Т-клетки могут непосредственно индуцировать опосредованную SMC гибель опухолевых клеток.

Авторы также оценили влияние комбинированной терапии SMC и анти-PD-1 блокады на концентрацию сыворотки и уровни экспрессии генов цитокинов и хемокинов на модели с внутричерепной глиобластомой СТ-2А. Авторы обнаружили статистически значимое повышение провоспалительных цитокинов IFN-, IL-1- α , IL-1 β и IL-17 и многофакторных цитокинов IFN- γ , IL-27 и GM-CSF (фиг. 60 и 62E). Примечательно, что не было отличий в присутствии противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10. Аналогично, анализ профилей экспрессии цитокинов и хемокинов внутри внутричерепных опухолей СТ-2А после комбинированной обработки SMC и ICI показал кластеризацию провоспалительных цитокинов и хемокинов (фиг. 62F и 63). Кроме кандидатов SMC или комбинированного лечения SMC и ICI также были указаны провоспалительные цитокины IFN- β , IL-1 β , IL-17, Osm и TNF- α , хемокины Ccl2 (также известные как MCP-1), Ccl5, Ccl7, Ccl22, Cxcl9, Cxcl10 и Cxcl11 и многофакторные факторы, такие как

FasL, IL-2, IL-12 и IFN- γ .

Поскольку авторы наблюдали последовательное увеличение уровней IFN- β и IFN- γ , была сделана попытка охарактеризовать функциональную роль этих сигнальных молекул с использованием блокирующих/нейтрализующих антител у мышей с внутрочерепными опухолями CT-2A, обработанных SMC и анти-PD-1. Блокада сигнального пути IFN типа I с использованием антитела, которое блокирует рецептор IFNAR1, прекращает синергические эффекты, увеличивающие выживаемость мышей с внутрочерепными опухолями CT-2A после комбинированной обработки SMC и анти-PD1 (фиг. 62G).

Напротив, антагонизм функции IFN- γ с использованием анти-IFN- γ антитела частично ингибировал синергический эффект комбинированной терапии SMC и ICI. В целом, эти результаты показывают, что каждый лечебный агент, в том числе в сочетании, приводит к продукции различных набор генов и белков, но в целом зависит от интактного сигнального пути IFN I типа.

В целом, результаты показали, что синергические эффекты SMC и ICI могут быть в основном связаны с усилением CTL-опосредованной атаки на клетки глиобластомы, и это связано с провоспалительным ответом, который включает IFN типа I. Сокультивирование клеток CT-2A и CD8+ Т клеток, выделенных из мышей, ранее вылеченных от внутрочерепных опухолей, приводило к увеличению GrzB-позитивных CD8+ Т-клеток, которые не были увеличены только обработкой SMC (фиг. 65A). Однако было небольшое снижение числа жизнеспособных клеток CT-2A при совместной инкубации с теми же CTL, даже когда ось PD-1/PD-L1 была нейтрализована (фиг. 65B).

Как ранее было отмечено, что ответ IFN типа I также приводит к продукции TNF- α , авторы исследовали способность Т-клеток продуцировать TNF- α после лечения SMC в присутствии клеток глиобластомы. Соответственно, после этого была оценена продукция TNF- α .

Включение SMC значительно повышало долю CD8+ Т-клеток, экспрессирующих TNF- α , независимо от введения антител, нацеленных на PD-1 (фиг. 65A). В соответствии с повышенным уровнем экспрессии TNF- α из CD8 Т-клеток авторы наблюдали значительное снижение клеток CT-2A в сокультуральной системе, используя клетки CT-2A и CD8 Т-клетки вылеченных мышей (фиг. 65B). Примечательно, что SMC-опосредованные эффекты в отношении индукции гибели клеток CT-2A в основном зависели от TNF- α (основного медиатора SMC-индуцированного уничтожения клеток). После этого, были оценены улучшает ли терапия SMC пролиферацию Т-клеток. Действительно, авторы наблюдали значительное снижение CFSE-загруженных CD8+ Т-клеток наряду с появлением новой популяции слабо меченных CFSE-клеток после совместной инкубации клеток CT-2A, и этот эффект был выражен при введении SMC и анти-PD-1 (фиг. 64).

Эти результаты показывают, что цитотоксические Т-клетки в ответ на лечение SMC и анти-PD-1 могут приводить к усилению гибели опухолевых клеток из-за увеличения продукции GrzB и TNF- α , профакторов смерти, которые индуцируют гибель опухолевых клеток из-за антагонизма к IAP. Авторы функционально охарактеризовали роль TNF- α , используя блокирующие антитела, нацеленные на TNF- α . При применении системной блокады TNF- α наблюдалось почти полное изменение эффективности комбинированной обработки SMC и ICI (фиг. 65C), подчеркивая важность TNF- α для синергического эффекта этих разрозненных агентов.

Иммуномодулирующие противораковые эффекты SMC являются мультимодальными (фиг. 66 и 67). SMC могут поляризовать макрофаги от иммуносупрессивного типа M2 в отношении воспалительного TNF- α -продуцирующего фенотипа M1. Более того, противоопухолевые эффекты SMC сильно усиливаются под действием провоспалительных цитокинов, а присутствие этих цитокинов, например, TNF- α или TRAIL, в опухолевом микроокружении приводит к гибели опухолевых клеток. В частности, SMC-опосредованное истощение cIAP превращает TNF- α -опосредованный ответ выживания в путь гибели в раковых клетках.

Проведенные на настоящий момент авторами исследования показывают, что SMC могут сотрудничать и драматически активизировать действие ICI, в том числе антител против PD-1 или анти-CTLA4, что позволяет осуществлять стойкое излечение мышей с агрессивными внутрочерепными опухолями. Множественность и сложность механизмов, связанных с терапией SMC, затрудняют выделение отдельных ролей для различных иммуномодулирующих действий в комбинаторную синергию. Однако ясно, что в нее вовлечена цитотоксичность TNF- α . Более того, настоящее исследование дополнительно демонстрирует, что CD8+ Т-клетки также необходимы для противораковой активности, если ICI находится в комбинации с SMC.

Таким образом, авторы впервые показали, что SMC могут усиливать активность ICI на моделях опухолей у мышей.

Кроме того, этот комбинаторный эффект зависит от наличия CD8+ Т-клеток с сопутствующим снижением иммуносупрессивных CD4+ Т-клеток и сигнальных путей IFN типа I и II и TNF- α , что явно подразумевает роль адаптивного иммунитета для SMC-опосредованной терапии у мышей. Таким образом, SMC-опосредованные ко-стимулирующие сигналы Т-клеток обеспечивают стимул для адаптивных иммунных реакций, которые развиваются против опухоли, и это полностью реализуется, если с ICI снимаются тормоза, наложенные коингибирующими сигналами, такими как PD-1 или PD-L1.

Другие варианты осуществления изобретения

Все публикации, патентные заявки и патенты, указанные в настоящем описании, включены в настоящее изобретения в качестве ссылки.

Хотя изобретение было описано на примерах с конкретными вариантами осуществления, следует понимать, что оно может быть дополнительно модифицировано. Следовательно, настоящая заявка охватывает любые варианты, применения или модификации изобретения, которые в целом следуют из принципов изобретения, включая отступления от настоящего раскрытия, которые очевидны в известной или общепринятой практике в рамках уровня техники.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Противоопухолевая комбинация, содержащая одновалентное соединение-миметик Smac (SMC) и Атезолизумаб.

2. Комбинация по п.1, в которой указанный одновалентный SMC представляет собой AT-406/SM406/Debio1143/D1143.

3. Применение комбинации по любому из пп.1-2 для лечения пациента со злокачественным новообразованием.

4. Применение по п.3, где злокачественное новообразование устойчиво к лечению только миметиком Smac.

5. Применение по любому из пп.3 или 4, где указанное злокачественное новообразование выбрано из рака надпочечников, базальноклеточной карциномы, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, хориокарциномы, рака толстой кишки, колоректального рака, рака соединительной ткани, рака пищеварительной системы, рака эндометрия, эпифарингиальной карциномы, рака пищевода, рака глаз, рака желчного пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, интраэпителиального новообразования, рака почек, рака гортани, лейкоза, рака печени, метастазов в печени, рака легких, лимфомы, меланомы, миеломы, множественной миеломы, нейробластомы, мезотелиомы, нейроглиомы, миелодиспластического синдрома, множественной миеломы, рака полости рта, рака яичников, рака у детей, рака поджелудочной железы, эндокринных опухолей поджелудочной железы, рака полового члена, плазмноклеточных опухолей, аденомы гипофиза, тимомы, рака предстательной железы, карциномы почек, рака дыхательной системы, рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, саркомы, рака кожи, рака тонкой кишки, рака желудка, рака яичек, рака щитовидной железы, рака мочеточника, и рака мочевой системы.

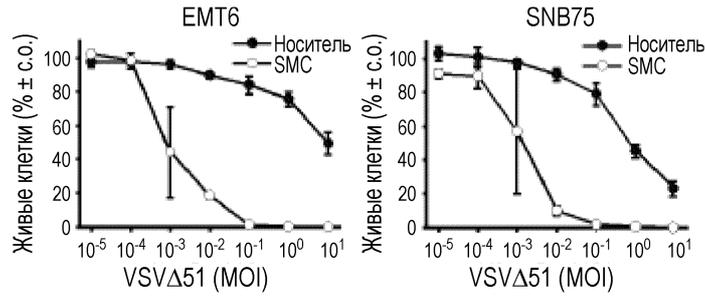
6. Способ лечения злокачественного новообразования, где указанный способ включает введение пациенту эффективного количества комбинации по любому из пп.1-2, где SMC и Атезолизумаб вводят одновременно или с интервалом 28 дней друг от друга в количествах, которые вместе эффективны для лечения указанного злокачественного новообразования.

7. Способ по п.6, где SMC и Атезолизумаб вводят в диапазоне 14 дней друг от друга или в диапазоне 10 дней друг от друга, или в диапазоне 5 дней друг от друга, или в диапазоне 24 ч друг от друга, или в диапазоне 6 ч друг от друга или, по существу, одновременно.

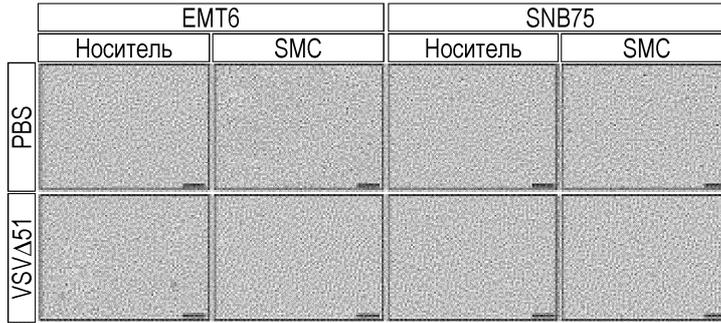
8. Способ по п.6 или 7, где злокачественное новообразование устойчиво к лечению только миметиком Smac.

9. Способ по любому из пп.6-8, где указанный способ также включает введение терапевтического агента, содержащего интерферон, где указанный интерферон предпочтительно является интерфероном 1-го типа.

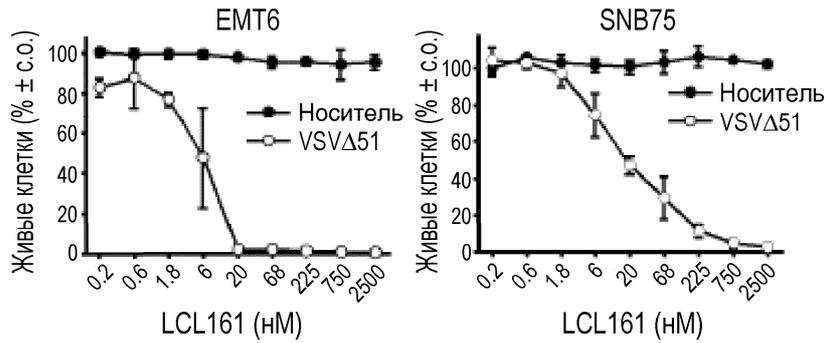
10. Способ по любому из пп.6-9, где указанное злокачественное новообразование выбрано из рака надпочечников, базальноклеточной карциномы, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, хориокарциномы, рака толстой кишки, колоректального рака, рака соединительной ткани, рака пищеварительной системы, рака эндометрия, эпифарингиальной карциномы, рака пищевода, рака глаз, рака желчного пузыря, рака желудочно-кишечного тракта, рака головы и шеи, гепатоцеллюлярной карциномы, интраэпителиального новообразования, рака почек, рака гортани, лейкоза, рака печени, метастазов в печени, рака легких, лимфомы, меланомы, миеломы, множественной миеломы, нейробластомы, мезотелиомы, нейроглиомы, миелодиспластического синдрома, множественной миеломы, рака полости рта, рака яичников, рака у детей, рака поджелудочной железы, эндокринных опухолей поджелудочной железы, рака полового члена, плазмноклеточных опухолей, аденомы гипофиза, тимомы, рака предстательной железы, карциномы почек, рака дыхательной системы, рабдомиосаркомы, рака слюнных желез, саркомы, рака кожи, рака тонкой кишки, рака желудка, рака яичек, рака щитовидной железы, рака мочеточника, и рака мочевой системы.



