

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490071 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.03.06

(51) Int. Cl. A61K 35/768 (2015.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.07.18

(54) КОМБИНАЦИЯ ИНГИБИТОРОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК И ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

(31) 63/223,281; 63/365,030

(72) Изобретатель:

(32) 2021.07.19; 2022.05.20

Дади-Мехметадж Саида, Мохрс
Маркус, Терстон Гэвин (US)

(33) US

(86) PCT/US2022/073845

(74) Представитель:

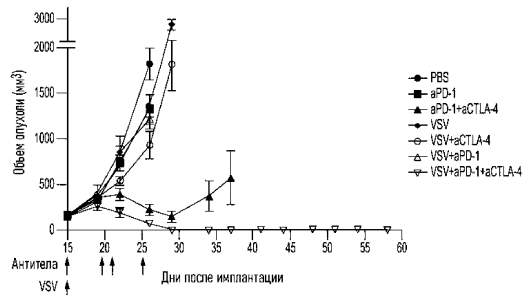
(87) WO 2023/004287 2023.01.26

Джермакян Р.В., Гизатуллина Е.М.,
Угрюмов В.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (RU)

(71) Заявитель:

РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК.; ВИРИАД, ИНК. (US)

(57) Изобретение относится к новым трехкомпонентным комбинированным терапиям из онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и ингибитора CTLA4 для лечения и ингибирования роста опухоли у пациента с раком.



202490071 A1

202490071 A1

КОМБИНАЦИЯ ИНГИБИТОРОВ КОНТРОЛЬНЫХ ТОЧЕК И ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВИРУСА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

ОПИСАНИЕ

Область техники, к которой относится настоящее изобретение

[001] Настоящее раскрытие в целом относится к комбинированным терапиям для лечения рака с помощью онколитических вирусов и ингибиторов контрольных точек, таких как ингибиторы пути запрограммированной гибели 1 (programmed death 1, PD-1) и ингибиторы антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4, CTLA4).

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[002] До недавнего времени иммунотерапия рака сосредоточивала значительные усилия на подходах, которые усиливают противоопухолевые иммунные ответы путем адоптивного переноса активированных эффекторных клеток, иммунизации против соответствующих антигенов или предоставления неспецифических иммуностимулирующих средств, таких как цитокины. Однако в последнее десятилетие интенсивные усилия по разработке специфических ингибиторов пути иммунных контрольных точек начали обеспечивать новые иммунотерапевтические подходы к лечению рака, включая разработку анти-PD-1 антител и анти-CTLA4 антител.

[003] PD-1 (также известная как CD279) играет важную роль в аутоиммунитете, иммунитете против инфекции и противоопухолевом иммунитете. При лечении рака и хронических вирусных инфекций изучали блокирование PD-1 с помощью антагонистов, включая моноклональное антитела. Блокада PD-1 также является эффективным и хорошо переносимым подходом к стимуляции иммунного ответа и обеспечивает терапевтическое преимущество в отношении различных видов рака человека, включая меланому, почечно-клеточный рак (renal cell cancer, RCC) и немелкоклеточный рак легких (non-small cell lung cancer, NSCLC). (Sheridan 2012, *Nat. Biotechnol.*, 30:729-730; Postow *et al.*, 2015, *J Clin Oncol*, 33:1974-1982).

[004] CTLA4 (также известный как CD152) представляет собой трансмембранный Т-клеточный ингибирующий рецептор контрольной точки типа I, экспрессируемый на обычных и регуляторных Т-клетках. CTLA4 отрицательно регулирует активацию Т-клеток, выигрывая конкуренцию за связывание стимулирующего рецептора CD28 с их общими природными лигандами B7-1 (CD80) и B7-2 (CD86).

[005] Первоначальная активация Т-клеток достигается путем стимуляции Т-клеточных рецепторов (T-cell receptor, TCR), которые распознают специфические пептиды, представляемые белками главного комплекса гистосовместимости класса I или II (major histocompatibility complex, MHC I или MHC II) белки на антигенпрезентирующих клетках (antigen-presenting cells, APC) (Goldrath et al. 1999, *Nature* 402: 255-262). Активированный комплекс TCR в свою очередь инициирует каскад сигнальных событий, управляемых промоторами, регулирующими экспрессию различных факторов транскрипции, таких как белок-активатор 1 (activator-protein 1, AP-1), ядерный фактор активированных Т-клеток (Nuclear Factor of Activated T-cells, NFAT) или ядерный фактор энхансера легкой цепи каппа активированных В-клеток (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-kappa-B). Затем Т-клеточный ответ дополнительно модулируется за счет вовлечения костимулирующих или коингибирующих рецепторов, экспрессируемых либо конститутивно, либо индуцируемо на Т-клетках, таких как CD28, CTLA4, PD-1, ген активации лимфоцитов 3 (Lymphocyte-Activation Gene 3, LAG-3), или других молекул (Sharpe et al. 2002, *Nat. Rev. Immunol.* 2: 116-126).

[006] Онколитические вирусы также перспективны для лечения рака. Эти вирусы инфицируют злокачественные клетки, специфически реплицируются в них и убивают их, не затрагивая нормальные ткани. Некоторые онколитические вирусы достигли продвинутых стадий клинической оценки для лечения различных новообразований. Однако подавление иммунитета опухолями и преждевременный клиренс вируса часто приводят лишь к слабым опухолеспецифическим иммунным ответам, что ограничивает потенциал этих вирусов в качестве противораковых средств.

[007] Соответственно, существует острая потребность в более эффективных терапиях для лечения рака, включая, как раскрыто в настоящем документе, комбинированные терапии, содержащие онколитический вирус и ингибиторы контрольных точек, такие как ингибиторы пути PD-1 и ингибиторы CTLA4.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

[008] Согласно одному аспекту раскрытая технология относится к способу лечения или ингибирования роста опухоли, предусматривающему: (a) выбор пациента с раком; и (b) введение нуждающемуся в этом пациенту: (i) терапевтически эффективного количества онколитического вируса в комбинации с (ii) терапевтически эффективным количеством ингибитора пути запрограммированной гибели 1 (PD-1) и (iii) терапевтически эффективным количеством ингибитора антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA4). Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус относится

к онколитическому везикуловирусу. Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический везикуловирус относится к онколитическому вирусу везикулярного стоматита (vesicular stomatitis virus, VSV). Согласно некоторым вариантам осуществления VSV относится к рекомбинантному VSV. Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантный VSV включает в себя одну или несколько мутаций, таких как замена M51R. Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантный VSV экспрессирует цитокин. Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантный VSV содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую иммуностимулирующую молекулу, такую как цитокин.

[009] Согласно некоторым вариантам осуществления цитокин относится к интерферону-бета (IFN β), такому как человеческий или мышинный IFN β или их вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IFN β , расположена между вирусными генами M и G.

[010] Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантный VSV дополнительно экспрессирует натрий/йодидный симпортер (NIS). Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантный VSV дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую натрий/йодидный симпортер (NIS) или его вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая NIS, расположена между вирусными генами G и L. Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус представляет собой Voyager V1. Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус, ингибитор пути PD-1 и ингибитор CTLA4 вводят пациенту одновременно. Согласно некоторым вариантам осуществления одну или несколько доз онколитического вируса вводят последовательно в комбинации с одной или несколькими дозами ингибитора пути PD-1 и одной или несколькими дозами ингибитора CTLA4.

[011] Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус вводят пациенту до или после ингибитора пути PD-1 и/или ингибитора CTLA4. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор пути PD-1 вводят пациенту до или после онколитического вируса и/или ингибитора CTLA4. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор CTLA4 вводят пациенту до или после онколитического вируса и/или ингибитора пути PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно средство из онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4 вводят пациенту один раз в день, один раз в два дня, один раз в три дня, один раз в четыре дня, один раз в пять дней, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели. Согласно некоторым вариантам осуществления дозу онколитического вируса,

ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4 вводят пациенту в период от 1 дня до 12 недель после непосредственно предшествующей дозы онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4, соответственно.

[012] Согласно некоторым вариантам осуществления одна или несколько доз ингибитора CTLA4 включают в себя однократную дозу ингибитора CTLA4, причем введение однократной дозы ингибитора CTLA4 приводит к противоопухолевой эффективности, сравнимой с противоопухолевой эффективностью при комбинированной терапии, включающей в себя две или более дозы ингибитора CTLA4.

[013] Согласно некоторым вариантам осуществления противоопухолевая эффективность характеризуется уменьшением среднего или усредненного объема опухоли, процентной выживаемости, количества пациентов без опухолей в каждой группе лечения или их комбинации. Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус вводят пациенту в виде одной или нескольких доз 10^4 - 10^{14} TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infectious Dose, инфицирующая 50% тканевой культуры доза), 10^4 - 10^{12} TCID₅₀, 10^6 - 10^{12} TCID₅₀, 10^8 - 10^{14} TCID₅₀, 10^8 - 10^{12} TCID₅₀ или 10^{10} - 10^{12} TCID₅₀. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор пути PD-1 вводят пациенту в виде одной или нескольких доз от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг массы тела пациента. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор пути PD-1 вводят пациенту в виде одной или нескольких доз от приблизительно 1 мг до приблизительно 1000 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор CTLA4 вводят пациенту в виде одной или нескольких доз от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг массы тела пациента. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор CTLA4 вводят пациенту в виде однократной дозы от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг массы тела пациента. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор CTLA4 вводят пациенту в виде одной или нескольких доз от приблизительно 1 мг до приблизительно 600 мг. Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус вводят пациенту внутриопухолево или внутривенно. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор пути PD-1 и ингибитор CTLA4 вводят пациенту внутривенно, подкожно или внутривентально.

[014] Согласно некоторым вариантам осуществления рак выбирают из опухолей надпочечников, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, рака головного мозга, рака молочной железы, карциномы, рака ткани центральной или периферической нервной системы, рака шейки матки, рака толстой кишки, эндокринного или нейроэндокринного рака или гемопоэтического рака, рака пищевода, фибромы, желудочно-кишечного рака, глиомы, рака головы и шеи, опухолей Ли-Фраумени, рака печени, рака легких, лимфомы,

меланомы, менингиомы, множественных нейроэндокринных опухолей типа I и типа II, рака носоглотки, рака полости рта, рака ротоглотки, опухолей остеогенных сарком, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака островковых клеток поджелудочной железы, рака паращитовидной железы, феохромоцитомы, опухолей гипофиза, рака предстательной железы, рака прямой кишки, рака почки, рака дыхательных путей, саркомы, рака кожи, рака желудка, тестикулярного рака, рака щитовидной железы, рака трахеи, рака мочеполовой системы и рака матки. Согласно некоторым вариантам осуществления рак устойчив к лечению с помощью по меньшей мере одного анти-PD-1 средства или терапии.

[015] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор пути PD-1 относится к анти-PD-1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, анти-PD-L1 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или анти-PD-L2 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-1 антитело выбирают из цемиплимаба, ниволумаба, пембролизумаба, пидилизумаба, MEDI0608, BI 754091, PF-06801591, спартализумаба, камрелизумаба, JNJ-63723283 и MCLA-134.

[016] Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает в себя определяющие комплементарность области тяжелой цепи (heavy chain complementarity determining region, HCDR) вариабельной области тяжелой цепи (heavy chain variable region, HCVR), включающей в себя аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, и определяющие комплементарность области легкой цепи (light chain complementarity determining region, LCDR) вариабельной области легкой цепи (light chain variable region, LCVR), включающей в себя аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает в себя три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), включающие в себя соответствующие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 3, 4 и 5; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), включающие в себя соответствующие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 6, 7 и 8.

[017] Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает в себя вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), включающую в себя аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1; и вариабельную область легкой цепи (LCVR), включающую в себя аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает в

себя пару последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи согласно SEQ ID NO: 9 и 10.

[018] Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-L1 антитело выбирают из REGN3504, авелумаба, атезолизумаба, дурвалумаба, MDX-1105, LY3300054, FAZ053, STI-1014, CX-072, KN035 и СК-301. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает в себя вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), включающую в себя аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11; и вариабельную область легкой цепи (LCVR), включающую в себя аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-L1 антитело включает в себя REGN3504.

