

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202393517** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.03.13

(51) Int. Cl. **C07K 19/00** (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.15

(54) ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ TNFSF-L И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **63/211,766**

(32) **2021.06.17**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/033524**

(87) **WO 2022/266163 2022.12.22**

(88) **2023.01.26**

(71) Заявитель:

КАЛИВИР

ИММЬЮНОТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.

(US)

(72) Изобретатель:

**Торн Стивен Говард, Чжан Минжуй
(US)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к композициям, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие гибридные белки суперсемейства лигандов фактора некроза опухоли, объединенные с доменами олигомеризации. Кроме того, предлагаются вирусные и невирусные векторы для доставки таких композиций. Изобретение также относится к композициям, содержащим гибридные белки лигандов суперсемейства факторов некроза опухоли, объединенные с доменами олигомеризации.

SP-D Домен олигомеризации	SP-D Шейный домен	Линкер	TNFSF-L
---------------------------------	-------------------------	--------	---------

**202393517
A1**

**202393517
A1**

ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ TNFSF-L И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Перекрестные ссылки

Это заявка заявляет приоритет предварительной заявки № 63/211,766, поданной 17 июня 2021 г., которая полностью включена в настоящий документ ссылкой.

Перечень последовательностей

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящее описание ссылкой в полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 14 июня 2022 года, имеет название 199249-715601_SL.txt и размер 45 505 байт.

Предшествующий уровень техники

Суперсемейство TNF (TNFSF) состоит из белков, важных для развития и функционирования многих систем млекопитающих, включая иммунную, кроветворную и скелетную системы. Белки TNFSF являются лигандами соответствующего набора рецепторов суперсемейства рецепторов TNF (TNFS). Представители TNFSF обычно экспрессируются как мембранные белки типа II, за исключением лимфотоксина-альфа, который вырабатывается в виде секретируемого белка.

Для получения растворимых форм белков TNFSF, как правило, мембранный белок часто экспрессируют в клеточной линии, обладающей протеазой, способной отделять внеклеточный домен TNFSF от трансмембранного домена, или получают укороченную форму белка TNFSF, которая имеет внеклеточный домен плюс сигнальная последовательность. В любом случае некоторые растворимые формы белков-лигандов TNFSF (TNFSF-L) часто нестабильны в растворе в виде гомотримеров, состоящих исключительно из внеклеточного домена. Таким образом, существует потребность в более стабильных формах этих важных сигнальных белков.

Краткое описание

В настоящей заявке предлагаются композиции, где композиция включает нуклеиновую кислоту, причем нуклеиновая кислота кодирует гибридный белок, причем гибридный белок включает: лиганд суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант; и множество доменов из белка семейства коллектинов, причем множество доменов из белка семейства коллектинов включают: домен олигомеризации или его функциональный вариант; и шейный домен или его функциональный вариант, причем домен олигомеризации или его функциональный вариант и шейный домен или его функциональный вариант находятся ближе по последовательности по сравнению с их расположением в белке семейства коллектинов. Кроме того, предлагаются композиции, в

которых гибридный белок включает в порядке от N-конца к С-концу: домен олигомеризации или его функциональный вариант; шейный домен или его функциональный вариант; необязательно, линкерную последовательность; и TNFSF-L или его функциональный вариант. Кроме того, предлагаются композиции, в которых TNFSF-L включает лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, 4-1BBL, лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с TNF (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А или любую их комбинацию. Кроме того, предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд CD40. Кроме того, предлагаются композиции, в которых лиганд CD40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1. Кроме того, предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд OX40. Кроме того, предлагаются композиции, в которых лиганд OX40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Кроме того, предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой 4-1BBL. Кроме того, предлагаются композиции, в которых 4-1BBL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Кроме того, предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой LIGHT. Кроме того, предлагаются композиции, в которых LIGHT включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 6. Кроме того, предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL). Кроме того, предлагаются композиции, в которых GITRL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8. Кроме того, предлагаются композиции, в которых белок семейства коллектинов представляет собой SP-A, SP-D, маннозосвязывающий лектин (MBL), конглютинин, CL-43, CL-L1, CL-K1, CL-P1 или CL-46. Кроме того, предлагаются композиции, в которых белок семейства коллектинов представляет собой SP-D. Кроме того, предлагаются композиции, в которых домен олигомеризации включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 9. Кроме того, предлагаются композиции, в которых домен олигомеризации и шейный домен вместе включают последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 10. Кроме того, предлагаются композиции, в

которых домен олигомеризации и шейный домен вместе включают SEQ ID NO: 10. Кроме того, предлагаются композиции, в которых гибридный белок включает линкерную последовательность, и где линкерная последовательность включает GSG (глицин-серин-глицин) (SEQ ID NO: 12). Кроме того, предлагаются композиции, в которых нуклеиновая кислота включает РНК. Кроме того, предлагаются композиции, в которых нуклеиновая кислота включает ДНК.

В данной заявке предлагаются композиции, где композиция включает: нуклеиновую кислоту, причем нуклеиновая кислота включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

В данной заявке предлагаются композиции, где композиция включает: гибридный белок, причем гибридный белок включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

В данной заявке предлагаются композиции, где композиция включает: вектор; и нуклеиновую кислоту, кодирующую лиганд суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант, где TNFSF-L или его функциональный вариант объединен с доменом олигомеризации. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых нуклеиновая кислота кодирует гибридный белок, причем гибридный белок включает: лиганд суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант; и множество доменов из белка семейства коллектинов, причем множество доменов из белка семейства коллектинов включают: домен олигомеризации или его функциональный вариант; и шейный домен или его функциональный вариант, причем домен олигомеризации или его функциональный вариант и шейный домен или его функциональный вариант находятся ближе по последовательности по сравнению с их расположением в белке семейства коллектинов. Кроме того, в данной заявке предлагаются композиции, в которых вектор представляет собой вирусный вектор или невирусный вектор. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых невирусный вектор включает носитель из наночастиц. Кроме того, в данной заявке предлагаются композиции, в которых невирусный вектор включает носитель из липидных наночастиц. Кроме того, в данной заявке предлагаются композиции, в которых носитель из наночастиц включает золото, кремнезем, углеродные нанотрубки, водорастворимые фуллерены, кремниевые нанопроволоки, квантовые точки или любую их комбинацию. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых вектор включает бактериофаг, вирусоподобные частицы (VLP), тени эритроцитов, бактофекцию, экзосомы или любую их комбинацию. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых

гибридный белок включает в порядке от N-конца к С-концу: домен олигомеризации или его функциональный вариант; шейный домен или его функциональный вариант; необязательно, линкерную последовательность; и TNFSF-L или его функциональный вариант. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых TNFSF-L включает лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, 4-1BBL, TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А или любую их комбинацию. Кроме того, в данной заявке предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд CD40. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых лиганд CD40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1. Кроме того, в данной заявке предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд OX40. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых лиганд OX40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Кроме того, в данной заявке предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой 4-1BBL. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых 4-1BBL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Кроме того, в данной заявке предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой LIGHT. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых LIGHT включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 6. Кроме того, предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL). Кроме того, предлагаются композиции, в которых GITRL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых белок семейства коллектинов включает SP-A, SP-D, маннозосвязывающий лектин (MBL), конглютинин, CL-43, CL-L1, CL-K1, CL-P1 или CL-46. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых белок семейства коллектинов представляет собой SP-D. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых домен олигомеризации включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 9. Кроме того, предлагаются композиции, в которых домен олигомеризации и

шейный домен вместе включают последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 10. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых домен олигомеризации и шейный домен вместе включают SEQ ID NO: 10. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых гибридный белок включает линкерную последовательность, и где линкерная последовательность включает GSG (глицин-серин-глицин) (SEQ ID NO: 12). Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых нуклеиновая кислота включает РНК. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиции, в которых нуклеиновая кислота включает ДНК.

В данной заявке предлагаются композиции, где композиция включает: вектор; и нуклеиновую кислоту, причем нуклеиновая кислота включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 271.

В данной заявке предлагаются композиции, где композиция включает: вектор; и нуклеиновую кислоту, причем нуклеиновая кислота кодирует белок, содержащий последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

В данной заявке предлагаются клетки, причем клетка включает композицию, описанную в настоящей заявке. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются клетки, причем клетка представляет собой иммунную клетку. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются клетки, где иммунная клетка представляет собой лимфоидную клетку.

В данной заявке предлагаются гибридные белки, причем гибридный белок включает: лиганд суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант; и множество доменов из белка семейства коллектинов, причем множество доменов из белка семейства коллектинов включают: домен олигомеризации или его функциональный вариант; и шейный домен или его функциональный вариант, причем домен олигомеризации или его функциональный вариант и шейный домен или его функциональный вариант находятся ближе по последовательности по сравнению с их расположением в белке семейства коллектинов. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где гибридный белок включает следующее, в порядке от N-конца к C-концу: домен олигомеризации или его функциональный вариант; шейный домен или его функциональный вариант; необязательно, линкерную последовательность; и TNFSF-L или его функциональный вариант. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где TNFSF-L включает лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, 4-1BBL, TNF-связанный лиганд,

индуцирующий апоптоз (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А или любую их комбинацию. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд CD40. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где лиганд CD40 имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 1. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд OX40. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых лиганд OX40 имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где TNFSF-L представляет собой 4-1BBL. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где 4-1BBL имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где TNFSF-L представляет собой LIGHT. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где последовательность LIGHT имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 6. Кроме того, предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL). Кроме того, предлагаются композиции, в которых GITRL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где белок семейства коллектинов включает SP-A, SP-D, маннозосвязывающий лектин (MBL), конглутинин, CL-43, CL-L1, CL-K1, CL-P1, CL-46, или любую их комбинацию. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где белком семейства коллектинов является SP-D. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых домен олигомеризации имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 9. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых домен олигомеризации и шейный домен вместе имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 10. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых домен олигомеризации и шейный домен вместе включают SEQ ID NO: 10. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где гибридный белок включает линкерную последовательность, и где линкерная последовательность включает GSG (глицин-серин-глицин) (SEQ ID NO: 12).

В данной заявке предлагаются онколитические вирусы, где онколитический вирус включает: экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую лиганд суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант, где TNFSF-L или его функциональный вариант объединен с доменом олигомеризации. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, причем онколитический вирус представляет собой вирус болезни Ньюкасла (NDV), реовирус (RV), вирус миксомы (MYXV), вирус кори (MV), вирус простого герпеса (HSV), вирус осповакцины (VV), вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус полиомиелита (PV), вирус Сендай, флавивирус, лентивирус, вирус оспы, ретровирус, аденоассоциированный вирус или аденовирус. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, в которых нуклеиновая кислота, кодирующая TNFSF-L или его функциональный вариант, встроена в вирусный геном. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, в которых нуклеиновая кислота, кодирующая TNFSF-L или его функциональный вариант, встроена в ген тимидинкиназы. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, где TNFSF-L включает лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, 4-1BBL, TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А или любую их комбинацию. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд CD40. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, где лиганд CD40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд OX40. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, где лиганд OX40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, в которых TNFSF-L представляет собой 4-1BBL. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, где 4-1BBL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, в которых TNFSF-L представляет собой LIGHT. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, где LIGHT включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную

последовательности SEQ ID NO: 6. Кроме того, предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL). Кроме того, предлагаются композиции, в которых GITRL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, где домен олигомеризации включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 9. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, нуклеиновая кислота которых включает РНК. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, где нуклеиновая кислота включает ДНК.

В данной заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых вирус осповакцины включает: экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую лиганд суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант, где TNFSF-L или его функциональный вариант объединен с доменом олигомеризации. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, причем вирус осповакцины представляет собой модифицированный штамм вируса осповакцины Western Reserve (ATCC VR-1354), штамм Copenhagen, вирус осповакцины Ankara (ATCC VR-1508), вирус осповакцины Ankara (ATCC VR-1566), рекомбинантный вирус осповакцины Ankara (MVA), штамм NYVAC, штамм вируса осповакцины Wyeth (ATCC VR-1536), вирус осповакцины Wyeth (ATCC VR-325), штамм Wyeth (NYCBOH), штамм Tian Tan, штамм Lister, штамм USSR и штамм Evans. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая TNFSF-L или его функциональный вариант, встроена в вирусный геном. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая TNFSF-L или его функциональный вариант, встроена в ген тимидинкиназы. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых TNFSF-L включает лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, 4-1BBL, TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А или любую их комбинацию. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд CD40. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых лиганд CD40 включает последовательность, по меньшей мере на 85%

идентичную последовательности SEQ ID NO: 1. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд OX40. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, где лиганд OX40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых TNFSF-L представляет собой 4-1BBL. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых 4-1BBL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых TNFSF-L представляет собой LIGHT. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых LIGHT включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 6. Кроме того, предлагаются композиции, в которых TNFSF-L представляет собой лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL). Кроме того, предлагаются композиции, в которых GITRL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых домен олигомеризации включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 9. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, нуклеиновая кислота которых включает РНК. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых нуклеиновая кислота включает ДНК.

В данной заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, включающие: введение фармацевтической композиции субъекту в количестве, достаточном для лечения онкологического заболевания, причем фармацевтическая композиция включает: композицию, клетку, гибридный белок, онколитический вирус или вирус осповакцины, как описано в данной заявке. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, где онкологическое заболевание включает гемобластоз или солидную злокачественную опухоль. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, где онкологическое заболевание включает меланому, гепатоцеллюлярную карциному, рак молочной железы, рак легкого, рак брюшины, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак яичников, лейкоз, лимфому, карциному почки, рак поджелудочной железы, эпителиальную карциному, рак желудка, карциному ободочной кишки, рак двенадцатиперстной кишки, аденокарциному поджелудочной железы, мезотелиому, мультиформную глиобластому, астроцитому, множественную миелому, карциному

предстательной железы, гепатоцеллюлярную карциному, холангиосаркому, аденокарциному поджелудочной железы, плоскоклеточную карциному головы и шеи, колоректальный рак, аденокарциному желудка кишечного типа, плоскоклеточную карциному шейки матки, остеосаркому, эпителиальную карциному яичников, острую лимфобластную лимфому, миелопролиферативное новообразование или саркому. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, при этом онкологическое заболевание включает злокачественную опухоль мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, головного мозга, молочной железы, ободочной кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десен, головы, почек, печени, легкого, носоглотки, шеи, яичника, предстательной железы, кожи, желудка, яичка, языка или матки. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, где введение включает системное введение или местное введение. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, где введение включает внутриопухолевое введение, внутривенное введение, региональное введение, внутрибрюшинное введение, парентеральное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутриартериальное введение или любую их комбинацию. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, где введение включает внутриопухолевое введение. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, где фармацевтическая композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, где фармацевтически приемлемый носитель включает буфер, эмульсию, биоадсорбируемый полимер, гель или любую их комбинацию. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, в которых композицию, клетку или гибридный белок вводят в дозе от около 0,01 мкг/дозу до около 1 г/дозу. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, в которых онколитический вирус или вирус осповакцины вводят в дозе от около 10^3 до около 10^{12} БОЕ/дозу. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, где фармацевтическую композицию вводят в цикле лечения, включающем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доз. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, в которых фармацевтическую композицию вводят в каждой дозе в течение около 1 минуты, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 1 дня или более. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, в которых каждая доза не зависит от любых других доз. Кроме того, в

настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, в которых две или более дозы в цикле лечения разделены интервалом дозирования, в котором дозы не вводятся. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, в которых интервал введения дозы составляет около 1 минуты, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 1 дня, около 2 дней, около 3 дней, около 4 дней, около 5 дней, около 6 дней, около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 7 месяцев, около 8 месяцев, около 9 месяцев, около 10 месяцев, около 11 месяцев, около 1 года и более. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, в которых каждый интервал доз не зависит от любого другого интервала доз.

В данной заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, включающие: введение к опухолевой клетке в количестве, достаточном для уменьшения роста опухолевой клетки, композиции, клетки, гибридного белка, онколитического вируса или вируса осповакцины, как описано в настоящей заявке. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где опухоль представляет собой жидкую опухоль или солидную опухоль. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где опухоль включает меланому, гепатоцеллюлярную карциному, опухоль молочной железы, опухоль легкого, опухоль брюшины, опухоль предстательной железы, опухоль мочевого пузыря, опухоль яичника, лейкоз, лимфому, карциному почки, опухоль поджелудочной железы, эпителиальную карциному, опухоль желудка, карциному ободочной кишки, опухоль двенадцатиперстной кишки, аденокарциному поджелудочной железы, мезотелиому, мультиформную глиобластому, астроцитому, множественную миелому, карциному предстательной железы, гепатоцеллюлярную карциному, холангиосаркому, аденокарциному поджелудочной железы, плоскоклеточную карциному головы и шеи, колоректальную опухоль, аденокарциному желудка кишечного типа, плоскоклеточную карциному шейки матки, остеосаркому, эпителиальную карциному яичников, острую лимфобластную лимфому, миелопролиферативное новообразование или саркому. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где опухоль включает опухоль мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, головного мозга, молочной железы, толстой кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десен, головы, почек, печени, легкого, носоглотки, шеи, яичника, предстательной железы, кожи, желудка, яичка, языка или матки. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где введение включает системное введение или

местное введение. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где введение включает внутриопухолевое введение, внутривенное введение, региональное введение, внутрибрюшинное введение, парентеральное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутриартериальное введение или любую их комбинацию. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где введение включает внутриопухолевое введение. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где фармацевтически приемлемый носитель включает буфер, эмульсию, биоадсорбируемый полимер, гель или любую их комбинацию. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где композицию, клетку или гибридный белок вводят в дозе от около 0,01 мкг/дозу до около 1 г/дозу. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где онколитический вирус или вирус осповакцины вводят в дозе от около 10^3 до около 10^{12} БОЕ/дозу. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где введение осуществляется в цикле лечения, включающем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доз. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где каждую дозу вводят в течение около 1 минуты, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 1 дня или более. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, в которых две или более дозы разделены интервалом между дозами, при котором дозы не вводятся. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где интервал введения дозы составляет около 1 минуты, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 1 дня, около 2 дней, около 3 дней, около 4 дня, около 5 дней, около 6 дней, около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 7 месяцев, около 8 месяцев, около 9 месяцев, около 10 месяцев, около 11 месяцев, около 1 года или более. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, где каждый интервал доз не зависит от любого другого интервала доз.

Краткое описание чертежей

Новые признаки раскрытия подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание особенностей и преимуществ настоящего раскрытия

будет получено путем обращения к следующему подробному описанию, в котором представлены иллюстративные воплощения, в которых используются принципы настоящего раскрытия, и прилагаемые чертежи которых:

фиг. 1 иллюстрирует диаграмму примерной доменной структуры, содержащей домен олигомеризации, шейный домен, необязательный линкер и домен TNFSF-L;

на фиг. 2 показана экспрессия каркасного белка CD40L в клетках, инфицированных модифицированным трансгеном вируса онколитической коровьей оспы, экспрессирующим каркасный белок CD40L, по сравнению с клетками, инфицированными онколитическим вирусом осповакцины, не экспрессирующим трансген, или неинфицированными клетками. Ось Y учитывает mCD40L в нг/мл, а ось X учитывает образец (неинфицированные клетки, вирус осповакцины, имеющий делецию A52R и делецию тимидинкиназы, и вирус осповакцины, имеющий делецию тимидинкиназы и вставку варианта CD40L);

на фиг. 3 показаны результаты анализа ELISA mOX40L, в котором надосадочную жидкость разбавляют в 100 раз после учета фактора разведения и проверяют на экспрессию mOX40L. Ось Y учитывает mOX40L в пг/мл, а ось X отражает образец (неинфицированные клетки, вирус осповакцины с делецией A52R и делецией тимидинкиназы, вирус осповакцины с делецией тимидинкиназы и нативным OX40L и вирус осповакцины с делецией тимидинкиназы и вставкой варианта OX40L);

на фиг. 4 показаны результаты анализа 41BBL ELISA, в котором неразведенная надосадочная жидкость проверяют на экспрессию 41BBL. Ось Y учитывает m41BBL в нг/мл, а ось X учитывает образец (неинфицированные клетки, вирус осповакцины с делецией A52R и делецией тимидинкиназы, вирус осповакцины с делецией тимидинкиназы и нативным 41BBL и вирус осповакцины с делецией тимидинкиназы и вставка варианта 41BBL);

на фиг. 5 показаны результаты анализа репортерных клеток CD40L. Ось Y представляет собой OD, а ось X представляет собой объем использованной надосадочной жидкости. Образцы представляют собой неинфицированные клетки, клетки, инфицированные вирусом осповакцины, имеющим делецию A52R и делецию тимидинкиназы, и клетки, инфицированные вирусом осповакцины, содержащим делецию тимидинкиназы и вариант CD40L;

на фиг. 6 показана вероятность выживания мышей, обработанных вирусом с делецией ТК (ТК-), вирусом, имеющим гибридную конструкцию TNFSFL (s3CD40L), или буферным контролем;

на фиг. 7 показаны уровни экспрессии люциферазы (RLU) в неинфицированных контрольных клетках (буфер), клетках, инфицированных вирусом, экспрессирующим 41BBL, и клетках, инфицированных вирусом, экспрессирующим тримерный OX40L (3sOX40L);

на фиг. 8 показаны уровни экспрессии люциферазы (RLU) в неинфицированных контрольных клетках (буфер), клетках, инфицированных: вирусом, экспрессирующим тримерный GITRL в качестве отрицательного контроля, вирусом, экспрессирующим мономер 41BBL, и вирусом, экспрессирующим тримерный 41BBL (3s41BBL);

на фиг. 9 показаны уровни экспрессии IL-2 в CD8 T-клетках, стимулированных только CD3 или CD3 с помощью: CD28, рекомбинантного 41BBL, рекомбинантного OX40L, вируса, экспрессирующего 3s41BBL, или вируса, экспрессирующего 3xOX40L;

на фиг. 10 показан средний объем опухоли у мышей BALB/c с подкожными опухолями RENCA с объемом в мм³ по оси y, измеренным через дни после обработки по оси x. Объем измеряли через 0, 5, 8 и 12 дней после обработки буферным контролем, контрольным вирусом осповакцины с делецией тимидинкиназы (НССТКМ), вирусом, экспрессирующим 3s41BBL, или вирусом, экспрессирующим 3sOX40L. Объем опухоли в группах обработки, включающих вирус, экспрессирующий лиганды 3s41BBL или 3sOX40L, показал меньшие объемы опухоли по сравнению с отрицательным контролем после 5, 8 и 12 дней;

на фиг. 11А показана диаграмма рассеяния объема опухоли в мм³ у мышей BALB/c с подкожными опухолями карциномы легких Льюиса (LLC) через 30 дней после обработки контрольным буфером, контрольным вирусом осповакцины с делецией тимидинкиназы (НССТКМ) или вирусом, экспрессирующим 3sGITRL. Указаны средние объемы опухолей для каждой группы через 30 дней: около 1400 мм³ в контрольной группе с буфером, около 750 мм³ для группы НССТКМ и <100 мм³ для группы 3sGITRL;

на фиг. 11В показана диаграмма рассеяния объема опухоли в мм³ у мышей BALB/c с подкожными опухолями RENCA через 17 дней после обработки контрольным буфером, контрольным вирусом осповакцины с делецией тимидинкиназы (НССТКМ) или вирусом, экспрессирующим 3sGITRL. Указаны средние объемы опухолей для каждой группы через 17 дней: около 800 мм³ в контрольной группе с буфером, около 350 мм³ в группе НССТКМ и около 250 мм³ в группе 3sGITRL.

Подробное описание

Хотя в данной заявке были показаны и описаны предпочтительные воплощения настоящего раскрытия, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие воплощения представлены только в качестве примера. Теперь специалистам в данной

области техники будут понятны многочисленные вариации, изменения и замены, не отклоняющиеся от настоящего раскрытия. Следует понимать, что при реализации раскрытия могут быть использованы различные альтернативы воплощения настоящего раскрытия, описанным в настоящей заявке. Предполагается, что представленная ниже формула изобретения определяет объем раскрытия и охватывает способы и конструкции, входящие в объем этой формулы изобретения, и их эквиваленты.

В данной заявке предлагаются композиции и их применение для лечения онкологического заболевания, содержащие нуклеиновую кислоту, кодирующую гибридный белок лиганда суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант, объединенный с доменом полимеризации. В одной примерной конструкции, со ссылкой на фиг. 1, TNFSF-L объединен (необязательно через линкер) с N-концевым доменом олигомеризации и, необязательно, с шейным доменом, С-концевым по отношению к домену олигомеризации. На иллюстрации фиг. 1, домен олигомеризации и шейный домен представляют собой функциональные домены белка семейства коллектинов SP-D. Дополнительный домен олигомеризации и необязательный шейный домен и/или линкерный домен позволяют полимеризовать гибридный белок, обеспечивая структуры, обладающие повышенной активностью в запуске иммунного ответа, или его маркеры. В данной заявке более подробно описаны TNFSF-L, домены для объединения с TNFSF-L, вирусные и невирусные векторы для доставки нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридные белки, условия применения композиций и способы введения. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются композиция и способы лечения онкологического заболевания, обычно включающие онколитический вирус, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую гибридный белок TNFSF-L. Дополнительно в настоящей заявке предлагаются клетки, содержащие нуклеиновую кислоту, экспрессирующую гибридный белок, как описано в настоящей заявке.