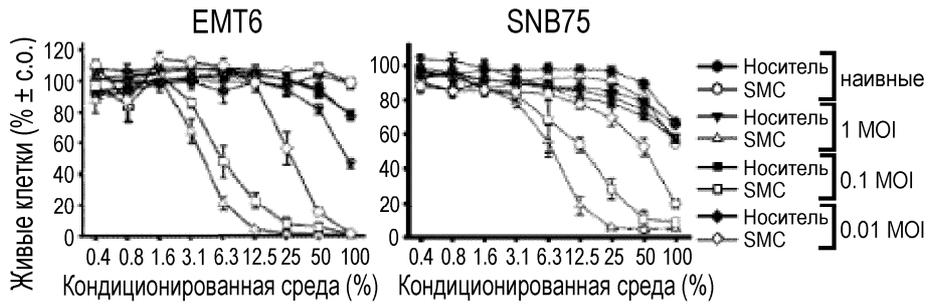
Фиг. 1А



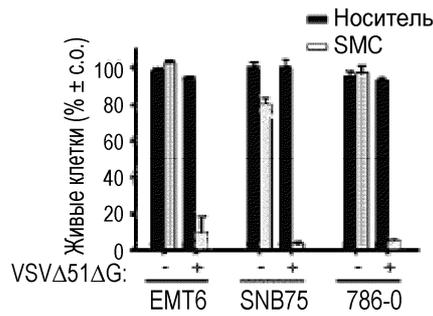
Фиг. 1В



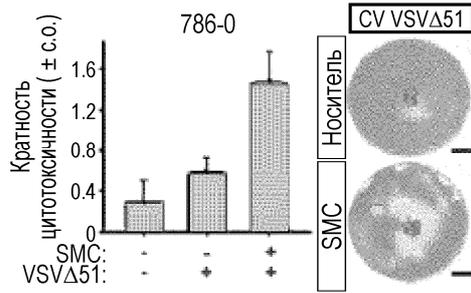
Фиг. 1С



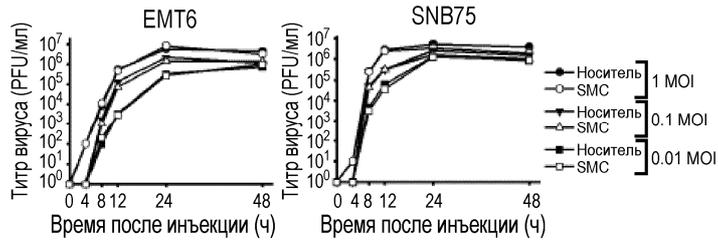
Фиг. 1D



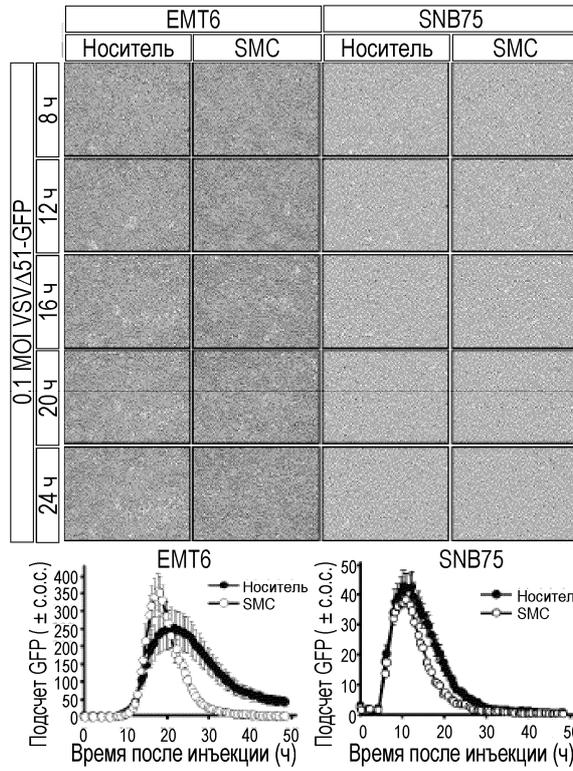
Фиг. 1Е



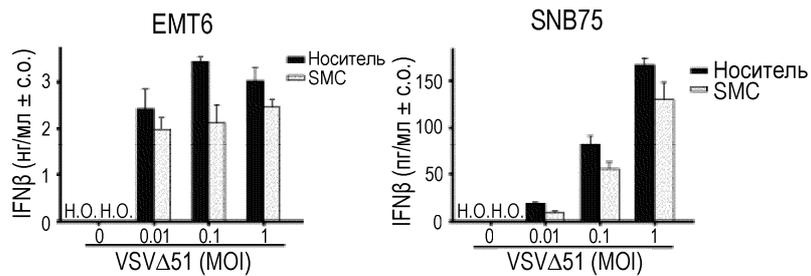
Фиг. 1F



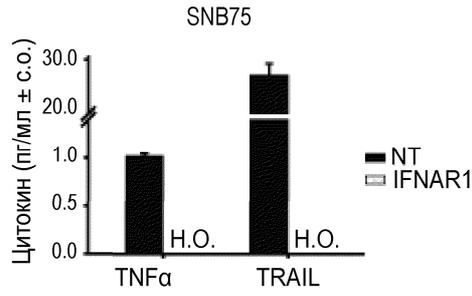
Фиг. 2A



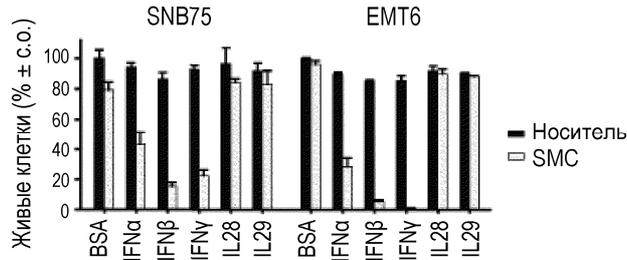
Фиг. 2B



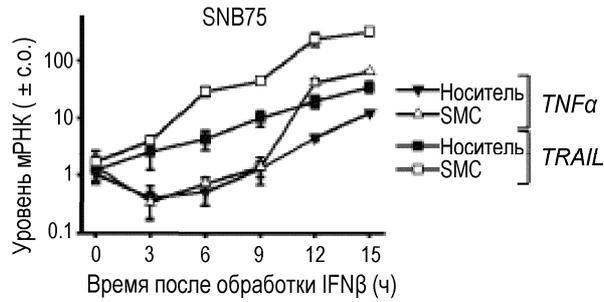
Фиг. 2C



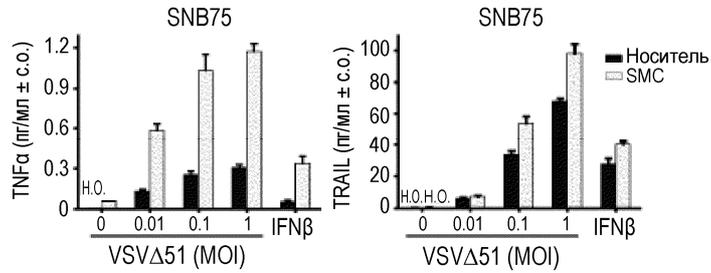
Фиг. 3D



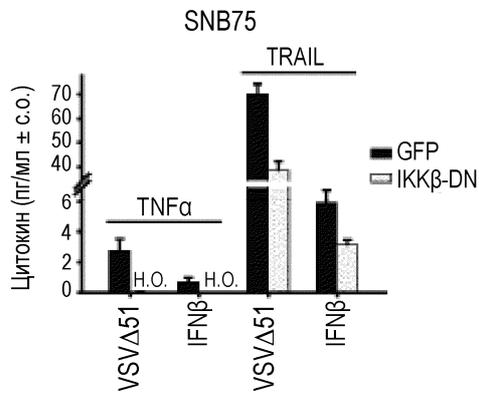
Фиг. 3E



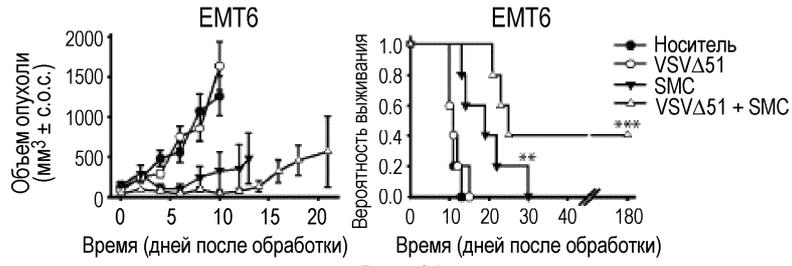
Фиг. 3F



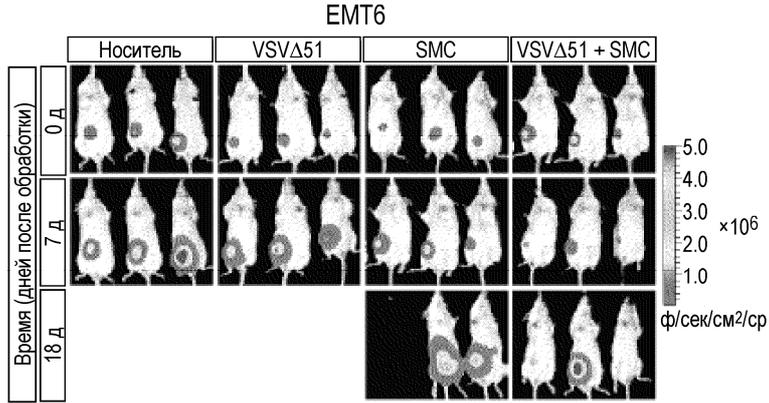
Фиг. 3G



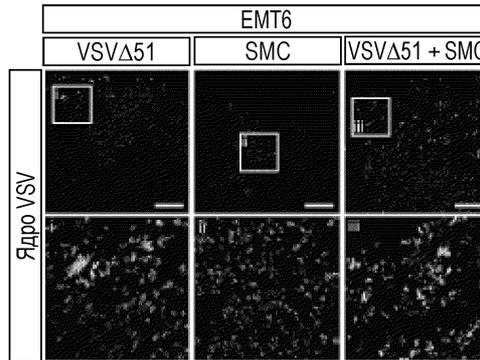
Фиг. 3H



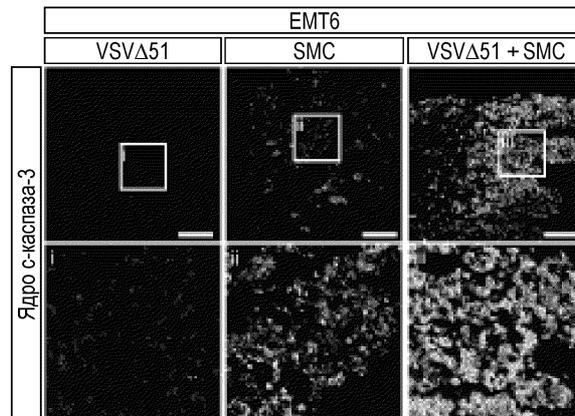
Фиг. 4А



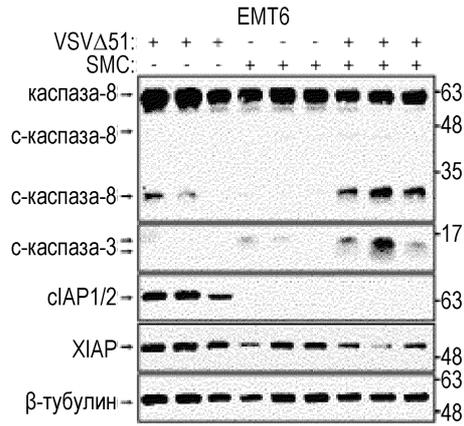
Фиг. 4В



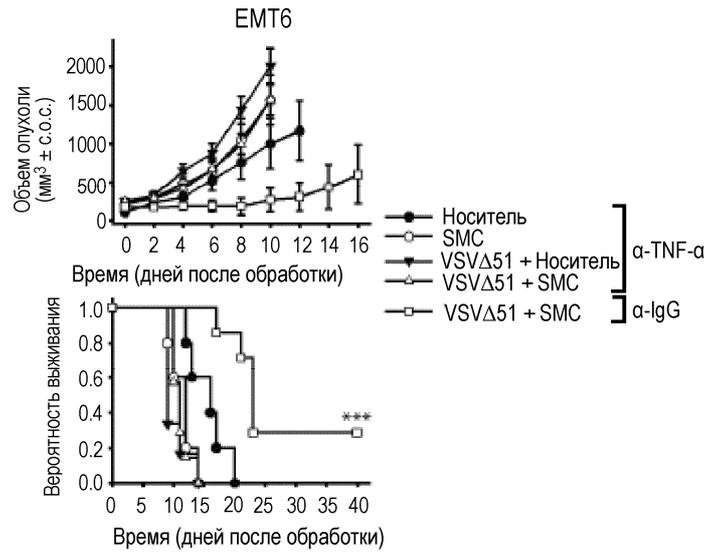
Фиг. 4С



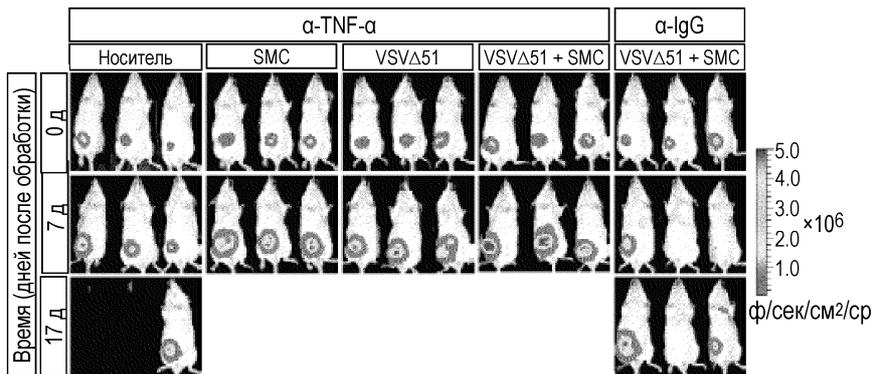
Фиг. 4D



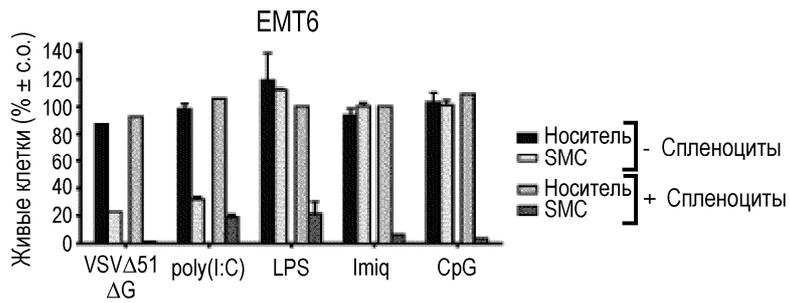
Фиг. 4Е



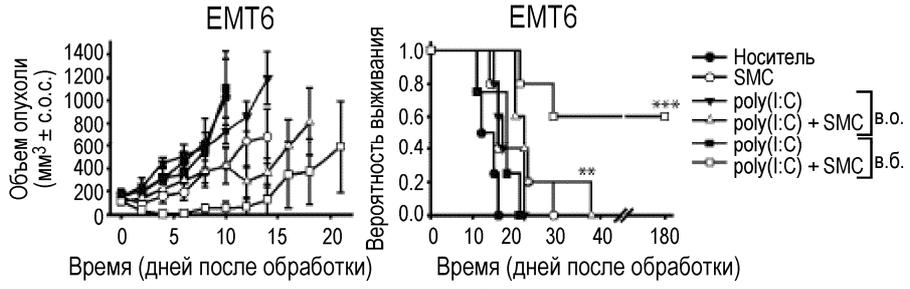
Фиг. F



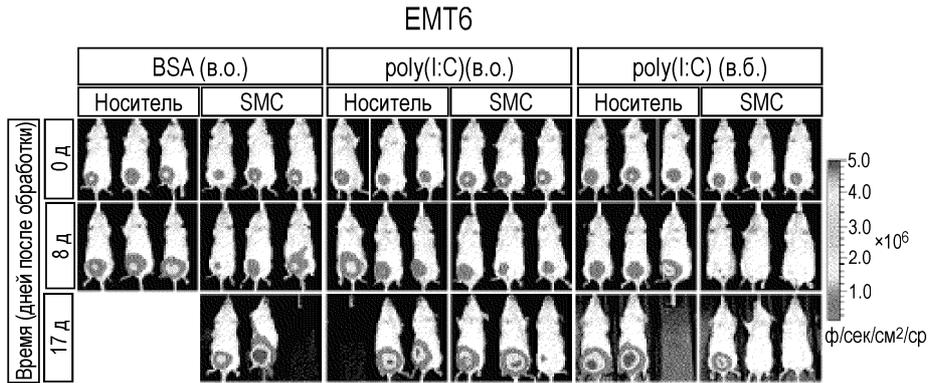
Фиг. 4G



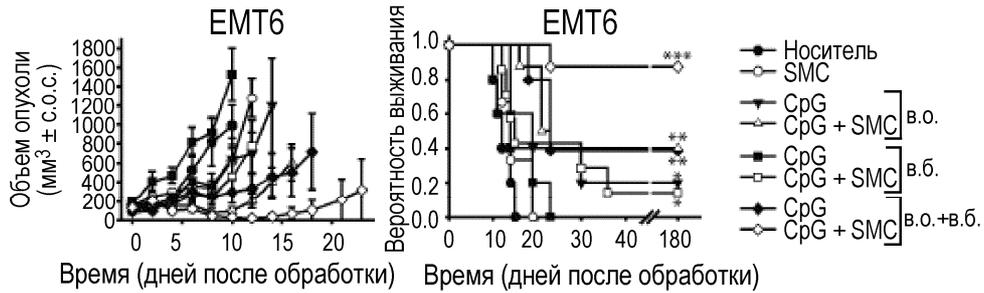
Фиг. 5А



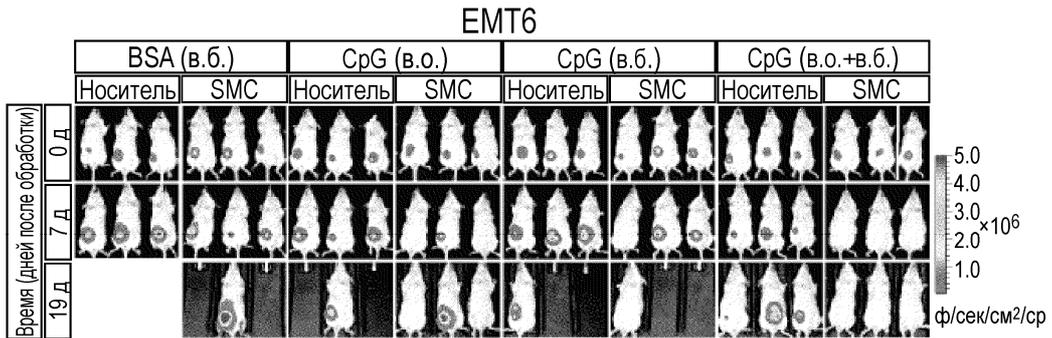
Фиг. 5B



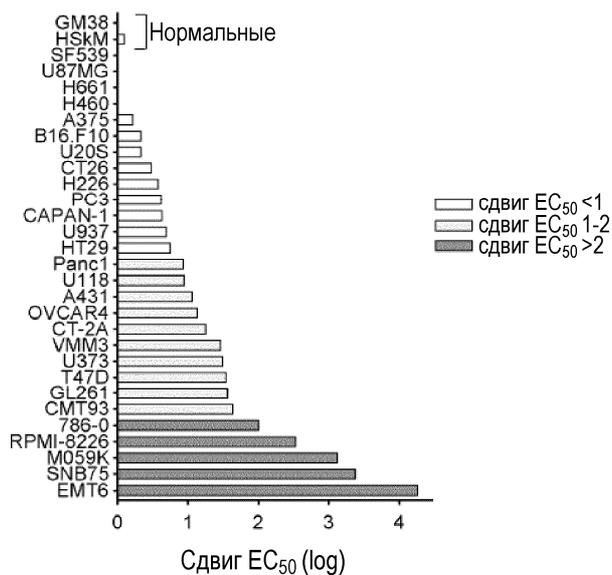
Фиг. 5C



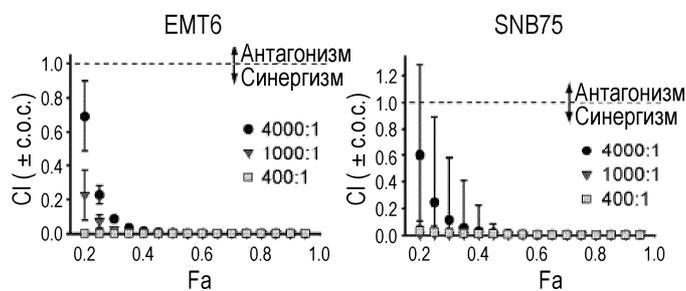
Фиг. 5D



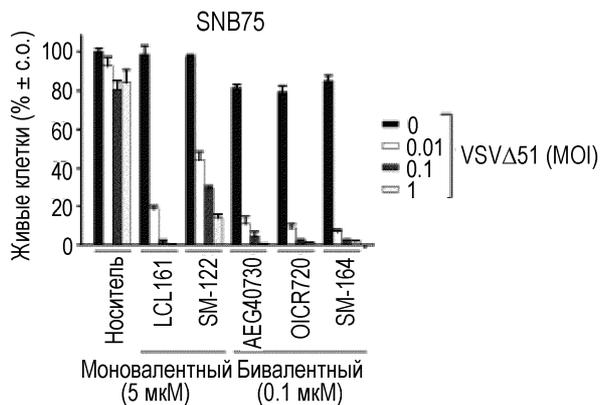
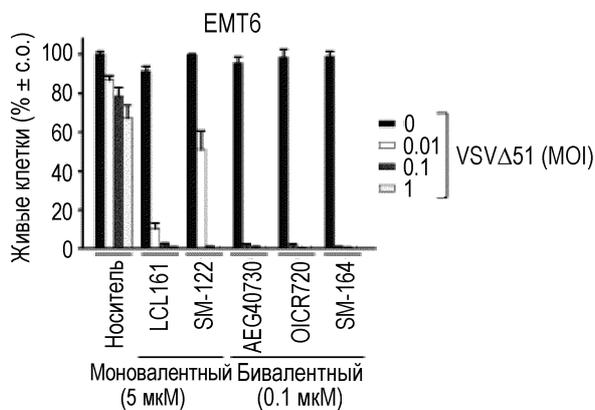
Фиг. 5E