[019] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор CTLA4 относится к анти-CTLA4 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CTLA4 антитело выбирают из ипилимумаба, тремелиумаба и REGN4659. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает в себя определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), включающую в себя аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) вариабельной области легкой цепи (LCVR), включающую в себя аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14.

[020] Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает в себя три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), включающие в себя соответствующие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 15, 16 и 17; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), включающие в себя соответствующие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 18, 19 и 20. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает в себя вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), включающую в себя аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13; и вариабельную область легкой цепи (LCVR), включающую в себя аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает в себя пару последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи согласно SEQ ID NO: 21 и 22.

[021] Согласно некоторым вариантам осуществления лечение оказывает терапевтический эффект, выбранный из одного или нескольких эффектов из: задержки

роста опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, регрессии опухоли, увеличения выживаемости, частичного ответа и полного ответа. Согласно некоторым вариантам осуществления рост опухоли ингибируется по меньшей мере на 50% по сравнению с не получавшим лечения пациентом. Согласно некоторым вариантам осуществления рост опухоли ингибируется по меньшей мере на 50% по сравнению с пациентом, которому вводили онколитический вирус, ингибитор пути PD-1 или ингибитор CTLA4 в качестве монотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления рост опухоли ингибируется по меньшей мере на 50% по сравнению с пациентом, которому вводили любые два средства из онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и ингибитора CTLA4.

[022] Согласно некоторым вариантам осуществления способ дополнительно предусматривает введение дополнительного терапевтического средства или терапии пациенту. Согласно некоторым вариантам осуществления дополнительное терапевтическое средство или терапию выбирают из: лучевой терапии, хирургического вмешательства, химиотерапевтического средства, противораковой вакцины, ингибитора B7-H3, ингибитора B7-H4, ингибитора гена активации лимфоцитов 3 (LAG3), ингибитора белка, содержащего домен иммуноглобулина Т-клеток и домен муцина 3 (TIM3), ингибитора галектина 9 (GAL9), ингибитора содержащего V-домен иммуноглобулина (Ig) супрессора активации Т-клеток (VISTA), ингибитора иммуноглобулиноподобного рецептора клеток-киллеров (KIR), ингибитора В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), ингибитора Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), ингибитора CD47, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ингибитора ангиопоэтина-2 (Ang2), ингибитора трансформирующего фактора роста бета (TGF β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), антитела к опухолеспецифическому антигену, вакцины бацилл Кальметта-Герена, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), цитотоксина, ингибитора рецептора интерлейкина-6 (IL-6R), ингибитора рецептора интерлейкина-4 (IL-4R), ингибитора IL-10, IL-2, IL-7, IL-12, IL-21, IL-15, конъюгата антитело-лекарственное средство, противовоспалительного лекарственного средства и их комбинаций.

[023] Согласно другому аспекту раскрытая технология относится к комбинации онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и ингибитора CTLA4 для применения в способе лечения или ингибирования роста опухоли, причем данный способ предусматривает: (а) выбор пациента с раком; и (б) введение нуждающемуся в этом пациенту: (i) терапевтически эффективного количества онколитического вируса в комбинации с (ii) терапевтически эффективным количеством ингибитора пути PD-1 и (iii) терапевтически эффективным количеством ингибитора CTLA.

[024] Согласно другому аспекту раскрытая технология относится к набору, включающему в себя онколитический вирус, ингибитор пути PD-1 и ингибитор CTLA4 в сочетании с письменными инструкциями по применению терапевтически эффективного количества комбинации онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и ингибитора CTLA4 для лечения и ингибирования роста опухоли у пациента.

[025] Приведенное выше краткое раскрытие не предназначено для определения каждого аспекта раскрытия, и дополнительные аспекты описаны в других разделах, таких как нижеследующее подробное раскрытие. Весь документ должен рассматриваться как единое раскрытие, и следует понимать, что предполагаются все комбинации описанных в настоящем документе признаков, даже если комбинация признаков не встречаются вместе в одном предложении, абзаце или разделе настоящего документа. Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на конкретные варианты осуществления настоящего раскрытия, даны только в качестве иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема настоящего раскрытия будут очевидны для специалистов в данной области техники из этого подробного описания.

Краткое описание фигур

[026] На **фигуре 1** представлен график, показывающий противоопухолевую эффективность комбинированного лечения с помощью анти-PD-1, анти-CTLA4 и внутриопухолевой доставкой онколитического вируса VSV-M51R-Fluc у мышей, имеющих опухоли MC38 со средним размером 150 мм^3 , как описано в примере 1. Показаны средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$ (standard error of the mean, стандартная ошибка среднего) в каждой группе лечения в нескольких временных точках после имплантации опухоли, причем дни лечения указаны стрелками, как описано в примере 1.

[027] На **фигуре 2** представлен график, показывающий объемы отдельных опухолей в день 11 после начала лечения (день 26 после имплантации опухоли) для каждой группы лечения, описанной в примере 1.

[028] На **фигуре 3** представлен график, показывающий кривые выживаемости Каплана-Мейера для каждой группы лечения, описанной в примере 1.

[029] На **фигурах 4A, 4B, 4C, 4D и 4E** представлен набор диаграмм, показывающих, что противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации анти-PD-1, анти-CTLA4 и онколитического вируса VSV-M51R-GFP, доставляемой внутриопухолево, может быть достигнута с помощью только одной дозы анти-CTLA4 антитела mIgG2a, как описано

в примере 2. На **фигуре 4А** показаны средние объемы опухолей в получавшей PBS группе в нескольких временных точках после имплантации опухоли. На **фигуре 4В** показаны средние объемы опухолей в получавшей PBS, анти-PD-1 антитело и анти-CTLA4 антитело (4 дозы) группе в нескольких временных точках после имплантации опухоли. На **фигуре 4С** показаны средние объемы опухолей в получавшей VSV, анти-PD-1 антитело и анти-CTLA4 антитело (1 доза) группе в нескольких временных точках после имплантации опухоли. На **фигуре 4D** показаны средние объемы опухолей в получавшей VSV, анти-PD-1 антитело и анти-CTLA4 антитело (2 дозы) группе в нескольких временных точках после имплантации опухоли. На **фигуре 4Е** показаны средние объемы опухолей в получавшей VSV в/о, анти-PD-1 антитело и анти-CTLA4 антитело (4 дозы) группе в нескольких временных точках после имплантации опухоли. Дни лечения указаны стрелками. TF: опухоли нет (tumor free).

[030] На **фигуре 5** представлен график, показывающий кривые выживаемости Каплана-Мейера для каждой группы лечения, описанной в примере 2.

[031] На **фигуре 6** представлен график, показывающий, что противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации анти-PD-1, анти-CTLA4 и онколитического вируса VSV-M51R-GFP может быть достигнута либо при внутриопухолевой, либо при внутривенной доставке вируса, как описано в примере 3. Показаны средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе лечения в нескольких временных точках после имплантации опухоли. Лечение проводили, как описано в таблице 5 и примере 3.

[032] На **фигуре 7** представлен график, показывающий кривые выживаемости Каплана-Мейера для каждой группы лечения, описанной в примере 3.

[033] На **фигуре 8** представлен график, показывающий противоопухолевую эффективность комбинированного лечения с помощью анти-PD-1, анти-CTLA4 и внутривенной доставки онколитического вируса VSV-mIFN β -NIS у мышей, имеющих опухоли MC38 со средним размером 150 мм^3 , как описано в примере 4. Показаны средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе лечения в нескольких временных точках после имплантации опухоли. Лечение проводили, как описано в таблице 7 и примере 4.

[034] На **фигуре 9** представлен график, показывающий объемы отдельных опухолей в день 10 после начала лечения для каждой группы лечения, описанной в примере 4. Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного ANOVA с апостериорным критерием множественных сравнений Даннетта (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

[035] На **фигуре 10** представлен график, показывающий кривые выживаемости Каплана-Мейера для каждой группы лечения, описанной в примере 4.

[036] На **фигуре 11** представлен график, показывающий средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе лечения, описанной в примере 5, в нескольких временных точках после имплантации опухоли, причем дни лечения указаны стрелками.

[037] На **фигуре 12** представлен график, показывающий объемы отдельных опухолей в день 29 после начала лечения для каждой группы лечения, описанной в примере 5.

[038] На **фигуре 13** представлен график, показывающий кривые выживаемости Каплана-Мейера для каждой группы лечения, описанной в примере 5.

[039] На **фигуре 14** представлен график, показывающий средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе лечения, описанной в примере 6, в нескольких временных точках после имплантации опухоли, причем дни лечения указаны стрелками.

[040] На **фигуре 15** представлен график, показывающий объемы отдельных опухолей в день 22 после имплантации опухоли (10 дней после начала лечения) для каждой группы лечения, описанной в примере 6.

[041] На **фигуре 16** представлен график, показывающий кривые выживаемости Каплана-Мейера для каждой группы лечения, описанной в примере 6.

[042] На **фигуре 17** представлен график, показывающий средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе лечения, описанной в примере 7, в нескольких временных точках после имплантации опухоли, причем дни лечения указаны стрелками.

[043] На **фигуре 18** представлен график, показывающий средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе лечения, описанной в примере 8, в нескольких временных точках после имплантации опухоли, причем дни лечения указаны стрелками.

[044] На **фигуре 19** представлен график, показывающий средние объемы опухолей ($\text{мм}^3 \pm \text{SEM}$) в каждой группе лечения, описанной в примере 9, в нескольких временных точках после имплантации опухоли.

[045] На **фигуре 20** представлен график, показывающий среднее количество пятнообразующих единиц (spot forming units, SFU) IFNg, высвобожденного CD8 TIL (tumor-infiltrating lymphocytes), собранных из опухолей и повторно подвергнутых в течение ночи воздействию указанного опухолевого антигена или VSV-NP в каждой группе лечения, описанной в примере 10, в день 17 после получения VSV в день 12 вместе с двумя дозами анти-PD-1 и α -CTLA4 в день 12 и 14. DMSO и PMA/иономицин служат отрицательным и положительным контролем соответственно в нескольких временных точках после имплантации опухоли, причем дни лечения указаны стрелками.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

[046] Настоящее раскрытие основано по меньшей мере частично на неожиданном открытии, что новые трехкомпонентные комбинированные терапии из онколитического вируса, ингибитора пути запрограммированной гибели 1 (PD-1) и ингибитора антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA4) проявляют синергическую активность в ингибировании роста опухоли, чем любая из монотерапий или двухкомпонентных комбинированных терапий из онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и ингибитора CTLA4. Как продемонстрировано в настоящем документе, раскрытая трехкомпонентная комбинированная терапия, содержащая введение одной дозы ингибитора CTLA4, обеспечивает противоопухолевую эффективность, сравнимую с комбинированной терапией, содержащей 2, 3, 4 или более доз ингибитора CTLA4. Кроме того, внутривенное введение онколитического вируса по меньшей мере так же эффективно, как и внутриопухолевое введение вируса. Таким образом, трехкомпонентная комбинированная терапия, раскрытая в настоящем документе, представляет собой удивительно эффективную терапию для лечения рака со сниженным риском связанной с лечением токсичности.

[047] Соответственно, согласно одному аспекту настоящее раскрытие относится к способу лечения или ингибирования роста опухоли, предусматривающему: (а) выбор пациента с раком; и (b) введение нуждающемуся в этом пациенту: (i) терапевтически эффективного количества онколитического вируса в комбинации с (ii) терапевтически эффективным количеством ингибитора пути PD-1 (например, анти-PD-1, анти-PD-L1 или анти-PD-L2 антитела, или их антигенсвязывающего фрагмента) и (iii) терапевтически эффективным количеством ингибитора CTLA4 (например, анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента).