Определения

Терминология, используемая в данной заявке, предназначена только для описания конкретных случаев и не предназначена для ограничения. Используемые в данной заявке формы единственного числа («a», «an» и «the» в исходном тексте на английском языке) могут также включать формы множественного числа, если из контекста явно не указано иное. Кроме того, в той степени, в которой термины «включает», «содержащий», «включающий», «включает», «имеющий», «имеет», «с» или их варианты используются либо в подробном описании, либо в формуле изобретения, такие термины должны быть всеобъемлющими, аналогично термину «содержащий».

Термин «около» или «приблизительно» может означать в пределах приемлемого диапазона ошибок для конкретного значения, определенного специалистом в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как значение измеряется или определяется, например, от ограничений системы измерения. Если в заявке и формуле изобретения описаны конкретные значения, если не указано иное, термин «около» следует считать означаемым приемлемый диапазон погрешности для конкретного значения, например, $\pm 10\%$ значения, измененного термином «около».

Термины «гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты», или «экзогенная последовательность нуклеиновой кислоты», или «трансгены», используемые в настоящей заявке, по отношению к конкретному вирусу, могут относиться к последовательности нуклеиновой кислоты, которая происходит из источника, отличного от указанного вируса.

Термин «мутация», используемый в настоящей заявке, может относиться к делеции, вставке гетерологичной нуклеиновой кислоты, инверсии или замене, включая удаление мутаций с открытой рамкой считывания, как это обычно понимается в данной области техники.

Термин «ген», используемый в настоящей заявке, может относиться к сегменту нуклеиновой кислоты, который кодирует отдельный белок или РНК (также называемый «кодирующей последовательностью» или «кодирующей областью»), необязательно вместе со связанными регуляторными областями, такими как промоторы, операторы, терминаторы и т.п., которые могут располагаться выше или ниже кодирующей последовательности.

«Промотор» в контексте настоящего документа может представлять собой контрольную последовательность, которая представляет собой область последовательности нуклеиновой кислоты, которая контролирует инициацию и скорость транскрипции. В некоторых воплощениях промотор может содержать генетические элементы, с которыми могут связываться регуляторные белки и молекулы, такие как РНК-полимераза и другие факторы транскрипции. Термины «функционально позиционированный», «функционально связанный», «под контролем» и «под транскрипционным контролем» могут означать, что промотор находится в правильном функциональном месте и/или ориентации по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты для контроля инициации транскрипции и/или экспрессии этой последовательности. В некоторых воплощениях промотор может использоваться или не использоваться в сочетании с «энхансером», который относится к цис-действующей

регуляторной последовательности, участвующей в активации транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты.

Термин «гомология», используемый в настоящей заявке, может относиться к расчетам «гомологии» или «процентной гомологии» между двумя или более нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, которые могут быть определены путем выравнивания последовательностей для целей оптимального сравнения (например, пробелы могут быть введены в последовательность первой последовательности). Затем можно сравнить нуклеотиды в соответствующих положениях, и процент идентичности между двумя последовательностями может быть функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % гомологии = количество идентичных положений/общее количество положений \times 100). Например, положение в первой последовательности может быть занято тем же нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы в этом положении будут идентичны. Процент гомологии между двумя последовательностями может быть функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей, с учетом количества пробелов и длины каждого пробела, которые необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. В некоторых воплощениях длина последовательности, выровненной для целей сравнения, может составлять по меньшей мере около: 30%, 40%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 95% длины референсной последовательности. Поиск BLAST® может определить гомологию между двумя последовательностями. Гомология может быть между полными длинами двух последовательностей или между частями полных длин двух последовательностей. Эти две последовательности могут представлять собой гены, нуклеотидные последовательности, белковые последовательности, пептидные последовательности, аминокислотные последовательности или их фрагменты. Фактическое сравнение двух последовательностей может быть осуществлено известными способами, например, с использованием математического алгоритма. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать любые соответствующие параметры соответствующих программ (например, NBLAST). Например, параметры для сравнения последовательностей могут быть установлены на уровне балла = 100, длины слова = 12 или могут варьировать (например, W=5 или W=20). Другие примеры включают алгоритм Myers и Miller, CABIOS (1989), ADVANCE, ADAM, BLAT и FASTA.

Термин «субъект» может относиться к животному, включая, без ограничения указанным, примата (например, человека), корову, овцу, козу, лошадь, собаку, кошку,

кролика, крысу или мышь. Термины «субъект» и «пациент» используются в данной заявке взаимозаменяемо по отношению, например, к субъекту-млекопитающему, такому как человек.

Термины «проводить лечение», «лечить» и «лечение» могут означать облегчение или отмену расстройства, заболевания или состояния; или один или несколько симптомов, связанных с расстройством, заболеванием или состоянием; или облегчение или устранение причины (причин) расстройства, заболевания или состояния как такового.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» может относиться к количеству соединения, которое при введении может быть достаточным для предотвращения развития или облегчения в некоторой степени одного или нескольких симптомов расстройства, заболевания или состояния, которое лечат.

Термин «онколитический», используемый в настоящей заявке, может относиться к уничтожению злокачественных опухолевых или опухолевых клеток агентом, таким как онколитический поксвирус, такой как онколитический вирус осповакцины, например, посредством прямого лизиса указанных клеток, путем стимуляции иммунного ответа по отношению к указанным клеткам, апоптоза, экспрессии токсичных белков, аутофагии и остановки синтеза белка, индукции противоопухолевого иммунитета или любых их комбинаций. Прямой лизис злокачественных опухолевых или опухолевых клеток, инфицированных агентом, таким как вирус онколитической коровьей оспы, может быть результатом репликации вируса внутри указанных клеток. В некоторых примерах термин «онколитик» может относиться к уничтожению злокачественных опухолевых или опухолевых клеток без лизиса указанных клеток.

Термин «онколитический вирус», используемый в настоящей заявке, может относиться к вирусу, который преимущественно инфицирует и убивает опухолевые клетки.

Термин «модифицированный онколитический вирус», используемый в настоящей заявке, может относиться к онколитическому вирусу, который включает модификацию своего компонента, такую как, без ограничения указанным, модификация нативного генома («каркаса») вируса, такую как мутация или делеция вирусного гена, введение экзогенной нуклеиновой кислоты, химическую модификацию вирусной нуклеиновой кислоты или вирусного белка и введение экзогенного белка или модифицированного вирусного белка в вирусный капсид. В целом, онколитические вирусы могут быть модифицированы (также известные как «сконструированные») для улучшения терапевтического воздействия на опухолевые клетки.

Гибридные конструкции

В данной заявке представлены нуклеиновые конструкции, кодирующие гибридные белки. В некоторых воплощениях гибридный белок, описанный в настоящей заявке, включает область TNFSF-L и область олигомеризации, необязательно из белка-коллектина. Такие гибридные белки могут кодироваться нуклеиновыми кислотами и встраиваться в онколитический вирус. Полученный экспрессированный гибридный белок может дополнительно содержать линкерную область между областью TNFSF-L и областью олигомеризации. Примеры представителей суперсемейства TNF для включения в область TNFSF-L включают, без ограничения указанным: лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, лиганд CD137, лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с TNF (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А или любую их комбинацию. В дополнительных воплощениях область TNFSF-L может быть связана на N-конце с линкерным пептидом. В некоторых случаях линкерные пептиды содержат до 10 аминокислот в длину и, необязательно, богаты глицином и/или серином.

В некоторых воплощениях в настоящей заявке предлагаются сами гибридные белки. В некоторых воплощениях гибридный белок включает область TNFSF-L и область олигомеризации, необязательно из белка коллектина. Такие гибридные белки могут кодироваться нуклеиновыми кислотами и встраиваться в онколитический вирус. Полученный экспрессированный гибридный белок может дополнительно содержать линкерную область между областью TNFSF-L и областью олигомеризации. Примеры представителей суперсемейства TNF для включения в область TNFSF-L включают, без ограничения указанным: лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, лиганд CD137, лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с TNF (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А или любую их комбинацию. В дополнительных воплощениях область TNFSF-L может быть связана на N-конце с линкерным пептидом. В некоторых случаях линкерные пептиды содержат до 10 аминокислот в длину и, необязательно, богаты глицином и/или серином.

Аминокислотные последовательности типичных лигандов суперсемейства некроза опухолей для включения полностью или частично в гибридные конструкции, описанные в

настоящей заявке, указаны в таблице 1. Такие типичные белки TNFSF-L включают эктодомены из мышинового CD40L, человеческого OX40L, мышинового OX40L, мышинового 4-1BBL, человеческого 4-1BBL, человеческого GITRL, мышинового GITRL, мышинового 3sCD40L, мышинового 3sOX40L, мышинового 3s4-1BBL, мышинового 3sGITRL, человеческого 3sOX40L, человеческого 3s4-1BBL и мышинового 3sGITRL.

Таблица 1

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
1	CD40-L (мышь)	HRRLDKVEEEVNLHEDFVFIKKLKRCKGEGSLSLNCEEMRRQ FEDLVKDITLNKEEKKENSFEMQRGDEDPQIAAHVVSEANSNAA SVLQWAKKGYITMKSNLVMLENGKQLTVKREGLYVYVYTQVTF CSNREPSSQRPFIVGLWLKPSSGSERILLKAANTHSSSQLCEQQSV HLGGVFELQAGASVFNVTASQVIHRVGFSSFGLLKL
2	OX40-L (человек)	RIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNSVIINCDGFYLIS LKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDK VYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
3	OX40-L (мышь)	AKDPPIQRLRGAVTRCEDGQLFISSYKNEYQTMEVQNSSVVIKCD GLYIYLKGSFFQEVKIDLHFREDHNPISIPMLNDGRRIVFTVVASL AFKDKVYLVNAPDTLCEHLQINDGELIVVQLTPGYCAPEGSYHS TVNQVPL
4	4-1BBL (мышь)	SHIGCPNTTQGGSPVFAKLLAKNQASLCNTTLNWHSDGAGSSY LSQGLRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPFTNTGHKVQGW VSLVLQAKPVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLLK AGHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTSFGFLVKPDNP WE
5	4-1BBL (человек)	QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKE LVVAKAGVYYVFFQLELRRVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
6	LIGHT (человек)	MEESVVRPSVFFVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCSVARVGLGLLLL LMGAGLAVQGWFLQLHWRLEGEMVTRLPDGPAGSWEQLIQERR SHEVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGA LVVTKAGYYYTYSKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPPEE LELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEKVVVRVL DERLVRLRDGTRSIFGAFMV
7	GITRL (мышь)	TSLKPTAIESCMVKFELSSSKWHMTSPKPHCVNTTSDGKLIKILQS GTYLIYGQVIPVDKKYIKDNAPFVVQIYKKNDVLQTLMNDFQILP IGGVYELHAGDNIYLFNSKDHIQKTNTYWGIIIMPDLPFIS
8	GITRL (человек)	TSLKPTAIESCMVKFELSSSKWHMTSPKPHCVNTTSDGKLIKILQS GTYLIYGQVIPVDKKYIKDNAPFVVQIYKKNDVLQTLMNDFQILP IGGVYELHAGDNIYLFNSKDHIQKTNTYWGIIIMPDLPFIS

Многие рецепторы суперсемейства TNF блокируют свои когнатные лиганды в виде гомотримеров. Лиганды в нативном виде экспрессируются в виде трансмембранных белков, закрепленных на поверхности клеток. В данной заявке предлагаются гибридные конструкции, содержащие лиганды TNFSF, объединенные с фрагментом, способствующим олигомеризации, например, из белка коллектина человека. В некоторых воплощениях область олигомеризации включает полипептидный фрагмент белка коллектина, необязательно связанный с N-концом области TNFSF-L или с N-концом

линкерного пептида, причем С-конец линкерного пептида связан с N-концом области TNFSF-L. Обычно коллектины содержат С-концевую углеводную часть, шейную часть, коллагеновую часть и N-концевую часть. С-концевая углеводная область коллектинов, также известная как лектиновый домен или CRD, обычно включает остатки цистина, способствующие олигомеризации. Шейный участок инициирует тримеризацию и образует застежку-молнию вдоль коллагенового хвоста шейного отдела по направлению к N-концевому отделу. Сама N-концевая часть включает богатую цистином часть, которая способствует олигомеризации через дисульфидные мостики.

Домены олигомеризации

В данной заявке предлагаются гибридные конструкции TNFSF-L, содержащие область олигомеризации. Такие области обеспечивают повышенную стабильность и функциональность экспрессируемого TNFSF-L и, следовательно, повышенную активацию активности иммунной системы хозяина. В некоторых воплощениях область олигомеризации включает по меньшей мере один домен или его функциональный вариант белка семейства коллектинов. Известно, что белки коллектины образуют стабильные олигомеры. Коллектины являются одними из 18 представителей группы, образующей суперсемейство белков лектинов, содержащее структурную складку белка, называемую доменом лектина С-типа. Было показано, что некоторые представители имеют дополнительные структурные особенности; таким образом, они содержат следующие компоненты: i) N-концевой коллагеновый домен, соединенный с ii) альфа-спиральным сегментом, который также называется шейной областью, и iii) CRD на С-конце. Примеры коллектинов включают поверхностно-активный белок А (SP-A), поверхностно-активный белок D (SP-D), маннозосвязывающий лектин (MBL), конглутинин, CL-43, CL-L1, CL-K1, CL-P1 и CL-46. SP-A и SP-D содержат N-концевые цистеины, которые участвуют в дисульфид-опосредованной олигомеризации предварительно сформированных тримеров. В некоторых воплощениях также рассматриваются нуклеиновые кислоты, кодирующие вышеуказанные пептидные последовательности. В некоторых воплощениях гибридная конструкция, описанная в настоящей заявке, включает домен олигомеризации коллектина или его функциональный вариант. В некоторых воплощениях гибридная конструкция, описанная в настоящей заявке, включает домен олигомеризации коллектина или его функциональный вариант и шейный домен коллектина или его функциональный вариант. Типичные последовательности представлены в таблице 2 (аминокислотные) и таблице 3 (нуклеотидные).

Таблица 2

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
9	домен олигомеризации из SP-D	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTMP SACTLVMCSSVESGLPGRDG
10	домен олигомеризации и шейный домен из SP-D (жирный шрифт для домена олигомеризации, нежирный – для шейного домена)	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTMP SACTLVMCSSVESGLPGRDGSDVASLRQQVEA LQGQVQHLQAAFSQYKKVE

Таблица 3

SEQ ID NO:	Описание	Нуклеотидная последовательность
11	домен олигомеризации и шейный домен из SP-D	ATGCTGCTCTTCCTCCTCTCTGCACTGGTCCT GCTCACACAGCCCCTGGGCTACCTGGAAGCA GAAATGAAGACCTACTCCCACAGAACAATG CCCAGTGCTTGCACCCTGGTCATGTGTAGCT CAGTGGAGAGTGGCCTGCCTGGTCGCGATgga tctgatGTTGCTTCTCTGAGGCAGCAGGTTGAGG CCTTACAGGGACAAGTACAGCACCTCCAGGC TGCTTTCTCTCAGTATAAGAAgtGgaG

В некоторых воплощениях фрагмент полипептида коллектина связан с N-концом области TNFSF-L гибридного белка или с N-концом линкерного пептида, причем C-конец линкерного пептида связан с N концом области TNFSF-L гибридного белка.

Линкеры

В данной заявке предлагаются гибридные конструкции, содержащие гибкий линкерный элемент, расположенный между доменом олигомеризации и доменом TNFSF-L. В некоторых воплощениях гибкий линкерный элемент имеет длину 25 аминокислот или менее. В некоторых воплощениях линкерный элемент имеет длину 3-30 аминокислот, в частности длину 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 или 30 аминокислот. В некоторых воплощениях длина линкера включает 3-10 или 5-10 аминокислот. В некоторых воплощениях линкерные элементы построены из небольших гидрофильных незаряженных аминокислот. В некоторых воплощениях линкерный элемент согласно изобретению может содержать аминокислоты, выбранные из G, S, A и T. Линкерный элемент предпочтительно представляет собой глицин/сериновый линкер, т.е. пептидный линкер, содержащий аминокислоты глицин и серин. В некоторых воплощениях линкер включает аминокислотную последовательность (GSG) (SEQ ID NO: 12). В некоторых воплощениях линкер включает аминокислотную последовательность (GSS)_a(SSG)_b(GSG)_c (SEQ ID NO: 13), где каждый из a, b, c представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 повторов. Если TNFSF-L заканчивается или начинается с аминокислоты серина или глицина, такой остаток может также образовывать первый остаток линкера.

Строительные блоки подобных элементов могут состоять из 1, 2, 3, 4, 5 или более аминокислот. Обычно линкерный элемент, используемый в данной заявке, может состоять из строительных блоков или также из последовательности аминокислот.

Векторы доставки

В данной заявке предлагаются системы для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих гибридные конструкции, как описано в настоящей заявке, обеспечивающие проникновение конструкции нуклеиновой кислоты в клетку-мишень при одновременном снижении деградации нуклеазой нуклеиновой кислоты. Такие системы доставки могут содержать вирусный или невирусный вектор.

Онколитические вирусы

В данном документе представлены векторы в форме вируса. В некоторых воплощениях векторы вирусной доставки содержат онколитические вирусы. В данной заявке предлагаются композиции, содержащие онколитический вирус, причем онколитический вирус включает гибридную конструкцию TNFSF-L, описанную в настоящей заявке. Онколитические вирусы, используемые в данной заявке, убивают злокачественные опухолевые или опухолевые клетки посредством таких механизмов, как прямой лизис указанных клеток, путем стимуляции иммунного ответа на указанные клетки, апоптоза, экспрессии токсичных белков, аутофагии и прекращения синтеза белков, индукции противоопухолевого иммунитета или любых их комбинаций. Типичные онколитические вирусы для включения в композицию, описанную в настоящей заявке, включают, без ограничения указанным, вирус оспы, вирус болезни Ньюкасла (NDV), реовирус (RV), вирус миксомы (MYXV), вирус кори (MV), вирус простого герпеса (HSV), вирус осповакцины (VV), вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус полиомиелита (PV), вирус Сендай, флавивиролы, лентивирусы, ретровирусы, аденоассоциированные вирусы и аденовирусы. В некоторых воплощениях онколитический вирус может представлять собой поксвирус. В некоторых воплощениях поксвирус включает Betaentomopoxvirus, Yatapoxvirus, Cervidpoxvirus, Gammaentomopoxvirus, Leporipoxvirus, Suipoxvirus, Molluscipoxvirus, Crocodylidpoxvirus, Alphaentomopoxvirus, Capripoxvirus, Avipoxvirus, Parapoxvirus, вирус оспы канареек или вирус оспы кур. Эти онколитические вирусы обладают склонностью специфически поражать клетки злокачественной опухоли и при репликации вируса вызывают значительную гибель клеток и регрессию опухоли.

В некоторых воплощениях онколитический вирус может представлять собой модифицированный онколитический вирус, который может иметь одну или несколько модификаций, которые могут привести к более сильному терапевтическому эффекту против опухолевых клеток по сравнению с идентичным в остальном вирусом, который не

включает модификаций. Некоторые неограничивающие примеры более сильного терапевтического эффекта могут включать каждое или любые комбинации: усиленного иммунного уклонения от вируса, усиленной системной доставки вируса, нацеленной на опухоль, усиленного внутриопухолевого и межопухолевого распространения вируса и усиленной опухолеспецифической репликации вируса или высвобождение иммуномодуляторов и противоопухолевых агентов во внеклеточный матрикс. Модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию в некоторых случаях можно использовать в качестве вектора-платформы для системной доставки.

В некоторых воплощениях настоящего раскрытия предложен модифицированный онколитический вирус, содержащий модификацию, которая может усиливать системную доставку вируса, нацеленную на опухоль. Обычно онколитические вирусы можно либо (a) вводить системно, либо (b) инокулировать местно над опухолью или, во многих случаях, вводить непосредственно в опухоль («внутриопухолевая доставка»). Считается, что системная доставка онколитического вируса может дать возможность одновременно лечить как первичную опухоль, так и любые явные или недиагностированные метастатические отложения. В результате этот метод доставки может быть очень привлекательным вариантом для лечения пациентов с запущенным/метастатическим заболеванием или пациентов с недоступным заболеванием, например, с раком поджелудочной железы или раком головного мозга, где доступ затруднен, например, из-за физиологических барьеров, например, гематоэнцефалического барьера. Однако для успешной системной доставки многих онколитических вирусов могут существовать препятствия. Например, в некоторых случаях, как описано выше, защита хозяина ограничивает способность большинства онколитических вирусов инфицировать опухоли после системного введения. Клетки крови, комплемент, антитела и противовирусные цитокины, а также неспецифическое поглощение другими тканями, такими как легкие, печень и селезенка, тканерезидентные макрофаги, а также плохой выход вируса из сосудистого компартмента являются одними из основных препятствий для системной доставки онколитических вирусов. В некоторых воплощениях настоящего раскрытия представленные онколитические вирусы могут содержать модификацию, которая может способствовать постоянному существованию вируса в системе кровообращения, по меньшей мере, за счет, как указано выше, усиления уклонения от иммунитета. С другой стороны, при определенных обстоятельствах может быть желательной усиленная доставка вируса, нацеленная на опухоль, поскольку она может не только повысить терапевтическую эффективность против онкологического заболевания, но также может облегчить проблемы безопасности, связанные с вирусопосредованной онкотерапией,

поскольку неопухолевая инфекция может быть ограничено, избегая нежелательных побочных эффектов вирусной инфекции. Некоторые воплощения в настоящей заявке относятся к онколитическому вирусу, содержащему модификацию, которая может способствовать доставке вируса к опухоли.

В некоторых воплощениях настоящего раскрытия предлагается модифицированный онколитический вирус, содержащий модификацию, которая может усиливать внутриопухолевое и межопухолевое распространение вируса. Усиленное распространение онколитического вируса внутри и между опухолями может повысить терапевтическую эффективность за счет увеличения количества клеток злокачественной опухоли, инфицированных вирусом. В некоторых воплощениях настоящей заявки предлагается модифицированный онколитический вирус, который может содержать экзогенную нуклеиновую кислоту. В некоторых воплощениях настоящей заявки предлагается модифицированный онколитический вирус, который может содержать модификацию генома вируса. В некоторых воплощениях настоящей заявки предлагается модифицированный онколитический вирус, который может содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, а также модификацию генома вируса.

В некоторых воплощениях онколитические вирусы могут включать, без ограничения указанным, (i) вирусы, которые естественным образом реплицируются преимущественно в клетках злокачественной опухоли и являются непатогенными для человека, часто из-за повышенной чувствительности к врожденной противовирусной передаче сигналов или зависимости от онкогенных сигнальных путей; и (ii) вирусы, которые подвергаются генетическим манипуляциям для применения. В некоторых воплощениях онколитический вирус может представлять собой вирус кори, полиовирус, поксвирус, вирус осповакцины, аденовирус, аденоассоциированный вирус, вирус простого герпеса, вирус везикулярного стоматита, реовирус, вирус болезни Ньюкасла, сенекавирус, ретровирус, менговирус или вирус миксомы. В некоторых воплощениях онколитический вирус может представлять собой вирус оспы. В некоторых воплощениях вирус оспы может представлять собой вирус осповакцины. В некоторых случаях модифицированный вирус оспы может представлять собой ослабленный вирус оспы канареек. В некоторых случаях модифицированный вирус оспы может представлять собой вирус оспы кур.

В некоторых воплощениях используется модифицированный онколитический вирус. В общем, такой вирус включает модификацию своего компонента, такую как, без ограничения указанным, модификацию нативного генома («каркаса») вируса, такую как мутация или делеция вирусного гена, введение экзогенной нуклеиновой кислоты,

химическая модификация вирусной нуклеиновой кислоты или вирусного белка и введение экзогенного белка или модифицированного вирусного белка в вирусный капсид.

В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать LIGHT. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать IL15. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать IL15, и экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать CCL5. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать IL15, и экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать IL15-R α . В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать ITAC (CXCL11), и экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать фракталкин (CX3CL1). В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать ITAC (CXCL11), экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать фракталкин (CX3CL1), экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать IL15, и экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать IL15-R α .

В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена K7R и может дополнительно содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать цитокин, например, IL15. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена K7R и может дополнительно содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать цитокин, например, IL15, и экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать хемокин, например, CCL5. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена K7R и может дополнительно содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать цитокин, например, IL15, и экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать рецептор для цитокина, например, IL15R α . В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена K7R и может дополнительно содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать LIGHT. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена K7R и может дополнительно содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать ITAC (CXCL11). В

некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена K7R и содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать фракталкин (CX3CL1). В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена K7R и может дополнительно содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать ITAC (CXCL11), и экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать фракталкин (CX3CL1).

В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена A52R и может дополнительно содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать цитокин, например, IL15. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена A52R и может дополнительно содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать хемокин, например, IL15, и экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать хемокин, например, CCL5. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена A52R и может дополнительно содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать цитокин, например, IL15, и экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать рецептор для цитокин, например, IL15R α . В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена A52R и может дополнительно содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать LIGHT. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена A52R и может дополнительно содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать ITAC (CXCL11). В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена A52R и содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать фракталкин (CX3CL1). В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию гена A52R и может дополнительно содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать ITAC (CXCL11), и экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать фракталкин (CX3CL1).