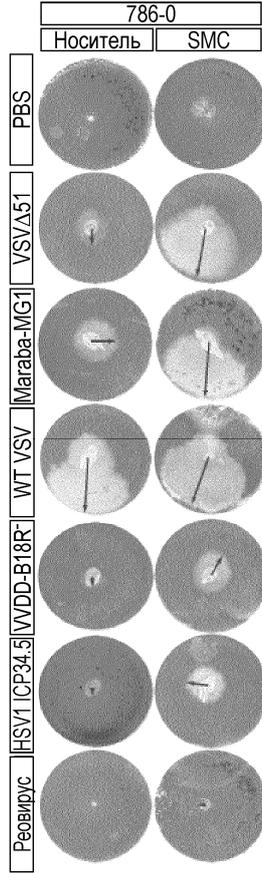
Фиг. 6



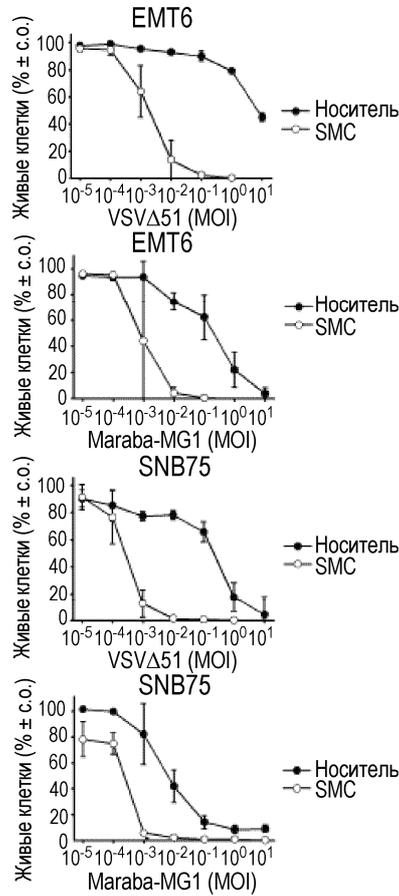
Фиг. 7



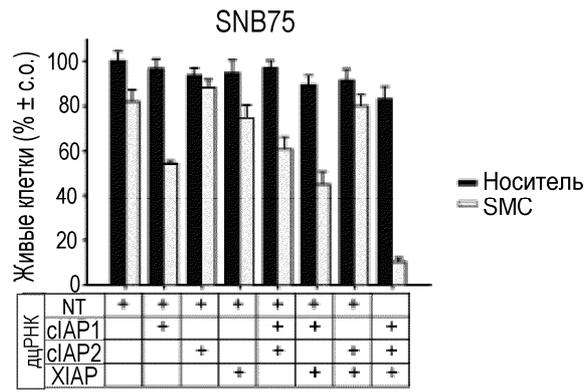
Фиг. 8



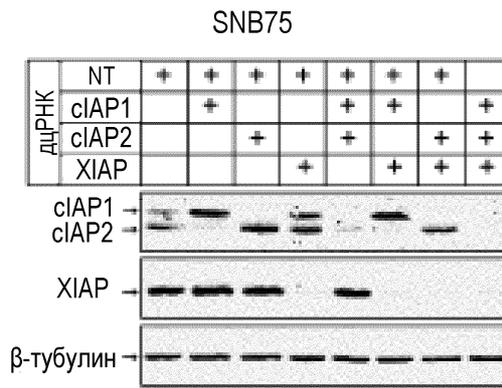
Фиг. 9А



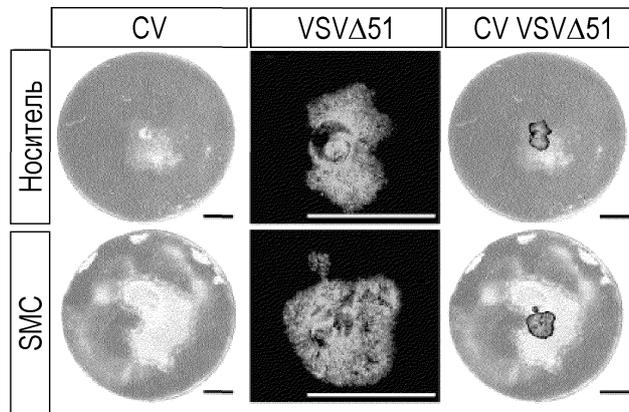
Фиг. 9В



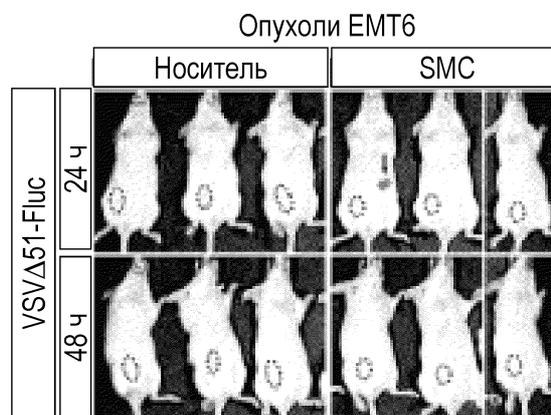
Фиг. 10А



Фиг. 10В

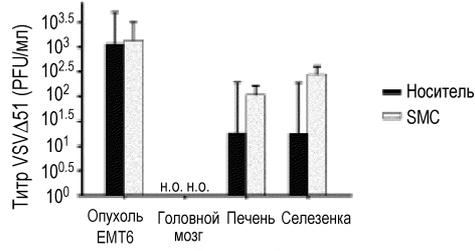


Фиг. 11

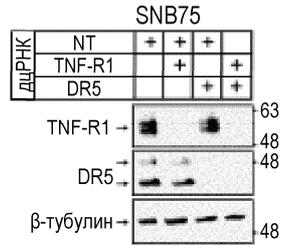


Фиг. 12А

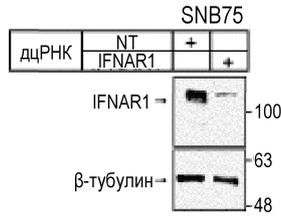
Опухоли EMT6



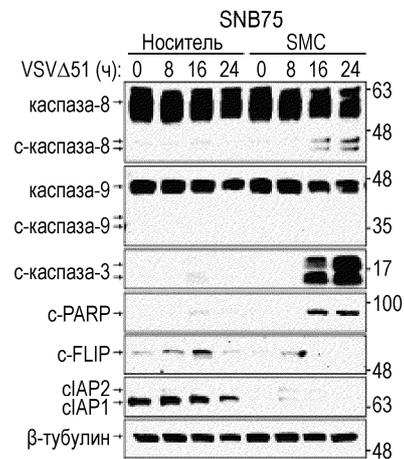
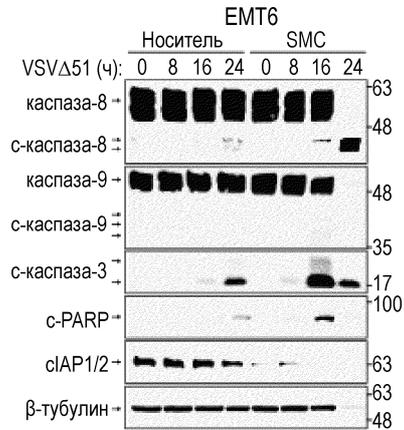
Фиг. 12В



Фиг. 13А



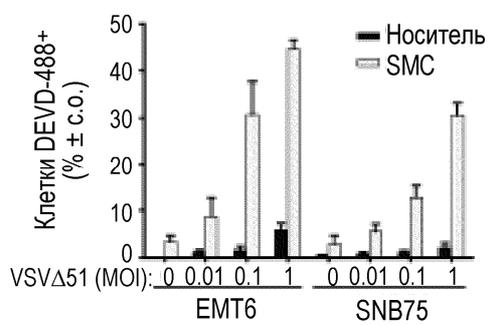
Фиг. 13В



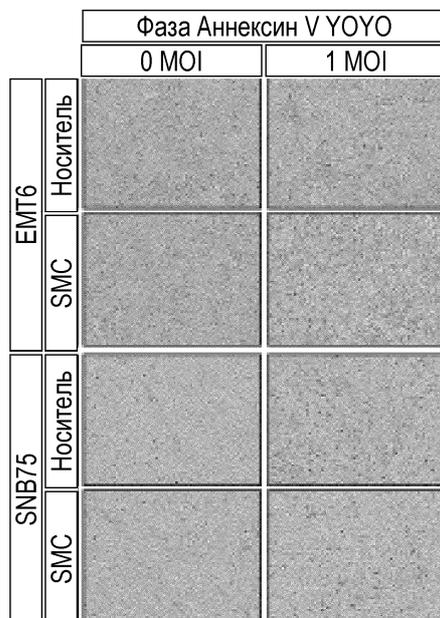
Фиг. 14А



Фиг. 14B

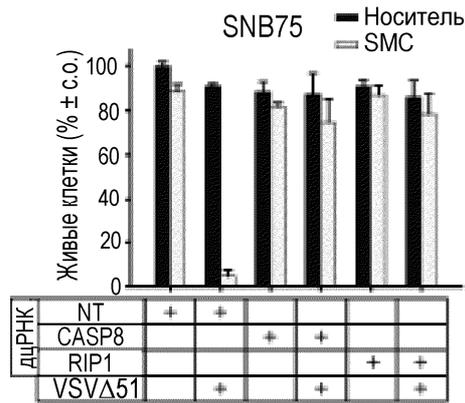
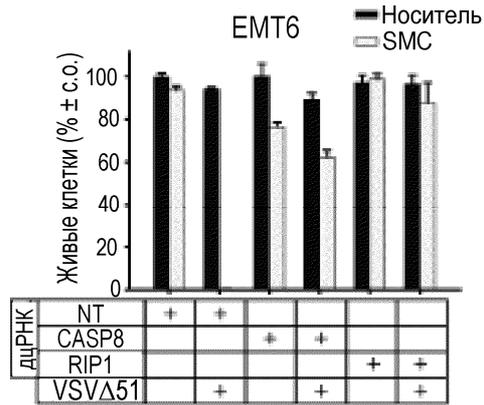
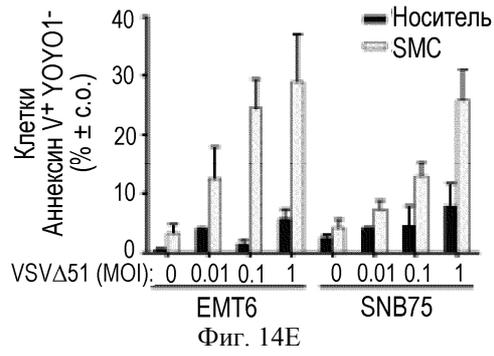


Фиг. 14C

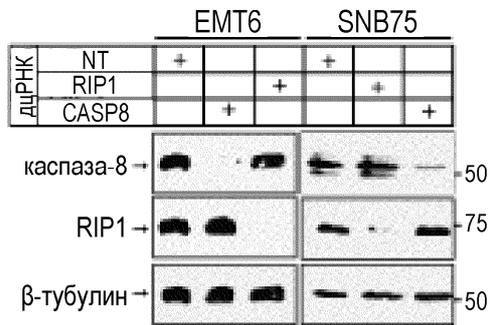


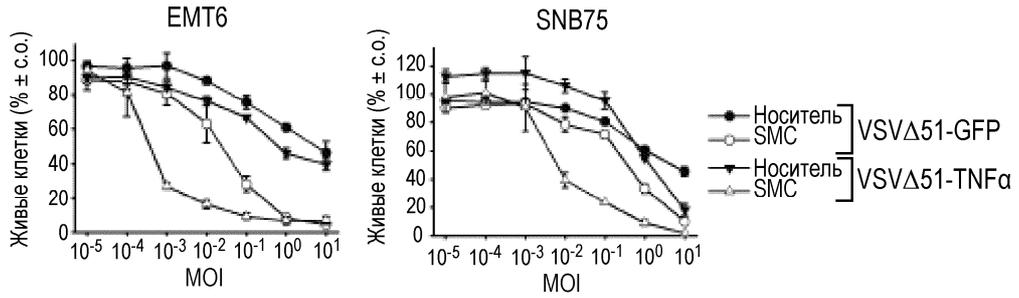
Фиг. 14D

046706

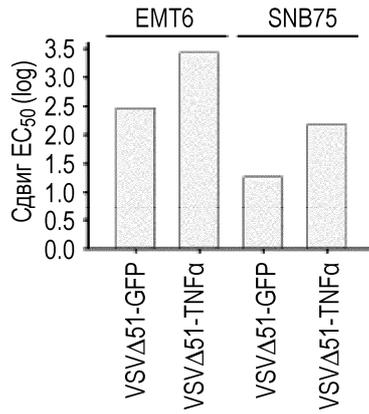


Фиг. 14F

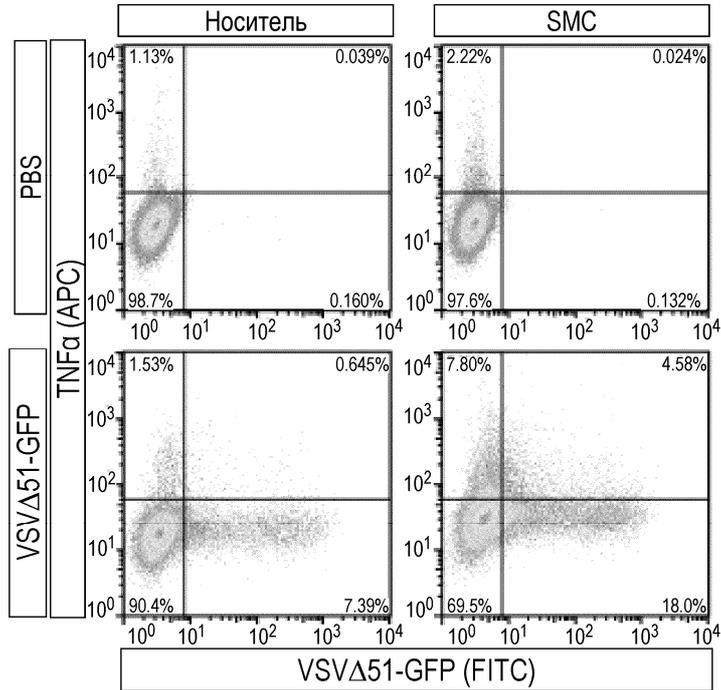




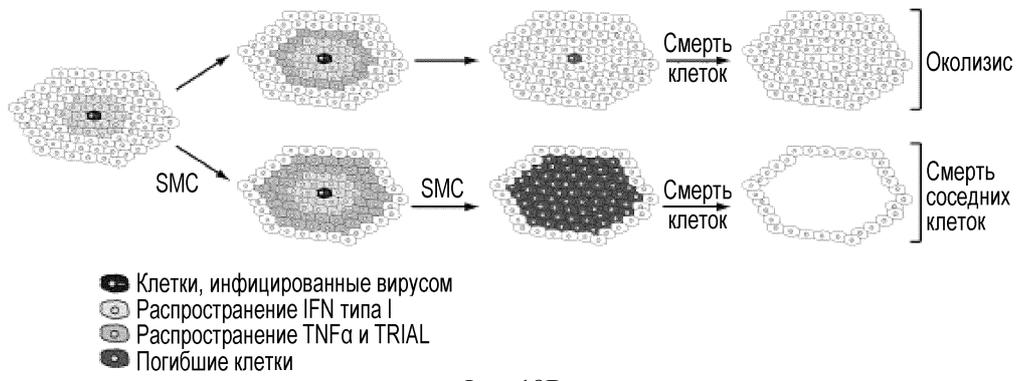
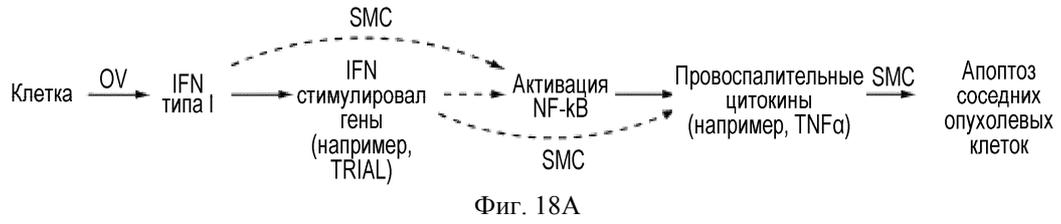
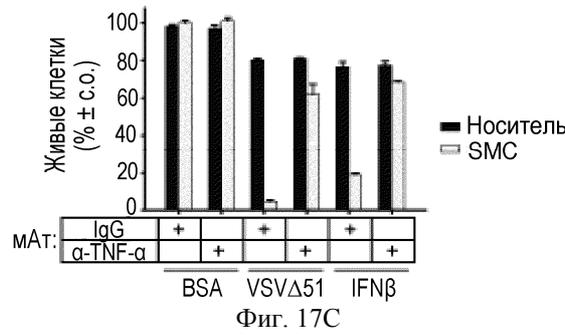
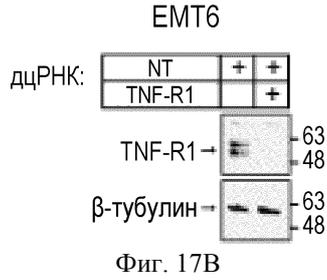
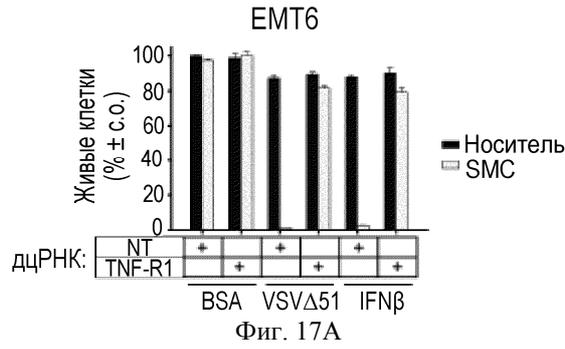
Фиг. 15А