[048] При использовании в настоящем документе термин «пациент» можно использовать взаимозаменяемо с термином «субъект». Выражение «нуждающийся в этом субъект» означает человека или отличное от человека млекопитающее, которое демонстрирует один или несколько симптомов или признаков рака и/или у которого был диагностирован рак. Согласно некоторым вариантам осуществления у субъекта-человека могут быть диагностированы первичная или метастатическая опухоль и/или один или несколько симптомов или признаков включая, но без ограничения, увеличение лимфатического(их) узла(ов), вздутие живота, боль/давление в груди, необъяснимую потерю веса, лихорадку, ночную потливость, постоянную усталость, потерю аппетита, увеличение селезенки, зуд. Это выражение относится к пациентам, получившим один или несколько циклов химиотерапии с токсическими побочными эффектами. Согласно некоторым вариантам осуществления выражение «нуждающийся в этом субъект» относится к пациентам с раком, которые подвергались лечению, но у которых впоследствии

возникли рецидив или метастазы. Например, пациенты, которые могли получать лечение с помощью одного или нескольких противораковых средств, приводящих к регрессии опухоли; однако впоследствии продемонстрировали рецидив рака, резистентного к одному или нескольким противораковым средствам (например, резистентного к химиотерапии рака), получают лечение с помощью способов согласно настоящему раскрытию.

[049] При использовании в настоящем документе термины «лечение», «лечить» или аналогичные означают облегчение или снижение тяжести по меньшей мере одного симптома или признака, устранение причины симптомов либо на временной, либо на постоянной основе, задержку или ингибирование роста опухоли, снижение нагрузки опухолевыми клетками или опухолевой нагрузки, способствование регрессии опухоли, вызывание сокращения, некроза и/или исчезновения опухоли, предотвращение рецидива опухоли, предотвращение или ингибирование метастазирования, ингибирование метастатического роста опухоли, устранение необходимости в лучевой терапии или хирургическом вмешательстве и/или увеличение продолжительности выживания субъекта.

[050] Согласно многим вариантам осуществления термины «опухоль», «очаг», «очаг опухоли», «рак» и «злокачественное новообразование» используются взаимозаменяемо и относятся к одному или нескольким раковым образованиям. Согласно некоторым вариантам осуществления рак выбирают из опухолей надпочечников, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, рака головного мозга, рака молочной железы, карциномы, рака ткани центральной или периферической нервной системы, рака шейки матки, рака толстой кишки, эндокринного или нейроэндокринного рака или гемопоэтического рака, рака пищевода, фибромы, желудочно-кишечного рака, глиомы, рака головы и шеи, опухолей Ли-Фраумени, рака печени, рака легких, лимфомы, меланомы, менингиомы, множественных нейроэндокринных опухолей типа I и типа II, рака носоглотки, рака полости рта, рака ротоглотки, опухолей остеогенных сарком, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака островковых клеток поджелудочной железы, рака паразитовидной железы, феохромоцитомы, опухолей гипофиза, рака предстательной железы, рака прямой кишки, рака почки, рака дыхательных путей, саркомы, рака кожи, рака желудка, тестикулярного рака, рака щитовидной железы, рака трахеи, рака мочеполовой системы и рака матки.

[051] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к способам лечения, задержки или ингибирования роста опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способам стимулирования регрессии опухоли. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее раскрытие относится к способам снижения нагрузки опухолевыми клетками или снижения опухолевой нагрузки. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящее

раскрытие относится к способам предотвращения рецидива опухоли.

[052] Способы согласно настоящему раскрытию в соответствии с некоторыми вариантами осуществления предусматривают введение нуждающемуся в этом субъекту онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 (например, анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) или ингибитора CTLA4 (например, анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента).

[053] Согласно некоторым вариантам осуществления способы предусматривают введение субъекту одной или нескольких доз онколитического вируса до, после или одновременно с введением субъекту одной или нескольких доз ингибитора пути PD-1 и/или одной или нескольких доз ингибитора CTLA4. Согласно некоторым вариантам осуществления одну или несколько доз ингибитора пути PD-1 можно вводить в комбинации с одной или несколькими дозами ингибитора CTLA4.

[054] При использовании в настоящем документе термин «в комбинации с» также относится к последовательному или одновременному введению онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 (например, анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) и ингибитора CTLA4 (например, анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента). Например, при введении «до» ингибитора CTLA4 одну или несколько доз ингибитора пути PD-1 (например, анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) можно вводить более чем приблизительно за 12 недель, приблизительно за 11 недель, приблизительно за 10 недель, приблизительно за 9 недель, приблизительно за 8 недель, приблизительно за 7 недель, приблизительно за 6 недель, приблизительно за 5 недель, приблизительно за 4 недели, приблизительно за 3 недели, приблизительно за 2 недели, приблизительно за 150 часов, приблизительно за 100 часов, приблизительно за 72 часа, приблизительно за 60 часов, приблизительно за 48 часов, приблизительно за 36 часов, приблизительно за 24 часа, приблизительно за 12 часов, приблизительно за 10 часов, приблизительно за 8 часов, приблизительно за 6 часов, приблизительно за 4 часа, приблизительно за 2 часа, приблизительно за 1 час, приблизительно за 30 минут, приблизительно за 15 минут или приблизительно за 10 минут до введения одной или нескольких доз ингибитора CTLA.

[055] При введении «после» ингибитора CTLA4 (например, анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) ингибитор пути PD-1 (например, анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) можно вводить приблизительно через 12 недель, приблизительно через 11 недель, приблизительно через 10 недель, приблизительно через 9 недель, приблизительно через 8 недель, приблизительно через 7 недель, приблизительно через 6 недель, приблизительно через 5 недель, приблизительно через 4

недели, приблизительно через 3 недели, приблизительно через 2 недели, приблизительно через 150 часов, приблизительно через 150 часов, приблизительно через 100 часов, приблизительно через 72 часа, приблизительно через 60 часов, приблизительно через 48 часов, приблизительно через 36 часов, приблизительно через 24 часа, приблизительно через 12 часов, приблизительно через 10 часов, приблизительно через 8 часов, приблизительно через 6 часов, приблизительно через 4 часа, приблизительно через 2 часа, приблизительно через 1 час, приблизительно через 30 минут, приблизительно через 15 минут или приблизительно через 10 минут после введения ингибитора CTLA4.

[056] Введение «одновременно» с ингибитором CTLA4 (например, анти-CTLA4 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом) означает, что ингибитор пути PD-1 (например, анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) вводят субъекту в отдельной лекарственной форме в течение менее чем 10 минут (до, после или в то же время) от введения ингибитора CTLA4 или вводят субъекту в виде однократной комбинированной лекарственной формы, содержащий как ингибитор пути PD-1, так и ингибитор CTLA4.

[057] Согласно некоторым вариантам осуществления раскрытые способы могут дополнительно предусматривать введение противоопухолевой терапии. К противоопухолевым терапиям относятся, но без ограничения, обычные противоопухолевые терапии, такие как химиотерапия, лучевая терапия, хирургическое вмешательство, или описанные в другом месте настоящего документа.

[058] Согласно некоторым вариантам осуществления лечение оказывает терапевтический эффект, выбранный из одного или нескольких эффектов из: задержки роста опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, регрессии опухоли, увеличения выживаемости, частичного ответа и полного ответа. Согласно некоторым вариантам осуществления рост опухоли у пациента задерживается по меньшей мере на 10 дней по сравнению с ростом опухоли у не получавшего лечения пациента. Согласно некоторым вариантам осуществления рост опухоли ингибируется по меньшей мере на 20% (например, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%) по сравнению с не получавшим лечения пациентом. Согласно некоторым вариантам осуществления рост опухоли ингибируется по меньшей мере на 20% (например, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%) по сравнению с пациентом, которому вводили онколитический вирус, ингибитор пути PD-1 или

ингибитор CTLA4 в качестве монотерапии. Согласно некоторым вариантам осуществления рост опухоли ингибируется по меньшей мере на 20% (например, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%) по сравнению с пациентом, которому вводили два средства из онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и ингибитора CTLA4.

Онколитические вирусы

[059] Онколитические вирусы представляют собой терапии рака, в которых используются сконструированные или естественно возникшие вирусы с раковым тропизмом, чтобы вызывать гибель опухолевых клеток у получающего лечение пациента. В целом, при введении реплицирующегося онколитического вируса инфицированные опухолевые клетки обладают возможностью производить потомство вируса, что позволяет разрушительной инфекции распространяться на соседние опухолевые клетки. Потенциал репликации вируса определяется способностью клетки чувствовать вирусную инфекцию и реагировать на нее. Кроме того, онколитические вирусы несут патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (pathogen-associated molecular patterns, PAMP), которые могут действовать как адьюванты для стимуляции миелоидных клеток (макрофагов и дендритных клеток) для усиления стимуляции Т-клеток.

[060] Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус представляет собой компетентный к репликации онколитический рабдовирус. К таким онколитическим рабдовирусам относятся, без ограничения, дикого типа или генетически модифицированные вирус Arajás, вирус Chandipura, вирус Cocal, вирус Isfahan, вирус Maraba, вирус Piru, вирус везикулярного стоматита Alagoas, вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус BeAn 157575, вирус Boteke, вирус Calchaquí, вирус угря американский, вирус Gray Lodge, вирус Jurona, вирус Klamath, вирус Kwatta, вирус La Joya, вирус Malpais Spring, вирус летучих мышей Mount Elgon, вирус Perinet, вирус Tupaia, Farmington, вирус Bahia Grande, вирус Muir Springs, вирус Reed Ranch, вирус Hart Park, вирус Flanders, вирус Kamese, вирус Mosqueiro, вирус Mossuril, вирус Barur, вирус Fukuoka, вирус Kern Canyon, вирус Nkolbisson, вирус Le Dantec, вирус Keuraliba, вирус Connecticut, вирус New Minto, вирус Sawgrass, вирус Chaco, вирус Sena Madureira, вирус Timbo, вирус Almpiwar, вирус Aguac, вирус Bangoran, вирус Bimbo, вирус Bivens Arm, вирус голубого краба, вирус Charleville, вирус Coastal Plains, вирус DakArK 7292, вирус Entamoeba, вирус Garba, вирус Gossas, вирус Humpty Doo, вирус Joinjakaka, вирус Kannamangalam, вирус Kolongo, вирус

Koolpinyah, вирус Kotonkon, вирус Landjia, вирус Manitoba, вирус Marco, вирус Nasoule, вирус Navarro, вирус Ngaingan, вирус Oak-Vale, вирус Obodhiang, вирус Oita, вирус Ouango, вирус Parry Creek, вирус цихлиды Rio Grande, вирус Sandjimba, вирус Sigma, вирус Sripur, вирус Sweetwater Branch, вирус Tibrogargan, вирус Xiburema, вирус Yata, Rhode Island, вирус Adelaide River, вирус Berrimah, вирус Kimberley или вирус эфемерной лихорадки крупного рогатого скота.

[061] Вирус везикулярного стоматита (VSV), как указано выше, является членом семейства Rhabdoviridae. Геном VSV представляет собой одну молекулу отрицательно-полярной РНК, которая кодирует 5 основных полипептидов: полипептид нуклеокапсида (N), полипептид фосфопротеина (P), полипептид матрикса (M), полипептид гликопротеина (G) и полипептид вирусной полимеразы (L).

[062] Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус представляет собой дикого типа или рекомбинантный VSV. Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантный VSV содержит одну или несколько мутаций, таких как замена M51R (также в настоящем документе называется VSV-M51R).

[063] Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус может быть сконструирован так, чтобы он экспрессировал один или несколько цитокинов, таких как интерферон-бета (IFN β). Согласно некоторым вариантам осуществления IFN β (например, интерферон бета-1a) может представлять собой человеческий или мышинный IFN β или их вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления IFN β содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 23 или 24, или содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 23 или 24. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IFN β , расположена между вирусными генами M и G. Такое положение позволяет вирусу экспрессировать такое количество полипептида IFN β , которое эффективно активирует противовирусные иммунные ответы в нераковых тканях и, таким образом, снижает потенциальную вирусную токсичность, не препятствуя эффективной репликации вируса в раковых клетках.