В некоторых примерах совместная экспрессия цитокина (например, IL15) и его рецептора (например, IL15-R α) из модифицированного онколитического вируса может в некоторых случаях приводить к усилению иммуномодулирующих эффектов онколитического вируса, например, благодаря улучшенной способности комплекса, образованного IL15 и IL15-R α (комплекс IL15:IL15-R), активировать естественные

клетки-киллеры и стимулировать Т-клеточный ответ. Безотносительно какой-либо конкретной теории, предполагается, что IL15 в комплексе IL15:IL15-R α может быть представлен IL15-R $\beta\gamma$ (бета-гамма комплекс IL15-рецептора), представленном на поверхности Т-клеток и клеток-естественных киллеров (NK), тем самым оказывая мощное иммуномодулирующее действие на NK-клетки и Т-клетки.

В некоторых воплощениях предлагаются модифицированные онколитические вирусы, в которых ген A52R может быть мутирован или удален, и, кроме того, модифицированные онколитические вирусы могут содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать секретируемую гиалуронидазу, такую как HysA. В некоторых воплощениях предлагаются модифицированные онколитические вирусы, в которых ген A52R может быть мутирован или удален, и, кроме того, модифицированные онколитические вирусы могут содержать экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать хемокиновый рецептор, такой как CXCR4.

В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус может содержать полную или частичную делецию гена вирусной тимидинкиназы (ТК). В некоторых воплощениях в геноме модифицированного онколитического вируса, раскрытого в настоящей заявке, одна или несколько экзогенных нуклеиновых кислот вставлены в локусы удаленного гена ТК.

В некоторых воплощениях в модифицированном онколитическом вирусе, таком как онколитический вирус осповакцины, вирусный ген ТК может быть заменен геном ТК из вируса простого герпеса (HSV-ТК). ТК HSV может служить заменой удаленному ТК и иметь многогранные преимущества. Например, (i) ТК HSV можно использовать в качестве дополнительного терапевтического фермента, конвертирующего пролекарство для превращения ганцикловира (GCV) в его цитотоксический метаболит в опухоли. В дополнение к дополнительному терапевтическому эффекту эта модификация может также служить геном «самоубийства», например, клетки, экспрессирующие осповакцину, можно эффективно уничтожать путем добавления GCV, тем самым отключая вирус в случае нежелательного явления или неконтролируемой репликации. Таким образом, в некоторых случаях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию может действовать как предохранительный выключатель). В дополнительных примерах можно использовать мутированную версию ТК из HSV для обеспечения ПЭТ-визуализации меченых субстратов со значительно повышенной чувствительностью. Таким образом, в некоторых случаях модифицированный онколитический вирус, содержащий ТК из HSV, который можно использовать при ПЭТ-визуализации, может действовать как репортер

репликации вируса *in vivo* для определения терапевтической активности вскоре после лечения.

В некоторых случаях модифицированный онколитический вирус может содержать полноразмерный ген вирусного каркаса или белок каркаса вируса, описанный выше, или их укороченные версии, или их функциональные домены, или их фрагменты, или их варианты. В различных примерах модифицированный онколитический вирус может содержать мутацию или делецию одного или нескольких генов вирусного каркаса или белков вирусного каркаса, как описано выше. Мутации генов вирусного каркаса и белков вирусного каркаса могут включать вставку, делецию, замену или модификации нуклеотидов в нуклеотидных последовательностях и аминокислот в белковых последовательностях. В некоторых примерах делеция может включать полную или частичную делецию гена или белка вирусного каркаса.

Вирусы осповакцины

В некоторых воплощениях онколитический вирус представляет собой вирус осповакцины. Типичные вирусы осповакцины включают, без ограничения, дикий тип или аттенуированный штамм вируса осповакцины, модифицированный включением гибридной конструкции, описанной в настоящей заявке, такой как вирус осповакцины Western Reserve (ATCC VR-1354), штамм Copenhagen, вирус осповакцины Ankara (ATCC VR-1508), вирус осповакцины Ankara (ATCC VR-1566), рекомбинантный вирус осповакцины Ankara (MVA), штамм NYVAC, штамм вируса осповакцины Wyeth (ATCC VR-1536), вирус осповакцины Wyeth (ATCC VR-325), штамм Wyeth (NYCBOH), штамм Tian Tan, штамм Lister, штамм USSR и штамм Evans. Базовый штамм вируса осповакцины, модифицированный, как изложено в настоящей заявке, сам может содержать одну или несколько мутаций относительно его исходного штамма, например, без ограничения указанным, одно или несколько из следующих: делецию в ТК (также называемую в данной заявке «ТК-») и делецию в A52R (также называемую в данной заявке «A52R-»). Вирусы осповакцины могут быть рекомбинантными или отобранными так, чтобы иметь низкую токсичность и накапливаться в ткани-мишени. В некоторых воплощениях модификации вирусного каркаса/вирусного генома представляют собой модификации, которые делают вирус осповакцины нереплицирующимся или обладающим плохой репликативной способностью. Неограничивающие примеры таких модификаций могут включать мутации в следующих вирусных генах: A1, A2, VH1, A33 и I7. В некоторых воплощениях мутация вирусного каркаса выбрана из группы, состоящей из: полной или частичной делеции гена A52R; полной или частичной делеции гена ТК; полной или частичной делеции гена B15R; полной или частичной делеции гена K7R;

полной или частичной делеции гена B14R; полной или частичной делеции гена N1L; полной или частичной делеции гена K1L; полной или частичной делеции гена M2L; полной или частичной делеции гена A49R; полной или частичной делеции гена VH1; полной или частичной делеции гена A33; полной или частичной делеции A1; полной или частичной делеции гена A2; полной или частичной делеции гена I7 и полной или частичной делеции гена A46R. В настоящей заявке ссылка на вирусный ген может быть сделана ссылкой на белок, кодируемый этим геном (например, ген A33 может означать ген, который кодирует белок A33). В некоторых воплощениях мутация вирусного каркаса, включая любые комбинации замены, вставки и делеции, может привести к образованию последовательности с содержанием менее 100%, 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90% или менее гомологии последовательности с последовательностью вирусного гена дикого типа или вирусным белком, кодируемым этим геном. Вирусный ген и белок, кодируемый им, в некоторых воплощениях выбраны из группы, состоящей из: B15R, K7R, B14R, N1L, K1L, M2L, A49R, VH1, A33, A1, A2, I7 и A46R. В некоторых воплощениях вирусный остов может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или более мутаций в аминокислотной последовательности вирусного белка (например, вирусного антигена). Вирусный антиген в некоторых примерах выбран из группы, состоящей из: B15R, K7R, B14R, N1L, K1L, M2L, A49R, VH1, A33, A1, A2, I7 и A46R. В некоторых воплощениях раскрытия предлагаются рекомбинантные вирусы осповакцины, содержащие еще одну мутацию в геноме вируса (остовный кости вируса), так что мутация увеличивает T-клеточное плечо иммунного ответа. Мутация может представлять собой добавление, делецию или замену одной или нескольких нуклеиновых кислот в вирусном геноме (дикий тип или аттенуированные нативные штаммы вируса осповакцины). В неограничивающих примерах мутация может представлять собой полную или частичную делецию генов, которые, как известно, ингибируют цитокины, участвующие в иммунном ответе Th1. В качестве неограничивающих примеров мутация может представлять собой делецию нуклеиновой кислоты, кодирующей B8R (белки, связывающие интерферон гамма (IFN-g); C12L (белки, связывающие интерлейкин-18 (IL-18)). В следующем неограничивающем примере мутация может представлять собой полную или частичную делецию генов передачи сигналов врожденного иммунитета. В качестве неограничивающих примеров мутация может представлять собой делецию нуклеиновой кислоты, кодирующей (B18R (белки, связывающие интерферон (IFN) типа I); A52R (белки-ингибиторы ядерного фактора κB (NF-κB)); E3L (ингибиторы протеинкиназы (PKR)); C4, C16 (ингибиторы пути STING). В дополнительном неограничивающем примере мутация может представлять собой полную или частичную делецию генов,

кодирующих белки для ингибирования других компонентов иммунного ответа. В качестве неограничивающих примеров мутация может представлять собой полную или частичную делецию нуклеиновой кислоты, кодирующей B15, K7, B14, N1, K1, M2, A49, VH1, A46 или их комбинацию. Мутация вирусного каркаса может также включать замену генов вирулентности коровьей оспы генами других поксвирусов, по существу эквивалентными по функциям. Вирусы коровьей оспы, представленные в настоящей заявке, содержат дополнительные вставки, мутации, делеции или замены в вирусном геноме. Вирус осповакцины может содержать одну или несколько дополнительных вставок или частичных вставок экзогенных нуклеиновых кислот, которые кодируют один или несколько из рецептора хемокинов, белка TRIF или его функционального домена, или одного или нескольких из числа лептина, интерлейкина-2 (IL2), интерлейкина-15/интерлейкина-15Ra (IL15/IL15Ra), интерлейкина-7 (IL-7), гибридного белка лептина-интерлейкина (например, гибридного белка лептина-IL2, показанного в примере 1 как L2). Модификации, такие как вставка хемокинового рецептора, представляют собой вставку дикого типа и/или мутантного типа CXCR4, CCR2, CCL2. Вирус осповакцины может дополнительно содержать одну или несколько дополнительных делеций или частичных делеций одного или нескольких генов из A52R, B15R, K7R, A46R, N1L, E3L, K1L, M2L, C16, N2R, B8R, B18R, VH1 и функционального домена или его фрагмент или вариант, или любые их комбинации. В некоторых случаях вирус осповакцины, представленный в настоящей заявке, может содержать полную или частичную делецию гена A52R и вставку хемокинового рецептора, такого как CCR2. В некоторых случаях вирус осповакцины, представленный в настоящей заявке, может включать полную или частичную делецию по меньшей мере одного из вирусных генов A52R или ТК и вставку экзогенной нуклеиновой кислоты, кодирующей гибридный белок (например, белок-модулятор метаболизма, объединенный с цитокином, такой как гибридный белок лептин-IL2).

Дополнительные векторы

Векторы для доставки конструкций нуклеиновой кислоты, описанные в настоящей заявке, могут включать физические, химические или биологические средства трансфекции. В некоторых воплощениях векторы обеспечивают доставку белка, описанного в настоящей заявке. В некоторых воплощениях вектор представляет собой носитель липидных наночастиц.

В некоторых воплощениях физическая трансфекция включает электропорацию, термический перенос генов, биолистическую микроинъекцию (или генную пушку), лазерную трансфекцию, перенос генов с помощью ультразвука, гидродинамический перенос генов, магнитофекцию или механический массаж, или любую их комбинацию. В

некоторых воплощениях трансфекция с помощью лазера включает оптоинъекцию, стрессовые волны под воздействием лазера, фотохимическую интернализацию или селективное направленное воздействие на клетки с помощью светопоглощающих частиц. В некоторых воплощениях микроинъекция включает одну иглу или массив.

В некоторых воплощениях химическая трансфекция включает трансфекцию, опосредованную фосфатом кальция; трансфекцию, опосредованную диэтиламиноэтил (DEAE) декстраном; катионную липид-опосредованную трансфекцию; липосомы; полимеры; другие наночастицы, такие как золото, кремнезем, углеродные нанотрубки, водорастворимые фуллерены, кремниевые нанопроволоки или квантовые точки; или любую их комбинацию.

В некоторых воплощениях трансфекцию опосредуют катионные, ионизируемые или другие типы липидов. В некоторых воплощениях описанные в данной заявке липиды включают тетракис(8-метилнонил)3,3',3'',3'''-(((метилазандиил)бис(пропан-3,1-диил))бис(азантриил))тетрапропионат (306O10); децил(2-(диоктиламмонио)этил)фосфат (9A1P9); этил-5,5-ди((Z)-гептадек-8-ен-1-ил)-1-(3-(пирролидин-1-ил)пропил)-2,5-дигидро-1H-имидазол-2-карбоксилат (A2-Iso5-2DC18); ((4-гидроксипропил)азандиил)бис(гексан-6,1-диил)бис(2-гексилдеканат) (ALC-0315); 2-[(полиэтиленгликоль)-2000]-N,N-дитетрадецилацетамид (ALC-0159); (3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-17-((2R, 5R)-5-этил-6-метилгептан-2-ил)-10,13-диметил-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-тетрадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ол (β -ситостерин); бис(2-(додecilдисульфанил)этил)3,3'-((3-метил-9-оксо-10-окса-13,14-дитиа-3,6-диазагексакозил)азандиил)дипропионат (BAME-O16B); 2-((((3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-10,13-диметил-17-((R)-6-метилгептан-2-ил)-2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-тетрадекагидро-1H-циклопента[а]фенантрен-3-ил)окси)карбонил)амино)-N, N-бис(2-гидроксиэтил)-N-метилэтан-1-аминий бромид (VHEM-холестерин); 1, 1'-((2-(4-(2-((2-бис(2-гидроксидодecil)амино)этил)(2-гидроксидодecil)амино)этил)пиперазин-1-ил)этил)азандиил)бис (додекан-2-ол) (C12-200); 3,6-бис(4-(бис(2-гидроксидодecil)амино)бутил)пиперазин-2,5-дион (сКК-E12); 3 β -[N-(N',N'-диметиламиноэтан)-карбамоил]холестерин (DC-холестерин); (6Z, 9Z, 28Z, 31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил-4-(диметиламино)бутаноат (DLin-MC3-DMA); 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин (DOPE); трифторацетат 2,3-диолеилокси-N-[2-(сперминкарбоксамидо)этил]-N,N-диметил-1-пропанаминия (DOSPA); 1,2-диолеоил-3-триметиламмонийпропан (DOTAP); 1,2-ди-О-октадеценил-3-триметиламмонийпропан (DOTMA); 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин; ePC, этилфосфатидилхолин (DSPC); гекса(октан-3-ил) 9, 9', 9'', 9''', 9''''- (((бензол-1,3,5-трикарбонил)ирис(азандиил)) трис

(пропан-3,1-диил) трис(азантриил)гексонаноат (FTT5); гептадекан-9-ил 8-((2-гидроксиэтил)(6-оксо-6-(ундецилокси)гексил)амино)октаноат (Липид Н (SM-102)); (((3,6-диоксопиперазин-2,5-диил)бис(бутан-4,1-диил))бис(азантриил) тетракис(этан-2,1-диил) (9Z, 9'Z, 9'' Z,9'''Z,12Z,12'''Z,12''Z,12''''Z)-тетракис(октадека-9,12-диеноат) (OF-Deg-Lin); 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метоксиполиэтиленгликоль-2000 (PEG2000-DMG); N1,N3,N5-трис(3-(дидодециламино)пропил)бензол-1,3,5-трикарбоксамид (TT3), диоктадециламидолиз-спермин или любую их комбинацию.

В некоторых воплощениях липосомы, описанные в настоящей заявке, являются заряженными или нейтральными. В некоторых воплощениях липосомы представляют собой однослойные или многослойные везикулы. В некоторых воплощениях липосомы представляют собой инвертированные липосомы.

В некоторых воплощениях полимеры, описанные в настоящей заявке, содержат катионные пептиды и их производные, такие как полиорнитин или полилизин. В некоторых воплощениях катионные полимеры включают линейные или разветвленные синтетические полимеры, включая полиэтиленмин или полибрен. В некоторых воплощениях катионные полимеры содержат соединения для доставки на основе полисахаридов, включая хитозан или циклодекстрин. В некоторых воплощениях катионные полимеры включают природные полимеры, включая коллаген или гистон.

В некоторых воплощениях углеродные нанотрубки (CNT), описанные в настоящей заявке, включают одностенные углеродные нанотрубки (SWNT), многостенные углеродные нанотрубки (MWNT) или т.п. В некоторых воплощениях описанные в данной заявке CNT содержат концентрические листы, свернутые в виде цилиндров.

В некоторых воплощениях описанные в данной заявке квантовые точки содержат наночастицы, изготовленные из полупроводникового материала, такого как кадмий, селенид, кремний, арсенид индия, сульфид кадмия или любой их комбинации.

В некоторых воплощениях биологическая трансфекция включает бактериофаг, вирусоподобные частицы (VLP), тени эритроцитов, бактофекцию, экзосомы или любую их комбинацию.

Нуклеиновые кислоты

В данной заявке представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные в данной заявке гибридные конструкции. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты кодируют гибридные белки. В некоторых воплощениях гибридные белки содержат полноразмерные белки, укороченные версии полноразмерных белков, функциональные домены полноразмерных белков, фрагменты полноразмерных белков, варианты полноразмерных белков или любую их комбинацию. Варианты полноразмерного белка

могут содержать, в некоторых примерах, аминокислотные замены (консервативные или неконсервативные), делеции, добавления, модификации или любые их комбинации. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует хемокиновый рецептор. В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует тримеризованный гибридный белок, содержащий лиганд представителя суперсемейства некроза опухолей (TNFSF-L). В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует лиганд лимфотоксина альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, лиганд CD137, лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с TNF (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А, его фрагмент или любые их комбинации.

В данной заявке представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие гибридные конструкции, содержащие TNFSF-L и домен олигомеризации. Типичные TNFSF-L для включения включают функциональные домены из лимфотоксина альфа, лиганда OX40, лиганда CD40, лиганда Fas, лиганда CD27, лиганда CD30, лиганда CD137, TNF-связанного лиганда, индуцирующего апоптоз (TRAIL), лиганда рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL), слабого индуктора апоптоза, связанного с TNF, лиганда, индуцирующего пролиферацию (APRIL), фактора активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитора роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганда 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазина А или любой их комбинации. Типичные домены олигомеризации включают, без ограничения указанным, область коллектина из белка поверхностно-активного вещества А (SP-A), белка поверхностно-активного вещества D (SP-D), маннозосвязывающего лектина (MBL), конглутинина, CL-43, CL-L1, CL-K1, CL-P1 или CL-46. Последовательности типичных гибридных конструкций, включающих такую комбинацию признаков, представлены в таблице 4 (аминокислотные) и таблице 5 (нуклеотидные).

Таблица 4

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
14	3sCD40L (мышь)	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTMP SACTLVMCSSVE SGLPGRDGS DVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKVEGSGH RRLDKVEEEVNLHEDFVFIKCLKRCNKGEGLSLLNCEEMRRQF EDLVKDITLNKEEKENSFEMQRGDEDPQIAAHVVSEANSNAAS VLQWAKKGYT M KSNLVMLENGKQLTVKREGLYVYVTQVTFC SNREPSSQRPFIVGLWLKPSSG SERILLKAANTHSSSQLCEQQSVH LGGVFELQAGASVFNVT EASQVIHRVGFSSFGLLKL*
15	3sOX40L (мышь)	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTMP SACTLVMCSSVE SGLPGRDGS DVASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKVESSSP

		AKDPPIQRLRGAVTRCEDGQLFISSYKNEYQTMEVQNNSVVIKCD GLYIIYLKGSFFQEVKIDLHFREDHNPISIPMLNDGRRIVFTVVASL AFKDKVYLTVNAPDTLCEHLQINDGELIVVQLTPGYCAPEGSYHS TVNQVPL
16	3s41BBL (мышь)	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTMPSACTLVMCSSVE SGLPGRDGSVDASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKESSHIG CPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLCNTTLNWHSDGAGSSYLSQG LRYEEDKKELVVDSPGLYYVFLELKLSPTFTNTGHKVQGWVSLV LQAKPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLKAGH RLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTSFGFLVKPDNPWE*
17	3sGITRL (мышь)	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTMPSACTLVMCSSVE SGLPGRDGSVDASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKEVSGT SLKPTAIESCMVKFELSSSKWHMTSPKPHCVNTTSDGKLIKLSG TYLIYGQVIPVDKKYIKDNAPFVVQIYKKNVDVLQTLMNDFQILPI GGVYELHAGDNIYLFNSKDHIQKTNTYWGIIIMPDLPFIS
18	3sOX40L (человек)	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTMPSACTLVMCSSVE SGLPGRDGSVDASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKEVSGRI QSIKVFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNSVIINCDGFYLISL KGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKV YLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
19	3s41BBL (человек)	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTMPSACTLVMCSSVE SGLPGRDGSVDASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKEVSGGQ GMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE*
20	3sGITRL (человек)	MLLFLLSALVLLTQPLGYLEAEMKTYSHRTMPSACTLVMCSSVE SGLPGRDGSVDASLRQQVEALQGQVQHLQAAFSQYKKEVSGT AKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGLYLI YGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNVGGTY ELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIIILLANPQFIS

Таблица 5

SEQ ID NO:	Описание	Нуклеотидная последовательность
21	3sCD40L (мышь)	ATGCTGCTCTTCCTCCTCTCTGCACTGGTCCTGCTCACACAGCC CCTGGGCTACCTGGAAGCAGAAATGAAGACCTACTCCCACAG ACAATGCCAGTGCTTGCACCTGGTCATGTGTAGCTCAGTG GAGAGTGGCCTGCCTGGTCGCGATGGATCTGATGTTGCTTCTC TGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCACC TCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTGAGGGGATCCGG TCACAGGCGTCTGGACAAGGTCTGAAGAGGAAGTAAACCTTCA TGAAGATTTTGTATTCATAAAAAAGCTAAAGAGATGCAACAA AGGAGAAGGATCTTTATCCTTGCTGAACTGTGAGGAGATGAG AAGGCAATTTGAAGACCTTGTCAAGGATATAACGTAAACAA AGAAGAGAAAAAAGAAAACAGCTTTGAAATGCAAAGAGGTG ATGAGGATCCTCAAATTGCAGCACACGTTGTAAGCGAAGCCA ACAGTAATGCAGCATCCGTTCTACAGTGGGCCAAGAAAGGAT ATTATACCATGAAAAGCAACTTGGTAATGCTTGA AAAATGGGA AACAGCTGACGGTTAAAAGAGAAGGACTCTATTATGTCTACA CTCAAGTCACCTTCTGCTCTAATCGGGAGCCTTCGAGTCAACG CCCATTTCATCGTCGGCCTCTGGCTGAAGCCCAGCAGTGGATCT GAGAGAATCTTACTCAAGGCGGCAAATACCCACAGTTCCTCCC AGCTTTGCGAGCAGCAGTCTGTTCCTTGGGCGGAGTGTTTGA ATTACAAGCTGGTGCTTCTGTGTTTGTCAACGTGACTGAAGCA AGCCAAGTGATCCACAGAGTTGGCTTCTCATCTTTTGGCTTAC TCAAACCTCTGA

22	3sOX40L (мышь)	<p>ATGCTGCTCTTCCTCCTCTCTGCACTGGTCCTGCTCACACAGCC CCTGGGCTACCTGGAAGCAGAAATGAAGACCTACTCCCACAG ACAATGCCCAGTGCTTGCACCCTGGTCATGTGTAGCTCAGTG GAGAGcGGCCTGCCTGGTCGCGATGGATCTGATGTTGCTTCTC TGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCACC TCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTAGAATCATCTTC CTCTCCGGCAAAGGACCTCCAATCCAAAGACTCAGAGGAGC AGTTACCAGATGTGAGGATGGGCAACTATTCATCAGCTCATA AGAATGAGTATCAAACATATGGAGGTGCAGAACAATTCGGTT GTCATCAAGTGCATGGGCTTTATATCATCTACCTGAAGGGCT CCTTTTTCCAGGAGGTCAAGATTGACCTTCATTTCCGGGAGGA TCATAATCCCATCTCTATTCCAATGCTGAACGATGGTCGAAGG ATTGTCTTCACTGTGGTGGCCTCTTTGGCTTTCAAAGATAAAGT TTACCTGACTGTAATGCTCCTGATACTCTCTGCGAACACCTC CAGATAAATGATGGGGAGCTGATTGTTGTCCAGCTAACGCCTG GATACTGTGCTCCTGAAGGATCTTACCACAGCACTGTGAACCA AGTACCCTGTGA</p>
23	3s41BBL (мышь)	<p>ATGCTGCTCTTCCTCCTCTCTGCACTGGTCCTGCTCACACAGCC CCTGGGCTACCTGGAAGCAGAAATGAAGACCTACTCCCACAG ACAATGCCCAGTGCTTGCACCCTGGTCATGTGTAGCTCAGTG GAGAGTGGCCTGCCTGGTCGCGATGGATCTGATGTTGCTTCTC TGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCACC TCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTAGAATCATCCCA CATTGGCTGCCCAACACTACACAACAGGGCTCTCCTGTGTTT GCCAAGCTACTGGCTAAAAACCAAGCATCGTTGTGCAATACA ACTCTGAACTGGCACAGCCAAGATGGAGCTGGGtctTCATACT ATCTCAAGGTCTGAGGTACGAAGAAGACAAAAAGGAGTTGGT GGTAGACAGTCCCGGGCTCTACTACGTATTTTTGGAAGTGAAG CTCAGTCCAACATTCACAAACACAGGCCACAAGGTGCAGGGC TGGGTCTCTCTTGTTTTTGCAAGCAAAGCCTCAGGTAGATGACT TTGACAACCTTGGCCCTGACAGTGGAAGTGTCCCTTGCTCCAT GGAGAACAAGTTAGTGGACCGTTCTGGAGTCAACTGTTGCTC CTGAAGGCTGGCCACCGCCTCAGTGTGGGTCTGAGGGCTTATC TGCATGGAGCCCAGGATGCATACAGAGACTGGGAGCTGTCTT ATCCCAACACCACCAGCTTTGGACTCTTTCTTGTGAAACCCGA CAACCCATGGGAATGA</p>
24	3xGITRL (мышь)	<p>ATGCTGCTCTTCCTCCTCTCTGCACTGGTCCTGCTCACACAGCC CCTGGGCTACCTGGAAGCAGAAATGAAGACCTACTCCCACAG ACAATGCCCAGTGCTTGCACCCTGGTCATGTGTAGCTCAGTG GAGAGTGGCCTGCCTGGTCGCGATGGATCTGATGTTGCTTCTC TGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCACC TCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTGGAGGGATCCGG TACTTCACTCAAGCCAACTGCCATCGAGTCTGATGGTTAAG TTTGAACATATCATCTCAAATGGCACATGACATCTCCCAAAC CTCACTGTGTGAATACGACATCTGATGGGAAGCTGAAGATACT GCAGAGTGGCACATATTTAATCTACGGCCAAGTGATTCCTGTG GATAAGAAATACATAAAAGACAATGCCCCCTTCGTAGTACAG ATATATAAAAAGAATGATGTCCTACAAACTCTAATGAATGATT TTCAAATCTTGCCTATAGGAGGGTTTATGAACTGCATGCTGG AGATAACATATATCTGAAGTTCAACTCTAAAGACCATATTCAG AAAACATAACATACTGGGGGATCATCTTAATGCCTGATCTAC CATTCATCTCTTAG</p>
25	3sOX40L (человек)	<p>ATGCTGCTCTTCCTCCTCTCTGCACTGGTCCTGCTCACACAGCC CCTGGGCTACCTGGAAGCAGAAATGAAGACCTACTCCCACAG ACAATGCCCAGTGCTTGCACCCTGGTCATGTGTAGCTCAGTG GAGAGTGGCCTGCCTGGTCGCGATGGATCTGATGTTGCTTCTC TGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCACC</p>

		TCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTGGAGGGATCCGG TCGAATTCAAAGTATCAAAGTACAATTTACCGAATATAAGAA GGAGAAAGGTTTCATCCTCACTTCCCAAAGGAGGATGAAAT CATGAAGGTGCAGAACAACCTCAGTCATCATCAACTGTGATGG GTTTTATCTCATCTCCCTGAAGGGCTACTTCTCCCAGGAAGTC AACATTAGCCTTCATTACCAGAAGGATGAGGAGCCCTCTTCC AACTGAAGAAGGTCAGGTCTGTCAACTCCTTGATGGTGGCCTC TCTGACTTACAAAGACAAAGTCTACTTGAATGTGACCACTGAC AATACCTCCCTGGATGACTTCCATGTGAATGGCGGAGAAGTGA TTCTTATCCATCAAATCCTGGTGAATTCTGTGTCCTTTGA
26	3s41BBL (человек)	ATGCTGCTCTTCCCTCCTCTCTGCACTGGTCCTGCTCACACAGCC CCTGGGCTACCTGGAAGCAGAAATGAAGACCTACTCCCACAG ACAATGCCAGTGCTTGCACCCTGGTCATGTGTAGCTCAGTG GAGAGTGGCCTGCCTGGTCGCGATGGATCTGATGTTGCTTCTC TGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCACC TCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTGTGTTCTGCTGA TCGATGGGCCCTGAGCTGGTACAGTGACCCAGGCCTGGCAG GCGTGTCCCTGACGGGGGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACGA AGGAGCTGGTGGTGGCCAAGGCTGGAGTCTACTATGTCTTCTT TCAACTAGAGCTGCGGCGCGTGGTGGCCGGCGAGGGCTCAGG CTCCGTTTCACTTGCCTGCACCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTG CTGGGGCCGCCCTGGCTTTGACCGTGGACCTGCCACCCGC CTCCTCCGAGGCTCGGAACTCGGCCTTCGGTTTCCAGGGCCGC TTGCTGCACCTGAGTGCCGGCCAGCGCCTGGGCGTCCATCTTC ACACTGAGGCCAGGGCACGCCATGCCTGGCAGCTTACCCAGG GCGCCACAGTCTTGGGACTCTTCCGGGTGACCCCGAAATCCC AGCCGGACTCCCTTACCCGAGGTCGGAATAA
27	3sGITRL (человек)	ATGCTGCTCTTCCCTCCTCTCTGCACTGGTCCTGCTCACACAGCC CCTGGGCTACCTGGAAGCAGAAATGAAGACCTACTCCCACAG ACAATGCCAGTGCTTGCACCCTGGTCATGTGTAGCTCAGTG GAGAGTGGCCTGCCTGGTCGCGATGGATCTGATGTTGCTTCTC TGAGGCAGCAGGTTGAGGCCTTACAGGGACAAGTACAGCACC TCCAGGCTGCTTTCTCTCAGTATAAGAAAGTGGAGGGATCCGG TACTGCTAAGGAGCCCTGTATGGCTAAGTTTGGACCATTACCC TCAAATGGCAAATGGCATCTTCTGAACCTCCTTGCCTGAATA AGGTGTCTGACTGGAAGCTGGAGATACTTCAGAATGGCTTATA TTAATTTATGGCCAAGTGGCTCCCAATGCAAACCTACAATGAT GTAGCTCCTTTTGGAGGTGCGGCTGTATAAAAACAAAGACATGA TACAACTCTAACAAACAAATCTAAAATCCAAATGTAGGAG GGACTTATGAATTGCATGTTGGGGACACCATAGACTTGATATT CAACTCTGAGCATCAGGTTCTAAAAATAATACATACTGGGGT ATCATTTTACTAGCAAATCCCAATTCATCTCCTAG

В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты, описанные в настоящей заявке, комбинируются с вектором. В некоторых воплощениях нуклеиновые кислоты включены в геном. В некоторых воплощениях геном представляет собой вирусный геном, бактериальный геном или геном клетки. В некоторых воплощениях клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых воплощениях клетка млекопитающего представляет собой иммунную клетку. В некоторых воплощениях клетка млекопитающего представляет собой опухолевую клетку.

В данной заявке предлагаются модифицированные онколитические вирусы, содержащие одну или несколько экзогенных нуклеиновых кислот, которые кодируют

гибридные белки, причем гибридные белки включают полноразмерные белки, укороченные версии полноразмерных белков, функциональные домены полноразмерных белков, фрагменты полноразмерных белков, вариантов полноразмерных белков или любую их комбинацию. Варианты полноразмерного белка могут содержать, в некоторых примерах, аминокислотные замены (консервативные или неконсервативные), делеции, добавления, модификации или любые их комбинации. В некоторых воплощениях в настоящей заявке предложен модифицированный онколитический вирус, содержащий экзогенную нуклеиновую кислоту, также называемую в данной заявке трансгеном, которая может кодировать хемокиновый рецептор. В некоторых случаях экзогенная нуклеиновая кислота может представлять собой терапевтический трансген. В некоторых воплощениях в настоящей заявке предлагается модифицированный онколитический вирус, содержащий экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать тримеризованный гибридный белок, содержащий лиганд представителя суперсемейства некроза опухолей (TNFSF-L).

В некоторых воплощениях нуклеиновая кислота кодирует лиганд лимфотоксина альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, лиганд CD137, лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с TNF (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А, их фрагмент или любые их комбинации. Каждая или любая комбинация этих белков может способствовать большей терапевтической эффективности каркасного онколитического вируса.

В некоторых воплощениях модификация онколитического вируса может привести к кратности увеличения эффективности системной доставки вируса, направленного на опухоль, по меньшей мере в около 1,1, 1,2, 1,5, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,5, 3,8, 4, 4,2, 4,5, 4,8, 5, 5,2, 5,5, 5,8, 6, 6,2, 6,5, 6,8, 7, 7,2, 7,5, 7,8, 8, 8,2, 8,5, 8,8, 9, 9,2, 9,5, 9,8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 500, 800, 1000, 2500, 5000, 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 , $7,5 \times 10^4$, 1×10^5 , $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 , $7,5 \times 10^5$, 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$, 5×10^6 , $7,5 \times 10^6$, 1×10^7 , $2,5 \times 10^7$, 5×10^7 , $7,5 \times 10^7$, 1×10^8 , $2,5 \times 10^8$, 5×10^8 , $7,5 \times 10^8$, 1×10^9 , $2,5 \times 10^9$, 5×10^9 , $7,5 \times 10^9$, 1×10^{10} раз или даже больше, по сравнению с идентичным в остальном онколитическим вирусом, который не включает модификации. В некоторых воплощениях эффективность системной доставки вируса, нацеленной на опухоль, можно измерить путем количественного определения вирусов, инфицирующих опухолевые клетки, и, необязательно, в отличие от вирусов, инфицирующих неопухолевые клетки

организма. В некоторых воплощениях количественное определение вируса можно проводить путем окрашивания вирусных частиц в срезах тканей или мазков крови в случаях лейкоза, лимфомы или миеломы. В некоторых воплощениях количественную оценку можно проводить с помощью репортерной(ых) молекулы(ул), которая(ые)/сконструирована(ы) для экспрессии вирусами, например, люциферазы и флуоресцентных белков. В некоторых случаях такую количественную оценку можно проводить путем количественного определения вирусного генома в опухоли. Не ограничиваясь этим, системную доставку вируса, нацеленную на опухоль, можно измерить путем количественной оценки определенных последующих эффектов вирусной инфекции в опухолевых клетках, например, цитокинов в ответ на вирусную инфекцию или накопление лимфоцитов. В некоторых воплощениях онколитический вирус включает экзогенную нуклеиновую кислоту, которая может кодировать олигомеризованный гибридный белок, предназначенный для внеклеточного высвобождения, содержащий область лиганда суперсемейства некроза опухолей (TNFSF-L), и присутствие экзогенной нуклеиновой кислоты может приводить к увеличению в около 5-10 раз эффективности системной доставки вируса к опухоли по сравнению с идентичным в других отношениях онколитическим вирусом, который не включает экзогенную нуклеиновую кислоту.

В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус включает экзогенную нуклеиновую кислоту, которая кодирует тримеризованный гибридный белок, предназначенный для внеклеточного высвобождения, содержащий область TNFSF-L и область олигомеризации, и экспрессия этого гибридного белка модифицированным онколитическим вирусом может привести к усилению иммунного ответа против инфицированной опухоли. Следовательно, иммуносупрессивное микроокружение в опухоли может быть изменено, что приводит к усилению иммунотерапевтической активности модифицированного онколитического вируса по сравнению с идентичным в остальном вирусом, который включает нуклеиновую кислоту, кодирующую вышеупомянутый гибридный белок. В некоторых воплощениях увеличение иммунотерапевтической активности может составлять по меньшей мере около 1,1, 1,1, 1,2, 1,5, 1,8, 2, 2,2, 2,5, 2,8, 3, 3,2, 3,5, 3,8, 4, 4,2, 4,5, 4,8, 5, 5,2, 5,5, 5,8, 6, 6,2, 6,5, 6,8, 7, 7,2, 7,5, 7,8, 8, 8,2, 8,5, 8,8, 9, 9,2, 9,5, 9,8, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 500, 800, 1000, 2500, 5000, 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 , $7,5 \times 10^4$, $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 , 1×10^6 или даже выше. Не ограничиваясь этим, повышенная иммунотерапевтическая активность может отражаться повышенным накоплением В-клеток в опухоли, усиленным ответом Т-клеток на иммуногены, связанные с опухолью, или тем и другим. Накопление В-клеток можно измерить, например, путем

количественного определения В-клеток в опухоли, а иммуноактивность Т-клеток можно измерить, например, по секреции интерферона- γ (интерферона-гамма) в анализах ELISPOT.

В данной заявке предлагаются онколитические вирусы, содержащие экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридные конструкции, содержащие TNFSF-L и домен олигомеризации. Типичные TNFSF-L для включения включают функциональные домены из лимфотоксина альфа, лиганда OX40, лиганда CD40, лиганда Fas, лиганда CD27, лиганда CD30, лиганда CD137, TNF-связанного лиганда, индуцирующего апоптоз (TRAIL), лиганда рецептора-активатора ядерного фактора каппа-В (RANKL), слабого индуктора апоптоза, связанного с TNF, лиганда, индуцирующего пролиферацию (APRIL), фактора активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитора роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганда 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазина А, любой их комбинации. Типичные домены олигомеризации включают, без ограничения указанным, область коллектина из белка поверхностно-активного вещества А (SP-A), белка поверхностно-активного вещества D (SP-D), маннозосвязывающего лектина (MBL), конглутинина, CL-43, CL-L1, CL-K1, CL-P1 или CL-46. Типичные гибридные конструкции, включающие такую комбинацию признаков, представлены в таблице 4 (аминокислотные) и таблице 5 (нуклеотидные).

Условия и введение

В данной заявке предлагаются гибридные конструкции для применения в системе экспрессии для лечения онкологического заболевания. В некоторых воплощениях гибридные конструкции экспрессируются внутри клетки злокачественной опухоли. В некоторых воплощениях онкологическое заболевание представляет собой гемобластоз (также известный как злокачественное новообразование кроветворной системы) или солидную злокачественную опухоль. В некоторых воплощениях онкологическое заболевание включает, без ограничения указанным, меланому, гепатоцеллюлярную карциному, рак молочной железы, рак легкого, рак брюшины, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак яичников, лейкоз, лимфому, карциному почки, рак поджелудочной железы, эпителиальную карциному, рак желудка, карциному ободочной кишки, рак двенадцатиперстной кишки, аденокарциному поджелудочной железы, мезотелиому, мультиформную глиобластому, астроцитому, множественную миелому, карциному предстательной железы, гепатоцеллюлярную карциному, холангиосаркому, аденокарциному поджелудочной железы, плоскоклеточную карциному головы и шеи, колоректальный рак, аденокарциному желудка кишечного типа, плоскоклеточную карциному шейки матки, остеосаркому, эпителиальную карциному яичников, острую

лимфобластную лимфому, миелопролиферативное новообразование или саркому. В некоторых воплощениях онкологическое заболевание представляет собой рак мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, головного мозга, молочной железы, ободочной кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десен, головы, почек, печени, легкого, носоглотки, шеи, яичников, предстательной железы, кожи, желудка, яичка, языка или матки.

В некоторых воплощениях гибридная конструкция экспрессируется в иммунной клетке. В некоторых воплощениях клетка представляет собой лимфоидную или миелоидную клетку. В некоторых воплощениях лимфоидная клетка представляет собой В-клетку, естественную клетку-киллер или Т-клетку. В некоторых воплощениях Т-клетка представляет собой эффекторную клетку. В некоторых воплощениях эффекторная клетка представляет собой цитотоксическую Т-клетку или CD8+ клетку. В некоторых воплощениях эффекторная клетка представляет собой хелперную клетку или CD4+ клетку. В некоторых воплощениях эффекторная клетка представляет собой регуляторную Т-клетку. В некоторых воплощениях Т-клетка представляет собой Т-клетку памяти. В некоторых воплощениях миелоидная клетка представляет собой нейтрофил, эозинофил или моноцит.

В данной заявке предлагаются гибридные конструкции для применения в системе экспрессии для уменьшения роста опухолевых клеток. В некоторых воплощениях опухоль представляет собой опухоль жидких тканей или солидную опухоль. В некоторых воплощениях опухоль включает меланому, гепатоцеллюлярную карциному, опухоль молочной железы, опухоль легкого, опухоль брюшины, опухоль предстательной железы, опухоль мочевого пузыря, опухоль яичника, лейкоз, лимфому, карциному почки, опухоль поджелудочной железы, эпителиальную карциному, опухоль желудка, карциному ободочной кишки, опухоль двенадцатиперстной кишки, аденокарциному поджелудочной железы, мезотелиому, мультиформную глиобластому, астроцитому, множественную миелому, карциному предстательной железы, гепатоцеллюлярную карциному, холангиосаркому, аденокарциному поджелудочной железы, плоскоклеточную карциному головы и шеи, колоректальную опухоль, аденокарциному желудка кишечного типа, плоскоклеточную карциному шейки матки, остеосаркому, эпителиальную карциному яичников, острую лимфобластную лимфому, миелопролиферативное новообразование или саркому. В некоторых воплощениях опухоль включает опухоль мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, головного мозга, молочной железы, ободочной кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десен, головы, почек, печени, легкого,

носоглотки, шеи, яичников, предстательной железы, кожи, желудка, яичка, языка или матки.

В некоторых воплощениях в настоящем раскрытии предлагаются способы лечения субъекта путем введения одного или нескольких модифицированных онколитических вирусов, как раскрыто в настоящей заявке. «Индивидуум» или «субъект»: при взаимозаменяемом использовании в настоящей заявке относится к человеку или субъекту, не являющемуся человеком. Неограничивающие примеры субъектов, отличных от человека, включают приматов, отличных от человека, собак, кошек, мышей, крыс, морских свинок, кроликов, свиней, домашних птиц, лошадей, коров, коз, овец, китообразных и т.д. В некоторых воплощениях объектом является человек.

В некоторых воплощениях в настоящей заявке предлагается способ оказания токсического эффекта на клетку злокачественной опухоли, включающий введение в клетку злокачественной опухоли терапевтически эффективного количества модифицированного вируса, такого как онколитический вирус осповакцины, как описано выше, или фармацевтической композиции, включающей то же самое. В настоящем раскрытии дополнительно предлагается способ ингибирования по меньшей мере одного из роста и пролиферации второй клетки злокачественной опухоли, включающий введение в первую клетку злокачественной опухоли модифицированного онколитического вируса, как описано выше, так что первая клетка злокачественной опухоли инфицирована указанным вирусом. Таким образом, в некоторых воплощениях раскрытых в данной заявке способов предполагается, что не каждая злокачественная опухолевая или опухолевая клетка инфицирована при введении терапевтически эффективного количества онколитического вируса осповакцины, как описано в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, содержащей то же самое, и рост неинфицированных клеток может быть ингибирован без прямого заражения.

В некоторых воплощениях, чтобы вызвать онколиз, убить клетки, ингибировать рост, ингибировать метастазы, уменьшить размер опухоли и иным образом обратить вспять или уменьшить злокачественный фенотип опухолевых клеток, используя способы и композиции настоящего раскрытия, клетка злокачественной опухоли или опухоль могут контактировать с терапевтически эффективной дозой типичного онколитического вируса осповакцины, как описано в настоящей заявке, или фармацевтической композиции, содержащей то же самое. В некоторых воплощениях эффективное количество модифицированного онколитического вируса настоящего раскрытия, такого как онколитический вирус осповакцины, как описано в настоящей заявке, или его фармацевтическая композиция, может включать количество, достаточное для индукции

онколиза, разрушения или лизиса клетки злокачественной опухоли или ингибирования или уменьшения роста или размера клетки злокачественной опухоли. Уменьшение роста клеток злокачественной опухоли может проявляться, например, посредством гибели клеток или более медленной скорости репликации, или снижения скорости роста опухоли, содержащей клетку, или длительного выживания субъекта, содержащего клетку злокачественной опухоли.

В некоторых воплощениях предлагается способ лечения субъекта, имеющего злокачественную опухоль или опухоль, включающий введение субъекту эффективного количества нуклеиновой кислоты, гибридного белка или модифицированного вируса, как описано выше. Эффективное количество в таком способе может включать количество, которое снижает скорость роста или распространения злокачественной опухоли или продлевает выживаемость субъекта. В настоящем раскрытии предлагается способ уменьшения роста опухоли, который может включать введение в опухоль эффективного количества нуклеиновой кислоты, гибридного белка или модифицированного онколитического вируса, как описано выше. В некоторых воплощениях эффективное количество нуклеиновой кислоты, гибридного белка или модифицированного вируса или их фармацевтической композиции может включать количество, достаточное для индукции замедления, ингибирования или уменьшения роста или размера опухоли, и может включать эрадикацию опухоли. Уменьшение роста опухоли может проявляться, например, в снижении скорости роста или увеличении продолжительности выживания субъекта, содержащего опухоль.

В некоторых воплощениях нуклеиновую кислоту, как описано в настоящей заявке, вводят субъекту в количестве от около 0,01 мкг/дозу до около 1 г/дозу или от около 0,5 мкг/дозу до около 500 мг/дозу. В некоторых воплощениях нуклеиновую кислоту вводят субъекту в дозе около 0,01 мкг/дозу, около 0,05 мкг/дозу, около 0,1 мкг/дозу, около 0,5 мкг/дозу, около 1 мкг/дозу, около 5 мкг/дозу, около 10 мкг/дозу, около 50 мкг/дозу, около 100 мкг/дозу, около 500 мкг/дозу, около 1 мг/дозу, около 5 мг/дозу, около 10 мг/дозу, около 50 мг/дозу, около 100 мг/дозу, около 500 мг/дозу, около 1 г/дозу.

В некоторых воплощениях клетки, описанные в настоящей заявке, вводят субъекту в количестве от около 0,01 мкг/дозу до около 1 г/дозу или от около 0,5 мкг/дозу до около 500 мг/дозу. В некоторых воплощениях клетки вводят субъекту в дозе около 0,01 мкг/дозу, около 0,05 мкг/дозу, около 0,1 мкг/дозу, около 0,5 мкг/дозу, около 1 мкг/дозу, около 5 мкг/дозу, около 10 мкг/дозу, около 50 мкг/дозу, около 100 мкг/дозу, около 500 мкг/дозу, около 1 мг/дозу, около 5 мг/дозу, около 10 мг/дозу, около 50 мг/дозу, около 100 мг/дозу, около 500 мг/дозу, около 1 г/дозу.

В некоторых воплощениях гибридный белок, описанный в настоящей заявке, вводят субъекту в количестве от около 0,01 мкг/дозу до около 1 г/дозу или от около 0,5 мкг/дозу до около 500 мг/дозу. В некоторых воплощениях гибридный белок вводят субъекту в дозе около 0,01 мкг/дозу, около 0,05 мкг/дозу, около 0,1 мкг/дозу, около 0,5 мкг/дозу, около 1 мкг/дозу, около 5 мкг/дозу, около 10 мкг/дозу, около 50 мкг/дозу, около 100 мкг/дозу, около 500 мкг/дозу, около 1 мг/дозу, около 5 мг/дозу, около 10 мг/дозу, около 50 мг/дозу, около 100 мг/дозу, около 500 мг/дозу, около 1 г/дозу.