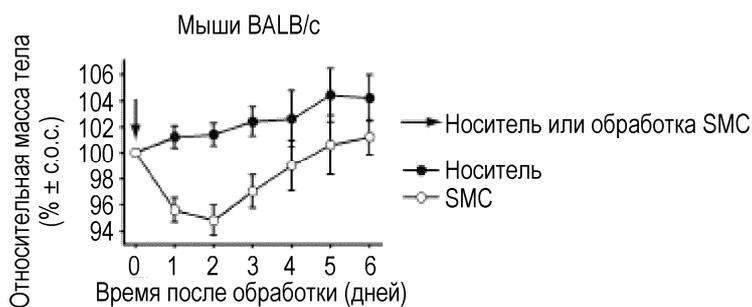


Фиг. 15В

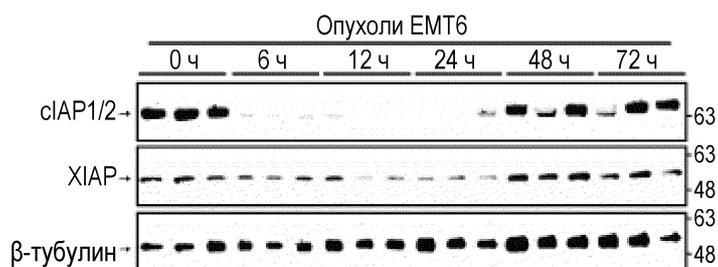


Фиг. 16

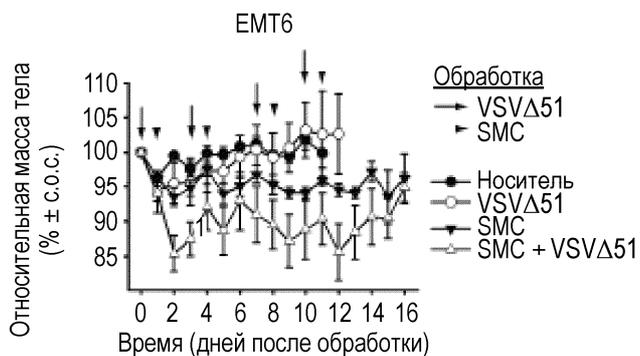




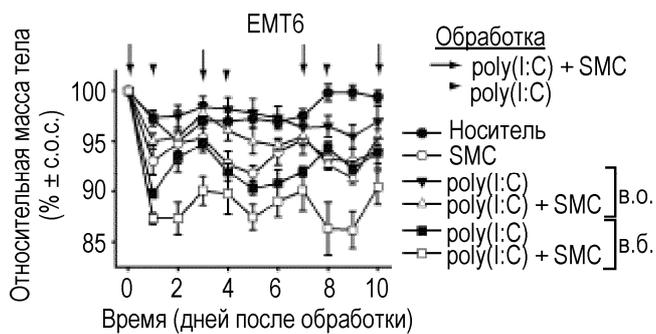
Фиг. 19А



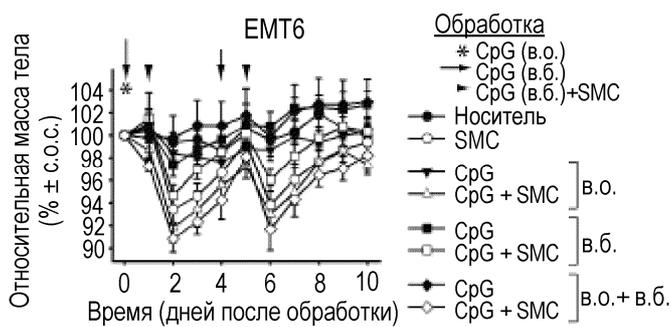
Фиг. 19В



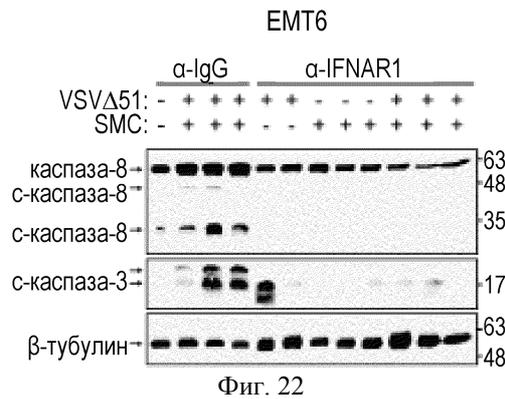
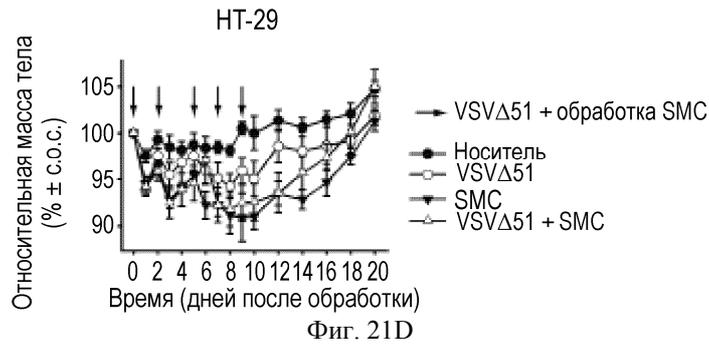
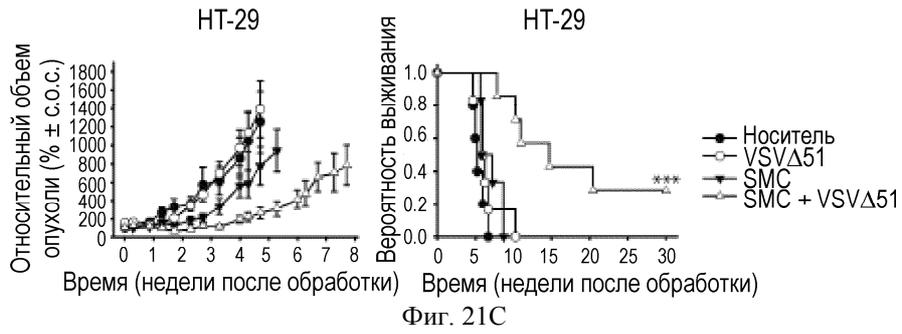
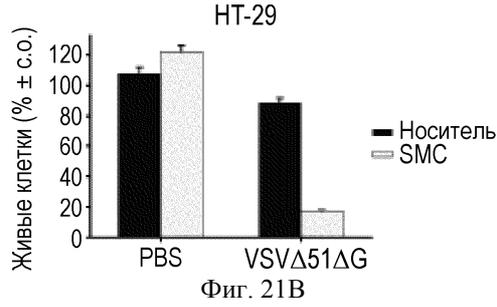
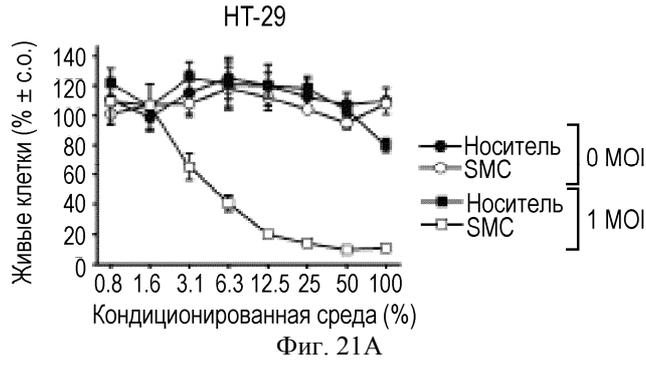
Фиг. 20А