[064] Согласно некоторым вариантам осуществления рекомбинантный VSV дополнительно экспрессирует натрий/йодидный симпортер (NIS) или его вариант. Согласно некоторым вариантам осуществления NIS содержит аминокислотную последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) с аминокислотной

последовательностью согласно SEQ ID NO: 25, или содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 25. Согласно некоторым вариантам осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая NIS, расположена между вирусными генами G и L, что обеспечивает соответствующие уровни экспрессии полипептидов NIS.

[065] Согласно определенным вариантам осуществления онколитический вирус представляет собой рекомбинантный VSV, известный в данной области техники как Voyager V1, описанный, например, в документе US 9428736, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

Ингибиторы пути PD-1

[066] Способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение терапевтически эффективного количества ингибитора пути PD-1. При использовании в настоящем документе «ингибитор пути PD-1» относится к любой молекуле, способной ингибировать, блокировать, прекращать или препятствовать активности или экспрессии PD-1. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор пути PD-1 может представлять собой антитело, низкомолекулярное соединение, нуклеиновую кислоту, полипептид или их функциональный фрагмент или вариант. Неограничивающими примерами подходящих ингибиторов пути PD-1 служат анти-PD-1 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, анти-PD-L1 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты и анти-PD-L2 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

[067] Другими неограничивающими примерами подходящих ингибиторов пути PD-1 служат молекулы РНКи, такие как молекулы РНКи анти-PD-1, РНКи анти-PD-L1 и РНКи анти-PD-L2, бессмысловые молекулы, такие как бессмысловая РНК анти-PD-1, бессмысловая РНК анти-PD-L1 и бессмысловая РНК анти-PD-L2, и доминантно-негативные белки, такие как доминантно-негативный белок PD-1, доминантно-негативный белок PD-L1 и доминантно-негативный белок PD-L2. Некоторые примеры вышеуказанных ингибиторов пути PD-1 описаны, например, в документах US 9308236, US 10011656 и US 20170290808, части которых, идентифицирующие ингибиторы пути PD-1, включены в настоящий документ посредством ссылки.

[068] Термин «антитело» при использовании в настоящем документе предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями (то есть «полных молекул антител»), а также их мультимеров (например, IgM) или их антигенсвязывающих фрагментов. Каждая тяжелая цепь содержит

вариабельную область тяжелой цепи («HCVR» или «VH») и константную область тяжелой цепи (состоящую из доменов CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи («LCVR или «VL») и константную область легкой цепи (CL). Области VH и VL можно дополнительно подразделить на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (complementarity determining region, CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (framework region, FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Согласно некоторым вариантам осуществления FR антитела (или его антигенсвязывающего фрагмента) могут быть идентичны человеческим последовательностям зародышевой линии или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусная аминокислотная последовательность может быть определена на основе параллельного анализа двух или более CDR. Термин «антитело» при использовании в настоящем документе также относится к антигенсвязывающим фрагментам полных молекул антител.

[069] При использовании в настоящем документе термины «антигенсвязывающий фрагмент» антитела, «антигенсвязывающая часть» антитела и аналогичные относятся к любым встречающимся в природе, получаемым ферментативным путем, синтетическим или генетически сконструированным полипептиду или гликопротеину, которые специфически связывают антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из полных молекул антитела с использованием любых подходящих стандартных методов, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методы генной инженерии, предусматривающие манипуляцию с ДНК, кодирующей вариабельные и, необязательно, константные домены антитела, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, библиотеки фаговых антител), или может быть синтезирована. ДНК может быть секвенирована, и с ней можно манипулировать химическим путем или с использованием методов молекулярной биологии, например, чтобы расположить один или несколько вариабельных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или ввести кодоны, создать остатки цистеина, модифицировать, добавить или удалить аминокислоты и так далее.

[070] Неограничивающими примерами антигенсвязывающих фрагментов служат: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты; и (vii) минимальные единицы узнавания, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют

гипервариабельную область антитела (например, выделенную определяющую комплементарность область (CDR), такую как пептид CDR3) или ограниченный пептид FR3-CDR3-FR4. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитыми CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и так далее), малые модульные иммунофармацевтические средства (small modular immunopharmaceutical, SMIP) и переменные домены IgNAR акулы, также охватываются выражением «антигенсвязывающий фрагмент» при использовании в настоящем документе.

[071] Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно содержит по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и обычно содержит по меньшей мере одну CDR, которая примыкает к одной или нескольким каркасным последовательностям или находится с ними внутри рамки. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен V_H , связанный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут быть расположены друг относительно друга в любом подходящем образом. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . Альтернативно, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

[072] Согласно некоторым вариантам осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный по меньшей мере с одним константным доменом. К неограничивающим примерам конфигураций переменных и константных доменов, которые можно обнаружить в антигенсвязывающем фрагменте антитела согласно настоящему раскрытию, относятся: (i) V_H - C_{H1} ; (ii) V_H - C_{H2} ; (iii) V_H - C_{H3} ; (iv) V_H - C_{H1} - C_{H2} ; (v) V_H - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ; (vi) V_H - C_{H2} - C_{H3} ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_{H1} ; (ix) V_L - C_{H2} ; (x) V_L - C_{H3} ; (xi) V_L - C_{H1} - C_{H2} ; (xii) V_L - C_{H1} - C_{H2} - C_{H3} ; (xiii) V_L - C_{H2} - C_{H3} ; и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, включая любой из примеров конфигураций, приведенный выше, переменные и константные домены либо могут быть непосредственно связаны друг с другом, либо могут быть связаны полной шарнирной или линкерной областью или их частью. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например 5, 10, 15, 20, 40, 60 или более) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между соседними переменными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела согласно настоящему раскрытию может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) любой из конфигураций переменных и константных доменов, приведенных

выше, в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной(ых) связи(ей)).

[073] Антитела, используемые в способах, раскрытых в настоящем документе, могут представлять собой человеческие антитела. При использовании в настоящем документе термин «человеческое антитело» относится к антителам, содержащим переменные и константные области, происходящие от человеческих иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии. Человеческие антитела согласно настоящему раскрытию, тем не менее, могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими иммуноглобулиновыми последовательностями зародышевой линии (например, мутации, введенные в результате случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDR и, в частности, в CDR3. Однако термин «человеческое антитело» при использовании в настоящем документе не предназначен для обозначения антител, в которых последовательности CDR, происходящие от зародышевой линии другого вида млекопитающих, таких как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности.

[074] Антитела, используемые в способах, раскрытых в настоящем документе, могут представлять собой рекомбинантные человеческие антитела. При использовании в настоящем документе термин «рекомбинантное человеческое антитело» относится ко всем человеческим антителам, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, таким как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяина (дополнительно описаны ниже), антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (дополнительно описаны ниже), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам иммуноглобулинов человека (смотри, например, документ Taylor *et al.* (1992) *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими средствами, которые предусматривают сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулинов человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, происходящие от человеческих иммуноглобулиновых последовательностей зародышевой линии. Однако согласно некоторым вариантам осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают мутагенезу *in vitro* (или при использовании животного, трансгенного по человеческим Ig-последовательностям, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности,

которые, хотя и происходят от человеческих последовательностей V_H и V_L зародышевой линии и родственны им, в природе не могут существовать в зародышевом репертуаре человеческих антител *in vivo*.

Анти-PD-1 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты

[075] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы пути PD-1, используемые в способах, раскрытых в настоящем документе, представляют собой антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают PD-1 (например, анти-PD-1 антитела). Термин «специфически связывает» или аналогичные термины означают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Способы определения, связываются ли антитела специфически с антигеном, хорошо известны в данной области техники, и к ним относятся, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и аналогичные способы. Например, антитело, которое «специфически связывает» PD-1, при использовании в контексте настоящего раскрытия относится к антителам, которые связывают PD-1 или ее часть с K_D меньше чем приблизительно 500 нМ, меньше чем приблизительно 300 нМ, меньше чем приблизительно 200 нМ, меньше чем приблизительно 100 нМ, меньше чем приблизительно 90 нМ, меньше чем приблизительно 80 нМ, меньше чем приблизительно 70 нМ, меньше чем приблизительно 60 нМ, меньше чем приблизительно 50 нМ, меньше чем приблизительно 40 нМ, меньше чем приблизительно 30 нМ, меньше чем приблизительно 20 нМ, меньше чем приблизительно 10 нМ, меньше чем приблизительно 5 нМ, меньше чем приблизительно 4 нМ, меньше чем приблизительно 3 нМ, меньше чем приблизительно 2 нМ, меньше чем приблизительно 1 нМ или меньше чем приблизительно 0,5 нМ при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса. Выделенное антитело, которое специфически связывает PD-1 человека, может, однако, характеризоваться перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы PD-1 других (отличных от человека) видов.

[076] В соответствии с некоторыми примерами вариантов осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи (HCVR), переменную область легкой цепи (LCVR) и/или определяющие комплементарность области (CDR), содержащие аминокислотные последовательности любого из анти-PD-1 антител, представленных в документе US 9987500, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

[077] Согласно некоторым примерам вариантов осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые можно использовать в контексте

настоящего раскрытия, содержат определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2.

[078] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три HCDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три LCDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 3; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 4; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 5; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 7; и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 8.

[079] Согласно другим вариантам осуществления анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую SEQ ID NO: 1, и LCVR, содержащую SEQ ID NO: 2. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 9. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-1 антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 10.

[080] Примером антитела, содержащего варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, служит полностью человеческое анти-PD-1 антитело, известное как цемиплимаб (также известно как REGN2810; LIBTAYO®).

[081] В соответствии с некоторыми примерами вариантов осуществления способы согласно настоящему раскрытию предусматривают применение цемиплимаба или его биоэквивалента. При использовании в настоящем документе термин «биоэквивалент» по отношению к ингибитору пути PD-1 относится к анти-PD-1 антителу или к связывающим PD-1 белкам или их фрагментам, которые являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, уровень и/или степень абсорбции которых не демонстрирует значительной разницы с абсорбцией эталонного антитела (например, цемиплимаба) при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, будь то однократная доза или многократные дозы. В контексте настоящего раскрытия термин «биоэквивалент» относится к антигенсвязывающим белкам, которые

связываются с PD-1 и не характеризуются клинически значимыми различиями с цемиплимабом в отношении безопасности, чистоты и/или активности.

[082] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия антитело к PD-1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, характеризующуюся идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) с SEQ ID NO: 1.

[083] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия антитело к PD-1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, характеризующуюся идентичностью последовательности (например, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) с SEQ ID NO: 2. Идентичность последовательности может быть измерена с помощью способов, известных в данной области техники (например, GAP, BESTFIT и BLAST).

[084] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия антитело к PD-1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, содержащую не более 10 аминокислотных замен. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия антитело к PD-1 человека или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2, содержащую не более 10 аминокислотных замен.

[085] Также в объем настоящего раскрытия входят варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, содержащие одну или несколько консервативных аминокислотных замен. Например, настоящее раскрытие относится к применению анти-PD-L1 антител, имеющих аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и так далее консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе.

[086] К другим анти-PD-1 антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые можно использовать в контексте способов согласно настоящему раскрытию, относятся, например, антитела, обозначаемые и известные в данной области техники как ниволумаб, пембролизумаб, MEDI0608, пидилизумаб, BI 754091, спартализумаб (также известен как PDR001), камрелизумаб (также известен как SHR-1210), JNJ-63723283, MCLA-134, или любое из анти-PD-1 антител, представленных в патентах США №№ 6808710, 7488802, 8008449, 8168757, 8354509, 8609089, 8686119, 8779105, 8900587 и

9987500 и в патентных публикациях WO 2006/121168, WO 2009/114335. Части всех вышеупомянутых публикаций, в которых идентифицируются анти-PD-1 антитела, включены в настоящий документ посредством ссылки.