В некоторых воплощениях количество модифицированного онколитического вируса по настоящему раскрытию, такого как онколитический вирус или вирус осповакцины, вводимого субъекту, составляет от около 10^3 до 10^{12} инфекционных вирусных частиц или бляшкообразующих единиц (БОЕ) или от около 10^5 до 10^{10} БОЕ, или от около 10^5 до 10^8 БОЕ, или от около 10^8 до 10^{10} БОЕ. В некоторых воплощениях количество модифицированного онколитического вируса по настоящему раскрытию, такого как онколитический вирус или вирус осповакцины, вводимого субъекту, составляет от около 10^3 до 10^{12} вирусных частиц или бляшкообразующих единиц (БОЕ) или от около 10^5 до 10^{10} БОЕ или от около 10^5 до 10^8 БОЕ, или от около 10^8 до 10^{10} БОЕ. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию, такой как онколитический вирус осповакцины, вводят в дозе, которая может составлять от около 10^3 БОЕ/дозу до около 10^4 БОЕ/дозу, от около 10^4 БОЕ/дозу до около 10^5 БОЕ/дозу, от около 10^5 БОЕ/дозу до около 10^6 БОЕ/дозу, от около 10^7 БОЕ/дозу до около 10^8 БОЕ/дозу, от около 10^{10} БОЕ/дозу до около 10^{10} БОЕ/дозу, от около 10^{10} БОЕ/дозу до около 10^{11} БОЕ/дозу, от около 10^{11} БОЕ/дозу до около 10^{12} БОЕ/дозу, от около 10^{12} БОЕ/дозу до около 10^{14} БОЕ/дозу, от около 10^{14} БОЕ/дозу до около 10^{14} БОЕ/дозу или от около 10^{14} БОЕ/дозу до около 10^{15} БОЕ/дозу. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию, такой как онколитический вирус осповакцины, можно вводить в дозе, которая может составлять около 2×10^3 БОЕ/дозу, 3×10^3 БОЕ/дозу, 4×10^3 БОЕ/дозу, 5×10^3 БОЕ/дозу, 6×10^3 БОЕ/дозу, 7×10^3 БОЕ/дозу, 8×10^3 БОЕ/дозу, 9×10^3 БОЕ/дозу, около 10^4 БОЕ/дозу, около 2×10^4 БОЕ/дозу, около 3×10^4 БОЕ/дозу, около 4×10^4 БОЕ/дозу, около 5×10^4 БОЕ/дозу, около 6×10^4 БОЕ/дозу, около 7×10^4 БОЕ/дозу, около 8×10^4 БОЕ/дозу, около 9×10^4 БОЕ/дозу, около 10^5 БОЕ/дозу, 2×10^5 БОЕ/дозу, 3×10^5 БОЕ/дозу, 4×10^5 БОЕ/дозу, 5×10^5 БОЕ/дозу, 6×10^5 БОЕ/дозу, 7×10^5 БОЕ/дозу, 7×10^5 БОЕ/дозу, 8×10^5 БОЕ/дозу, 9×10^5 БОЕ/дозу, около 10^6 БОЕ/дозу, около 2×10^6 БОЕ/дозу, около 3×10^6 БОЕ/дозу, около 4×10^6 БОЕ/дозу, около 5×10^6 БОЕ/дозу, около 6×10^6 БОЕ/дозу, около 7×10^6 БОЕ/дозу, около 8×10^6 БОЕ/дозу, около 9×10^6 БОЕ/дозу, около 10^7 БОЕ/дозу, около 2×10^7 БОЕ/дозу около 3×10^7 БОЕ/дозу,

около 4×10^7 БОЕ/дозу, около 5×10^7 БОЕ/дозу, около 6×10^7 БОЕ/дозу, около 7×10^7 БОЕ/дозу, около 8×10^7 БОЕ/дозу, около 9×10^7 БОЕ/дозу, около 10^8 БОЕ/дозу, около 2×10^8 БОЕ/дозу, около 3×10^8 БОЕ/дозу, около 4×10^8 БОЕ/дозу, около 5×10^8 БОЕ/дозу, около 6×10^8 БОЕ/дозу, около 7×10^8 БОЕ/дозу, около 8×10^8 БОЕ/дозу, около 9×10^8 БОЕ/дозу, около 10^{10} БОЕ/дозу, около 2×10^{10} БОЕ/дозу, около 3×10^{10} БОЕ/дозу, около 4×10^{10} БОЕ/дозу, около 5×10^{10} БОЕ/дозу, около 6×10^{10} БОЕ/дозу, около 7×10^{10} БОЕ/дозу, около 8×10^{10} БОЕ/дозу, около 9×10^{10} БОЕ/дозу, около 10^{10} БОЕ /доза, около 2×10^{10} БОЕ/дозу, около 3×10^{10} БОЕ/дозу, около 4×10^{10} БОЕ/дозу, около 5×10^{10} БОЕ/дозу, около 6×10^{10} БОЕ/дозу, около 7×10^{10} БОЕ/дозу, около 8×10^{10} БОЕ/дозу, около 9×10^{10} БОЕ/дозу, около 10^{10} БОЕ/дозу, около 2×10^{10} БОЕ/дозу, около 3×10^{10} БОЕ/дозу, около 4×10^{10} БОЕ/дозу, около 5×10^{10} БОЕ/дозу, около 6×10^{10} БОЕ/дозу, около 7×10^{10} БОЕ/дозу, около 8×10^{10} БОЕ/дозу, около 9×10^{10} БОЕ/дозу, около 10^{11} БОЕ/дозу, около 2×10^{11} БОЕ/дозу около 3×10^{11} БОЕ/дозу, около 4×10^{11} БОЕ/дозу, около 5×10^{11} БОЕ/дозу, около 6×10^{11} БОЕ/дозу, около 7×10^{11} БОЕ/дозу, около 8×10^{11} БОЕ/дозу, около 9×10^{11} БОЕ/дозу, или около 10^{12} БОЕ/дозу, от около 10^{12} БОЕ/дозу до около 10^{14} БОЕ/дозу, от около 10^{14} БОЕ/дозу до около 10^{14} БОЕ/дозу, или от около 10^{14} БОЕ/дозу до около 10^{15} БОЕ/дозу. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию, такой как онколитический вирус осповакцины, можно вводить в дозе, которая может составлять 5×10^{10} БОЕ/дозу. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию, такой как онколитический вирус осповакцины, можно вводить в дозе, которая может составлять вплоть до 5×10^{10} БОЕ/дозу.

В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию, такой как онколитический вирус осповакцины, можно вводить в дозе, которая может включать от около 10^3 вирусных частиц/дозу до около 10^4 вирусных частиц/дозу, от около 10^4 вирусных частиц/дозу до около от 10^5 вирусных частиц/дозу, от около 10^5 вирусных частиц/дозу до около 10^6 вирусных частиц/дозу, от около 10^7 вирусных частиц/дозу до около 10^8 вирусных частиц/дозу, от около 10^9 вирусных частиц/дозу до около 10^{10} вирусных частиц/дозу, от около 10^{10} вирусных частиц/дозу до около 10^{11} вирусных частиц/дозу, от около 10^{11} вирусных частиц/дозу до около 10^{12} вирусных частиц/дозу, от около 10^{12} вирусных частиц/дозу до около 10^{13} вирусных частиц/дозу, до около 10^{13} вирусных частиц/дозу до около 10^{14} вирусных частиц/дозу или от около 10^{14} вирусных частиц/дозу до около 10^{15} вирусных частиц/дозу.

В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию можно вводить в дозе, которая может составлять от около 10^3

БОЕ/кг до около 10^4 БОЕ/кг, от около 10^4 БОЕ/кг до около 10^5 БОЕ/кг, от около 10^5 БОЕ/кг до от около 10^6 БОЕ/кг, от около 10^7 БОЕ/кг до около 10^8 БОЕ/кг, от около 10^{10} БОЕ/кг до около 10^{10} БОЕ/кг, от около 10^{10} БОЕ/кг до около 10^{11} БОЕ/кг, от около 10^{11} БОЕ/кг до около 10^{12} БОЕ/кг, от около 10^{12} БОЕ/кг до около 10^{13} БОЕ/кг, от около 10^{13} БОЕ/кг до около 10^{14} БОЕ/кг или от около 10^{14} БОЕ/кг до около 10^{15} БОЕ/кг. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию, такой как онколитический вирус осповакцины, можно вводить в дозе, которая может составлять около 2×10^3 БОЕ/кг, 3×10^3 БОЕ/кг, 4×10^3 БОЕ/кг, 5×10^3 БОЕ/кг, 6×10^3 БОЕ/кг, 7×10^3 БОЕ/кг, 8×10^3 БОЕ/кг, 9×10^3 БОЕ/кг, около 10^4 БОЕ/кг, около 2×10^4 БОЕ/кг, около 3×10^4 БОЕ/кг, около 4×10^4 БОЕ/кг, около 5×10^4 БОЕ/кг, около 6×10^4 БОЕ/кг, около 7×10^4 БОЕ/кг, около 8×10^4 БОЕ/кг, около 9×10^4 БОЕ/кг, около 10^5 БОЕ/кг, 2×10^5 БОЕ/кг, 3×10^5 БОЕ/кг, 4×10^5 БОЕ/кг, 5×10^5 БОЕ/кг, 6×10^5 БОЕ/кг, 7×10^5 БОЕ/кг /кг, 8×10^5 БОЕ/кг, 9×10^5 БОЕ/кг, около 10^6 БОЕ/кг, около 2×10^6 БОЕ/кг, около 3×10^6 БОЕ/кг, около 4×10^6 БОЕ/кг, около 5×10^6 БОЕ/кг, около 6×10^6 БОЕ/кг, около 7×10^6 БОЕ/кг, около 8×10^6 БОЕ/кг, около 9×10^6 БОЕ/кг, около 10^7 БОЕ/кг, около 2×10^7 БОЕ/кг, около 3×10^7 БОЕ/кг, около 4×10^7 БОЕ/кг, около 5×10^7 БОЕ/кг, около 6×10^7 БОЕ/кг, около 7×10^7 БОЕ/кг, около 8×10^7 БОЕ/кг, около 9×10^7 БОЕ/кг, около 10^8 БОЕ/кг, около 2×10^8 БОЕ/кг, около 3×10^8 БОЕ/кг, около 4×10^8 БОЕ/кг, около 5×10^8 БОЕ/кг, около 6×10^8 БОЕ/кг /кг, около 7×10^8 БОЕ/кг, около 8×10^8 БОЕ/кг, около 9×10^8 БОЕ/кг, около 10^{10} БОЕ/кг, около 2×10^{10} БОЕ/кг, около 3×10^{10} БОЕ/кг, около 4×10^{10} БОЕ/кг, около 5×10^{10} БОЕ/кг, около 6×10^{10} БОЕ/кг, около 7×10^{10} БОЕ/кг, около 8×10^{10} БОЕ/кг, около 9×10^{10} БОЕ/кг, около 10^{10} БОЕ /кг, около 2×10^{10} БОЕ/кг, около 3×10^{10} БОЕ/кг, около 4×10^{10} БОЕ/кг, около 5×10^{10} БОЕ/кг, около 6×10^{10} БОЕ/кг, около 7×10^{10} БОЕ/кг, около 8×10^{10} БОЕ/кг, около 9×10^{10} БОЕ/кг, около 10^{10} БОЕ/кг, около 2×10^{10} БОЕ/кг, около 3×10^{10} БОЕ/кг, около 4×10^{10} БОЕ/кг, около 5×10^{10} БОЕ/кг, около 6×10^{10} БОЕ/кг, около 7×10^{10} БОЕ/кг, около 8×10^{10} БОЕ/кг, около 9×10^{10} БОЕ/кг, около 10^{11} БОЕ/кг, около 2×10^{11} БОЕ/кг, около 3×10^{11} БОЕ/кг, около 4×10^{11} БОЕ/кг, около 5×10^{11} БОЕ/кг, около 6×10^{11} БОЕ/кг, около 7×10^{11} БОЕ/кг, около 8×10^{11} БОЕ/кг, около 9×10^{11} БОЕ/кг или около 10^{12} БОЕ/кг, от около 10^{12} БОЕ/кг до около 10^{13} БОЕ/кг, от около 10^{13} БОЕ/кг до около 10^{14} БОЕ/кг, или от около 10^{14} БОЕ/кг до около 10^{15} БОЕ/кг. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию, такой как онколитический вирус осповакцины, можно вводить в дозе, которая может составлять 5×10^{10} БОЕ/кг. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию, такой как онколитический вирус осповакцины, можно вводить в дозе, которая может составлять вплоть до 5×10^{10} БОЕ/кг.

В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию можно вводить в дозе, которая может содержать от около 10^3 вирусных частиц/кг до около 10^4 вирусных частиц/кг, от около 10^4 вирусных частиц/кг до около 10^5 вирусных частиц/кг, около 10^5 вирусных частиц/кг до около 10^6 вирусных частиц/кг, от около 10^7 вирусных частиц/кг до около 10^8 вирусных частиц/кг, от около 10^9 вирусных частиц/кг до около 10^{10} вирусных частиц/кг, от около 10^{10} вирусных частиц/кг до около 10^{11} вирусных частиц/кг, от около 10^{11} вирусных частиц/кг до около 10^{12} вирусных частиц/кг, от около 10^{12} вирусных частиц/кг до около 10^{13} вирусных частиц/кг, от около 10^{13} вирусных частиц/кг до около 10^{14} вирусных частиц/кг или от около 10^{14} вирусных частиц/кг до около 10^{15} вирусных частиц/кг.

Жидкая лекарственная форма онколитического вируса осповакцины, описанная в настоящей заявке, может содержать, в некоторых воплощениях, вирусную дозу от около 10^3 БОЕ/мл до около 10^4 БОЕ/мл, от около 10^4 БОЕ/мл до около 10^5 БОЕ/мл, от около 10^5 БОЕ/мл до около 10^6 БОЕ/мл, от около 10^7 БОЕ/мл до около 10^8 БОЕ/мл, от около 10^{10} БОЕ/мл до около 10^{10} БОЕ/мл, от около 10^{10} БОЕ/мл до около 10^{11} БОЕ/мл, около 10^{11} БОЕ/мл от около 10^{12} БОЕ/мл, от около 10^{12} БОЕ/мл до около 10^{14} БОЕ/мл, от около 10^{14} БОЕ/мл до около 10^{14} БОЕ/мл или от около 10^{14} БОЕ/мл до около 10^{15} БОЕ/мл. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию, такой как онколитический вирус осповакцины, можно вводить в дозе, которая может составлять около 2×10^3 БОЕ/мл, 3×10^3 БОЕ/мл, 4×10^3 БОЕ/мл, 5×10^3 БОЕ/мл, 6×10^3 БОЕ/мл, 7×10^3 БОЕ/мл, 8×10^3 БОЕ/мл, 9×10^3 БОЕ/мл, около 10^4 БОЕ/мл, около 2×10^4 БОЕ/мл, около 3×10^4 БОЕ/мл, около 4×10^4 БОЕ/мл, около 5×10^4 БОЕ/мл, около 6×10^4 БОЕ/мл, около 7×10^4 БОЕ/мл, около 8×10^4 БОЕ/мл, около 9×10^4 БОЕ/мл, около 10^5 БОЕ/мл, 2×10^5 БОЕ/мл, 3×10^5 БОЕ/мл, 4×10^5 БОЕ/мл, 5×10^5 БОЕ/мл, 6×10^5 БОЕ/мл, 7×10^5 БОЕ/мл, 8×10^5 БОЕ/мл, 9×10^5 БОЕ/мл, около 10^6 БОЕ/мл, около 2×10^6 БОЕ/мл, около 3×10^6 БОЕ/мл, около 4×10^6 БОЕ/мл, около 5×10^6 БОЕ/мл, около 6×10^6 БОЕ/мл, около 7×10^6 БОЕ/мл, около 8×10^6 БОЕ/мл, около 9×10^6 БОЕ/мл, около 10^7 БОЕ/мл, около 2×10^7 БОЕ/мл, около 3×10^7 БОЕ/мл, около 4×10^7 БОЕ/мл, около 5×10^7 БОЕ/мл, около 6×10^7 БОЕ/мл, около 7×10^7 БОЕ/мл, около 8×10^7 БОЕ/мл, около 9×10^7 БОЕ/мл, около 10^8 БОЕ/мл, около 2×10^8 БОЕ/мл, около 3×10^8 БОЕ/мл, около 4×10^8 БОЕ/мл, около 5×10^8 БОЕ/мл, около 6×10^8 БОЕ/мл /мл, около 7×10^8 БОЕ/мл, около 8×10^8 БОЕ/мл, около 9×10^8 БОЕ/мл, около 10^{10} БОЕ/мл, около 2×10^{10} БОЕ/мл, около 3×10^{10} БОЕ/мл, около 4×10^{10} БОЕ/мл, около 5×10^{10} БОЕ/мл, около 6×10^{10} БОЕ/мл, около 7×10^{10} БОЕ/мл, около 8×10^{10} БОЕ/мл, около 9×10^{10} БОЕ/мл, около 10^{10} БОЕ /мл, около 2×10^{10} БОЕ/мл, около 3×10^{10} БОЕ/мл, около 4×10^{10} БОЕ/мл, около 5×10^{10} БОЕ/мл, около

6×10^{10} БОЕ/мл, около 7×10^{10} БОЕ/мл, около 8×10^{10} БОЕ/мл, около 9×10^{10} БОЕ/мл, около 10^{10} БОЕ/мл, около 2×10^{10} БОЕ/мл, около 3×10^{10} БОЕ/мл, около 4×10^{10} БОЕ/мл, около 5×10^{10} БОЕ/мл, около 6×10^{10} БОЕ/мл, около 7×10^{10} БОЕ/мл, около 8×10^{10} БОЕ/мл, около 9×10^{10} БОЕ/мл, около 10^{11} БОЕ/мл, около 2×10^{11} БОЕ/мл, около 3×10^{11} БОЕ/мл, около 4×10^{11} БОЕ/мл, около 5×10^{11} БОЕ/мл, около 6×10^{11} БОЕ/мл, около 7×10^{11} БОЕ/мл, около 8×10^{11} БОЕ/мл, около 9×10^{11} БОЕ/мл или около 10^{12} БОЕ/мл, от около 10^{12} БОЕ/мл до около 10^{14} БОЕ/мл, от около 10^{14} БОЕ/мл до около 10^{14} БОЕ/мл или от около 10^{14} БОЕ/мл до около 10^{15} БОЕ/мл. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию, такой как онколитический вирус осповакцины, можно вводить в дозе, которая может составлять 5×10^{10} БОЕ/мл. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию, такой как онколитический вирус осповакцины, можно вводить в дозе, которая может составлять вплоть до 5×10^{10} БОЕ/мл.

В некоторых случаях, когда модифицированный онколитический вирус вводят посредством инъекции, доза может включать около 10^3 вирусных частиц на инъекцию, 10^4 вирусных частиц на инъекцию, 10^5 вирусных частиц на инъекцию, 10^6 вирусных частиц на инъекцию, 10^7 вирусных частиц на инъекцию, 10^8 вирусных частиц на инъекцию, 10^9 вирусных частиц на инъекцию, 10^{10} вирусных частиц на инъекцию, 10^{11} вирусных частиц на инъекцию, 10^{12} вирусных частиц на инъекцию, 2×10^{12} вирусных частиц на инъекцию, 10^{13} вирусных частиц на инъекцию, 10^{14} вирусных частиц на инъекцию или 10^{15} вирусных частиц на инъекцию. В дополнительных случаях, когда модифицированный онколитический вирус вводят путем инъекции, доза может составлять около 10^3 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^4 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^5 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^6 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^7 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^8 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^9 инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^{10} инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^{11} инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^{12} инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 2×10^{12} инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^{13} инфекционных вирусных частиц на инъекцию, 10^{14} инфекционных вирусных частиц на инъекцию или 10^{15} инфекционных вирусных частиц на инъекцию. В некоторых воплощениях вирус можно вводить в количестве, достаточном для индукции онколиза по меньшей мере в около 20% клеток опухоли, по меньшей мере в около 30% клеток опухоли, по меньшей мере в около 40% клеток опухоли, по меньшей мере в около 50% клеток опухоли, по меньшей мере в около

60% клеток опухоли, по меньшей мере в около 70% клеток опухоли, по меньшей мере в около 80% клеток опухоли, или по меньшей мере в около 90% клеток опухоли.

В некоторых воплощениях разовая доза фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, может относиться к количеству, введенному субъекту или опухоли в течение 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 24 часов. В некоторых воплощениях доза может быть распределена во времени или путем отдельной инъекции. В некоторых воплощениях субъекту можно вводить несколько доз (например, 2, 3, 4, 5, 6 или более доз) фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, например, когда вторая обработка может проводиться в течение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 дней или недель после первой обработки. В некоторых воплощениях многократные дозы фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, можно вводить субъекту в течение периода 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или более дней или недель. В некоторых воплощениях фармацевтическую композицию, описанную в настоящей заявке, или фармацевтическую композицию, описанную в настоящей заявке, можно вводить в течение периода от около 1 недели до около 2 недель, от около 2 недель до около 3 недель, от около 3 недель до около 4 недель, от около 4 недель до около 5 недель, от около 6 недель до около 7 недель, от около 7 недель до около 8 недель, от около 8 недель до около 9 недель, от около 9 недель до около 10 недель, от около 10 недель до около 11 недель, от около 11 недель до около 12 недель, от около 12 недель до около 24 недель, от около 24 недель до около 48 недель, от около 48 недель или около 52 недель или дольше. Частота введения онколитического вируса осповакцины или фармацевтической композиции, описанной в настоящей заявке, в некоторых случаях может составлять один раз в день, два раза в день, один раз в неделю, один раз в три недели, один раз в четыре недели (или один раз в месяц), один раз в 8 недель (или один раз в 2 месяца), один раз в 12 недель (или один раз в 3 месяца) или один раз в 24 недели (один раз в 6 месяцев). В некоторых воплощениях способов, раскрытых в настоящей заявке, рекомбинантный вирус осповакцины или фармацевтическую композицию можно вводить независимо в начальной дозе в течение первого периода времени, промежуточной дозе в течение второго периода времени и высокой дозе в течение третьего периода времени. В некоторых воплощениях начальная доза ниже, чем промежуточная доза, а промежуточная доза ниже, чем высокая доза. В некоторых воплощениях первый, второй и третий периоды времени независимо составляют от около 1 недели до около 2 недель, от около 2 недель до около 3 недель, от около 3 недель до около 4 недель, от около 4 недель до около 5 недель, от около 6 недель до около 7 недель, от около 7 недель до около 8 недель, от около 8 недель до около 9 недель, от около 9 недель до около 10 недель, от около 10 недель до около 11 недель, от около 11 недель до

около 12 недель, от около 12 недель до около 24 недель, от около 24 недель до около 48 недель, около 48 недель или около 52 недель или дольше.

Одна или несколько доз фармацевтической композиции включают цикл лечения. Две или более дозы в цикле лечения могут быть разделены интервалом дозирования, при котором фармацевтическая композиция не вводится. Один или несколько циклов лечения составляют курс лечения. Два или более циклов лечения в курсе лечения могут быть разделены интервалом лечения, при котором лечение не проводится.

В некоторых воплощениях способов, описанных в настоящей заявке, одна или несколько доз композиции, клетки, гибридного белка, онколитического вируса или вируса осповакцины, описанных в настоящей заявке, составляют цикл лечения. В некоторых воплощениях 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доз композиции, клетки, гибридного белка, онколитического вируса или вируса осповакцины, описанных в настоящей заявке, составляют цикл лечения. В некоторых воплощениях дозу вводят в течение около 1 минуты, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 1 дня или более. В некоторых воплощениях все дозы в цикле лечения примерно одинаковы по количеству и продолжительности. В некоторых воплощениях каждая доза в цикле лечения не зависит от любых других доз. В некоторых воплощениях две или более дозы в цикле лечения разделены интервалом приема, при котором дозы не вводятся. В некоторых воплощениях интервал введения дозы составляет около 1 минуты, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 1 дня, около 2 дней, около 3 дней, около 4 дней, около 5 дней, около 6 дней, около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 7 месяцев, около 8 месяцев, около 9 месяцев, около 10 месяцев, около 11 месяцев, около 1 года или более. В некоторых воплощениях все интервалы доз примерно одинаковы. В некоторых воплощениях каждый интервал доз не зависит от любого другого интервала доз.

В некоторых воплощениях способов, описанных в настоящей заявке, один или несколько циклов лечения включают курс лечения. В некоторых воплощениях курс лечения включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более циклов лечения. Описанный в данной заявке цикл лечения может составлять от 1 до 24 часов, от 1 до 6 дней, от 1 до 4 недель, от 1 до 12 месяцев или более по продолжительности. В некоторых воплощениях цикл лечения составляет 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 10 часов, 15 часов, 20 часов, 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев или более. В некоторых воплощениях все циклы

лечения примерно одинаковы. В некоторых воплощениях каждый цикл лечения не зависит от любых других циклов лечения. В некоторых воплощениях два или более циклов лечения разделены интервалом лечения, в течение которого лечение не проводится. В некоторых воплощениях интервал лечения составляет от 1 до 6 дней, от 1 до 4 недель, от 1 до 12 месяцев, от 1 до 5 лет или более. В некоторых воплощениях интервал лечения составляет около 1 дня, около 2 дней, около 3 дней, около 4 дней, около 5 дней, около 6 дней, около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 1 дня. месяц, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 7 месяцев, около 8 месяцев, около 9 месяцев, около 10 месяцев, около 11 месяцев, около 1 года, около 2 лет, около 3 лет, около 4 лет, около 5 лет или более. В некоторых воплощениях все интервалы лечения примерно одинаковы. В некоторых воплощениях каждый интервал лечения не зависит от любого другого интервала лечения.

В некоторых воплощениях способов, описанных в настоящей заявке, один или несколько курсов лечения композицией, клеткой, гибридным белком, онколитическим вирусом или вирусом осповакцины, описанными в настоящей заявке, включают описанный в настоящей заявке способ. В некоторых воплощениях способ включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более курсов лечения. В некоторых воплощениях курс лечения составляет от 1 до 6 дней, от 1 до 4 недель, от 1 до 12 месяцев, от 1 до 5 лет или более. В некоторых воплощениях курс лечения составляет около 1 дня, около 2 дней, около 3 дней, около 4 дней, около 5 дней, около 6 дней, около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 1 месяц, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 7 месяцев, около 8 месяцев, около 9 месяцев, около 10 месяцев, около 11 месяцев, около 1 года, около 2 лет, около 3 лет, около 4 лет, около 5 лет или более. В некоторых воплощениях все курсы лечения одинаковы. В некоторых воплощениях каждый курс лечения не зависит от любых других курсов лечения. В некоторых воплощениях за каждым курсом лечения следует интервал курса, во время которого лечение не проводится. В некоторых воплощениях интервал курса составляет от 1 до 6 дней, от 1 до 4 недель, от 1 до 12 месяцев, от 1 до 5 лет или более. В некоторых воплощениях интервал курса составляет около 1 дня, около 2 дней, около 3 дней, около 4 дней, около 5 дней, около 6 дней, около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 1 месяц, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 7 месяцев, около 8 месяцев, около 9 месяцев, около 10 месяцев, около 11 месяцев, около 1 года, около 2 лет, около 3 лет, около 4 лет, около 5 лет или более. В некоторых воплощениях продолжительность интервала курса зависит от

частоты возникновения или рецидива заболевания. В некоторых воплощениях все интервалы курса примерно одинаковы. В некоторых воплощениях каждый интервал курса не зависит от любого другого интервала курса.