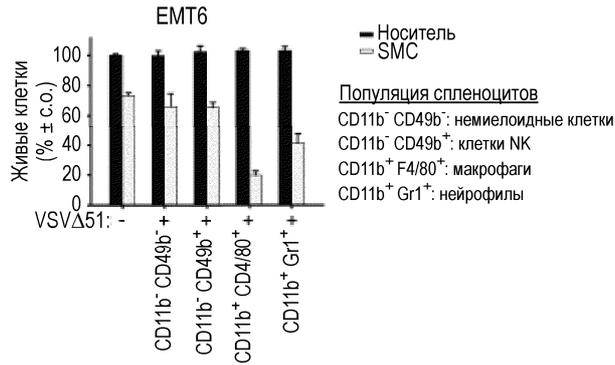


Фиг. 20В

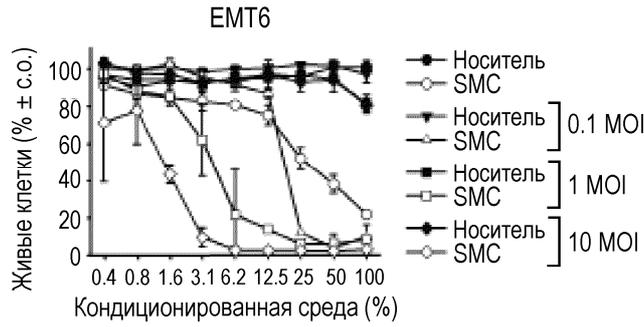


Фиг. 20С

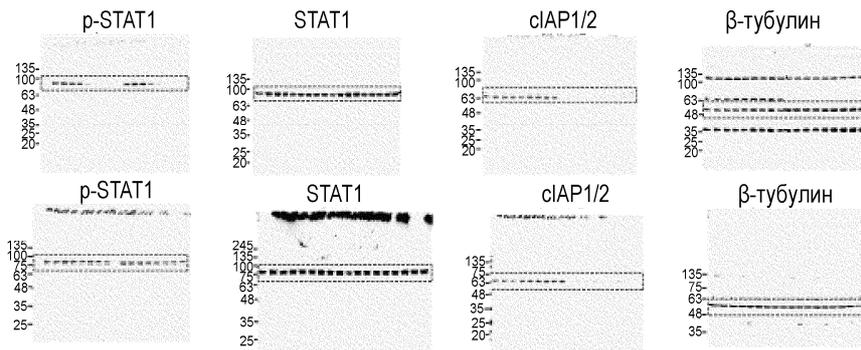




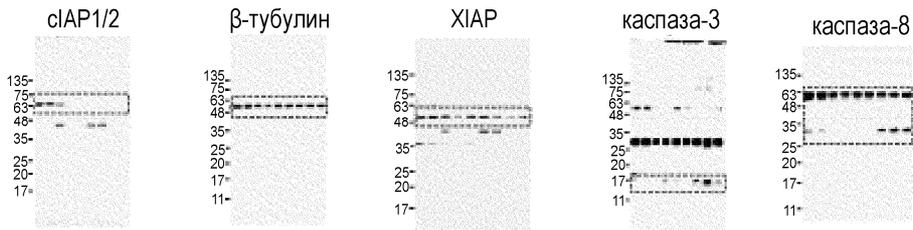
Фиг. 23А



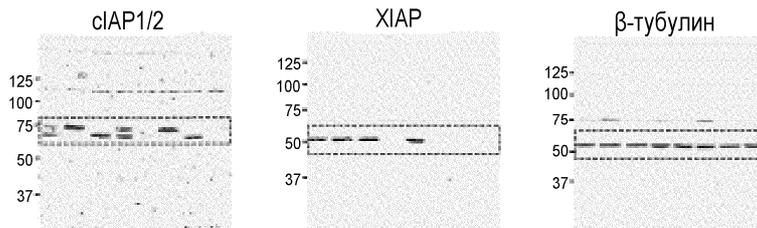
Фиг. 23В



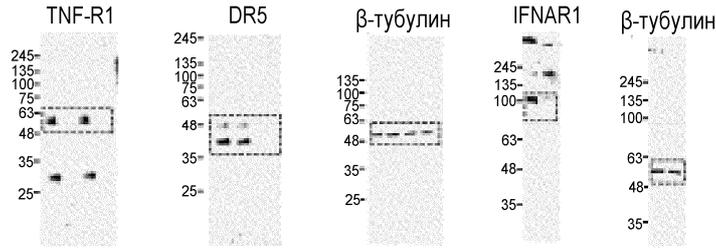
Фиг. 24А



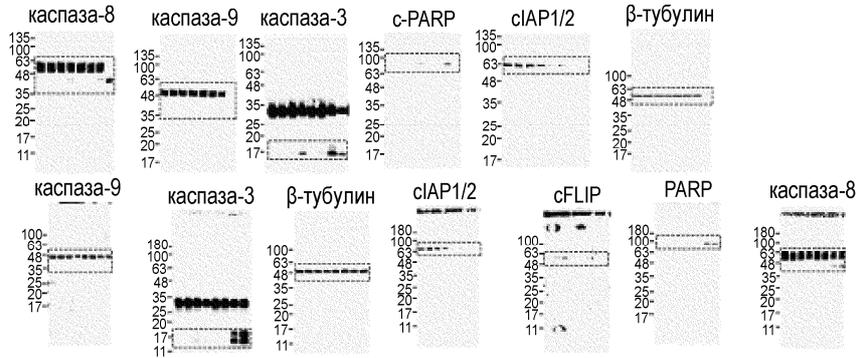
Фиг. 24В



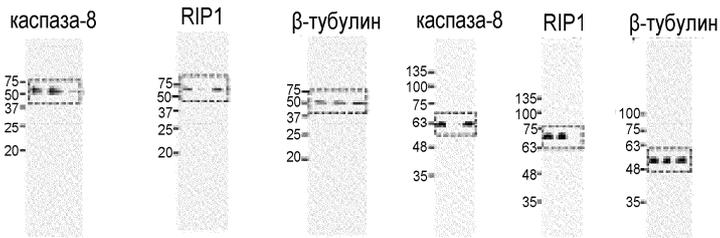
Фиг. 24С



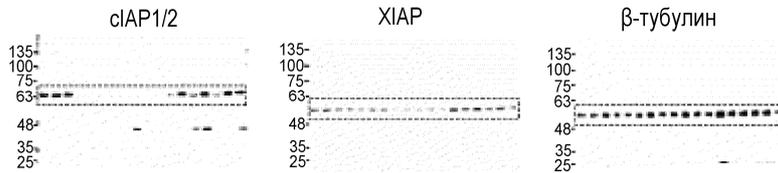
Фиг. 24D



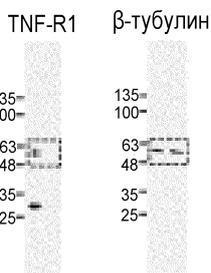
Фиг. 24E



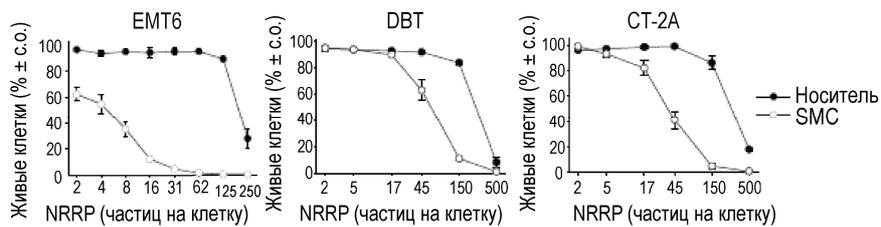
Фиг. 24F



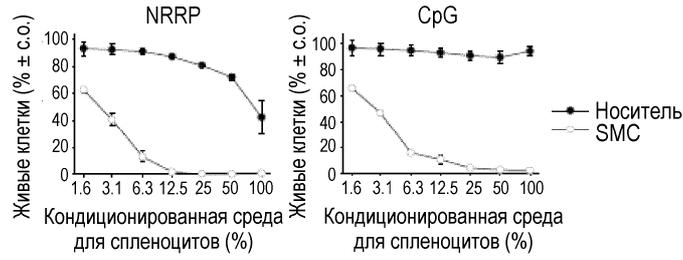
Фиг. 24G



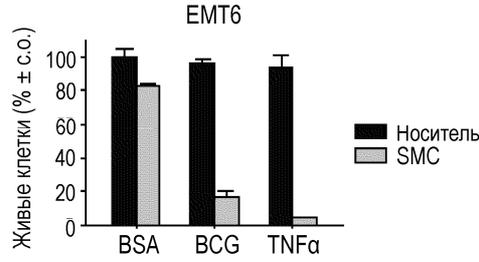
Фиг. 24H



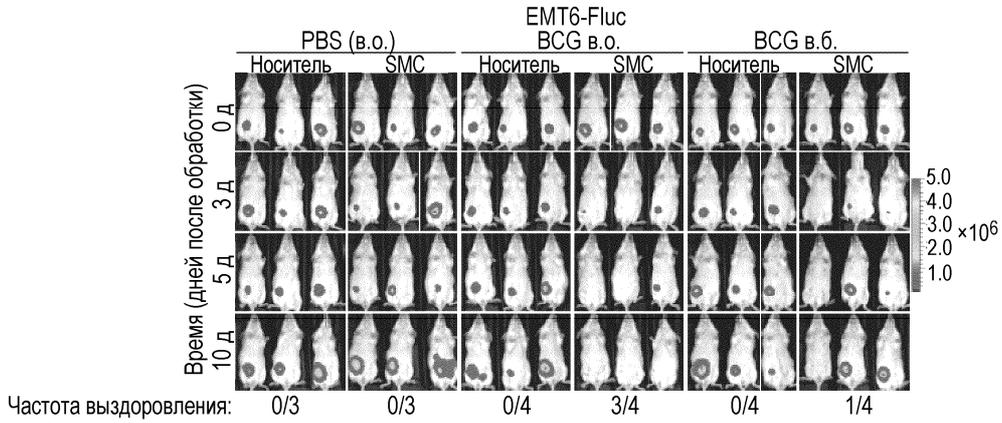
Фиг. 25A



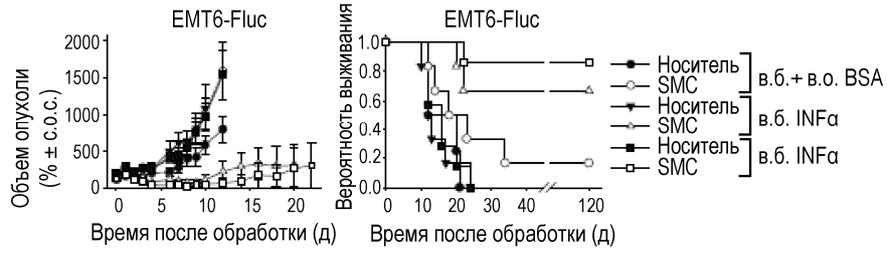
Фиг. 25В



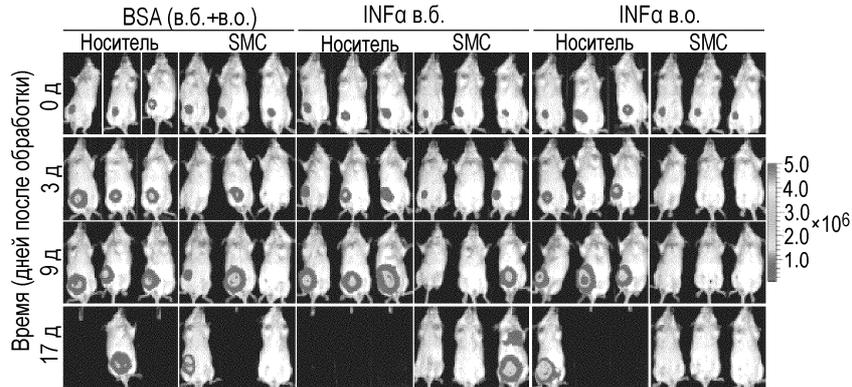
Фиг. 26А



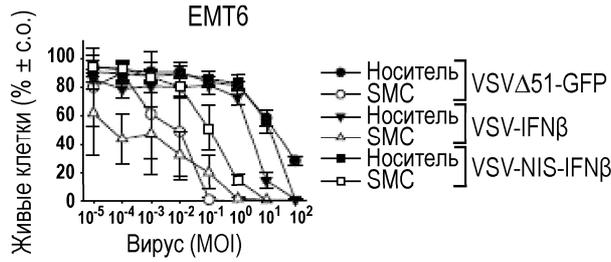
Фиг. 26В



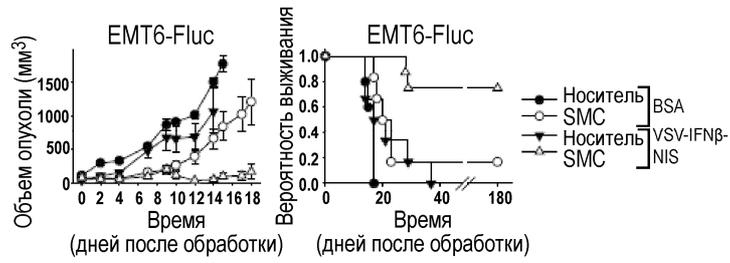
Фиг. 27А



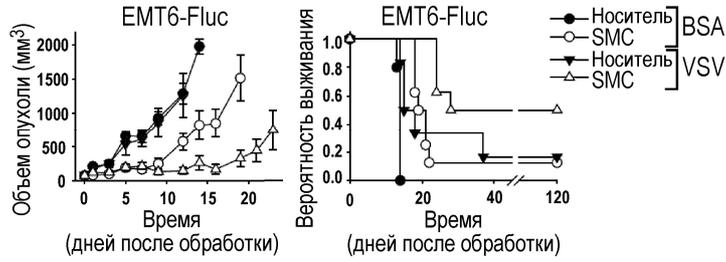
Фиг. 27В



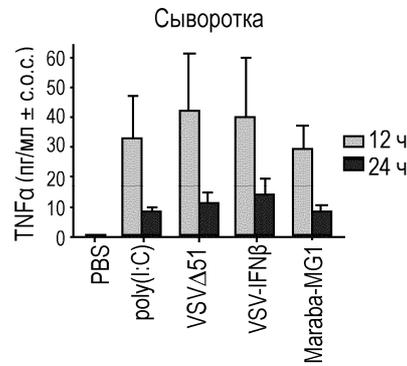
Фиг. 28А



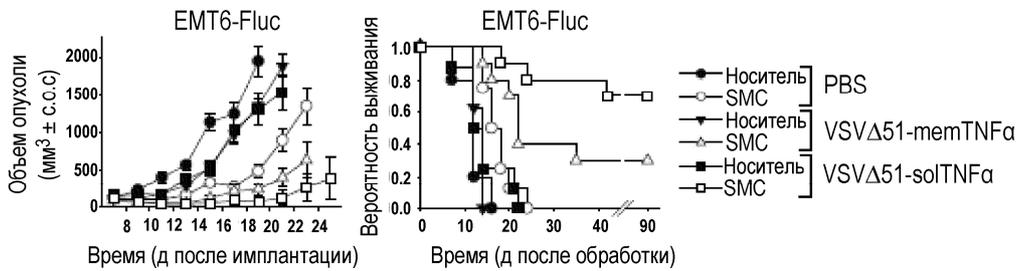