[087] Анти-PD-1 антитела, используемые в контексте способов согласно настоящему раскрытию, могут иметь рН-зависимые характеристики связывания. Например, анти-PD-1 антитело для применения в способах согласно настоящему раскрытию может проявлять пониженное связывание с PD-1 при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Альтернативно, анти-PD-1 антитело согласно настоящему раскрытию может проявлять усиленное связывание со своим антигеном при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Выражение «кислый рН» относится к значениям рН меньше чем приблизительно 6,2, например, приблизительно 6,0, 5,95, 5,9, 5,85, 5,8, 5,75, 5,7, 5,65, 5,6, 5,55, 5,5, 5,45, 5,4, 5,35, 5,3, 5,25, 5,2, 5,15, 5,1, 5,05, 5,0 или меньше. При использовании в настоящем документе выражение «нейтральный рН» означает рН от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4. Выражение «нейтральный рН» относится к значениям рН приблизительно 7,0, 7,05, 7,1, 7,15, 7,2, 7,25, 7,3, 7,35 и 7,4.

[088] В некоторых случаях «снижение связывания с PD-1 при кислом рН по сравнению с нейтральным рН» выражают в терминах отношения значения K_D антитела, связывающегося с PD-1 при кислом рН, к значению K_D антитела, связывающегося с PD-1 при нейтральном рН (или наоборот). Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно рассматривать как демонстрирующее «снижение связывания с PD-1 при кислом рН по сравнению с нейтральным рН» для целей настоящего раскрытия, если антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрирует отношение K_D в кислых/нейтральных условиях приблизительно 3,0 или больше. Согласно некоторым примерам вариантов осуществления отношение K_D в кислых/нейтральных условиях для антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему раскрытию может составлять приблизительно 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, 11,0, 11,5, 12,0, 12,5, 13,0, 13,5, 14,0, 14,5, 15,0, 20,0, 25,0, 30,0, 40,0, 50,0, 60,0, 70,0, 100,0 или больше.

[089] Антитела с рН-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител в отношении снижения (или усиления) связывания с конкретным антигеном при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислот могут давать антитела с рН-зависимыми характеристиками. Например, путем замены одной или нескольких аминокислот антигенсвязывающего домена (например, в CDR) на остаток гистидина, можно получить антитело с пониженным связыванием

антигена при кислом рН по сравнению с нейтральным рН. При использовании в настоящем документе выражение «кислый рН» означает рН 6,0 или меньше.

Анти-PD-L1 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты

[090] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы пути PD-1, используемые в способах, раскрытых в настоящем документе, представляют собой антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают PD-L1 (например, анти-PD-L1 антитела). Например, антитело, которое «специфически связывает» PD-L1, при использовании в контексте настоящего раскрытия относится к антителам, которые связывают PD-L1 или его часть с K_D приблизительно 1×10^{-8} М или меньше (например, меньшая K_D означает более плотное связывание). Анти-PD-L1 антитело с «высокой аффинностью» относится к mAb, характеризующимся аффинностью связывания с PD-L1, выраженной как K_D , по меньшей мере 10^{-8} М, например 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М, при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например BIACORE™, или с помощью измерения аффинности в растворе с помощью ELISA. Выделенное антитело, которое специфически связывает человеческий PD-L1, может, однако, характеризоваться перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы PD-L1 других (отличных от человека) видов.

[091] В соответствии с некоторыми примерами вариантов осуществления анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), вариабельную область легкой цепи (LCVR) и/или определяющие комплементарность области (CDR), содержащие аминокислотные последовательности любого из анти-PD-L1 антител, представленных в документе US 9938345, который включен в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

[092] Согласно некоторым примерам вариантов осуществления анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые можно использовать в контексте настоящего раскрытия, содержат определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей SEQ ID NO: 11, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей SEQ ID NO: 12. Примером анти-PD-L1 антитела, содержащего HCVR согласно SEQ ID NO: 11 и LCVR согласно SEQ ID NO: 12 служит REGN3504.

[093] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия антитело к человеческому PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, характеризующуюся идентичностью последовательности по меньшей

мере 90% (например, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) с SEQ ID NO: 11. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия антитело к человеческому PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, характеризующуюся идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) с SEQ ID NO: 12.

[094] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия антитело к человеческому PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11, содержащую не более 10 аминокислотных замен. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия антитело к человеческому PD-L1 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 12, содержащую не более 10 аминокислотных замен.

[095] Также в объем настоящего раскрытия входят варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, содержащие одну или несколько консервативных аминокислотных замен. Например, настоящее раскрытие относится к применению анти-PD-L1 антител, имеющих аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и так далее консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе.

[096] К другим анти-PD-L1 антителам, которые можно использовать в контексте способов согласно настоящему раскрытию, относятся, например, антитела, обозначаемые и известные в данной области техники как MDX-1105, атезолизумаб (TECENTRIQ™), дурвалумаб (IMFINZI™), авелумаб (BAVENCIO™), LY3300054, FAZ053, STI-1014, CX-072, KN035 (Zhang *et al.*, *Cell Discovery*, 3, 170004 (March 2017)), CK-301 (Gorelik *et al.*, American Association for Cancer Research Annual Meeting (AACR), 2016-04-04 Abstract 4606), или любое из других анти-PD-L1 антител, представленных в патентах США №№ 7943743, 8217149, 9402899, 9624298 и 9938345 и в патентных публикациях WO 2007/005874, WO 2010/077634, WO 2013/181452, WO 2013/181634, WO 2016/149201, WO 2017/034916 или EP3177649. Части всех вышеупомянутых публикаций, в которых идентифицируются анти-PD-L1 антитела включены в настоящий документ посредством ссылки.

Анти-PD-L2 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты

[097] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы пути PD-1, используемые в способах, раскрытых в настоящем документе, представляют собой

антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают PD-L2 (например, анти-PD-L2 антитела). Например, антитело, которое «специфически связывает» PD-L2, при использовании в контексте настоящего раскрытия относится к антителам, которые связывают PD-L2 или его часть с KD приблизительно 1×10^{-8} М или меньше (например, меньшая KD означает более плотное связывание). Анти-PD-L2 антитело с «высокой аффинностью» относится к mAb, характеризующимся аффинностью связывания с PD-L2, выраженной как KD, по меньшей мере 10^{-8} М, например 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М или 10^{-12} М, при измерении с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, BIACORE™, или с помощью измерения аффинности в растворе с помощью ELISA. Выделенное антитело, которое специфически связывает человеческий PD-L2, может, однако, характеризоваться перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы PD-L2 других (отличных от человека) видов.

[098] К анти-PD-L2 антителам, которые можно использовать в контексте способов согласно настоящему раскрытию, относятся, например, анти-PD-L2 антитела, представленные в патентах США №№ 8552154 и 10647771. Части всех вышеупомянутых публикаций, в которых идентифицируются анти-PD-L2 антитела, включены в настоящий документ посредством ссылки.

Ингибиторы CTLA4

[099] Способы, раскрытые в настоящем документе, предусматривают введение терапевтически эффективного количества ингибитора CTLA4. При использовании в настоящем документе «ингибитор CTLA4» относится к любой молекуле, способной ингибировать, блокировать, прекращать или препятствовать активности или экспрессии CTLA4. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор CTLA4 может представлять собой антитело, низкомолекулярное соединение, нуклеиновую кислоту, полипептид или их функциональный фрагмент или вариант. Неограничивающими примерами подходящих ингибиторов CTLA4 служат анти-CTLA4 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты. К другим неограничивающим примерам подходящих ингибиторов CTLA4 относятся молекулы РНКи, такие как молекулы РНКи анти-CTLA4, и доминантно-негативные белки, такие как доминантно-негативный белок CTLA4.

Анти-CTLA4 антитела и их антигенсвязывающие фрагменты

[100] Согласно некоторым вариантам осуществления ингибиторы CTLA4, используемые в способах, раскрытых в настоящем документе, представляют собой антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают

CTLA4 (например, анти-CTLA4 антитела). Термин «специфически связывает» или аналогичные термины означают, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент образует комплекс с антигеном, который относительно стабилен в физиологических условиях. Способы определения, связываются ли антитела специфически с антигеном, хорошо известны в данной области техники, и к ним относятся, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и аналогичные способы. Например, антитело, которое «специфически связывает» CTLA4, при использовании в контексте настоящего раскрытия, относится к антителам, которые связывают антитело CTLA4 или его часть с K_D меньше чем приблизительно 500 нМ, меньше чем приблизительно 300 нМ, меньше чем приблизительно 200 нМ, меньше чем приблизительно 100 нМ, меньше чем приблизительно 90 нМ, меньше чем приблизительно 80 нМ, меньше чем приблизительно 70 нМ, меньше чем приблизительно 60 нМ, меньше чем приблизительно 50 нМ, меньше чем приблизительно 40 нМ, меньше чем приблизительно 30 нМ, меньше чем приблизительно 20 нМ, меньше чем приблизительно 10 нМ, меньше чем приблизительно 5 нМ, меньше чем приблизительно 4 нМ, меньше чем приблизительно 3 нМ, меньше чем приблизительно 2 нМ, меньше чем приблизительно 1 нМ или меньше чем приблизительно 0,5 нМ, при измерении методом поверхностного плазмонного резонанса. Выделенное антитело, которое специфически связывает человеческий CTLA4, может, однако, характеризоваться перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как CTLA4 молекулы других (отличных от человека) видов.

[101] Согласно некоторым примерам вариантов осуществления анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые можно использовать в контексте настоящего раскрытия, содержат определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14.

[102] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три HCDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и три LCDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 15; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 16; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 17; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 18; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 19; и LCDR3 содержит

аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 20.

[103] Согласно другим вариантам осуществления анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14. Согласно некоторым вариантам осуществления антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 21. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CTLA4 антитело содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 22.

[104] Примером антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, служит полностью человеческое анти-CTLA4 антитело, известное как REGN4659.

[105] В соответствии с некоторыми примерами вариантов осуществления способы согласно настоящему раскрытию предусматривают применение REGN4659 или его биоэквивалента. При использовании в настоящем документе термин «биоэквивалент» по отношению к ингибитору CTLA4 относится к анти-CTLA4 антителам или связывающим CTLA4 белкам или их фрагментам, которые являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, уровень и/или степень абсорбции которых не демонстрирует значительной разницы с абсорбцией эталонного антитела (например, REGN4659) при введении в той же молярной дозе в аналогичных экспериментальных условиях, будь то однократная доза или многократные дозы. В контексте настоящего раскрытия термин «биоэквивалент» относится к антигенсвязывающим белкам, которые связываются с CTLA4 и не характеризуются клинически значимыми различиями с REGN4659 в отношении безопасности, чистоты и/или активности.

[106] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия антитело к человеческому CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, характеризующуюся идентичностью последовательности по меньшей мере 90% (например, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 13.

[107] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия антитело к человеческому CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, характеризующуюся идентичностью последовательности (например, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO:

14.

[108] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия антитело к человеческому CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, содержащую не более 10 аминокислотных замен. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего раскрытия антитело к человеческому CTLA4 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат LCVR, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14, содержащую не более 10 аминокислотных замен.

[109] Также в объем настоящего раскрытия входят варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе, содержащие одну или несколько консервативных аминокислотных замен. Например, настоящее раскрытие относится к применению анти-PD-L1 антител, имеющих аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и так далее консервативными аминокислотными заменами относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе.

[110] К другим анти-CTLA4 антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые можно использовать в контексте способов согласно настоящему раскрытию, относятся, например, антитела, обозначаемые и известные в данной области техники как ипилимумаб, тремелимуаб, или любое из анти-CTLA4 антител, представленных в патентах США №№ 7527969, 8779098, 7666424, 7737258, 7740845, 8148154, 8414892, 8501471 и 9062110; и в патентных публикациях US2013/0078234, US2010/0143245, WO2017062615A2, WO 2004/001381 и WO 2012/147713. Части всех вышеупомянутых публикаций, в которых идентифицируются анти-CTLA4 антитела, включены в настоящий документ посредством ссылки.