В некоторых примерах субъект может быть переведен на диету с пониженным содержанием углеводов, например, кетогенную диету до, одновременно и после введения модифицированных онколитических вирусов, таких как онколитические вирусы осповакцины, или фармацевтической композиции, содержащей их, как описанные в данной заявке, согласно любому из способов лечения, описанных в данной заявке. В некоторых воплощениях субъекта сажают на диету, которая может включать потребление менее 500 граммов углеводов в день, менее 450 граммов углеводов в день, менее 400 граммов углеводов в день, менее 350 граммов углеводов в день, менее 300 граммов углеводов в день, менее 250 граммов углеводов в день, менее 200 граммов углеводов в день, менее 150 граммов углеводов в день, менее 100 граммов углеводов в день, менее 90 граммов углеводов в день, менее 80 граммов углеводов в день, менее 70 граммов углеводов в день, менее 60 граммов углеводов в день, менее 50 граммов углеводов в день, менее 40 граммов углеводов в день, менее 30 граммов углеводов в день, менее 20 граммов углеводов в день, менее 10 граммов углеводов в день.

Типичный способ доставки модифицированного онколитического вируса настоящего раскрытия, такого как онколитический вирус осповакцины, как описано в настоящей заявке, или содержащей его фармацевтической композиции, к злокачественным опухолевым или опухолевым клеткам может осуществляться посредством внутриопухолевой инъекции. Однако можно использовать и альтернативные способы введения. Пути введения могут варьировать в зависимости от локализации и характера опухоли. В некоторых воплощениях введение может представлять собой местное введение или системное введение. В некоторых воплощениях путь введения является внутривенным, региональным (например, в непосредственной близости к опухоли, особенно в сосудистую сеть или прилегающую сосудистую сеть опухоли), внутривнутрибрюшинным, парентеральным, внутримышечным, подкожным, внутриартериальным, чрескожным, интратекальным, интратрахеальным, внутрипузырным, чрескожным, внутрикожным, ингаляционным, перфузионным, интраназальным, внутриуретральным, интравагинальным, путем промывания, пероральным, внутризубным, ректальным или любой их комбинацией. Инъекционную дозу онколитического вируса можно вводить в виде болюсной инъекции или в виде медленной инфузии. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус можно вводить пациенту из источника, имплантированного пациенту. В некоторых

воплощениях введение модифицированного онколитического вируса может происходить путем непрерывной инфузии в течение выбранного периода времени. В некоторых случаях онколитический вирус осповакцины, описанный в настоящей заявке, или фармацевтическую композицию, содержащую его, можно вводить в терапевтически эффективной дозе путем инфузии в течение периода около 15 минут, около 30 минут, около 45 минут, около 50 минут, около 55 минут, около 60 минут, около 75 минут, около 90 минут, около 100 минут или около 120 минут или дольше. Онколитический вирус или фармацевтическую композицию по настоящему раскрытию можно вводить в виде жидкой дозы, при этом общий объем введения составляет от около 1 мл до около 5 мл, от около 5 мл до около 10 мл, от около 15 мл до около 20 мл, от около 25 мл до около 30 мл, от около 30 мл до около 50 мл, от около 50 мл до около 100 мл, от около 100 мл до около 150 мл, от около 150 мл до около 200 мл, от около 200 мл до около 250 мл, около 250 мл до около 300 мл, от около 300 до около 350 мл, от около 350 до около 400 мл, от около 400 до около 450 мл, от около 450 до 500 мл, от около 500 до 750 мл или от около 750 до 1000 мл.

Фармацевтические композиции

В данной заявке предлагаются фармацевтические композиции, содержащие гибридную конструкцию или нуклеиновую кислоту, кодирующую такую конструкцию, и фармацевтически приемлемый носитель. Термин «Фармацевтически приемлемый» в настоящей заявке включает любой носитель, который не влияет на эффективность биологической активности активных ингредиентов и/или который не токсичен для пациента, которому его вводят. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых носителей включают буферы, воду, эмульсии, различные типы смачивающих агентов, стерильные растворы, консерванты, стабилизаторы, уплотняющие агенты, смазочные вещества, хелаторы, усилители дисперсии, дезинтеграторы и любую их комбинацию. В некоторых воплощениях буфер включает цитратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер или любую их комбинацию. В некоторых воплощениях эмульсия представляет собой эмульсию масла в воде (М/В), эмульсию воды в масле (В/М) или множественную эмульсию. Дополнительные неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых носителей могут включать гели, биоадсорбируемые полимеры, элементы для имплантации, содержащие гибридную конструкцию или нуклеиновую кислоту, или любой другой подходящий носитель, средства или материал для доставки или дозирования. В некоторых воплощениях биоадсорбируемый полимер включает полимолочную кислоту (PLA), полигликолевую кислоту (PGA), поликапролактон (PCL), полидиоксон (PDO) или любую их комбинацию. В некоторых воплощениях гель включает белок, полисахарид, производное целлюлозы, синтетический

полимер или любую их комбинацию. В некоторых воплощениях белок включает желатин, коллаген или любую их комбинацию. В некоторых воплощениях полисахарид включает пектин, гелевую камедь, альгиновую кислоту, агар, ксантин, кассию тора, трагакант, каррагинан натрия или калия, гуаровую камедь или любую их комбинацию. В некоторых воплощениях производное целлюлозы включает метилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу или любую их комбинацию. В некоторых воплощениях синтетический полимер включает карбомер, полиакриламид, полоксамер, поливиниловый спирт, полиэтилен или его сополимеры или любую их комбинацию. Такие носители могут быть приготовлены обычными способами и введены субъекту в эффективном количестве.

В некоторых воплощениях фармацевтические композиции, описанные в настоящей заявке, составлены в виде раствора на водной основе, раствора на масляной основе, дисперсии в глицерине, жидкого полиэтиленгликоля, твердого вещества, формы для ингаляции, формы для интраназального введения, липосом, наночастиц, микрочастиц, полимеров или любой их комбинации. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, может содержать стабилизатор и буфер. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция, описанная в настоящей заявке, может содержать солюбилизатор, такой как стерильная вода или буфер.

Способы получения

В некоторых воплощениях модифицированные онколитические вирусы по настоящему раскрытию упакованы в клеточные линии. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус можно размножить в подходящих клетках-хозяевах, например, клетках HeLa, клетках 293 или клетках Vero, выделять из клеток-хозяев и хранить в условиях, которые способствуют стабильности и целостности вируса, так что потеря инфекционной способности со временем сводится к минимуму. В некоторых типичных способах модифицированные онколитические вирусы размножаются в клетках-хозяевах с использованием культуральных сосудов CellSTACK, роллер-флаконов или перфузионных биореакторов. В некоторых примерах последующие способы очистки модифицированных онколитических вирусов могут включать фильтрацию (например, глубинную фильтрацию, тангенциальную поточную фильтрацию или их комбинацию), ультрацентрифугирование или хроматографический захват. Модифицированный онколитический вирус можно хранить, например, путем замораживания или сушки, например, путем лиофилизации. В некоторых воплощениях перед введением хранящийся модифицированный онколитический вирус можно восстановить (если высушить для хранения) и развести в фармацевтически приемлемом

носителе для введения. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус, описанный в настоящей заявке, демонстрирует более высокий титр в клетках HeLa и клетках 293 по сравнению с идентичным в остальном вирусом, который не включает модификаций модифицированного онколитического вируса. В некоторых случаях более высокий титр в клетках HeLa и клетках 293 наблюдается у модифицированного онколитического вируса.

Наборы

В воплощениях настоящего раскрытия предлагается набор для введения модифицированного онколитического вируса, как описано в настоящей заявке. В некоторых воплощениях набор по настоящему раскрытию может включать модифицированный онколитический вирус или фармацевтическую композицию, содержащую модифицированный онколитический вирус, как описано выше. В некоторых воплощениях набор по настоящему раскрытию может дополнительно включать один или несколько компонентов, таких как инструкции по применению, устройства и дополнительные реагенты, а также компоненты, такие как пробирки, контейнеры и шприцы, для выполнения способов, раскрытых выше. В некоторых воплощениях набор по настоящему раскрытию может дополнительно включать один или несколько агентов, например, по меньшей мере, один из числа противоопухолевого агента, иммуномодулирующего агента или любых их комбинаций, которые можно вводить в сочетании с модифицированным вирусом.

В некоторых воплощениях набор по настоящему раскрытию может включать один или несколько контейнеров, содержащих модифицированный вирус, раскрытый в настоящей заявке. Например, но не в качестве ограничения, набор по настоящему раскрытию может включать один или несколько контейнеров, которые содержат модифицированный онколитический вирус по настоящему раскрытию.

В некоторых воплощениях набор по настоящему раскрытию может включать инструкции по применению, устройство для введения модифицированного онколитического вируса субъекту или устройство для введения субъекту дополнительного агента или соединения. Например, но не в качестве ограничения, инструкции могут включать описание модифицированного онколитического вируса и, необязательно, других компонентов, включенных в набор, и способов введения, включая способы определения надлежащего состояния субъекта, правильной дозировки и правильного способа введения модифицированного вируса. Инструкции также могут включать указания по наблюдению за субъектом в течение всего времени лечения.

В некоторых воплощениях набор по настоящему раскрытию может включать устройство для введения модифицированного онколитического вируса субъекту. Любое из множества устройств, известных в данной области техники для введения лекарств и фармацевтических композиций, может быть включено в представленные в данной заявке наборы. Например, но не в качестве ограничения, такие устройства включают иглу для подкожных инъекций, иглу для внутривенного введения, катетер, безыгольное инъекционное устройство, ингалятор и дозатор жидкости, такой как пипетка. В некоторых воплощениях модифицированный онколитический вирус для системной доставки, например, путем внутривенной инъекции, внутриопухолевой инъекции, внутрибрюшинной инъекции, может быть включен в набор с иглой для подкожных инъекций и шприцем.

Примерные воплощения

В данной заявке предлагаются гибридные белки, причем гибридный белок включает: лиганд суперсемейства TNF (фактора некроза опухоли) (TNFSF-L) или его функциональный вариант; и множество доменов из белка семейства коллектинов, причем множество доменов из белка семейства коллектинов включают: домен олигомеризации или его функциональный вариант; и шейный домен или его функциональный вариант, причем домен олигомеризации или его функциональный вариант и шейный домен или его функциональный вариант находятся ближе по последовательности по сравнению с их расположением в белке семейства коллектинов. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где гибридный белок включает следующее, в порядке от N-конца к C-концу: домен олигомеризации или его функциональный вариант; шейный домен или его функциональный вариант, необязательно, линкерную последовательность; и TNFSF-L или его функциональный вариант. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где TNFSF-L представляет собой лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, 4-1BBL, TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), 18-й представитель суперсемейства TNF, Эктодисплазин А. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых пептид TNFSF-L представляет собой лиганд CD40. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где лиганд CD40 имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 1. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых пептид TNFSF-L представляет собой лиганд

OX40. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых лиганд OX40 имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где пептид TNFSF-L представляет собой 4-1BBL. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где 4-1BBL имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых пептид TNFSF-L представляет собой LIGHT. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где последовательность LIGHT имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 6. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых белок семейства коллектинов представляет собой SP-A, SP-D, маннозосвязывающий лектин (MBL), конглутинин, CL-43, CL-L1, CL-K1, CL-P1 или CL-46. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где белком семейства коллектинов является SP-D. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых домен олигомеризации имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 9. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых домен олигомеризации и шейный домен вместе имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 11. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, в которых домен олигомеризации и шейный домен вместе включают SEQ ID NO: 11. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются гибридные белки, где гибридный белок включает линкерную последовательность, и где линкерная последовательность включает GSG (глицин-серин-глицин) (SEQ ID NO: 12).

В данной заявке предлагаются гибридные белки, причем гибридный белок включает последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 18 или 19.

В данной заявке предлагаются онколитические вирусы, причем онколитический вирус включает: лиганд суперсемейства TNF (фактора некроза опухоли) (TNFSF-L) или его функциональный вариант, объединенный с доменом олигомеризации. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, причем онколитический вирус представляет собой вирус болезни Ньюкасла (NDV), реовирус (RV), вирус миксомы (MYXV), вирус кори (MV), вирус простого герпеса (HSV), вирус осповакцины (VV), вирус везикулярного стоматита (VSV) или вирус полиомиелита (PV). Кроме того, в настоящей заявке предлагаются онколитические вирусы, у которых TNFSF-L или его функциональный вариант встроен в вирусный геном. Кроме того, в настоящей заявке

предлагаются онколитические вирусы, в которых TNFSF-L или его функциональный вариант встроен в ген тимидинкиназы.

В данной заявке предлагаются онколитические вирусы, причем онколитический вирус включает: лиганд суперсемейства TNF (фактора некроза опухоли) (TNFSF-L) или его функциональный вариант, объединенный с доменом олигомеризации. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, причем вирус осповакцины представляет собой модифицированный штамм вируса осповакцины Western Reserve (ATCC VR-1354), вируса осповакцины Ankara (ATCC VR-1508), вируса осповакцины Ankara (ATCC VR-1566), штамм вируса осповакцины Wyeth (ATCC VR-1536) или вирус осповакцины Wyeth (ATCC VR-325). Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых TNFSF-L или его функциональный вариант встроен в вирусный геном. Кроме того, в настоящей заявке предлагаются вирусы осповакцины, в которых TNFSF-L или его функциональный вариант встроен в ген тимидинкиназы.

В данной заявке предлагаются онколитические вирусы, причем онколитический вирус включает гибридный белок, как описано в настоящей заявке.

В данном документе предлагаются вирусы осповакцины, причем вирус осповакцины включает гибридный белок, как описано в настоящей заявке.

В данной заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, включающие: введение вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, субъекту в количестве, достаточном для лечения онкологического заболевания, при этом нуклеиновая кислота кодирует гибридный белок, как описано в настоящей заявке.

В данной заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, включающие: введение онколитического вируса, как описано в настоящей заявке, субъекту в количестве, достаточном для лечения онкологического заболевания.

В данной заявке предлагаются способы лечения онкологического заболевания, включающие: введение вируса осповакцины, как описано в настоящей заявке, субъекту в количестве, достаточном для лечения онкологического заболевания.

В данной заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, включающие: введение вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, в опухолевые клетки в количестве, достаточном для уменьшения роста опухолевых клеток, причем нуклеиновая кислота кодирует гибридный белок, как описано в настоящей заявке.

В данной заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, включающие: введение онколитического вируса, как описано в настоящей заявке, в опухолевые клетки в количестве, достаточном для уменьшения роста опухолевых клеток.

В данной заявке предлагаются способы уменьшения роста опухолевых клеток, включающие: введение вируса осповакцины, как описано в настоящей заявке, в опухолевые клетки в количестве, достаточном для уменьшения роста опухолевых клеток.

Примеры

Приведенные ниже примеры дополнительно иллюстрируют описанные воплощения, не ограничивая объем данного раскрытия.

Пример 1. Экспрессия нативных и гибридных конструкций TNFSF-L

Были разработаны следующие гибридные конструкции TNFSF-L. 3sCD40L (мышь); 3sOX40L (мышь); 3s41BBL (мышь); 3sOX40L (человек); и 3s41BBL (человек). Последовательности этих конструкций описаны в таблице 4 и таблице 5.

Кроме того, были разработаны следующие конструкции, продуцирующие нативный мономер: mOX40L (мышиный, нативный) и m41BBL (мышиный, нативный). Последовательности этих конструкций представлены в таблице 6 (аминокислотные) и таблице 7 (нуклеотидные).

Таблица 6

SEQ ID NO:	Описание	Аминокислотная последовательность
28	mOX40L (мышь, нативный)	MEGEGVQPLDENLENGSRPRFKWKKTLRLVVSGIKGAGMLLCFI YVCLQLSSSPA KDPPIQLRGAVTRCEDGQLFISSYKNEYQTM EV QNNSVVIKCDGLYIIYLKGSFFQEVKIDLHFREDHNPISIPMLNDG RRIVFTVVASLAFKDKVYLTVNAPDTLCEHLQINDGELIVVQLTP GYCAPEGSYHSTVNQVPL*
29	m4-1BBL (мышь, нативный)	MDQHTLDVEDTADARHPAGTSCPSDAALLRDTGLLADAALLSD TVRPTNAALPTDAAYPAVNVDRDREAAWPPALNFCSRHPKLYGL VALVLLLLIAACVPIFTRTEPRPALTITSPNLGTRENNADQVTPVS HIGCPNTTQQGSPVFAKLLAKNQASLCNTTLNWHQSODGAGSSYL SQGLRYEEDKKELVVDSPGLYVVFLELKLSPFTNTGHKVQGWV SLVLQAKPQVDDFDNLALTVELFPCSMENKLVDRSWSQLLLKA GHRLSVGLRAYLHGAQDAYRDWELSYPNNTTSFGLFLVKPDNPW E*

Таблица 7

SEQ ID NO:	Описание	Нуклеотидная последовательность
30	mOX40L (мышь, нативный)	ATGGAAGGGGAAGGGGTTCAACCCCTGGATGAGAATCTGGAA AACGGATCAAGGCCAAGATTCAAGTGAAGAAGACGCTAAGG CTGGTGGTCTCTGGGATCAAGGGAGCAGGGATGCTTCTGTGCT TCATCTATGTCTGCCTGCAACTCTCTCCTCTCCGGCAAAGGAC CCTCCAATCCAAAGACTCAGAGGAGCAGTTACCAGATGTGAG GATGGGCAACTATTCATCAGCTCATAACAAGAATGAGTATCAA ACTATGGAGGTGCAGAACAATTCGGTTGTCATCAAGTGCAGT GGCTTTATATCATCTACCTGAAGGGCTCCTTTTCCAGGAGGT CAAGATTGACCTTCATTTCCGGGAGGATCATAATCCCATCTCT ATTCCAATGCTGAACGATGGTCAAGGATTGTCTTCACTGTGG TGGCCTCTTTGGCTTTCAAAGATAAAGTTTACCTGACTGTAAA TGCTCCTGATACTCTCTGCGAACACCTCCAGATAAATGATGGG GAGCTGATTGTTGTCCAGCTAACGCCTGGATACTGTGCTCCTG AAGGATCTTACCACAGCACTGTGAACCAAGTACCACTGTGA

31	m4-1BBL (мышь, нативный)	ATGGACCAGCACACACTTGATGTGGAGGATACCGCGGATGCC AGACATCCAGCAGGTA CTTCGTGCCCTCGGATGCGGCGCTCC TCAGAGATACCGGGCTCCTCGCGGACGCTGCGCTCCTCTCAGA TACTGTGCGCCCCACAAATGCCGCGCTCCCCACGGATGCTGCC TACCCTGCGGTTAATGTTCTGGGATCGCGAGGCCGCGTGGCCGC CTGCACTGAACTTCTGTTCCCGCCACCCAAAGCTCTATGGCCT AGTCGCTTTGGTTTTGCTGCTTCTGATCGCCGCCTGTGTTCTTA TCTTCAACCCGCACCGAGCCTCGGCCAGCGCTCACAATCACCAC CTCGCCCAACCTGGGTACA CGAGAGAATAATGCAGACCAGGTC ACCCCTGTTTCCACATTGGCTGCCCAACACTACACAACAGG GCTCTCCTGTGTTCGCCAAGCTACTGGCTAAAACCAAGCATC GTTGTGCAATACA ACTCTGAACTGGCACAGCCAAGATGGAGC TGGGtctTCATACCTATCTCAAGGTCTGAGGTACGAAGAAGACA AAAAGGAGTTGGTGGTAGACAGTCCC GGGCTCTACTACGTATT TTTGAACTGAAGCTCAGTCCAACATTCACAAACACAGGCCAC AAGGTGCAGGGCTGGGTCTCTCTTGT TTTGCAAGCAAAGCCTC AGGTAGATGACTTTGACA ACTTGGCCCTGACAGTGGAACTGTT CCCTTGCTCCATGGAGAACAAGTTAGTGGACCGTTCCTGGAGT CAACTGTTGCTCCTGAAGGCTGGCCACCGCCTCAGTGTGGGTC TGAGGGCTTATCTGCATGGAGCCCAGGATGCATACAGAGACT GGGAGCTGTCTTATCCCAACACCACCAGCTTTGGACTCTTTCTT GTGAAACCCGACAACCCATGGGAATGA
----	--------------------------------	---

Осуществляли экспрессию нативного мономера TNFSF-L или вариантных гибридных конструкций из онколитических вирусов. Вкратце, клетки HeLa были инфицированы при MOI 5,0 вирусами, экспрессирующими мономеры или объединенные каркас-TNFSF-L (для OX40L или 41BBL), или контрольным вирусом, не экспрессирующим TNFSF-L, или вирусом, экспрессирующим гибридный каркас-TNFSF-L (для CD40L). Среду собирали через 24 часа и анализировали с помощью коммерческого набора ELISA в соответствии с инструкциями производителя (образцы были неразбавленными или разбавленными, как указано). Образцы разводили в соотношении 1:100, регистрировали связывание, а суммы, суммированные в таблицах, учитывали коэффициент разведения.

Ссылаясь на фиг. 2, неинфицированные клетки HeLa не обнаруживали детектируемых уровней mCD40L. Аналогично, клетки HeLa, инфицированные онколитическим вирусом осповакцины, имеющим делеции A52R и ТК, не обнаруживали детектируемых уровней mCD40L. Клетки HeLa, инфицированные онколитическим вирусом осповакцины, имеющим делецию ТК, и гибридной конструкцией 3sCD40L (мышинной), имеющей домен олигомеризации и встроенной в ген ТК, демонстрируют гораздо более высокий уровень экспрессии, около 400 нг/мл.

Согласно фиг. 3, неинфицированные клетки HeLa не обнаруживали детектируемых уровней mOX40L. Аналогично, клетки HeLa, инфицированные онколитическим вирусом осповакцины, имеющим делеции A52R и ТК, не обнаруживали детектируемых уровней mOX40L. Клетки HeLa, инфицированные онколитическим вирусом осповакцины с делецией ТК и нативным mOX40L, встроенным в ген ТК, показали слегка повышенную

экспрессию mOX40L, при этом было обнаружено около 4500 пг/мл. Клетки HeLa, инфицированные онколитическим вирусом осповакцины с делецией ТК и гибридной конструкцией 3sOX40L (мышь), содержащей домен олигомеризации, встроенный в ген ТК, имели гораздо более высокие уровни экспрессии mOX40L, при этом было обнаружено около 265 000 пг/мл mOX40L.

Согласно фиг. 4, неинфицированные клетки HeLa не обнаруживали детектируемых уровней m41BBL. Клетки HeLa, инфицированные онколитическим вирусом осповакцины, имеющим делеции A52R и ТК, также не демонстрировали детектируемых уровней m41BBL. Клетки HeLa, инфицированные онколитическим вирусом осповакцины с делецией ТК и нативным m41BBL, встроенным в ген ТК, демонстрировали минимальную экспрессию, с детектируемой концентрацией 1,4 нг/мл. Клетки HeLa, инфицированные онколитическим вирусом осповакцины, имеющим делецию ТК и гибридную конструкцию 3s41BBL (мышь), включающую домен олигомеризации, встроенный в ген ТК, имели гораздо более высокие уровни экспрессии 41BBL, при этом обнаруживалось около 1500 нг/мл 41BBL.

Пример 2. Экспрессия нативных и каркасных структур

Были исследованы функциональные эффекты модифицированного онколитического вируса осповакцины, экспрессирующего гибридную конструкцию TNFSF-L, имеющую домен олигомеризации. Был использован анализ активности CD40L с помощью репортерной системы с SEAP, где количество продуцирования SEAP коррелирует с функциональной активностью CD40L. Вкратце, клетки HeLa инфицировали онколитическим вирусом осповакцины (без CD40L) или вирусом онколитической осповакцины, экспрессирующим гибридную конструкцию 3sCD40L, содержащую: [домен олигомеризации]-[шейный домен]-[mCD40L] с MOI, равным 1. Надосадочную жидкость инфицированных и неинфицированных клеток собирали через 24 часа. В 96-луночный планшет добавляли 20 мкл, 10 мкл или 1 мкл надосадочной жидкости, в трех повторах в лунки с 20 мкл среды. Рекомбинантный CD40L в концентрации 10 нг/мл использовали в качестве положительного контроля. В лунки добавляли 180 мкл репортерной клеточной линии, чтобы получить около 50 000 клеток на лунку. Клетки инкубировали в течение ночи в CO₂-инкубаторе. На следующий день 1 мл раствора Quanti-Blue добавляли к 1 мл буфера QB и 98 мл стерильной воды и приготовленный реагент распределяли по 180 мкл/лунку в 96-луночный планшет. 20 мкл надосадочной жидкости из экспериментального планшета добавляли в планшет с раствором Quanti blue. После инкубации при 37°C в течение 3 часов относительный уровень SEAP определяли путем измерения оптической плотности (ОП) с использованием планшет-

ридера/спектрофотометра при 625 нМ. Результаты представлены ниже в таблице 8 и визуализированы на фиг. 5.

Таблица 8

	Имитационный контроль	Вирус осповакцины без трансгена (A52R-, ТК-)	Вирус осповакцины с доменом олигомеризации, объединенным с CD40L (ТК-)
20 мкл	0,075	0,087	2,297
10 мкл	0,088	0,039	1,617
1 мкл	0,063	0,07	0,223
контроль: Рекомбинантный CD40L (10 нг/мл)	0,29765 (не показано)		

Неожиданно эти результаты как в примерах 1, так и в примерах 2 показывают, что во внеклеточной среде вырабатывается в 1000 раз больше функционально активного TNFSF-L. В частности, последовательность мономера не продуцировала функционально активный тример даже в культуре клеток, а объединение с каркасными доменами приводило к значительному увеличению продуцирования.