Фиг. 28В



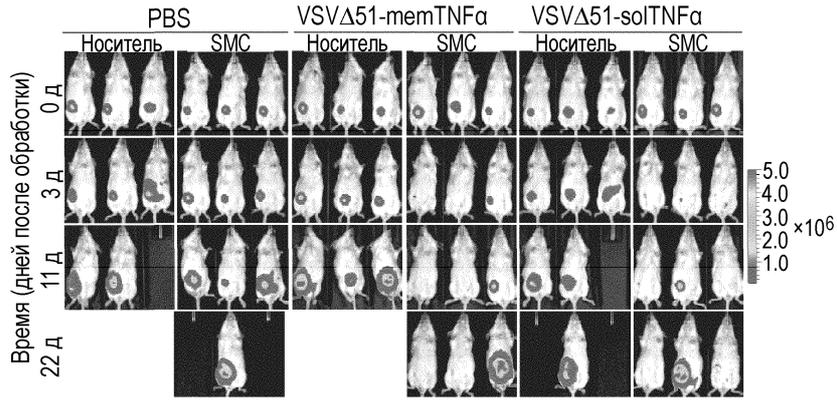
Фиг. 28С



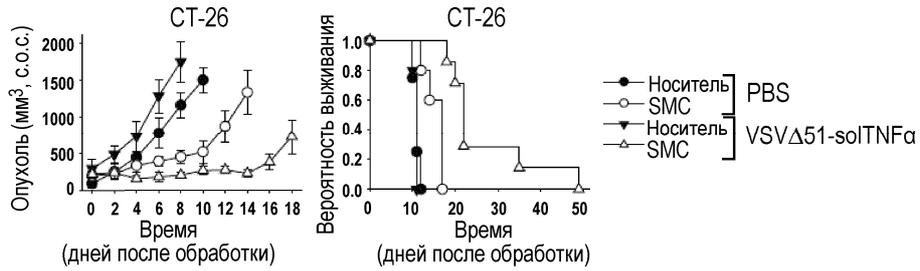
Фиг. 29



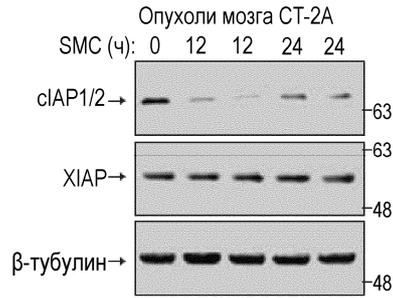
Фиг. 30А



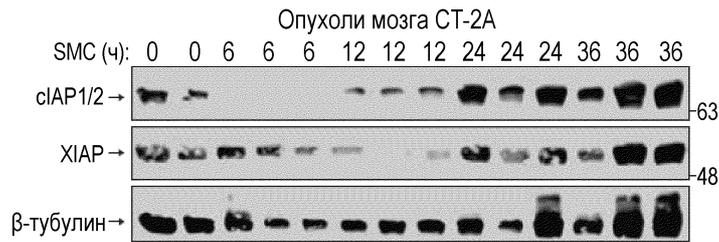
Фиг. 30В



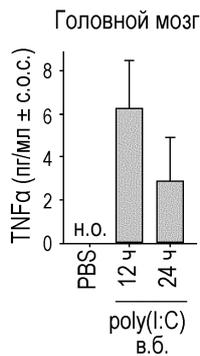
Фиг. 30С



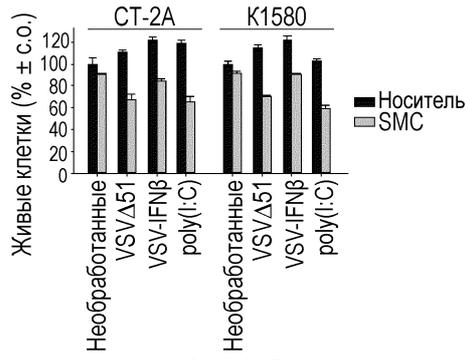
Фиг. 31А



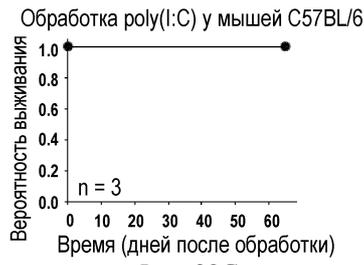
Фиг. 31В



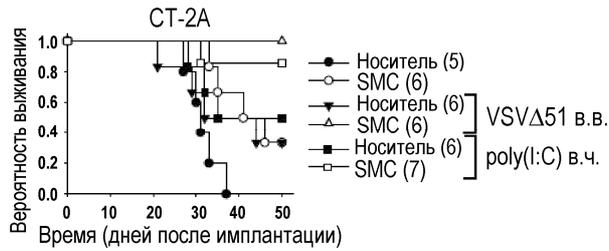
Фиг. 32А



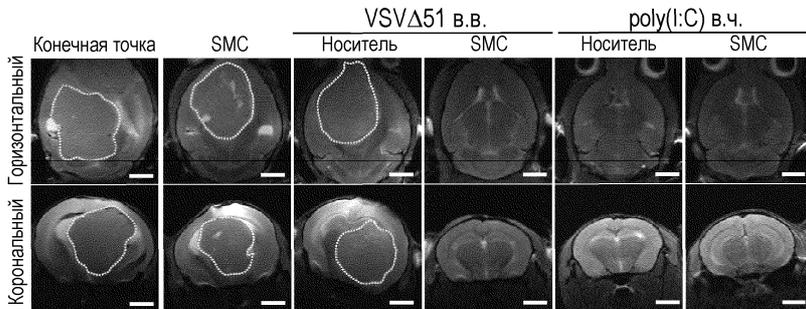
Фиг. 32В



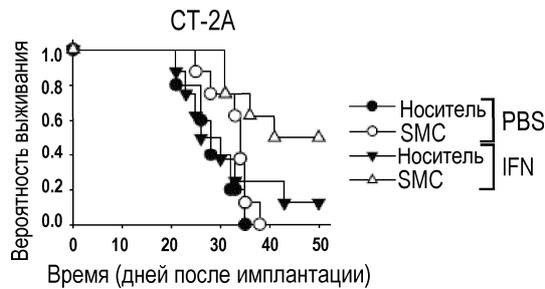
Фиг. 32С



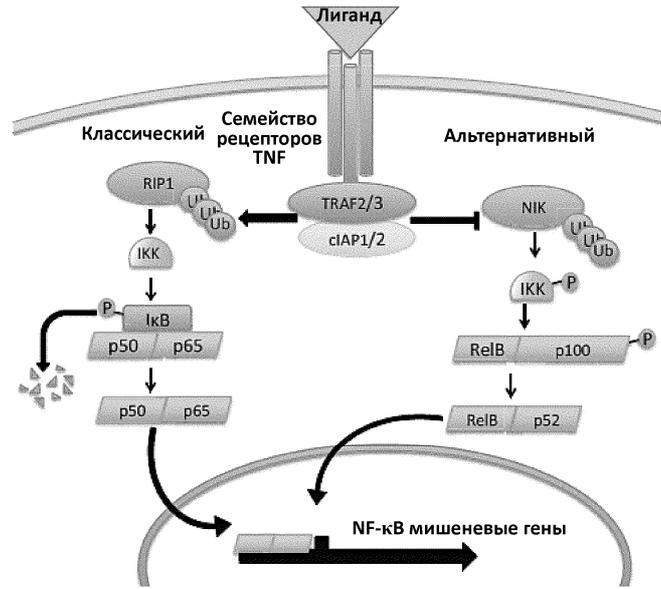
Фиг. 32D



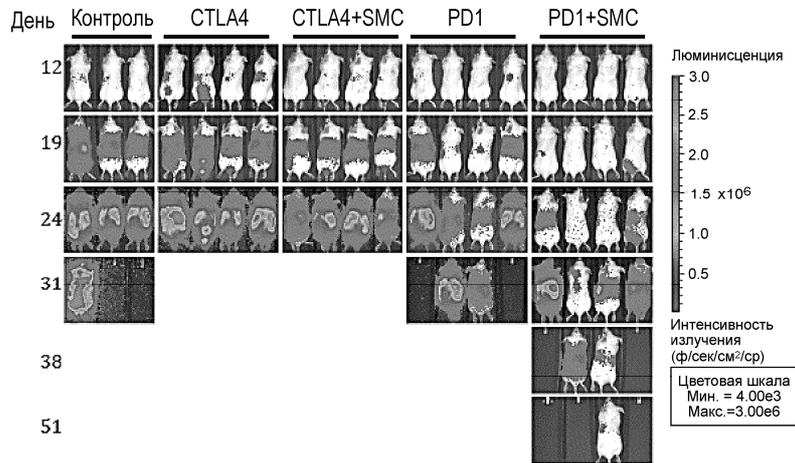
Фиг. 32Е



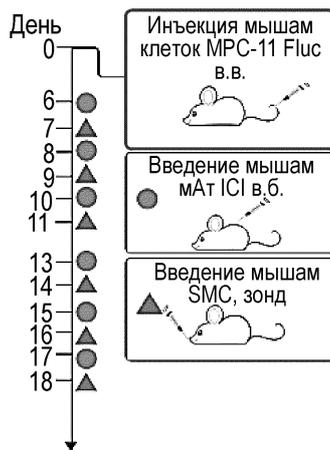
Фиг. 33



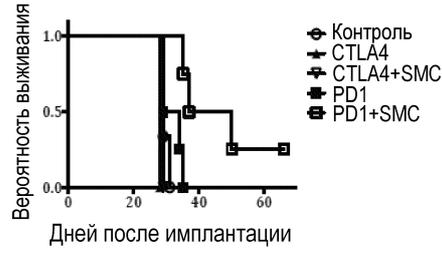
Фиг. 34



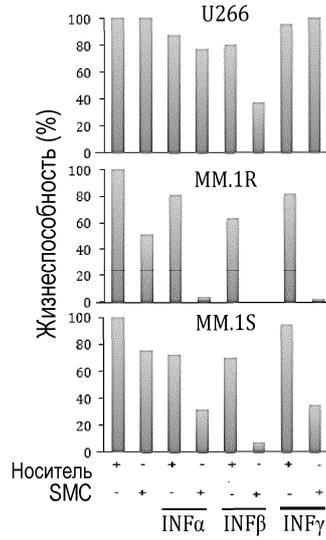
Фиг. 35А



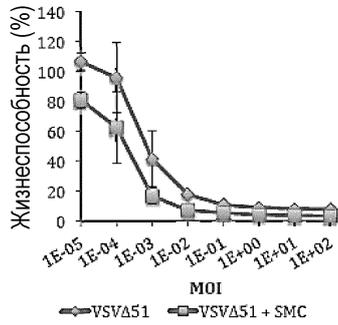
Фиг. 35В



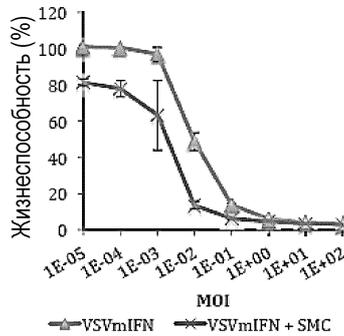
Фиг. 35С



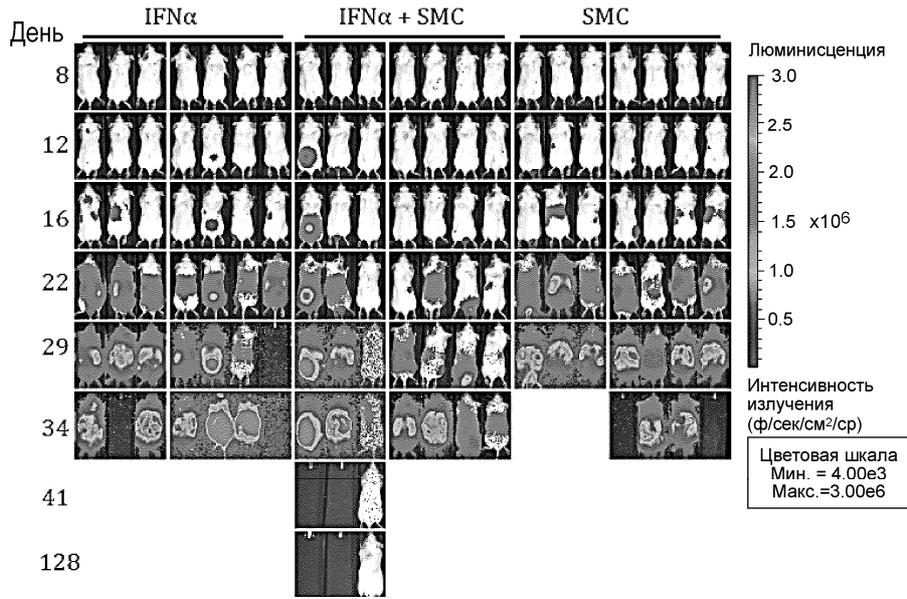
Фиг. 36А



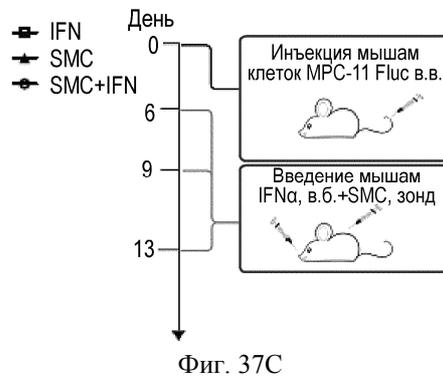
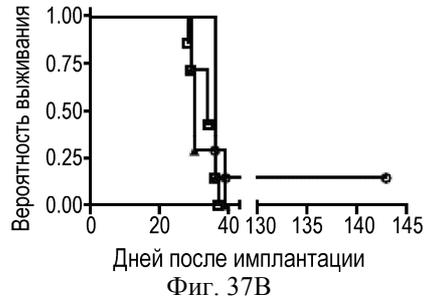
Фиг. 36В