Фармацевтические композиции и введение

[111] Настоящее раскрытие относится к способам, которые предусматривают введение онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и/или ингибитора CTLA4 субъекту, причем антитела содержатся в отдельной или комбинированной (единой) фармацевтической композиции. Фармацевтические композиции согласно настоящему раскрытию могут быть составлены с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают подходящие перенос, доставку, переносимость и аналогичные характеристики. Множество подходящих составов можно

найти в справочнике, известном всем фармацевтическим химикам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa. К этим составам относятся, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, содержащие липиды (катионные или анионные) везикулы (такие как LIPOFECTIN), конъюгаты ДНК, безводные абсорбционные пасты, эмульсии масло в воде и вода в масле, эмульсии карбовакса (полиэтиленгликоли различной молекулярной массы), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Смотри также Powell *et al.* PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[112] Известны различные системы доставки, которые можно использовать для введения фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию, например инкапсуляция в липосомы, микрочастицы, микрокапсулы, рекомбинантные клетки, способные экспрессировать мутантные вирусы, рецептор-опосредованный эндоцитоз (смотри, например, Wu *et al.*, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432). К способам введения относятся, но без ограничения, внутрикожный, внутримышечный, внутриопухолевый, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный и пероральный пути. Композицию можно вводить любым удобным путем, например с помощью инфузии или болюсной инъекции, с помощью абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные выстилки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и так далее), и можно вводить вместе с другими биологически активными средствами.

[113] Фармацевтическая композиция, содержащая онколитический вирус, ингибитор пути PD-1 или ингибитор CTLA4, может быть доставлена внутриопухолево, подкожно или внутривенно с помощью стандартной иглы и шприца. Кроме того, что касается подкожной доставки, при доставке фармацевтической композиции согласно настоящему раскрытию легко находит применение шприц-ручка для доставки. Такой шприц-ручка для доставки может быть многоразовым или одноразовым. В многоразовом шприце-ручке для доставки обычно используется сменный картридж, который содержит фармацевтическую композицию. После того как вся фармацевтическая композиция в картридже введена и картридж опустошен, пустой картридж можно легко выбросить и заменить новым картриджем, который содержит фармацевтическую композицию. Затем шприц-ручку для доставки можно использовать повторно. В одноразовом шприце-ручке для доставки нет сменного картриджа. Вместо этого одноразовый шприц-ручка для доставки поставляется предварительно заполненным фармацевтической композицией, содержащейся в резервуаре внутри устройства. После того как резервуар опорожняется от фармацевтической композиции, все устройство выбрасывают.

[114] В определенных ситуациях фармацевтическая композиция может быть доставлена в системе контролируемого высвобождения. Согласно одному варианту осуществления можно использовать насос. Согласно другому варианту осуществления можно использовать полимерные материалы; смотри, например, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Fla. Согласно еще одному варианту осуществления система контролируемого высвобождения может быть помещена вблизи мишени композиции, что требует только части системной дозы (смотри, например, Goodson, 1984, в *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138). Другие системы контролируемого высвобождения рассмотрены в обзоре Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533.

[115] Инъекционные препараты могут включать в себя лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных, внутриопухолевых и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и так далее. Эти инъекционные препараты могут быть приготовлены с помощью известных способов. Например, инъекционные препараты могут быть приготовлены, например, с помощью растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его соли, описанных выше, в стерильной водной среде или масляной среде, обычно используемых для инъекций. В качестве водной среды для инъекций используют, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные средства, и так далее, которые можно использовать в сочетании с подходящим солюбилизующим средством, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество [например, полисорбат 80, HCO-50 (полиоксиэтиленовый (50 моль) аддукт гидрогенизированного касторового масла)] и так далее. В качестве масляной среды используют, например, кунжутное масло, соевое масло и так далее, которые можно использовать в сочетании с солюбилизующим средством, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и так далее. Приготовленную таким образом инъекцию предпочтительно помещают в соответствующую ампулу.

[116] Преимущественно фармацевтические композиции для перорального или парентерального применения, описанные выше, готовят в виде лекарственных форм в разовой дозе, соответствующей дозе активных ингредиентов. К таким лекарственным формам в разовой дозе относятся, например, таблетки, пилюли, капсулы, инъекции (ампулы), суппозитории и так далее.

[117] Настоящее раскрытие также относится к наборам, содержащим онколитический вирус, ингибитор пути PD-1 и ингибитор CTLA4 в сочетании с письменными инструкциями по применению терапевтически эффективного количества

комбинации онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и ингибитора CTLA4 для лечения и ингибирования роста опухоли у пациента.

Схемы введения

[118] Способы согласно настоящему раскрытию могут предусматривать введение субъекту онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 (например, анти-PD-1, анти-PD-L1 или анти-PD-L2 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) или ингибитора CTLA4 (например, анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) с частотой введения доз приблизительно четыре раза в неделю, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели, один раз в пять недель, один раз в шесть недель, один раз в восемь недель, один раз в двенадцать недель или реже, пока не будет достигнут терапевтический ответ. Способы согласно настоящему раскрытию могут также предусматривать введение однократной дозы каждого средства из онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4.

[119] Согласно некоторым вариантам осуществления по меньшей мере одно средство из онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4 вводят пациенту один раз в день, один раз в два дня, один раз в три дня, один раз в четыре дня, один раз в пять дней, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в три недели.

[120] Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус, ингибитор пути PD-1 и ингибитор CTLA4 вводят пациенту одновременно.

[121] Согласно некоторым вариантам осуществления способы могут предусматривать последовательное введение субъекту двух или более средств из онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и ингибитора CTLA4. Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус вводят пациенту до или после ингибитора пути PD-1 и ингибитора CTLA4. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор пути PD-1 вводят пациенту до или после онколитического вируса и ингибитора CTLA4. Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор CTLA4 вводят пациенту до или после онколитического вируса и ингибитора пути PD-1.

[122] При использовании в настоящем документе «последовательно введение» означает, что все дозы онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4 вводят субъекту в различные моменты времени, например различные дни, разделенные заранее определенным интервалом (например, часами, днями, неделями или месяцами). Настоящее раскрытие относится к способам, которые предусматривают последовательное введение пациенту одной начальной дозы онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4, за которой следует одна или несколько вторичных доз онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4 и,

необязательно, за которыми следует одна или несколько третичных доз онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4. Согласно некоторым вариантам осуществления способы дополнительно предусматривают последовательное введение пациенту одной начальной дозы онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4, за которой следует одна или несколько вторичных доз онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4 и, необязательно, за которыми следует одна или несколько третичных доз онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4.

[123] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которую вводят в начале схемы лечения (также называется «исходной дозой»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводят после вторичных доз. Начальная, вторичные и третичные дозы могут содержать одинаковое количество онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4. Согласно некоторым вариантам осуществления, однако, количества, содержащиеся в начальной, вторичных и/или третичных дозах, различаются между собой (например, корректируются в большую или меньшую сторону по мере необходимости) в течение курса лечения. Согласно некоторым вариантам осуществления одну или несколько (например, 1, 2, 3, 4 или 5) доз вводят в начале схемы лечения в качестве «нагрузочных доз», за которыми следуют последующие дозы, которые вводят не так часто (например, «поддерживающие дозы»).

[124] Согласно одному примеру варианта осуществления настоящего раскрытия каждую вторичную и/или третичную дозу вводят каждые $\frac{1}{2}$ -14 (например, $\frac{1}{2}$, 1, $1\frac{1}{2}$, 2, $2\frac{1}{2}$, 3, $3\frac{1}{2}$, 4, $4\frac{1}{2}$, 5, $5\frac{1}{2}$, 6, $6\frac{1}{2}$, 7, $7\frac{1}{2}$, 8, $8\frac{1}{2}$, 9, $9\frac{1}{2}$, 10, $10\frac{1}{2}$, 11, $11\frac{1}{2}$, 12, $12\frac{1}{2}$, 13, $13\frac{1}{2}$, 14, $14\frac{1}{2}$ или более) недель после непосредственно предшествующей дозы. Фраза «непосредственно предшествующая доза» при использовании в настоящем документе означает в последовательности нескольких введений дозу онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4, которую вводят пациенту до введения следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

[125] Согласно некоторым вариантам осуществления способы могут предусматривать введение пациенту любого количества вторичных и/или третичных доз онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 (например, анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) или ингибитора CTLA4 (например, анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента). Например, согласно некоторым

вариантам осуществления пациенту вводят только одну вторичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) вторичные дозы. Аналогично, согласно некоторым вариантам осуществления пациенту вводят только одну третичную дозу. Согласно другим вариантам осуществления пациенту вводят две или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) третичные дозы.

[126] Согласно вариантам осуществления с несколькими вторичными дозами каждую вторичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие вторичные дозы. Например, каждую вторичную дозу можно вводить пациенту через 1-2 недели после непосредственно предшествующей дозы. Аналогично, согласно вариантам осуществления с несколькими третичными дозами каждую третичную дозу можно вводить с той же частотой, что и другие третичные дозы. Например, каждую третичную дозу можно вводить пациенту через 2-4 недели после непосредственно предшествующей дозы. Альтернативно, частота, с которой пациенту вводят вторичные и/или третичные дозы, может меняться в течение курса лечения. Частота введения также может быть скорректирована врачом в течение курса лечения в зависимости от потребностей конкретного пациента после клинического обследования.

[127] Согласно некоторым вариантам осуществления одну или несколько доз онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 или ингибитора CTLA4 вводят в начале схемы лечения в качестве «индукционных доз» с более высокой частотой (два раза в неделю, один раз в неделю или один раз в 2 недели), за чем следуют последующие дозы («консолидирующие дозы» или «поддерживающие дозы»), которые вводят с меньшей частотой (например, один раз в 4-12 недель).

Дозировка

[128] Количество онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 (например, анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) или ингибитора CTLA4 (например, анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), вводимое субъекту в соответствии со способами, раскрытыми в настоящем документе, обычно представляет собой терапевтически эффективное количество. При использовании в настоящем документе термин «терапевтически эффективное количество» означает количество онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и/или ингибитора CTLA4, которое приводит к одному или нескольким результатам из: (a) снижения тяжести или продолжительности симптома или признака рака, например опухолевого поражения; (b) ингибирования роста опухоли или усиления некроза опухоли, уменьшения опухоли и/или исчезновения опухоли; (c) задержки роста и развития опухоли; (d) ингибирования

метастазирования опухоли; (е) предотвращения рецидива роста опухоли; (f) увеличения выживаемости субъекта с раком; и/или (g) снижения использования или потребности в обычной противораковой терапии (например, устранения необходимости в хирургическом вмешательстве или уменьшения или прекращения использования химиотерапевтических или цитотоксических средств) по сравнению с не получавшим лечения субъектом, субъектом, получавшим монотерапию, или субъектом, получавшим любые два из трех терапевтических средств, раскрытых в настоящем документе (ингибитора пути PD-1, ингибитора CTLA4 и онколитического вируса).

[129] Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус комбинации можно вводить в виде одной или нескольких единичных доз по 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или больше вирусных частиц (viral particles, vp) или бляшкообразующих единиц (plaque-forming units, pfu). Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус представляет собой онколитический рабдовирус (например, дикого типа или генетически модифицированный VSV), и его вводят человеку с раком в виде одной или нескольких доз по 10^6 - 10^{14} pfu, 10^6 - 10^{12} pfu, 10^8 - 10^{14} pfu, 10^8 - 10^{12} или 10^{10} - 10^{12} pfu или в любом диапазоне между ними.

[130] Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус комбинации можно вводить в виде одной или нескольких единичных доз по 10, 100, 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или больше инфицирующей 50% тканевой культуры дозы (TCID₅₀). Согласно некоторым вариантам осуществления онколитический вирус представляет собой онколитический рабдовирус (например, дикого типа или генетически модифицированный VSV), и его вводят человеку с раком в виде одной или нескольких доз по 10^4 - 10^{14} TCID₅₀, 10^4 - 10^{14} TCID₅₀, 10^4 - 10^{12} TCID₅₀, 10^8 - 10^{14} TCID₅₀, 10^8 - 10^{12} или 10^{10} - 10^{12} TCID₅₀ или в любом диапазоне между ними.