Пример 3. Анализ активности s3CD40L in vivo

Измеряли активность на мышах гибридной конструкции TNFSF-L 3sCD40L (мышь), как описано в примере 1. Мышам BALB/c подкожно имплантировали клетки, полученные из аденокарциномы коры почек в мышях Balb/cCr (RENCA). Опухолям давали вырасти до 50-100 мм³ и обрабатывали 1×10⁷ БОЕ вируса, экспрессирующего гибридную конструкцию 3sCD40L, имеющего делецию ТК (ТК-) или буферный контроль. Обработки проводили внутриопухолево (ИТ) в однократной дозе. За ростом опухоли следили, и мышей исключали из исследования, как только размер опухоли превышал 1000 мм³. Общая выживаемость мышей с опухолями размером до 1000 мм³ показана на фиг. 6. Данные показывают, что мыши, обработанные гибридом TNFSF-L, показали более высокую вероятность выживания по сравнению с мышами, обработанными вирусом ТК- или контрольным буфером.

Пример 4. Функциональная активность S3 OX40L

Измеряли in vitro активность гибридной конструкции TNFSF-L 3sOX40L (человек), как описано в примере 1. Клетки HeLa высевали в 6-луночные планшеты по 1×10⁶ клеток на лунку. Клетки инокулировали при MOI 5,0 вирусом, экспрессирующим гибридную конструкцию 3sOX40L, экспрессирующим m41BBL, как описано в примере 1, в качестве отрицательного контроля или буферного контроля. Клетки инкубировали с вирусом при 37°C, 5% CO₂ в течение 3 часов. Среду удаляли из лунок и клетки промывали DMEM. Добавляли DMEM+10% FBS и планшеты инкубировали в течение 60 часов при 37°C, 5% CO₂. Надосадочные жидкости собирали через 60 часов после замены среды. Экспрессию

люциферазы в инфицированных клетках измеряли с помощью обнаружения люциферазы и выражали в относительных световых единицах (RLU). На фиг. 7 показана более высокая экспрессия в вирусе, имеющем гибридную конструкцию 3OX40L.

Пример 5. Функциональная активность 3s41BBL

Измеряли *in vitro* активность гибридной конструкции TNFSF-L 3s41BBL (человеческая последовательность), как описано в примере 1. Клетки HeLa высевали в 12-луночные планшеты по 4×10^5 клеток на лунку. Клетки инфицировали при MOI 5,0 вирусом, экспрессирующим гибридную конструкцию 3s41BBL, экспрессирующим мономер 41BBL, экспрессирующим несвязанный TNFSF-L, тримерный GITRL или буферный контроль. Клетки инкубировали с вирусом при 37°C, 5% CO₂ в течение 48 часов. Надосадочные жидкости собирали через 48 часов после заражения. Экспрессию люциферазы в инфицированных клетках измеряли с использованием детекции люциферазы и экспрессии в относительных световых единицах (RLU). На фиг. 8 показано, что активна только экспрессируемая вирусом гибридная конструкция 3s41BBL, мономер 41BBL, экспрессируемый вирусом, неактивен.

Пример 6. Секреция IL-2 после стимуляции мышиными последовательностями S3 OX40L и S3 41BBL

Измеряли изменение секреции IL-2 в клетках, инфицированных вирусом, содержащим гибридные конструкции TNFSF-L. Т-клетки CD8 из селезенки мыши очищали с использованием набора для выделения CD8⁺ Т-клеток EasySep™ Mouse (#19853, STEMCELL Technologies, Inc., Ванкувер, Канада). Клетки метили сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE). Затем клетки либо не стимулировали, либо стимулировали только CD3, либо стимулировали CD3 и CD28, рекомбинантным тримером 41BBL, рекомбинантным тримером OX40L, вирусом, экспрессирующим гибридную конструкцию 3s41BBL, вирусом, экспрессирующим гибридную конструкцию 3sOX40L, или отрицательным вирусным контролем. Клетки инкубировали в течение 3 дней. Секрецию IL-2 в надосадочных жидкостях анализировали с использованием набора ELISA для мышинового IL-2. Итоговые обнаруженные уровни IL-2 показаны на фиг. 9. На графике показаны экспрессируемые вирусом гибридные конструкции TNFSF-L 3s41BBL и 3sOX40L функционально активны в том отношении, что они индуцируют экспрессию IL-2.

Пример 7. Ингибирование роста опухолей у мышей с использованием каркасных конструкций 3S41BBL и 3S OX40L

Чтобы продемонстрировать ингибирование роста опухоли (TGI) *in vivo*, мышей BALB/c, ранее индуцированных подкожными опухолями RENCA, как в примере 3,

обрабатывали однократной IT-дозой контрольного буфера или 1×10^7 БОЕ контрольного вируса осповакцины, содержащего только делецию тимидинкиназы (НССТКМ), вируса, экспрессирующего 3s41BBL, или вируса, экспрессирующего 3sOX40L. Предварительные результаты показывают, как показано на фиг. 10, что через 12 дней после обработки средний объем опухоли у мышей, получавших вирус, экспрессирующий либо 3s41BBL, либо 3sOX40L, был ниже, чем у опухолей, обработанных только буфером или НССТКМ.

Пример 8. Ингибирование роста опухолей у мышей с использованием каркасных конструкций GITRL

Чтобы продемонстрировать ингибирование роста опухоли *in vivo* (TGI), мышей BALB/c, ранее индуцированных подкожными опухолями LLC или RENCA, как в примере 3, обрабатывали однократной IT-дозой контрольного буфера (VFB), 1×10^7 БОЕ контрольного вируса осповакцины, содержащего только делецию тимидинкиназы (НССТКМ) или вирус А, экспрессирующего 3sGITRL. Опухоли LLC измеряли через 30 дней, как показано на фиг. 11А. Опухоли RENCA измеряли через 17 дней, как показано на фиг. 11В. Результаты показывают, что средний объем опухоли у мышей, получавших вирус, экспрессирующий 3sGITRL, был ниже, чем у опухолей, обработанных только буфером или контрольным НССТКМ.

Вышеприведенное описание и сопроводительные чертежи представляют ряд типичных воплощений на настоящее время. Различные модификации, дополнения и альтернативные конструкции, конечно, станут очевидными для специалистов в данной области техники в свете предшествующих идей, не выходя за пределы объема настоящего раскрытия, который указан в представленной ниже формуле изобретения, а не в предшествующем описании. Все изменения и вариации, попадающие в смысл и диапазон эквивалентности формулы изобретения, должны охватываться ее объемом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, отличающаяся тем, что композиция включает:
нуклеиновую кислоту, причем нуклеиновая кислота кодирует гибридный белок, причем гибридный белок включает:
лиганд суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант; и
множество доменов из белка семейства коллектинов, причем множество доменов из белка семейства коллектинов включает:
домен олигомеризации или его функциональный вариант; и
шейный домен или его функциональный вариант,
при этом домен олигомеризации или его функциональный вариант и шейный домен или его функциональный вариант находятся ближе по последовательности по сравнению с их расположением в белке семейства коллектинов.
2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что гибридный белок включает в порядке от N-конца к C-концу:
 1. Композиция, отличающаяся тем, что композиция включает:
домен олигомеризации или его функциональный вариант;
шейный домен или его функциональный вариант;
необязательно, линкерную последовательность; и
TNFSF-L или его функциональный вариант.
3. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что TNFSF-L включает лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, 4-1BBL, TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А или любую их комбинацию.
4. Композиция по п. 3, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд CD40.
5. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что лиганд CD40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1.
6. Композиция по п. 3, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд OX40.

7. Композиция по п. 6, отличающаяся тем, что лиганд OX40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

8. Композиция по п. 3, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой 4-1BBL.

9. Композиция по п. 8, отличающаяся тем, что 4-1BBL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

10. Композиция по п. 3, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой LIGHT.

11. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что LIGHT включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 6.

12. Композиция по п. 3, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL).

13. Композиция по п. 12, отличающаяся тем, что GITRL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

14. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что белок семейства коллектинов представляет собой SP-A, SP-D, маннозосвязывающий лектин (MBL), конглутинин, CL-43, CL-L1, CL-K1, CL-P1 или CL-46.

15. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что белок семейства коллектинов представляет собой SP-D.

16. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что домен олигомеризации включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 9.

17. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что домен олигомеризации и шейный домен вместе включают последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 10.

18. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что домен олигомеризации и шейный домен вместе включают SEQ ID NO: 10.

19. Композиция по п. 2, отличающаяся тем, что гибридный белок включает линкерную последовательность, и при этом указанная линкерная последовательность включает GSG (глицин-серин-глицин) (SEQ ID NO: 12).

20. Композиция по любому из пп. 1-19, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота включает РНК.

21. Композиция по любому из пп. 1-19, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота включает ДНК.

22. Композиция, отличающаяся тем, что композиция включает:
нуклеиновую кислоту, причем нуклеиновая кислота включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

23. Композиция, отличающаяся тем, что композиция включает:
гибридный белок, причем гибридный белок включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

24. Композиция, отличающаяся тем, что композиция включает:
вектор; и
нуклеиновую кислоту, кодирующую лиганд суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант, где TNFSF-L или его функциональный вариант объединен с доменом олигомеризации.

25. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота кодирует гибридный белок, причем гибридный белок включает:

лиганд суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант; и
множество доменов из белка семейства коллектинов, причем множество доменов из белка семейства коллектинов включает:

домен олигомеризации или его функциональный вариант; и
шейный домен или его функциональный вариант,
при этом домен олигомеризации или его функциональный вариант и шейный домен или его функциональный вариант находятся ближе по последовательности по сравнению с их расположением в белке семейства коллектинов.

26. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что вектор представляет собой вирусный вектор или невирусный вектор.

27. Композиция по п. 26, отличающаяся тем, что невирусный вектор включает носитель из наночастиц.

28. Композиция по п. 26, отличающаяся тем, что невирусный вектор включает носитель из липидных наночастиц.

29. Композиция по п. 27, отличающаяся тем, что носитель из наночастиц включает золото, кремнезем, углеродные нанотрубки, водорастворимые фуллерены, кремниевые нанопроволоки, квантовые точки или любую их комбинацию.

30. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что вектор включает бактериофаг, вирусоподобные частицы (VLP), тени эритроцитов, бактофекцию, экзосомы или любую их комбинацию.

31. Композиция по п. 25, отличающаяся тем, что гибридный белок включает в порядке от N-конца к C-концу:

домен олигомеризации или его функциональный вариант;

шейный домен или его функциональный вариант;

необязательно, линкерную последовательность; и

TNFSF-L или его функциональный вариант.

32. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что TNFSF-L включает лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, 4-1BBL, TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А или любую их комбинацию.

33. Композиция по п. 32, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд CD40.

34. Композиция по п. 33, отличающаяся тем, что лиганд CD40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1.

35. Композиция по п. 32, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд OX40.

36. Композиция по п. 35, отличающаяся тем, что лиганд OX40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

37. Композиция по п. 32, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой 4-1BBL.

38. Композиция по п. 37, отличающаяся тем, что 4-1BBL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

39. Композиция по п. 32, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой LIGHT.

40. Композиция по п. 39, отличающаяся тем, что LIGHT включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 6.

41. Композиция по п. 32, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL).

42. Композиция по п. 41, отличающаяся тем, что GITRL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

43. Композиция по п. 25, отличающаяся тем, что белок семейства коллектинов включает SP-A, SP-D, маннозосвязывающий лектин (MBL), конглутинин, CL-43, CL-L1, CL-K1, CL-P1 или CL-46.

44. Композиция по п. 43, отличающаяся тем, что белок семейства коллектинов представляет собой SP-D.

45. Композиция по п. 24, отличающаяся тем, что домен олигомеризации включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 9.

46. Композиция по п. 25, отличающаяся тем, что домен олигомеризации и шейный домен вместе включают последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 10.

47. Композиция по п. 25, отличающаяся тем, что домен олигомеризации и шейный домен вместе включают SEQ ID NO: 10.

48. Композиция по п. 31, отличающаяся тем, что гибридный белок включает линкерную последовательность, и при этом указанная линкерная последовательность включает GSG (глицин-серин-глицин) (SEQ ID NO: 12).

49. Композиция по любому из пп. 24-48, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота включает РНК.

50. Композиция по любому из пп. 24-48, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота включает ДНК.

51. Композиция, отличающаяся тем, что композиция включает:

вектор; и

нуклеиновую кислоту, причем нуклеиновая кислота включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27.

52. Композиция, отличающаяся тем, что композиция включает:

вектор; и

нуклеиновую кислоту, причем нуклеиновая кислота кодирует белок, содержащий последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

53. Клетка, причем клетка включает композицию по любому из пп. 1-52.

54. Клетка по п. 53, отличающаяся тем, что клетка представляет собой иммунную клетку.

55. Клетка по п. 54, отличающаяся тем, что иммунная клетка представляет собой лимфоидную клетку.

56. Гибридный белок, причем гибридный белок включает:

лиганд суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант; и

множество доменов из белка семейства коллектинов, причем множество доменов из белка семейства коллектинов включает:

домен олигомеризации или его функциональный вариант; и

шейный домен или его функциональный вариант,

при этом домен олигомеризации или его функциональный вариант и шейный домен или его функциональный вариант находятся ближе по последовательности по сравнению с их расположением в белке семейства коллектинов.

57. Гибридный белок по п. 56, отличающийся тем, что гибридный белок включает следующее, в порядке от N-конца к C-концу:

домен олигомеризации или его функциональный вариант;

шейный домен или его функциональный вариант;

необязательно, линкерную последовательность; и

TNFSF-L или его функциональный вариант.

58. Гибридный белок по п. 56, отличающийся тем, что TNFSF-L включает лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, 4-1BBL, TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А или любую их комбинацию.

59. Гибридный белок по п. 58, отличающийся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд CD40.

60. Гибридный белок по п. 59, отличающийся тем, что лиганд CD40 имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 1.

61. Гибридный белок по п. 58, отличающийся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд OX40.

62. Гибридный белок по п. 61, отличающийся тем, что лиганд OX40 имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

63. Гибридный белок по п. 58, отличающийся тем, что TNFSF-L представляет собой 4-1BBL.

64. Гибридный белок по п. 63, отличающийся тем, что 4-1BBL имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

65. Гибридный белок по п. 58, отличающийся тем, что TNFSF-L представляет собой LIGHT.

66. Гибридный белок по п. 65, отличающийся тем, что последовательность LIGHT по меньшей мере на 85% идентична SEQ ID NO: 6.

67. Композиция по п. 58, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL).

68. Композиция по п. 67, отличающаяся тем, что GITRL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

69. Гибридный белок по п. 56, отличающийся тем, что белок семейства коллектинов включает SP-A, SP-D, маннозосвязывающий лектин (MBL), конглютинин, CL-43, CL-L1, CL-K1, CL-P1, CL-46, или любую их комбинацию.

70. Гибридный белок по п. 56, отличающийся тем, что белок семейства коллектинов представляет собой SP-D.

71. Гибридный белок по п. 56, отличающийся тем, что домен олигомеризации имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 9.

72. Гибридный белок по п. 56, отличающийся тем, что домен олигомеризации и шейный домен вместе имеют по меньшей мере 85% идентичности последовательности SEQ ID NO: 10.

73. Гибридный белок по п. 56, отличающийся тем, что домен олигомеризации и шейный домен вместе включают SEQ ID NO: 10.

74. Гибридный белок по п. 57, отличающийся тем, что гибридный белок включает линкерную последовательность, и при этом указанная линкерная последовательность включает GSG (глицин-серин-глицин) (SEQ ID NO: 12).

75. Онколитический вирус, причем онколитический вирус включает:

экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую лиганд суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант, где TNFSF-L или его функциональный вариант объединен с доменом олигомеризации.

76. Онколитический вирус по п. 75, отличающийся тем, что онколитический вирус представляет собой вирус болезни Ньюкасла (NDV), реовирус (RV), вирус миксомы (MYXV), вирус кори (MV), вирус простого герпеса (HSV), вирус осповакцины (VV), вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус полиомиелита (PV), вирус Сендай, флавивирус, лентивирус, вирус оспы, ретровирус, аденоассоциированный вирус или аденовирус.

77. Онколитический вирус по п. 75, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая TNFSF-L или его функциональный вариант, встроена в вирусный геном.

78. Онколитический вирус по п. 75, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая TNFSF-L или его функциональный вариант, встроена в ген тимидинкиназы.

79. Онколитический вирус по п. 75, отличающийся тем, что TNFSF-L включает лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, 4-1BBL, TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А или любую их комбинацию.

80. Онколитический вирус по п. 79, отличающийся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд CD40.

81. Онколитический вирус по п. 80, отличающийся тем, что лиганд CD40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1.

82. Онколитический вирус по п. 79, отличающийся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд OX40.

83. Онколитический вирус по п. 82, отличающийся тем, что лиганд OX40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

84. Онколитический вирус по п. 79, отличающийся тем, что TNFSF-L представляет собой 4-1BBL.

85. Онколитический вирус по п. 84, отличающийся тем, что 4-1BBL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

86. Онколитический вирус по п. 79, отличающийся тем, что TNFSF-L представляет собой LIGHT.

87. Онколитический вирус по п. 86, отличающийся тем, что LIGHT включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 6.

88. Композиция по п. 79, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL).

89. Композиция по п. 88, отличающаяся тем, что GITRL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

90. Онколитический вирус по п. 75, отличающийся тем, что домен олигомеризации включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 9.

91. Онколитический вирус по любому из пп. 75-90, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота включает РНК.

92. Онколитический вирус по любому из пп. 75-90, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота включает ДНК.

93. Вирус осповакцины, причем вирус осповакцины включает: экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую лиганд суперсемейства TNF (TNFSF-L) или его функциональный вариант, где TNFSF-L или его функциональный вариант объединен с доменом олигомеризации.

94. Вирус осповакцины по п. 93, отличающийся тем, что вирус осповакцины представляет собой модифицированный штамм вируса осповакцины Western Reserve (ATCC VR-1354), штамм Copenhagen, вирус осповакцины Ankara (ATCC VR-1508), вирус осповакцины Ankara (ATCC VR-1566), рекомбинантный вирус осповакцины Ankara (MVA), штамм NYVAC, штамм вируса осповакцины Wyeth (ATCC VR-1536), вирус осповакцины Wyeth (ATCC VR-325), штамм Wyeth (NYCBOH), штамм Tian Tan, штамм Lister, штамм USSR и штамм Evans.

95. Вирус осповакцины по п. 93, отличающийся тем, что экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая TNFSF-L или его функциональный вариант, встроена в вирусный геном.

96. Вирус осповакцины по п. 93, отличающийся тем, что экзогенная нуклеиновая кислота, кодирующая TNFSF-L или его функциональный вариант, встроена в ген тимидинкиназы.

97. Вирус осповакцины по п. 93, отличающийся тем, что TNFSF-L включает лимфотоксин альфа, лиганд OX40, лиганд CD40, лиганд Fas, лиганд CD27, лиганд CD30, 4-1BBL, TNF-связанный лиганд, индуцирующий апоптоз (TRAIL), лиганд рецептора-активатора ядерного фактора каппа-B (RANKL), слабый индуктор апоптоза, связанный с TNF, лиганд, индуцирующий пролиферацию (APRIL), фактор активации В-клеток (BAFF), LIGHT, ингибитор роста эндотелия сосудов (VEGI), лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL), эктодисплазин А или любую их комбинацию.

98. Вирус осповакцины по п. 97, отличающийся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд CD40.

99. Вирус осповакцины по п. 98, отличающийся тем, что лиганд CD40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 1.

100. Вирус осповакцины по п. 97, отличающийся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд OX40.

101. Вирус осповакцины по п. 100, отличающийся тем, что лиганд OX40 включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 3.

102. Вирус осповакцины по п. 97, отличающийся тем, что TNFSF-L представляет собой 4-1BBL.

103. Вирус осповакцины по п. 102, отличающийся тем, что 4-1BBL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

104. Вирус осповакцины по п. 97, отличающийся тем, что TNFSF-L представляет собой LIGHT.

105. Вирус осповакцины по п. 104, отличающийся тем, что LIGHT включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 6.

106. Композиция по п. 97, отличающаяся тем, что TNFSF-L представляет собой лиганд 18-го представителя суперсемейства TNF (GITRL).

107. Композиция по п. 106, отличающаяся тем, что GITRL включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 7 или SEQ ID NO: 8.

108. Вирус осповакцины по п. , отличающийся тем, что домен олигомеризации включает последовательность, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 9.

109. Вирус осповакцины по любому из пп. 93-108, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота включает РНК.

110. Вирус осповакцины по любому из пп. 93-108, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота включает ДНК.

111. Способ лечения онкологического заболевания, включающий:

введение фармацевтической композиции субъекту в количестве, достаточном для лечения онкологического заболевания, причем фармацевтическая композиция включает:

композицию, клетку, гибридный белок, онколитический вирус или вирус осповакцины по любому из пп. 1-110.

112. Способ по п. 111, отличающийся тем, что онкологическое заболевание включает гемобластоз или солидную злокачественную опухоль.

113. Способ по п. 111, отличающийся тем, что онкологическое заболевание включает меланому, гепатоцеллюлярную карциному, рак молочной железы, рак легкого, рак брюшины, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак яичников, лейкоз, лимфому, карциному почки, рак поджелудочной железы, эпителиальную карциному, рак желудка, карциному ободочной кишки, рак двенадцатиперстной кишки, аденокарциному поджелудочной железы, мезотелиому, мультиформную глиобластому, астроцитому, множественную миелому, карциному предстательной железы, гепатоцеллюлярную карциному, холангиосаркому, аденокарциному поджелудочной железы, плоскоклеточную карциному головы и шеи, колоректальный рак, аденокарциному желудка кишечного типа, плоскоклеточную карциному шейки матки, остеосаркому, эпителиальную карциному яичников, острую лимфобластную лимфому, миелопролиферативное новообразование или саркому.

114. Способ по п. 111, отличающийся тем, что онкологическое заболевание включает злокачественную опухоль мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, головного мозга, молочной железы, ободочной кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десен, головы, почек, печени, легкого, носоглотки, шеи, яичников, предстательной железы, кожи, желудка, яичка, языка или матки.

115. Способ по п. 111, отличающийся тем, что введение включает системное введение или местное введение.

116. Способ по п. 111, отличающийся тем, что введение включает внутриопухолевое введение, внутривенное введение, региональное введение, внутрибрюшинное введение, парентеральное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутриартериальное введение или любую их комбинацию.

117. Способ по п. 111, отличающийся тем, что введение включает внутриопухолевое введение.

118. Способ по п. 111, отличающийся тем, что фармацевтическая композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

119. Способ по п. 118, отличающийся тем, что фармацевтически приемлемый носитель включает буфер, эмульсию, биоадсорбируемый полимер, гель или любую их комбинацию.

120. Способ по п. 111, отличающийся тем, что композицию, клетку или гибридный белок вводят в дозе от около 0,01 мкг/дозу до около 1 г/дозу.

121. Способ по п. 111, отличающийся тем, что онколитический вирус или вирус осповакцины вводят в дозе от около 10^3 до около 10^{12} БОЕ/дозу.

122. Способ по п. 111, отличающийся тем, что фармацевтическую композицию вводят в цикле лечения, включающем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доз.

123. Способ по п. 122, отличающийся тем, что каждую дозу вводят в течение около 1 минуты, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 1 дня или более.

124. Способ по п. 123, отличающийся тем, что каждая доза не зависит от любых других доз.

125. Способ по п. 122, отличающийся тем, что две или более дозы в цикле лечения разделены интервалом приема, в котором дозы не вводятся.

126. Способ по п. 125, отличающийся тем, что интервал введения дозы составляет около 1 минуты, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 1 дня, около 2 дней, около 3 дней, около 4 дней, около 5 дней., около 6 дней, около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 7 месяцев, около 8 месяцев, около 9 месяцев, около 10 месяцев, около 11 месяцев, около 1 года и более.

127. Способ по п. 126, отличающийся тем, что каждый интервал доз не зависит от любого другого интервала доз.

128. Способ уменьшения роста опухолевых клеток, включающий:

введение в опухолевую клетку в количестве, достаточном для уменьшения роста опухолевых клеток, композиции, клетки, гибридного белка, онколитического вируса или вируса осповакцины по любому из пп. 1-110.

129. Способ по п. 128, отличающийся тем, что опухоль представляет собой жидкую опухоль или солидную опухоль.

130. Способ по п. 128, отличающийся тем, что опухоль включает меланому, гепатоцеллюлярную карциному, опухоль молочной железы, опухоль легкого, опухоль брюшины, опухоль предстательной железы, опухоль мочевого пузыря, опухоль яичника, лейкоз, лимфому, карциному почки, опухоль поджелудочной железы, эпителиальную карциному, опухоль желудка, карциному ободочной кишки, опухоль двенадцатиперстной кишки, аденокарциному поджелудочной железы, мезотелиому, мультиформную глиобластому, астроцитому, множественную миелому, карциному предстательной железы, гепатоцеллюлярную карциному, холангиосаркому, аденокарциному поджелудочной железы, плоскоклеточную карциному головы и шеи, колоректальную опухоль, аденокарциному желудка кишечного типа, плоскоклеточную карциному шейки матки, остеосаркому, эпителиальную карциному яичников, острую лимфобластную лимфому, миелопролиферативное новообразование или саркому.