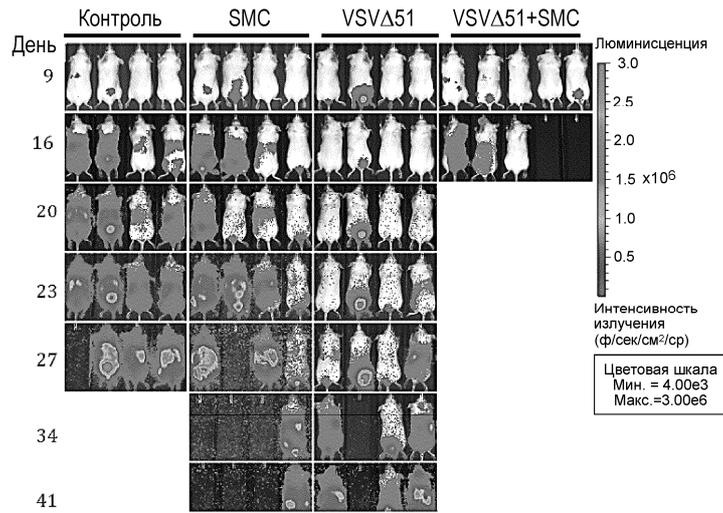


Фиг. 36С

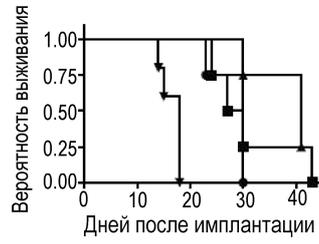


Фиг. 37А

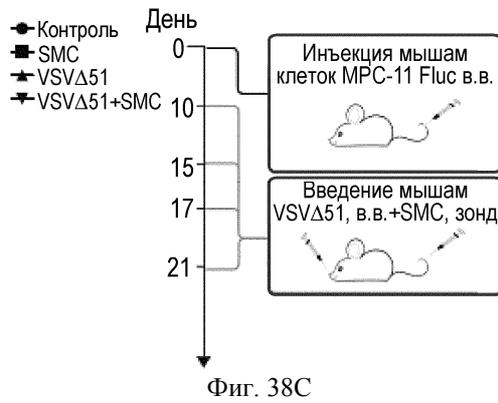




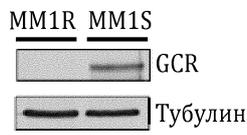
Фиг. 38А



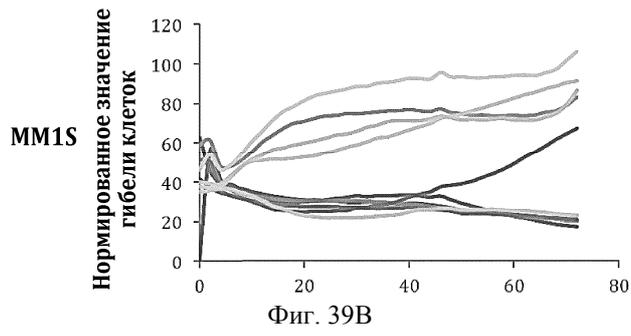
Фиг. 38В



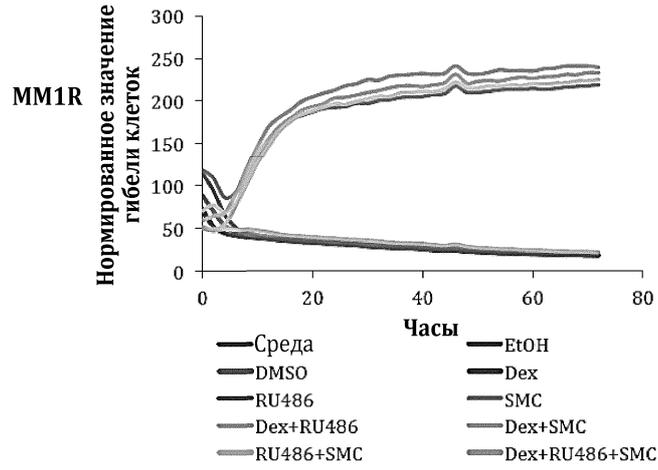
Фиг. 38С



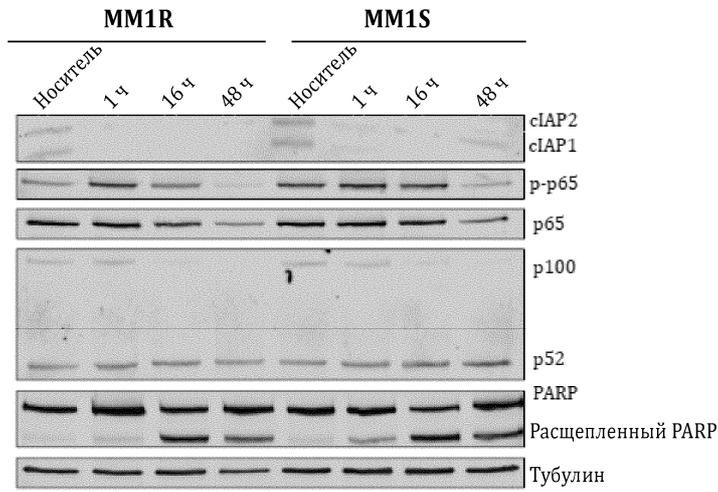
Фиг. 39А



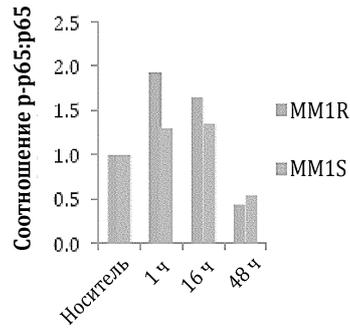
Фиг. 39В



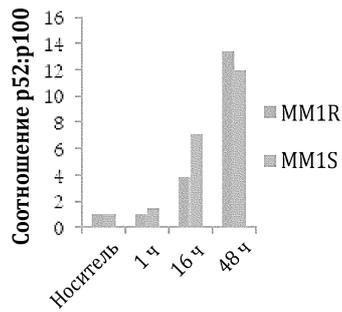
Фиг. 39С



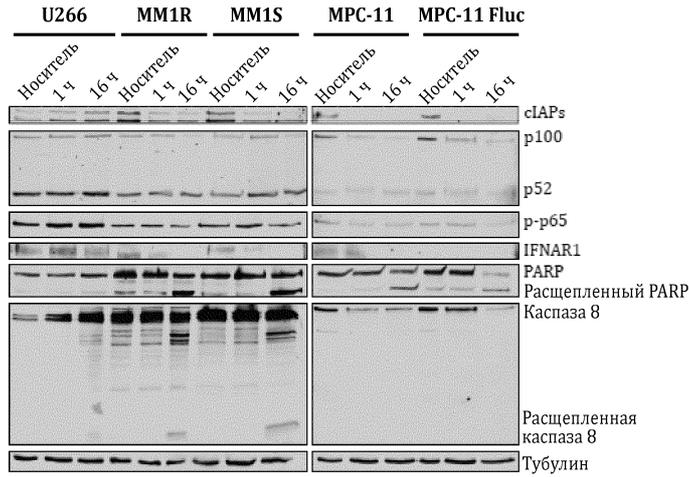
Фиг. 40А



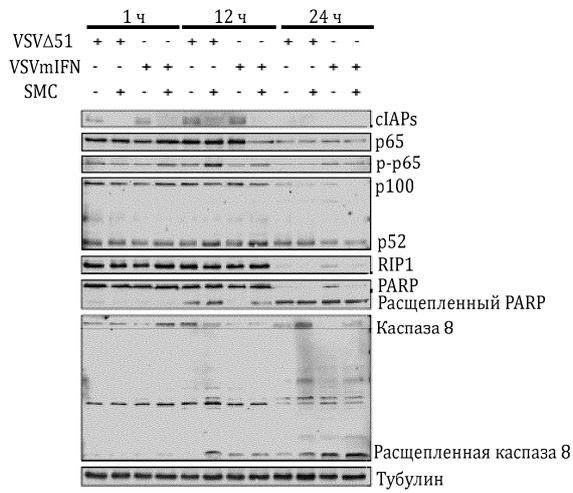
Фиг. 40В



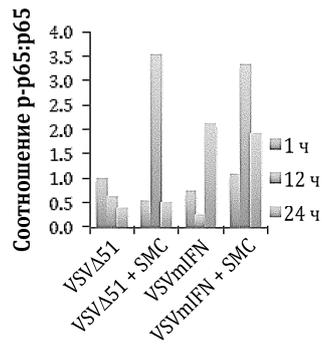
Фиг. 40С



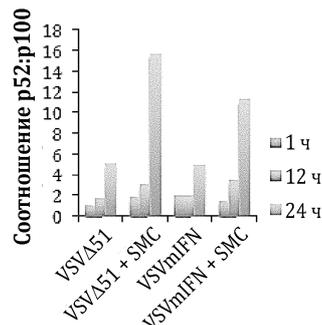
Фиг. 41



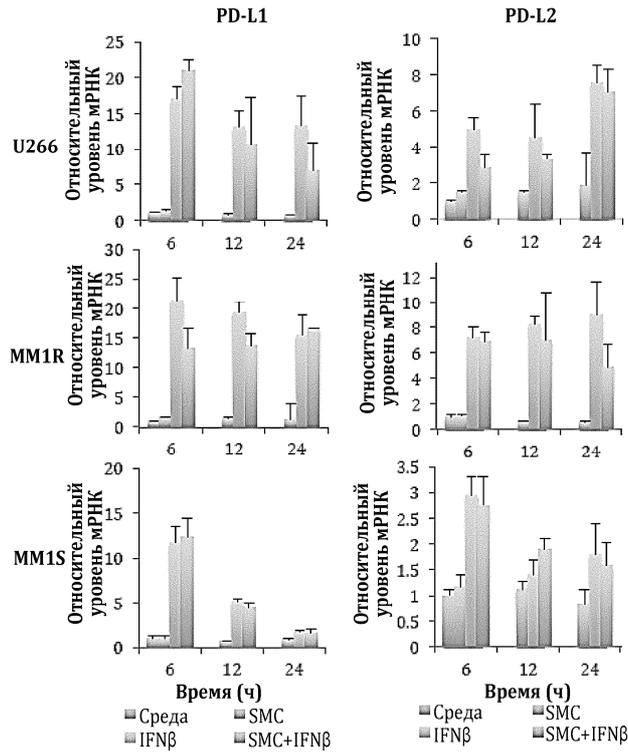
Фиг. 42А



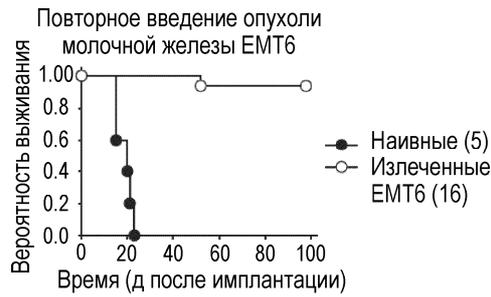
Фиг. 42В



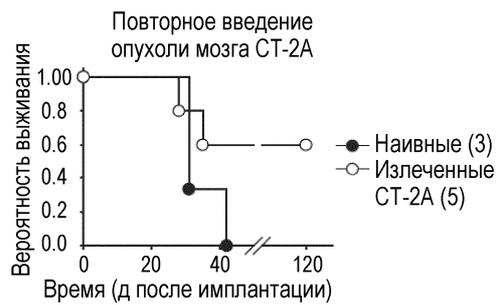
Фиг. 42С



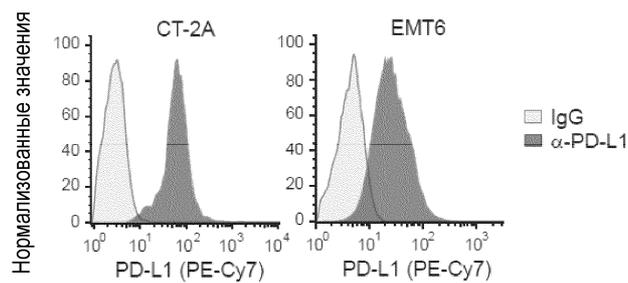
Фиг. 43



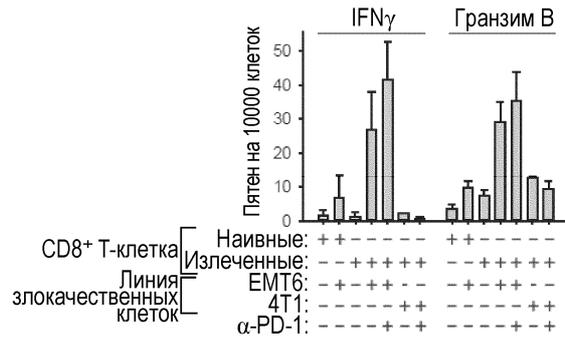
Фиг. 44А



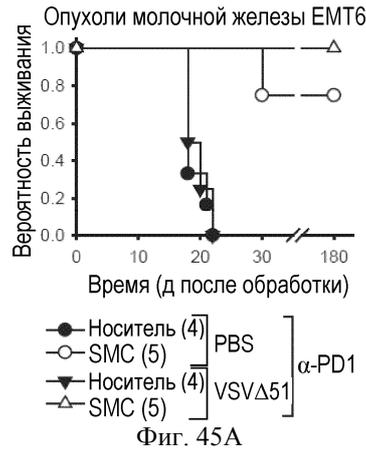
Фиг. 44В



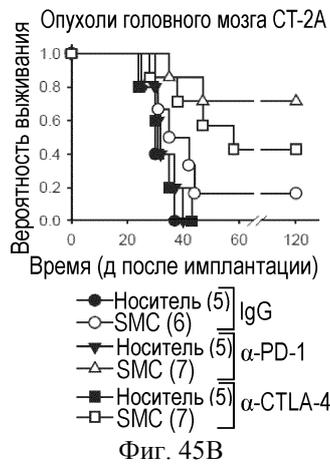
Фиг. 44С



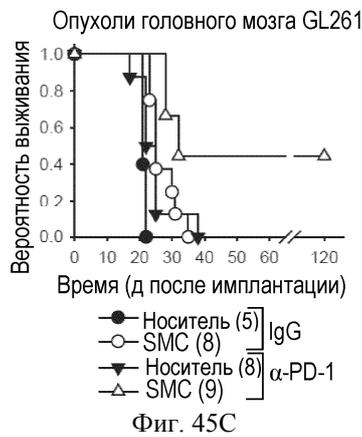
Фиг. 44D



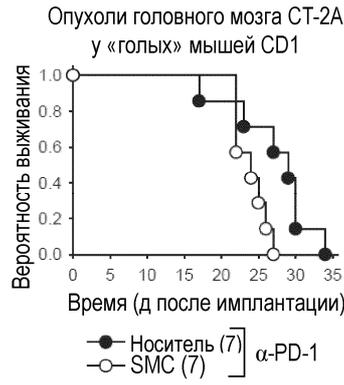
Фиг. 45А



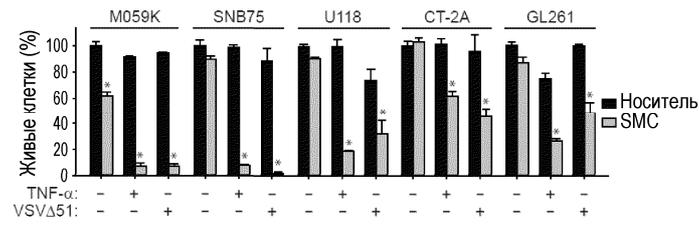
Фиг. 45В



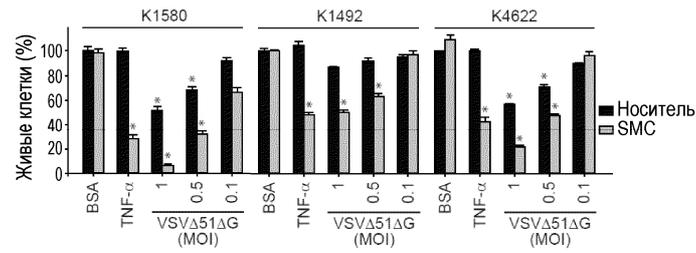
Фиг. 45С



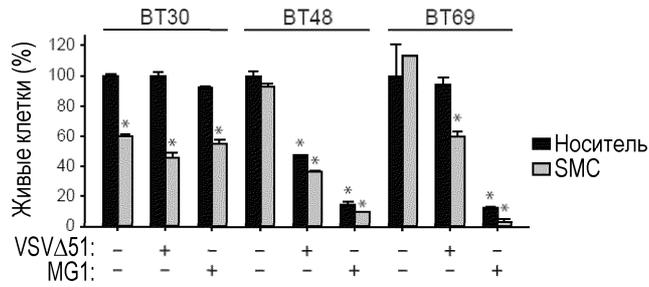
Фиг. 45D



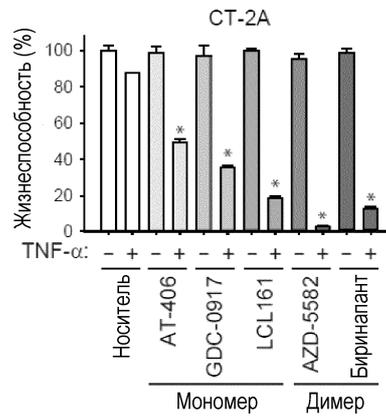
Фиг. 46А



Фиг. 46В

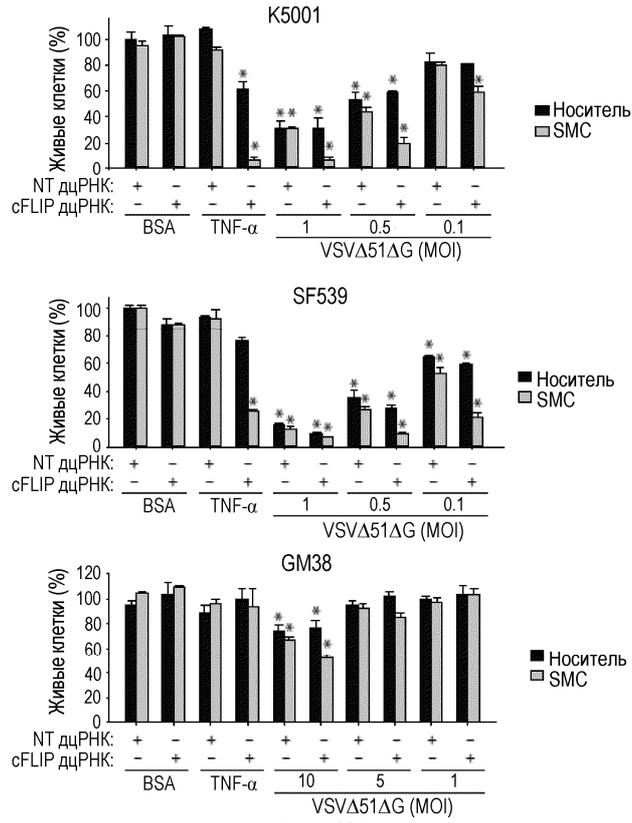


Фиг. 46С

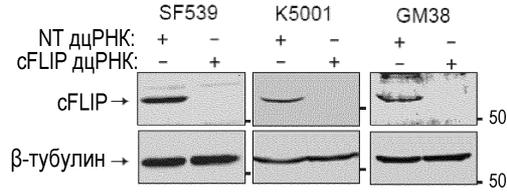


Фиг. 47

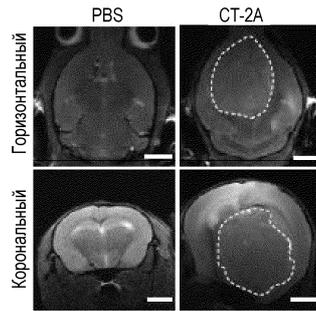
046706



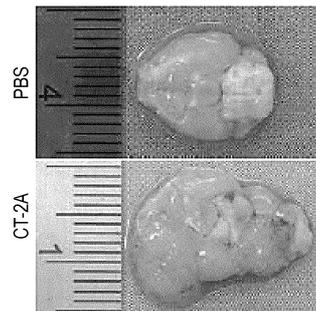
Фиг. 48А



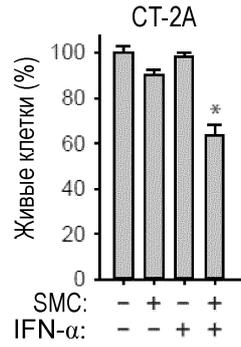
Фиг. 48В



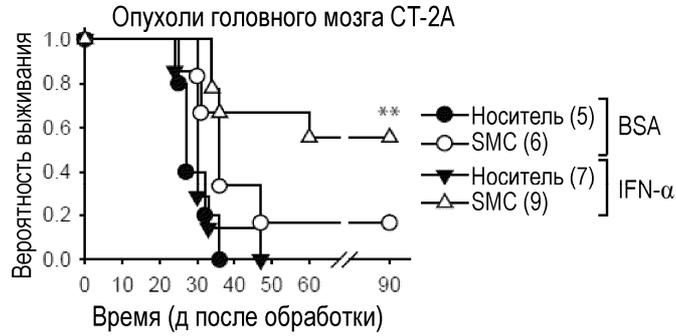
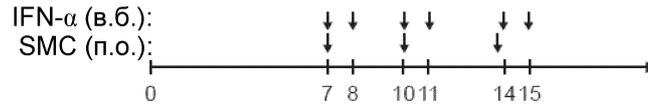
Фиг. 49А



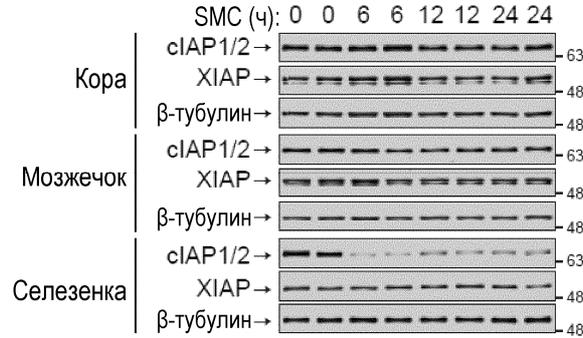
Фиг. 49В



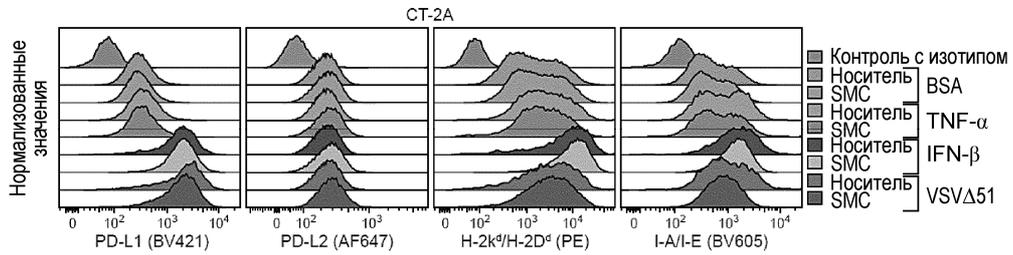
Фиг. 50А



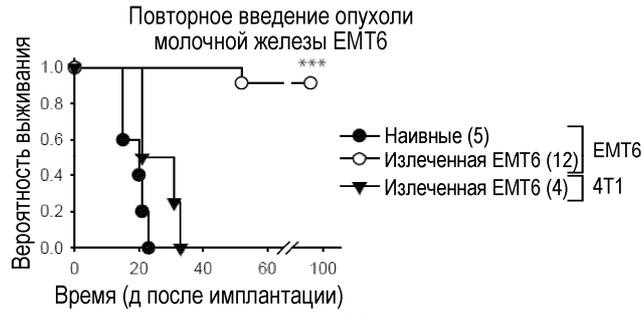
Фиг. 50В



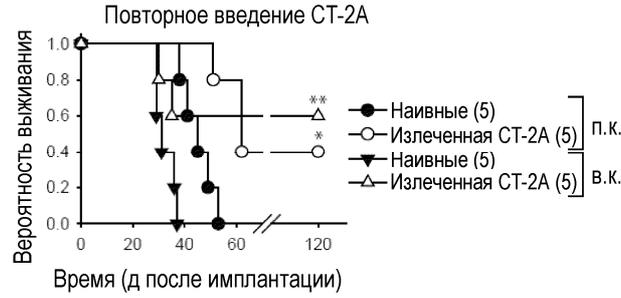
Фиг. 51



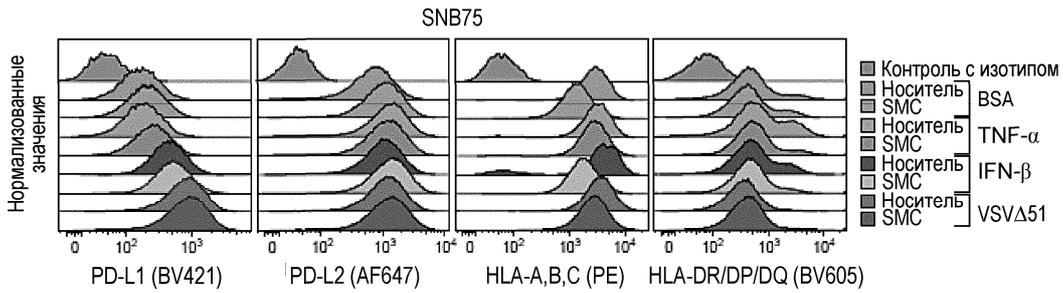
Фиг. 52А



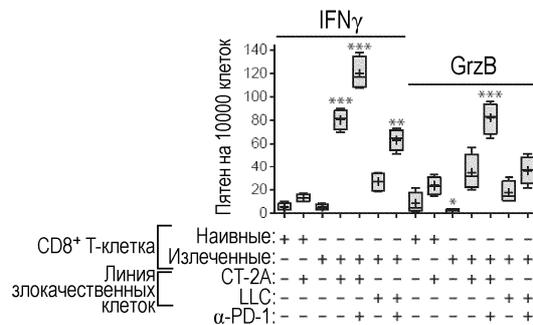
Фиг. 52В



Фиг. 52С

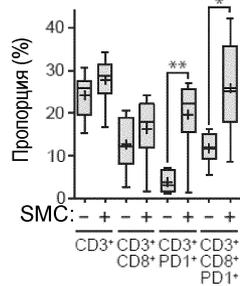


Фиг. 53

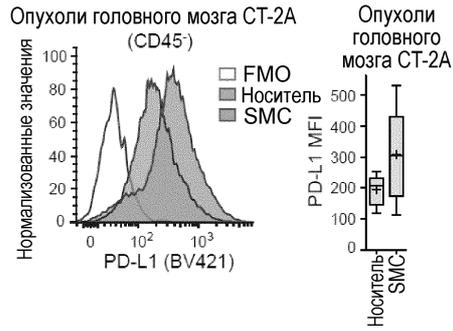


Фиг. 54А

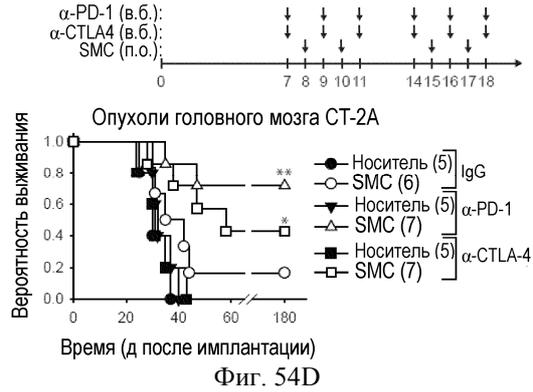
Опухоли головного мозга СТ-2А (CD45⁺)