[131] Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективное количество ингибитора пути PD-1 (например, анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, такого как цемиплимаб или его биоэквивалент) может составлять от приблизительно 0,05 мг до приблизительно 1500 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 50 мг до приблизительно 400 мг, от приблизительно 75 мг до приблизительно 350 мг или от приблизительно 100 мг до приблизительно 300 мг антитела. Например, согласно различным вариантам осуществления количество ингибитора пути PD-1 составляет приблизительно 0,05 мг, приблизительно 0,1 мг, приблизительно 1,0 мг, приблизительно 1,5 мг, приблизительно 2,0 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг,

приблизительно 1320 мг, приблизительно 1330 мг, приблизительно 1340 мг, приблизительно 1350 мг, приблизительно 1360 мг, приблизительно 1370 мг, приблизительно 1380 мг, приблизительно 1390 мг, приблизительно 1400 мг, приблизительно 1410 мг, приблизительно 1420 мг, приблизительно 1430 мг, приблизительно 1440 мг, приблизительно 1450 мг, приблизительно 1460 мг, приблизительно 1470 мг, приблизительно 1480 мг, приблизительно 1490 мг или приблизительно 1500 мг.

[132] Количество ингибитора пути PD-1 (например, анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), содержащееся в отдельной дозе, может быть выражено в миллиграммах антитела на килограмм массы тела субъекта (то есть, в мг/кг). Согласно некоторым вариантам осуществления ингибитор пути PD-1, используемый в способах, раскрытых в настоящем документе, можно вводить субъекту в дозе от приблизительно 0,0001 до приблизительно 100 мг/кг массы тела субъекта. Согласно некоторым вариантам осуществления анти-PD-1 антитело можно вводить в дозе от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг массы тела пациента. Согласно некоторым вариантам осуществления способы согласно настоящему раскрытию предусматривают введение ингибитора пути PD-1 (например, анти-PD-1 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) в дозе от приблизительно 1 мг/кг до 3 мг/кг, от 1 мг/кг до 5 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг или 10 мг/кг массы тела пациента.

[133] Согласно некоторым вариантам осуществления каждая доза содержит 0,1–10 мг/кг (например, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг) массы тела субъекта. Согласно некоторым другими вариантам осуществления каждая доза содержит 5–1500 мг ингибитора пути PD-1 (такого как анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), например 5 мг, 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг, 1000 мг, 1050 мг, 1100 мг, 1150 мг, 1200 мг, 1550 мг, 1300 мг, 1350 мг, 1400 мг, 1450 мг или 1500 мг ингибитора пути PD-1.

[134] Согласно некоторым вариантам осуществления терапевтически эффективное количество ингибитора CTLA4 (например, анти-CTLA4 антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, или его биоэквивалента) может составлять от приблизительно 0,05 мг до приблизительно 1000 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 800 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 600 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 550 мг, от приблизительно 50 мг до приблизительно 400 мг, от приблизительно 75 мг до приблизительно 350 мг или от приблизительно 100 мг до приблизительно 300 мг антитела. Например, согласно различным

вариантам осуществления количество ингибитора CTLA4 составляет приблизительно 0,05 мг, приблизительно 0,1 мг, приблизительно 1,0 мг, приблизительно 1,5 мг, приблизительно 2,0 мг, приблизительно 5 мг, приблизительно 10 мг, приблизительно 15 мг, приблизительно 20 мг, приблизительно 30 мг, приблизительно 40 мг, приблизительно 50 мг, приблизительно 60 мг, приблизительно 70 мг, приблизительно 80 мг, приблизительно 90 мг, приблизительно 100 мг, приблизительно 110 мг, приблизительно 120 мг, приблизительно 130 мг, приблизительно 140 мг, приблизительно 150 мг, приблизительно 160 мг, приблизительно 170 мг, приблизительно 180 мг, приблизительно 190 мг, приблизительно 200 мг, приблизительно 210 мг, приблизительно 220 мг, приблизительно 230 мг, приблизительно 240 мг, приблизительно 250 мг, приблизительно 260 мг, приблизительно 270 мг, приблизительно 280 мг, приблизительно 290 мг, приблизительно 300 мг, приблизительно 310 мг, приблизительно 320 мг, приблизительно 330 мг, приблизительно 340 мг, приблизительно 350 мг, приблизительно 360 мг, приблизительно 370 мг, приблизительно 380 мг, приблизительно 390 мг, приблизительно 400 мг, приблизительно 410 мг, приблизительно 420 мг, приблизительно 430 мг, приблизительно 440 мг, приблизительно 450 мг, приблизительно 460 мг, приблизительно 470 мг, приблизительно 480 мг, приблизительно 490 мг, приблизительно 500 мг, приблизительно 510 мг, приблизительно 520 мг, приблизительно 530 мг, приблизительно 540 мг, приблизительно 550 мг, приблизительно 560 мг, приблизительно 570 мг, приблизительно 580 мг, приблизительно 590 мг, приблизительно 600 мг, приблизительно 610 мг, приблизительно 620 мг, приблизительно 630 мг, приблизительно 640 мг, приблизительно 650 мг, приблизительно 660 мг, приблизительно 670 мг, приблизительно 680 мг, приблизительно 690 мг, приблизительно 700 мг, приблизительно 710 мг, приблизительно 720 мг, приблизительно 730 мг, приблизительно 740 мг, приблизительно 750 мг, приблизительно 760 мг, приблизительно 770 мг, приблизительно 780 мг, приблизительно 790 мг, приблизительно 800 мг, приблизительно 810 мг, приблизительно 820 мг, приблизительно 830 мг, приблизительно 840 мг, приблизительно 850 мг, приблизительно 860 мг, приблизительно 870 мг, приблизительно 880 мг, приблизительно 890 мг, приблизительно 900 мг, приблизительно 910 мг, приблизительно 920 мг, приблизительно 930 мг, приблизительно 940 мг, приблизительно 950 мг, приблизительно 960 мг, приблизительно 970 мг, приблизительно 980 мг, приблизительно 990 мг или приблизительно 1000 мг.

[135] Количество ингибитора CTLA4 (например, анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), содержащееся в отдельной дозе, может быть выражено в миллиграммах антитела на килограмм массы тела субъекта (то есть, в мг/кг). Согласно некоторым вариантам осуществления анти-CTLA4 антитело можно вводить в дозе от

приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг массы тела пациента. Согласно некоторым вариантам осуществления способы согласно настоящему раскрытию предусматривают введение ингибитора CTLA4 (например, анти-CTLA4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента) в дозе от приблизительно 1 мг/кг до 3 мг/кг, от 1 мг/кг до 5 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг, 5 мг/кг, 10 мг/кг или 15 мг/кг массы тела пациента.

[136] Согласно некоторым вариантам осуществления каждая доза содержит 0,1–10 мг/кг (например, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг, 3 мг/кг или 10 мг/кг) массы тела субъекта. Согласно некоторым другими вариантам осуществления каждая доза содержит 5–1000 мг ингибитора CTLA4 (такого как анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент), например 5 мг, 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 40 мг, 45 мг, 50 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг, 400 мг, 450 мг, 500 мг, 550 мг, 600 мг, 650 мг, 700 мг, 750 мг, 800 мг, 850 мг, 900 мг, 950 мг или 1000 мг ингибитора CTLA4.

[137] Согласно некоторым вариантам осуществления способы согласно настоящему раскрытию дополнительно предусматривают введение субъекту дополнительных терапевтического средства или терапии. Дополнительные терапевтическое средство или терапию можно вводить для повышения противоопухолевой эффективности, для снижения токсических эффектов одной или нескольких терапий и/или для снижения дозировки одной или нескольких терапий. Согласно различным вариантам осуществления к дополнительным терапевтическим средствам или терапиям могут относиться одно или несколько из: лучевой терапии, хирургического вмешательства, противораковой вакцины, имихимода, противовирусного средства (например, цидофовира), фотодинамической терапии, ингибитора гена активации лимфоцитов 3 (LAG3) (например, анти-LAG3 антитела), агониста индуцированного глюкокортикоидами рецептора фактора некроза опухоли (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*, GITR) (например, анти-GITR антитела), ингибитора белка, содержащего домен иммуноглобулина Т-клеток и домен муцина 3 (TIM3), ингибитора В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), ингибитора Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), ингибитора CD38, ингибитора CD47, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), активатора CD28, антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (например, «ловушки VEGF», такой как афлиберцепт, или анти-VEGF антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (например, бевацизумаба или ранибизумаба), или низкомолекулярного ингибитора киназ рецептора VEGF (например, сунитиниба, сорафениба или пазопаниба)), ингибитора ангиопоэтина-2 (Ang2), ингибитора трансформирующего фактора роста бета (TGF β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), антитела к

опухолеспецифическому антигену (например, CA9, CA125, меланома-ассоциированному антигену 3 (MAGE3), карциноэмбриональному антигену (CEA), виментину, опухолевой M2-PK, простатспецифическому антигену (PSA), муцину-1, MART-1 и CA19-9), вакцины (например, бацилл Кальметта-Герена), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), второго онколитического вируса, цитотоксина, химиотерапевтического средства (например, пеметрекседа, дакарбазина, темозоломида, циклофосфамида, доцетаксела, доксорубицина, даунорубицина, цисплатина, карбоплатина, гемцитабина, метотрексата, митоксантрона, оксалиплатина, паклитаксела, топотекана, иринотекана, винорелбина и винкристина), ингибитора IL-6R, ингибитора IL-4R, ингибитора IL-10, цитокина, такого как IL-2, IL-7, IL-12, IL-21 и IL-15, конъюгата антитело-лекарственное средство, противовоспалительного лекарственного средства, такого как кортикостероид, нестероидного противовоспалительного лекарственного средства (NSAID), криотерапии, анти-HPV терапии, лазерной терапии, электрохирургического иссечения клеток с HPV и их комбинаций.

[138] Согласно некоторым вариантам осуществления способы дополнительно предусматривают введение дополнительного терапевтического средства, такого как противораковое лекарственное средство. При использовании в настоящем документе «противораковое лекарственное средство» означает любое средство, полезное для лечения рака, включая, но без ограничения, цитотоксины и такие средства, как антиметаболиты, алкилирующие средства, антрациклины, антибиотики, антимитотические средства, прокарбазин, гидроксимочевина, аспарагиназа, кортикостероиды, митотан (O, P'-(DDD)), биологические препараты (например, антитела и интерфероны) и радиоактивные средства. При использовании в настоящем документе «цитотоксин или цитотоксическое средство» также относится к химиотерапевтическому средству и означает любое средство, которое вредно для клеток. Примерами служат TAXOL (паклитаксел), темозоломид, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, цисплатин, митомицин, этопозид, тенипозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрацендион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дигидротестостерон, глюкокортикоиды, новокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пурамицин и их аналоги или гомологи.

Дополнительные определения

[139] Для облегчения понимания подробного описания композиций и способов в соответствии с настоящим раскрытием предоставлено несколько четких определений, чтобы облегчить однозначное раскрытие различных аспектов настоящего раскрытия. Если

не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, которое обычно понятно рядовому специалисту в области техники, к которой принадлежит настоящее раскрытие.

[140] При использовании в настоящем документе термин «средство» обозначает химическое соединение, смесь химических соединений, биологическую макромолекулу (такую как нуклеиновая кислота, антитело, белок или его часть, например пептид) или экстракт, полученный из биологических материалов, таких как клетки или ткани бактерий, растений, грибов или животных (особенно млекопитающих). Активность такого средства может делать его пригодным для роли «терапевтического средства», которое представляет собой биологически, физиологически или фармакологически активное вещество (или вещества), которое воздействует локально или системно на субъекта. В контексте настоящего раскрытия термин «терапевтическое средство» относится к любому из ингибиторов пути PD-1, ингибиторов CTLA4 или онколитических вирусов, раскрытых в настоящем документе.

[141] При использовании в настоящем документе термины «терапевтическое средство», «терапевтически активное средство» или «лечебное средство» используются взаимозаменяемо и относятся к молекуле или соединению, которое оказывает некоторое полезное действие при введении субъекту. К полезным действиям относятся возможность диагностических определений; облегчение заболевания, симптома, расстройства или патологического состояния; уменьшение или предотвращение возникновения заболевания, симптома, расстройства или состояния; и общее противодействие заболеванию, симптому, расстройству или патологическому состоянию.