131. Способ по п. 128, отличающийся тем, что опухоль включает опухоль мочевого пузыря, крови, кости, костного мозга, головного мозга, молочной железы, ободочной кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десен, головы, почек, печени, легкого, носоглотки, шеи, яичников, предстательной железы, кожи, желудка, яичка, языка или матки.

132. Способ по п. 128, отличающийся тем, что введение включает системное введение или местное введение.

133. Способ по п. 128, отличающийся тем, что введение включает внутриопухолевое введение, внутривенное введение, региональное введение, внутрибрюшинное введение, парентеральное введение, внутримышечное введение, подкожное введение, внутриартериальное введение или любую их комбинацию.

134. Способ по п. 128, отличающийся тем, что введение включает внутриопухолевое введение.

135. Способ по п. 128, отличающийся тем, что композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

136. Способ по п. 135, отличающийся тем, что фармацевтически приемлемый носитель включает буфер, эмульсию, биоадсорбируемый полимер, гель или любую их комбинацию.

137. Способ по п. 128, отличающийся тем, что композицию, клетку или гибридный белок вводят в дозе от около 0,01 мкг/дозу до около 1 г/дозу.

138. Способ по п. 128, отличающийся тем, что онколитический вирус или вирус осповакцины вводят в дозе от около 10^3 до около 10^{12} БОЕ/дозу.

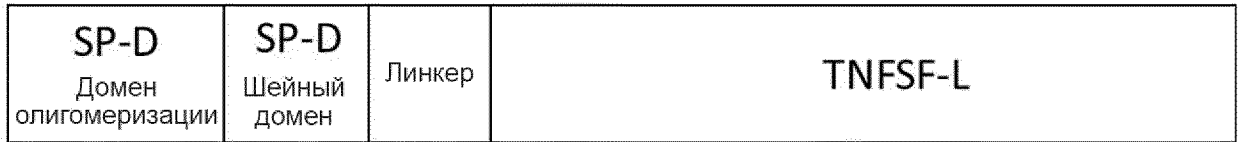
139. Способ по п. 128, отличающийся тем, что введение осуществляется в цикле лечения, включающем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доз.

140. Способ по п. 139, отличающийся тем, что каждую дозу вводят в течение около 1 минуты, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 1 дня или более.

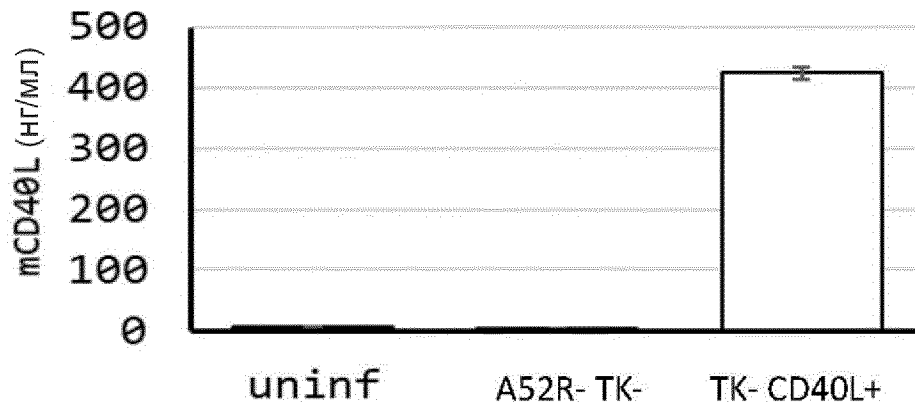
141. Способ по п. 139, отличающийся тем, что две или более дозы разделены интервалом между дозами, при котором дозы не вводятся.

142. Способ по п. 141, отличающийся тем, что интервал введения дозы составляет около 1 минуты, около 1 часа, около 2 часов, около 3 часов, около 4 часов, около 1 дня, около 2 дней, около 3 дней, около 4 дней, около 5 дней, около 6 дней, около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 4 недель, около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 7 месяцев, около 8 месяцев, около 9 месяцев, около 10 месяцев, около 11 месяцев, около 1 года и более.

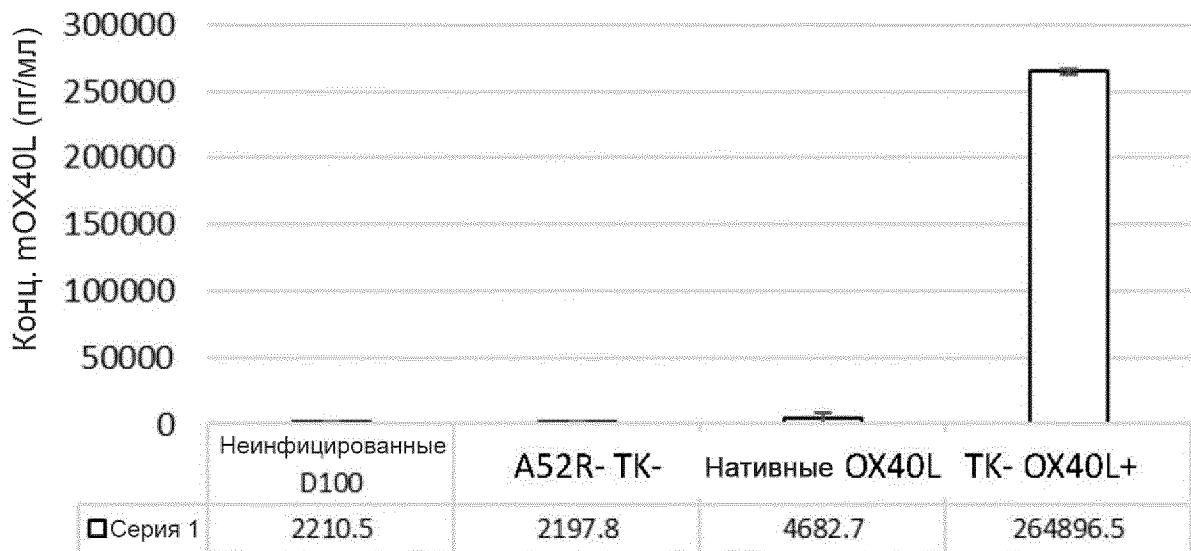
143. Способ по п. 142, отличающийся тем, что каждый интервал доз не зависит от любого другого интервала доз.



Фиг. 1



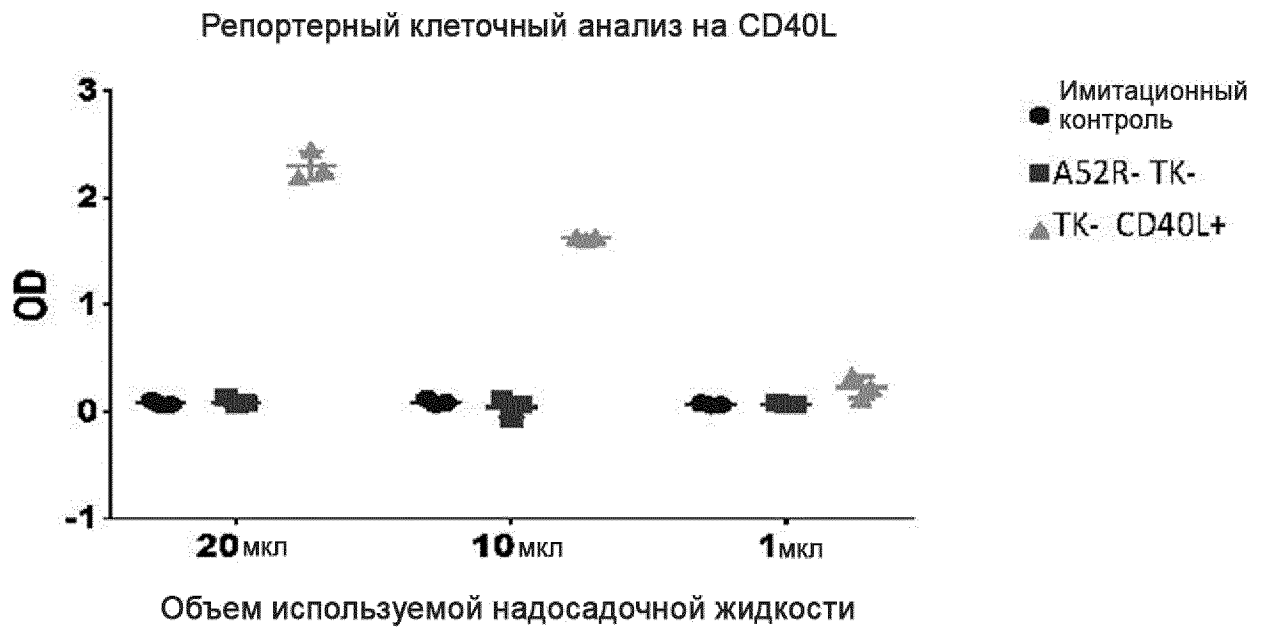
Фиг. 2



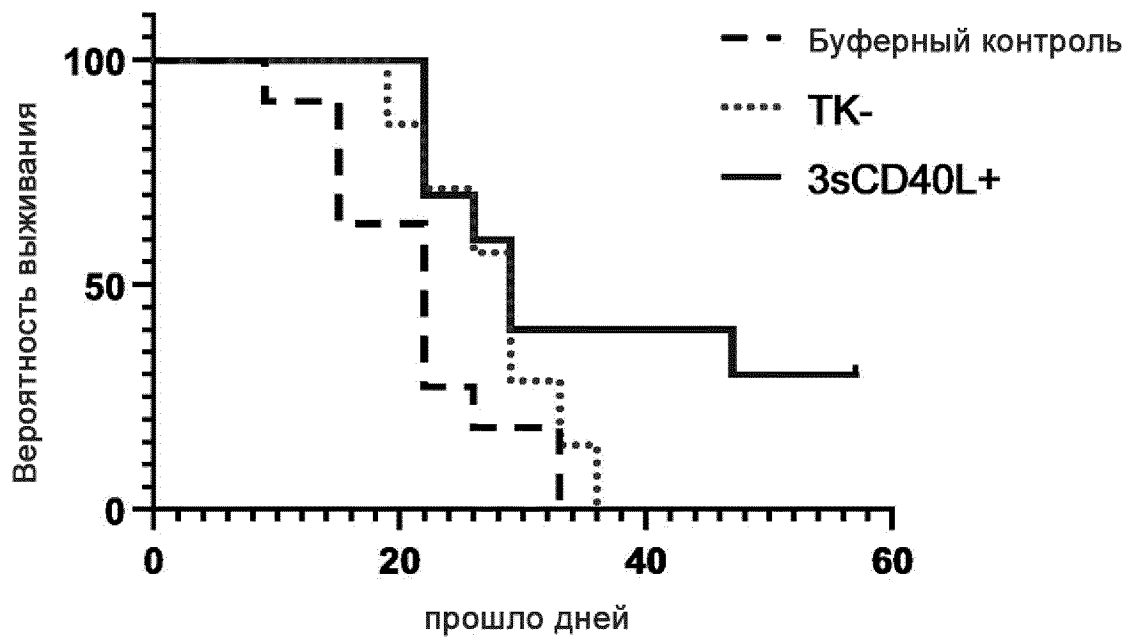
Фиг. 3



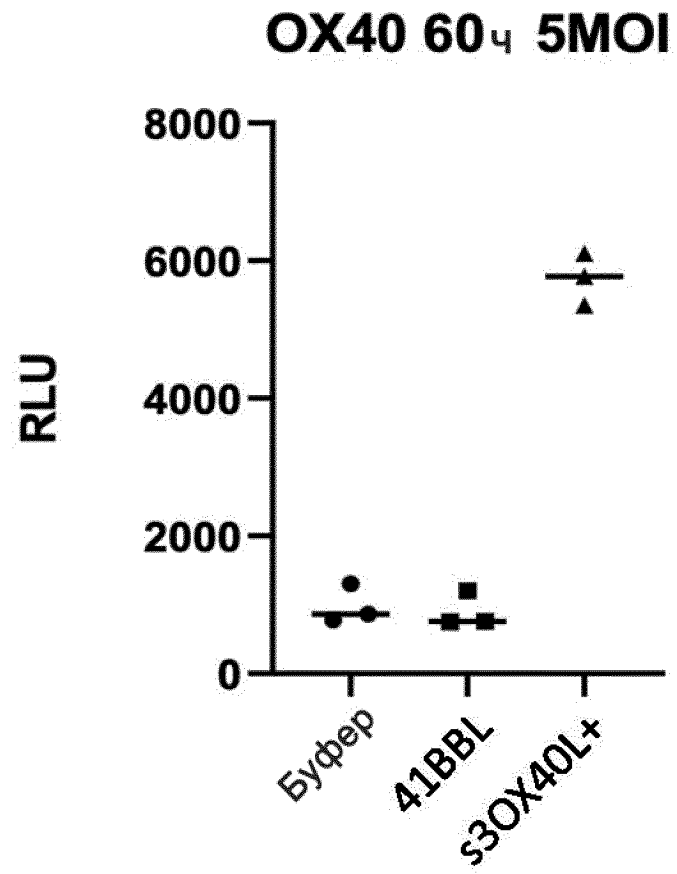
Фиг. 4



Фиг. 5

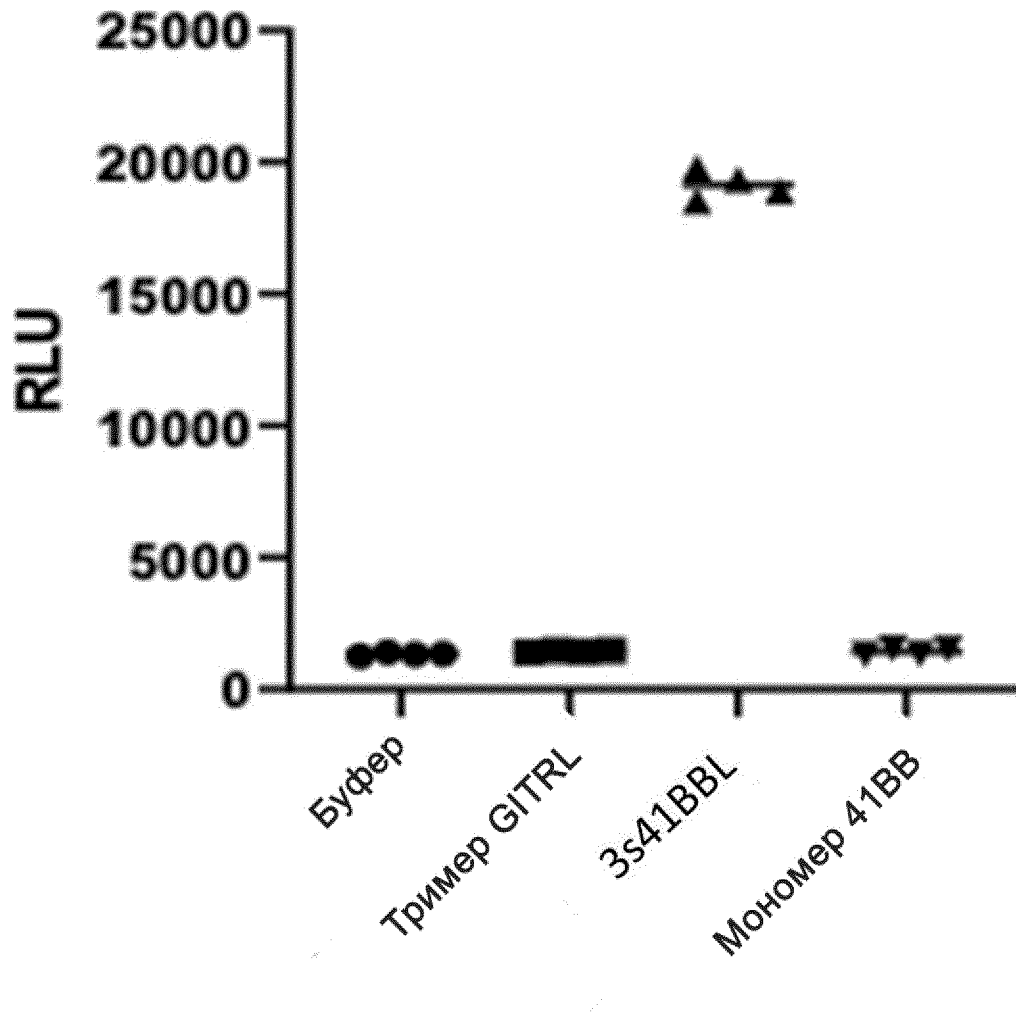


Фиг. 6

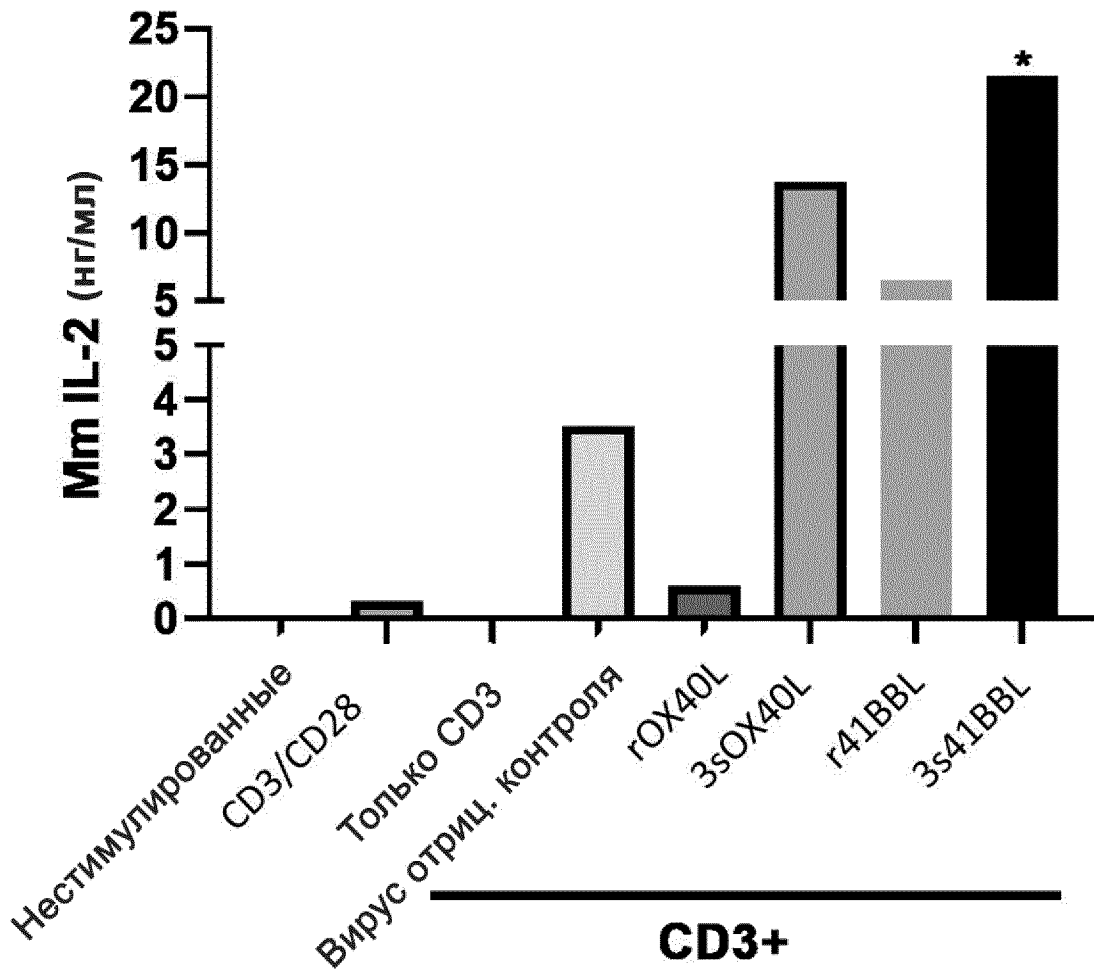


Фиг. 7

Функциональный анализ 41BB

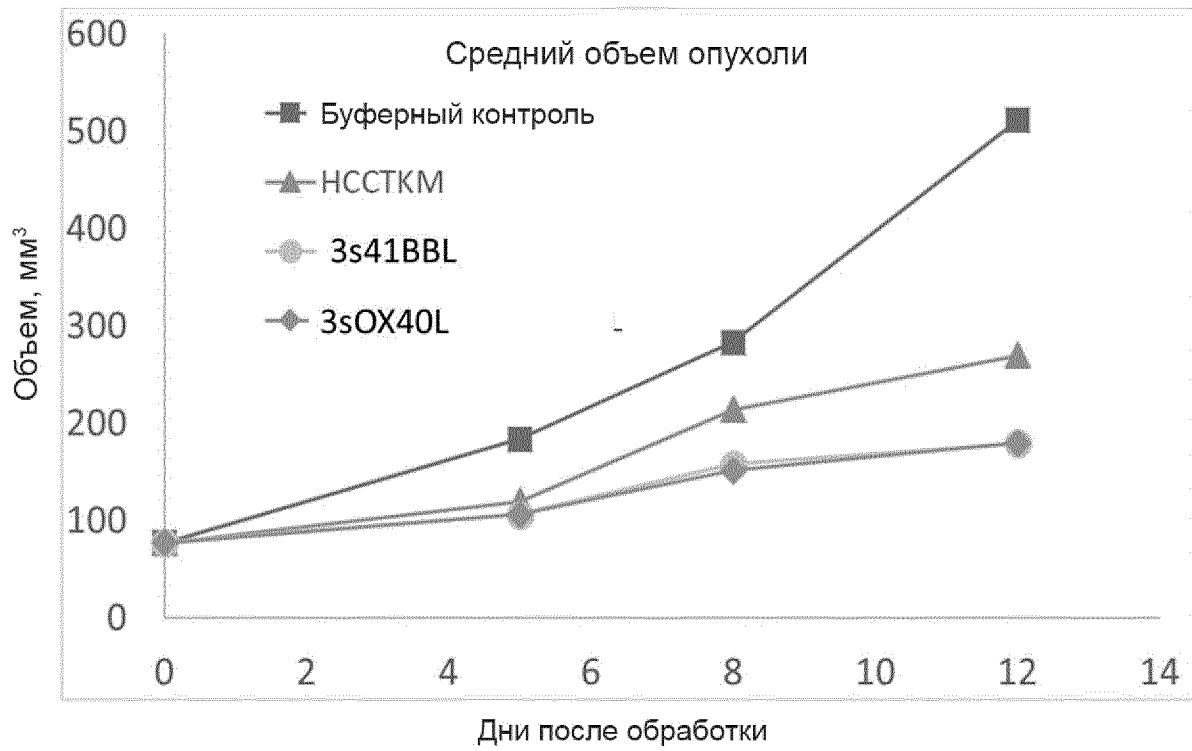


Фиг. 8

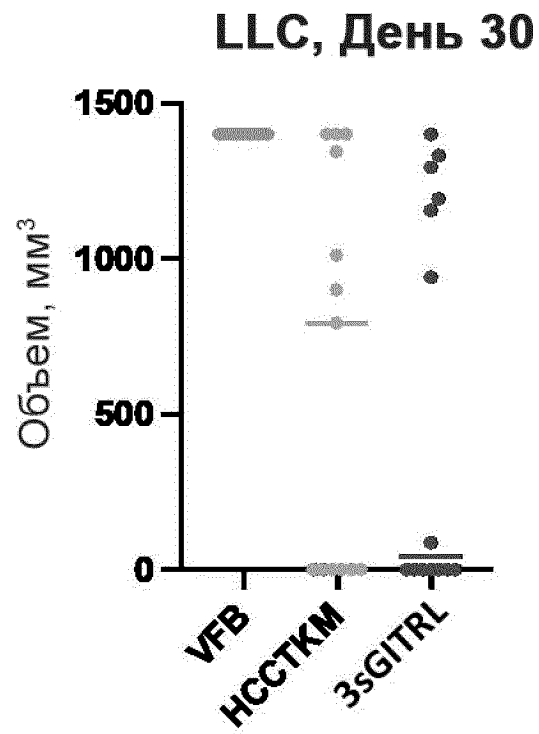


* Превышен верхний предел обнаружения

ФИГ. 9

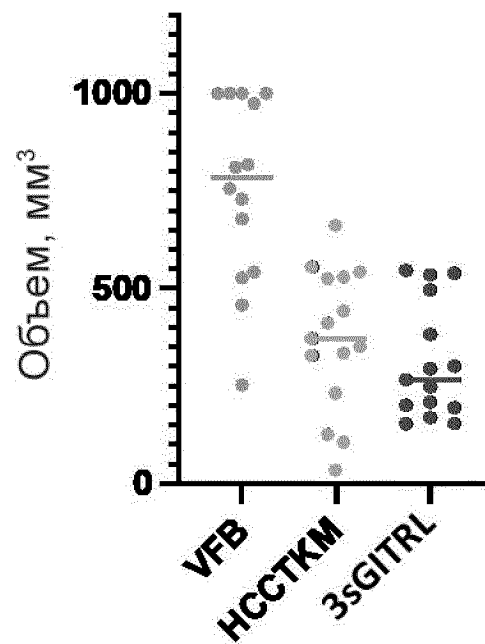


Фиг. 10



Фиг. 11А

Ренса, 17 день



Фиг. 11В