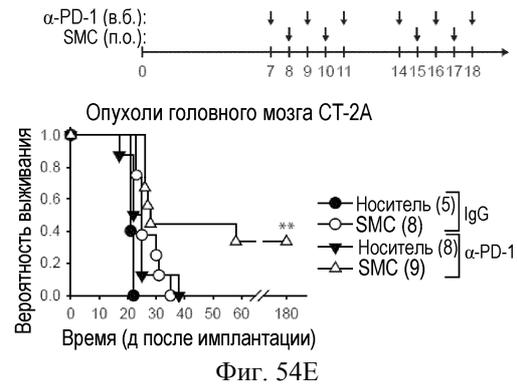
Фиг. 54В



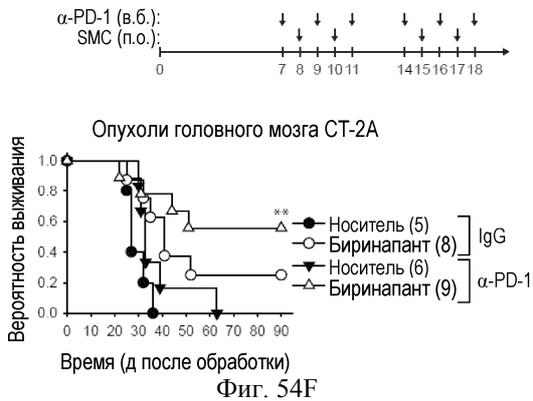
Фиг. 54С



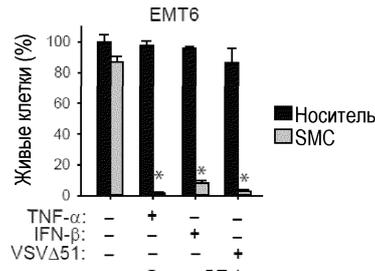
Фиг. 54D



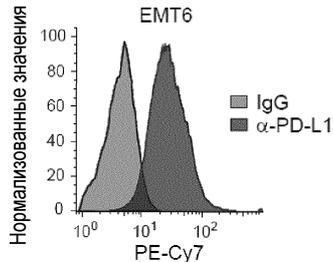
Фиг. 54E



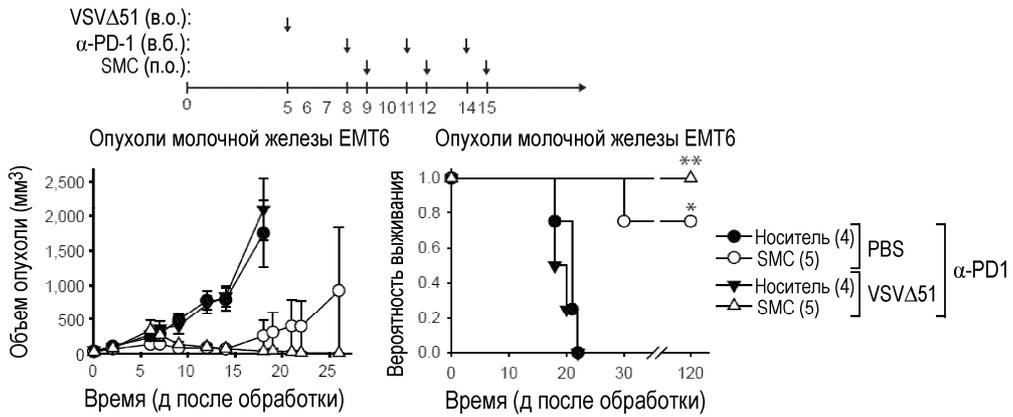
Фиг. 54F



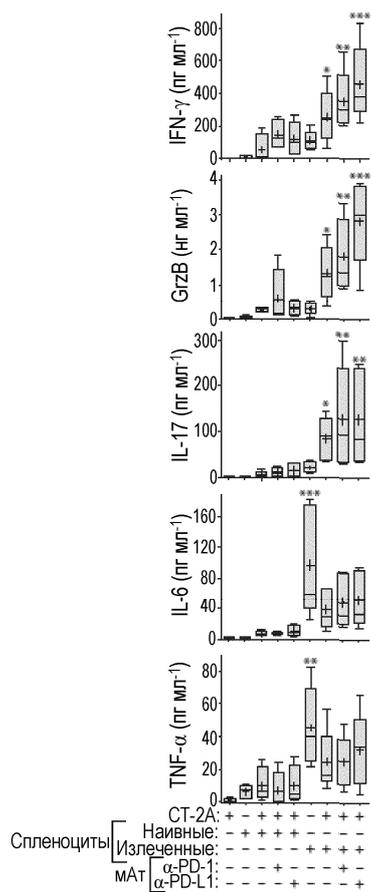
Фиг. 57А



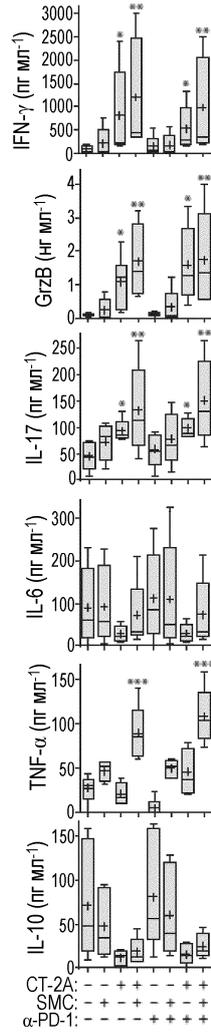
Фиг. 57В



Фиг. 57С

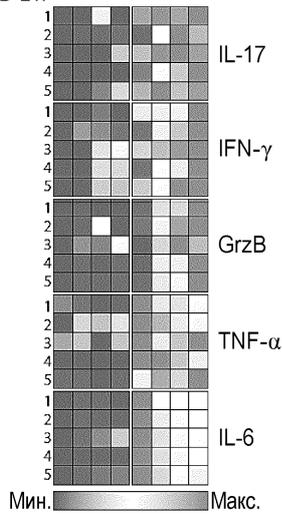


Фиг. 58А

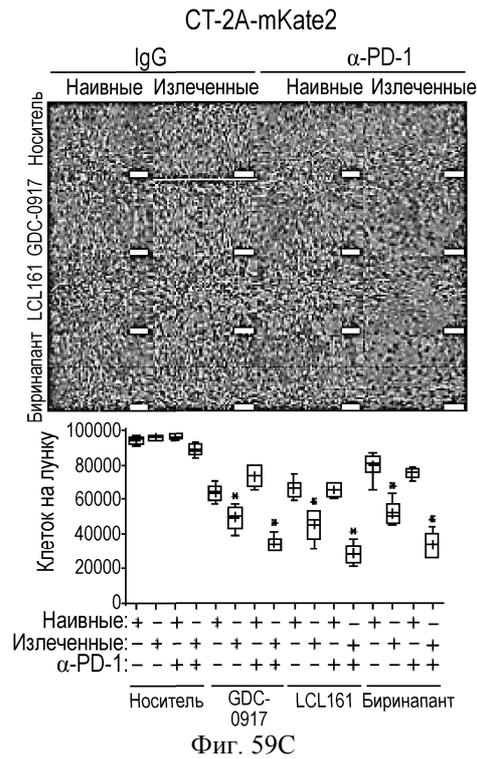
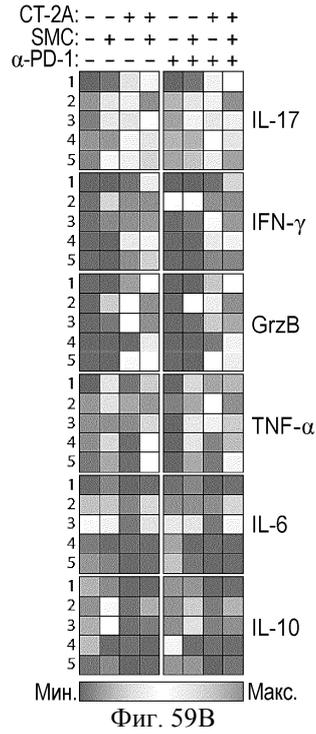


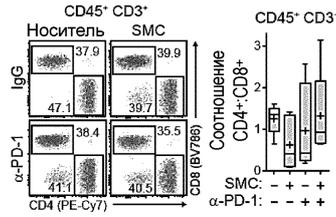
Фиг. 58В

ST-2A: - + + - + + +
 Наивные: + + + - - - -
 Излеченные: - - - + + + +
 α-PD-1: - - + - - - + -
 α-PD-L1: - - - + - - - +

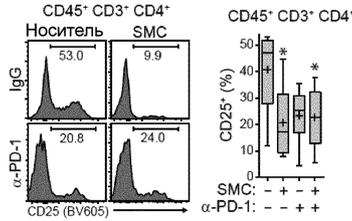


Фиг. 59А

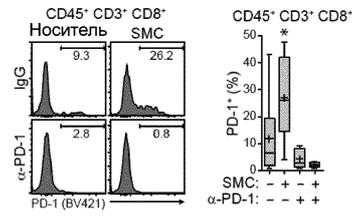




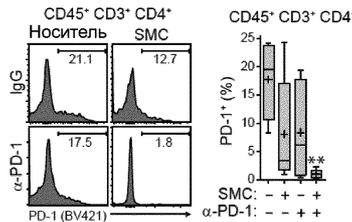
Фиг. 61B



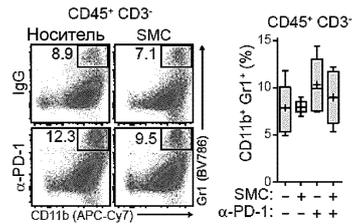
Фиг. 61C



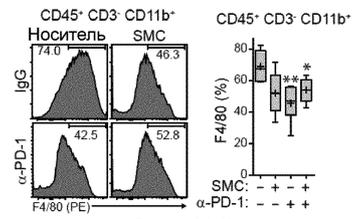
Фиг. 61D



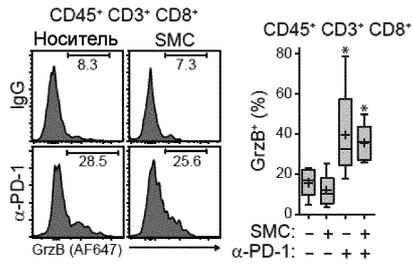
Фиг. 61E



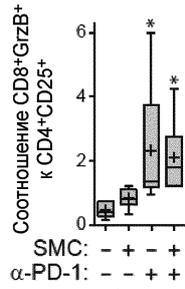
Фиг. 61F



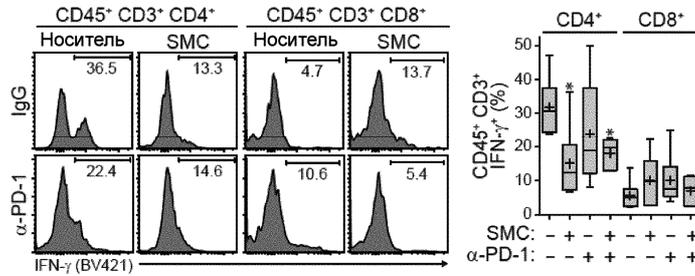
Фиг. 61G



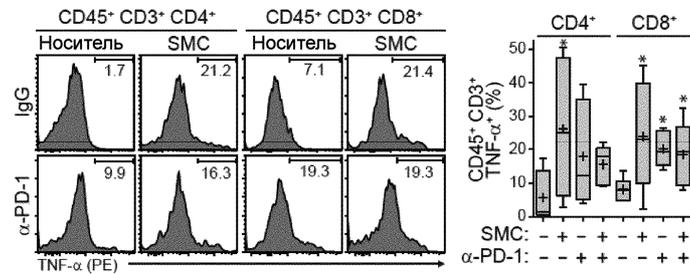
Фиг. 62А



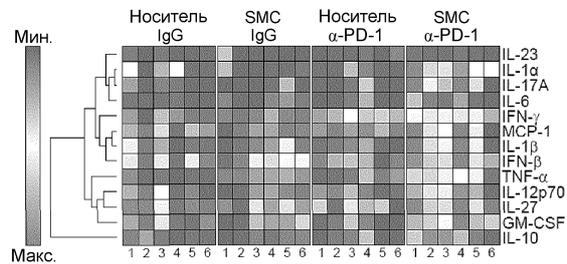
Фиг. 62В



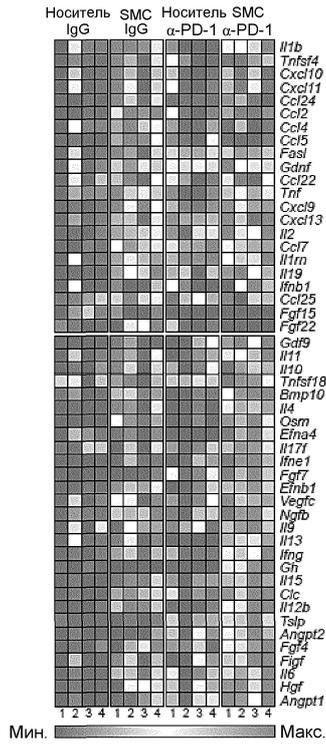
Фиг. 62С



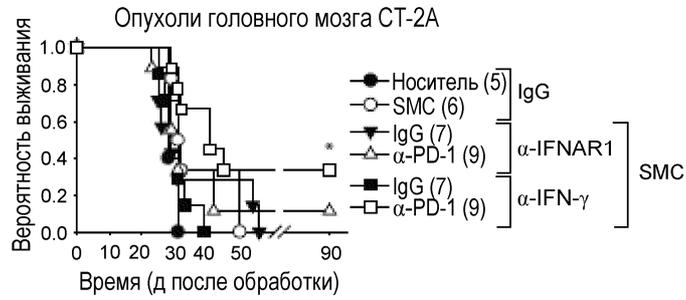
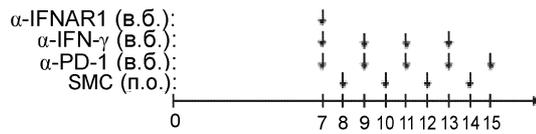
Фиг. 62D



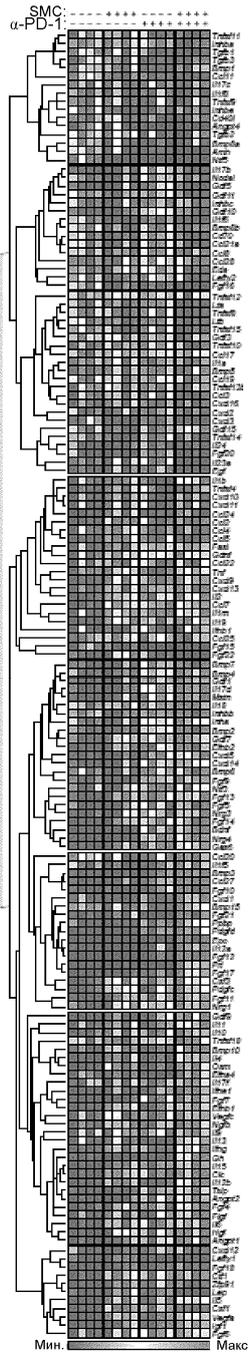
Фиг. 62Е



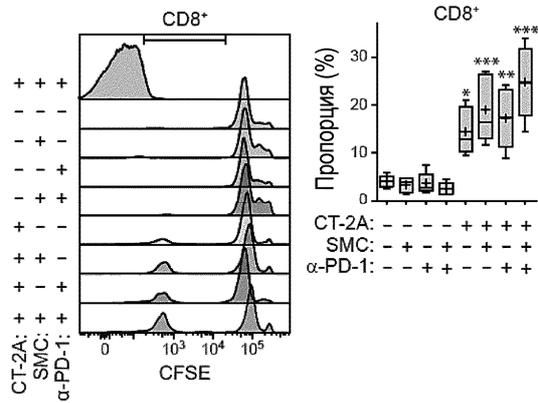
Фиг. 62F



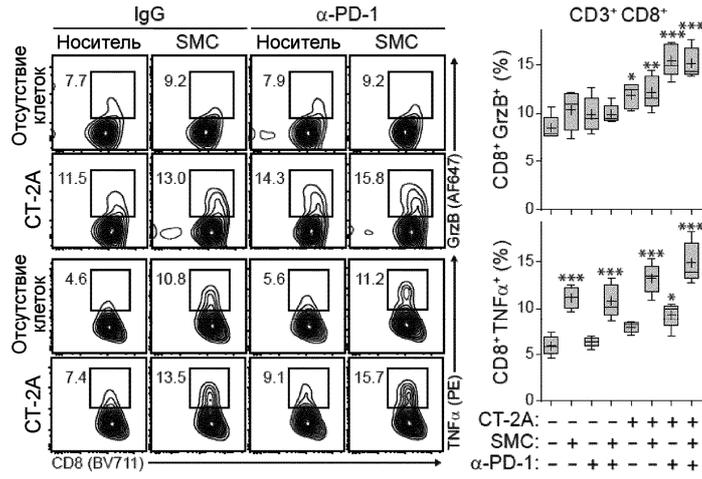
Фиг. 62G



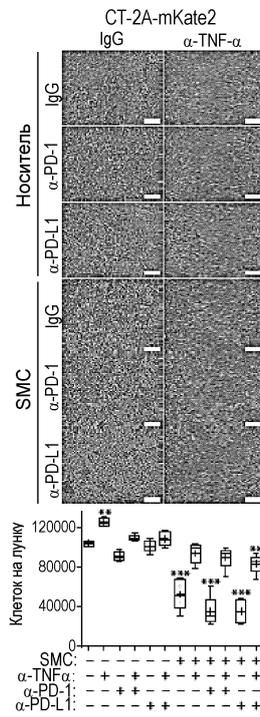
Фиг. 63



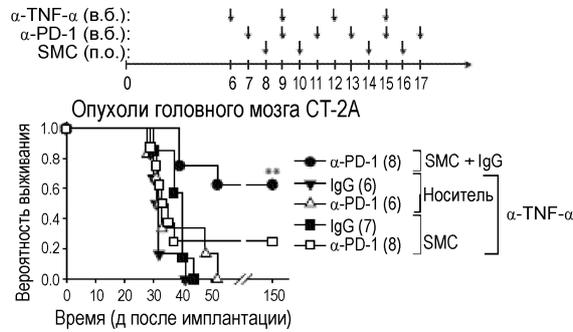
Фиг. 64



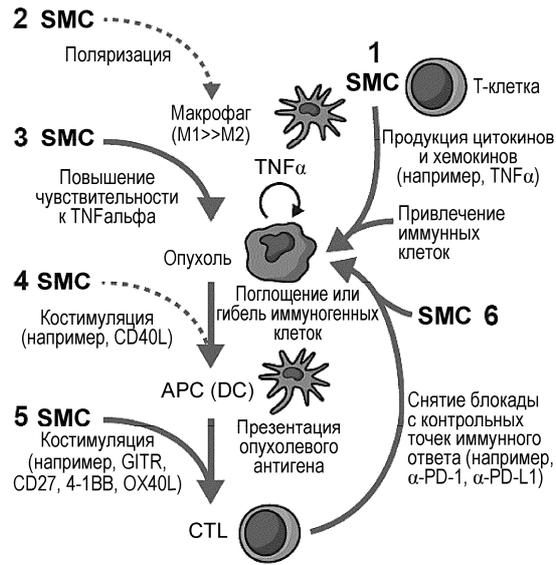
Фиг. 65А



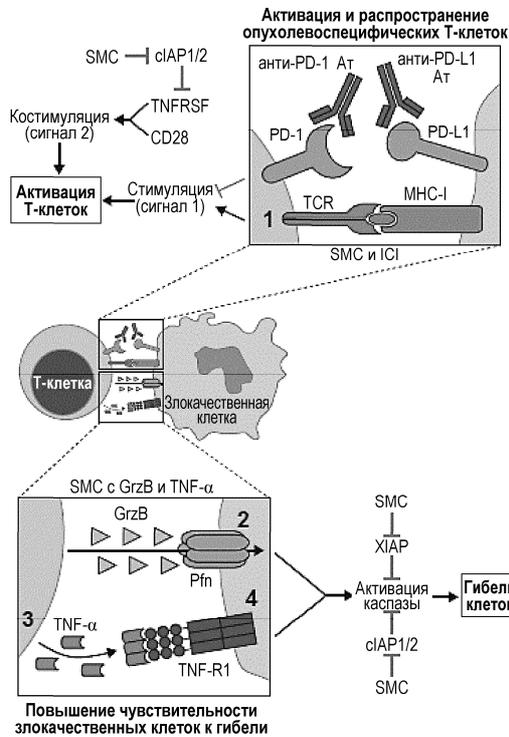
Фиг. 65В



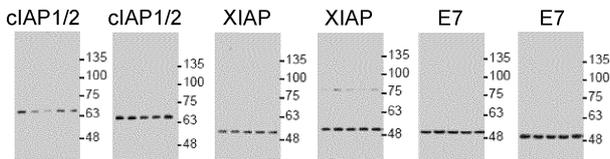
Фиг. 65С



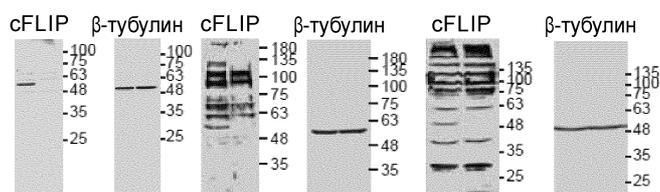
Фиг. 66



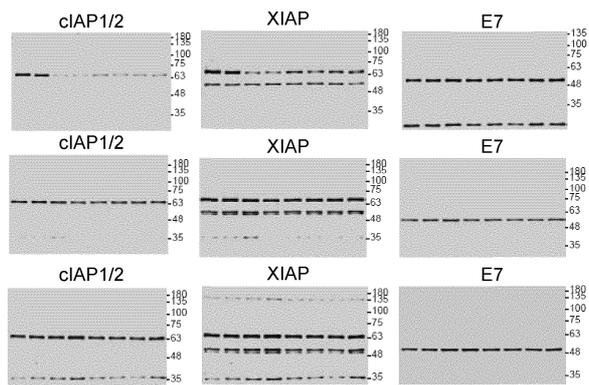
Фиг. 67



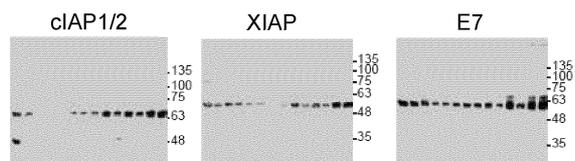
Фиг. 68А



Фиг. 68В



Фиг. 68С



Фиг. 68D