[142] При использовании в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый» относится к материалу, такому как носитель или разбавитель, который не подавляет биологическую активность или свойства композиции и является относительно нетоксичным, то есть этот материал можно вводить индивидууму, не вызывая нежелательных биологических эффектов или вредного взаимодействия с любым из компонентов композиции, в которой он содержится.

[143] При использовании в настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый носитель» относится к фармацевтически приемлемой соли, фармацевтически приемлемым материалу, композиции или носителю, такому как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или инкапсулирующий материал, участвующий в переносе или транспортировке соединения(ий) согласно настоящему раскрытию внутри субъекта или к субъекту, так что оно может выполнять свою предполагаемую функцию. Обычно такие соединения

переносятся или транспортируются из одного органа или части тела в другой орган или часть тела. Каждая соль или носитель должны быть «приемлемыми» в том смысле, что они совместимы с другими ингредиентами состава и не вредны для субъекта. Некоторыми примерами материалов, которые могут служить в качестве фармацевтически приемлемых носителей, являются: сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозиторий; масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло; гликоли, такие как пропиленгликоль; полиолы, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; агар; буферные средства, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; альгиновая кислота; апирогенная вода; изотонический физиологический раствор; раствор Рингера; этиловый спирт; фосфатные буферные растворы; разбавитель; гранулирующее средство; смазывающее вещество; связующее вещество; дезинтегрирующее средство; смачивающее средство; эмульгатор; красящее средство; разделительное средство; покрывающее средство; подслащивающее средство; ароматизирующее средство; парфюмирующее средство; консервант; антиоксидант; пластификатор; желирующее средство; загуститель; отвердитель; фиксирующее средство; суспендирующее средство; поверхностно-активное вещество; увлажнитель; носитель; стабилизатор; и другие нетоксичные совместимые вещества, используемые в фармацевтических составах, или любая их комбинация. При использовании в настоящем документе «фармацевтически приемлемый носитель» также относится к любым и всем покрытиям, антибактериальным и противогрибковым средствам, замедляющим абсорбцию средств и аналогичным средствам, которые совместимы с активностью одного или нескольких компонентов согласно настоящему раскрытию и физиологически приемлемы для субъекта. В композиции также могут быть включены дополнительные активные соединения.

[144] Дозы часто выражают в зависимости от массы тела. Таким образом, доза, которая выражена как [г, мг или другая единица]/кг (или г, мг и так далее) обычно относится к [г, мг или другой единице] «на кг (или г, мг и так далее) массы тела», даже если термин «масса тела» прямо не упоминается. Лечение может предусматривать различные «единичные дозы». Единичная доза определяется как содержащая заранее определенное количество терапевтической композиции. Единичную дозу не обязательно вводить в виде однократной инъекции, но она может содержать непрерывную инфузию в течение

установленного периода времени. Для онколитических вирусов единичная доза может быть описана в терминах бляшкообразующих единиц (pfu) или вирусных частиц для вирусных конструкций. Единичные дозы лежат в диапазоне от 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} pfu или vp и выше. Альтернативно, в зависимости от типа вируса и достижимого титра, можно доставлять от 1 до 100, от 10 до 50, 100-1000 или вплоть до приблизительно 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} или 1×10^{15} или более инфекционных вирусных частиц (vp) пациенту или в клетки пациента. Альтернативно, единичные дозы для онколитических вирусов представляют с помощью TCID₅₀. «TCID₅₀» относится к «инфицирующей тканевую культуру дозе» и определяется как разведение вируса, необходимое для инфицирования 50% данной партии инокулированных клеточных культур. Для расчета TCID₅₀ можно использовать различные способы, известные специалисту в данной области техники, включая метод Спирмана-Карбера, который используется в данном описании. Описание метода Спирмана-Карбера смотри в В. W. Mahy & Н. О. Kangro, *Virology Methods Manual* 25-46 (1996). Согласно некоторым вариантам осуществления единичные дозы лежат в диапазоне от 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} TCID₅₀ и выше или в любых диапазонах между ними.

[145] При использовании в настоящем документе термин «заболевание» рассматривается как в целом синонимичный и используется взаимозаменяемо с терминами «расстройство» и «состояние» (в случае медицинского состояния), поскольку все они отражают аномальное состояние (например, рак) тела человека или животного или одной из его частей, что нарушает нормальное функционирование, обычно проявляется характерными признаками и симптомами и приводит к снижению продолжительности или качества жизни человека или животного.

[146] При использовании в настоящем документе термин «*in vitro*» относится к событиям, которые происходят в искусственной среде, например в тестовой пробирке или реакционном сосуде, в клеточной культуре и так далее, а не внутри многоклеточного организма.

[147] При использовании в настоящем документе термин «*in vivo*» относится к событиям, которые происходят внутри многоклеточного организма, такого как отличное от человека животное.

[148] При использовании в настоящем документе формы единственного числа включают в себя ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

[149] При использовании в настоящем документе термины «включающий в себя», «содержащий», «предусматривающий» или «имеющий» и их варианты означают, что они охватывают перечисленные далее элементы и их эквиваленты, а также дополнительные

объекты, если не указано иное.

[150] При использовании в настоящем документе неоднократно используются фразы «согласно одному варианту осуществления», «согласно различным вариантам осуществления», «согласно некоторым вариантам осуществления» и аналогичные. Такие фразы не обязательно относятся к одному и тому же варианту осуществления, но это возможно, если контекст не требует иного.

[151] При использовании в настоящем документе термины «и/или» или «/» означают любой из элементов, любую комбинацию элементов или все элементы, с которыми связан этот термин.

[152] При использовании в настоящем документе слово «по существу» не исключает «полностью», например, композиция, которая «по существу свободна» от Y, может быть полностью свободна от Y. При необходимости слово «по существу» может быть опущено в определении настоящего раскрытия.

[153] При использовании в настоящем документе термин «каждый», когда он используется по отношению к набору элементов, предназначен для идентификации отдельного элемента в наборе, но не обязательно относится ко всем элементам в наборе. Исключения могут иметь место, если явное раскрытие или контекст прямо требуют иного.

[154] При использовании в настоящем документе термин «приблизительно» или «примерно» применительно к одному или нескольким представляющим интерес значениям относится к значению, которое аналогично заявленному эталонному значению. Согласно некоторым вариантам осуществления термин «приблизительно» или «примерно» относится к диапазону значений, которые попадают в пределы 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или менее в любом направлении (больше чем или меньше чем) от заявленного эталонного значения, если иное не указано или иным образом не очевидно из контекста (за исключением случаев, когда такое число превышает 100% возможного значения). Если иное не указано в настоящем документе, термин «приблизительно» предназначен для включения в себя значений, например массовых процентов, близких к указанному диапазону, которые эквивалентны с точки зрения функциональности отдельного ингредиента, композиции или варианта осуществления.

[155] Как раскрыто в настоящем документе, предложен ряд диапазонов значений. Следует понимать, что также конкретно раскрыто каждое промежуточное значение до десятой от единицы нижнего предела, если из контекста явно не следует иное, между верхним и нижним пределами этого диапазона. Каждый меньший диапазон между любым установленным значением или промежуточным значением в установленном диапазоне и

любым другим установленным или промежуточным значением в этом установленном диапазоне охватывается настоящим раскрытием. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в диапазон или исключены из диапазона, и каждый диапазон, в котором любой из пределов, ни один из них или они оба включены в меньшие диапазоны, также охватывается настоящим раскрытием с учетом любого специально исключенного предела в установленном диапазоне. Если установленный диапазон включает в себя один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в настоящее раскрытие.

[156] Использование любых и всех примеров или вводных слов для примеров (например, «такой как»), представленных в настоящем документе, предназначено только для лучшего освещения настоящего раскрытия и не накладывает ограничение на объем настоящего раскрытия, если не заявлено иное. Никакие формулировки в описании не должны быть истолкованы как указывающие на какой-либо не заявленный элемент как существенный для реализации настоящего раскрытия.

[157] Все способы, описанные в настоящем документе, выполняют в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящем документе или иным образом явно не противоречит контексту. Что касается любого из предложенных способов, стадии способа можно проводить одновременно или последовательно. Когда стадии способа проводят последовательно, стадии можно проводить в любом порядке, если не указано иное. В случаях, когда способ предусматривает комбинацию стадий, все без исключения комбинации или подкомбинации стадий входят в объем настоящего раскрытия, если иное не указано в настоящем документе.

[158] Все публикации, заявки на выдачу патента, патенты и другие ссылки, цитируемые в настоящем документе, включены посредством ссылки во всей полноте в той степени, в которой они не противоречат настоящему раскрытию. Публикации, раскрытые в настоящем документе, предложены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящего раскрытия. Ничто в настоящем документе не должно быть истолковано как признание того, что настоящее раскрытие не может быть противопоставлено такой публикации в силу предварительного раскрытия. Кроме того, предоставленные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут требовать независимого подтверждения.

[159] Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в настоящем документе, предназначены только для иллюстративных целей, и что специалистами в данной области техники будут предложены различные модификации или изменения в их свете, и они должны быть включены в сущность и объем настоящей заявки

и объем прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

[160] Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить рядовым специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как осуществлять и использовать способы и композиции согласно настоящему раскрытию, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы настоящего изобретения считают своим изобретением. Аналогично, настоящее раскрытие не ограничено любыми конкретными предпочтительными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, модификации и варианты вариантов осуществления могут быть очевидны специалистам в данной области техники после прочтения данного описания и могут быть выполнены без отклонения от его сущности и объема. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количеств, температуры и так далее), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура указана в градусах Цельсия, комнатная температура составляет приблизительно 25°C, и давление равно атмосферному или близко к нему.

Пример 1: Противоопухолевая эффективность комбинированного лечения с помощью анти-PD-1, анти-CTLA4 и внутриопухолевой доставки онколитического вируса VSV-M51R-Fluc у мышей с опухолями MC38 со средним размером 150 мм³

[161] В этом примере описана противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации с использованием онколитического вируса вирус везикулярного стоматита (VSV) с анти-PD-1 и анти-CTLA4 у мышей дикого типа, которым имплантировали опухоли MC38. VSV, используемый в этом примере (а также в последующих примерах 2-3), представляет собой генетически аттенуированный вирус, названный VSV-M51R-Fluc, поскольку он кодирует мутацию в белке М (M51R) (белок М ингибирует выработку белка клеткой-хозяином, но мутация M51R сохраняет выработку белка клеткой-хозяином) и кодирует люциферазу светлячка, вставленную между вирусными генами G и L. Анти-PD-1 антитело, используемое в этом примере (а также в последующих примерах 2-4), представляет собой антитело IgG2a крысы к PD-1 мыши (клон 29F1.A12 от Bioxcell), и анти-CTLA4 антитело, используемое в этом примере (а также в последующих примерах 2-4), представляло собой антитело mIgG2a к CTLA4 мыши (клон 9D9).

[162] Исходным мышам линии C57BL/6 от Jackson Laboratories имплантировали подкожно клетки MC38 (3×10^5 клеток, суспендированных в 100 мкл DMEM, на мышь) в день 0. Опухоли измеряли с использованием кронциркуля, и объемы опухолей рассчитывали с помощью формулы $(L^2 \times W)/2$, где L представляет собой наименьший размер. Мышей равномерно рандомизировали на 7 групп лечения, когда средний размер опухоли достигал 150 мм^3 , что происходило в день 15. Мышам внутриопухолево инъецировали по 50 мкл вируса VSV-M51R-Fluc в дозе $5 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}$, ресуспендированного в 50 мкл PBS, или PBS в качестве контроля и/или внутрибрюшинную инъекцию или 250 мкг антитела изотипического контроля (mIgG2a и/или IgG2a крысы), и/или 250 мкг анти-CTLA4 антитела, и/или анти-PD-1 антитела в дни 15, 19, 22 и 26. Экспериментальный протокол введения доз и лечения для различных групп показан в таблице 1.

Таблица 1: Экспериментальный протокол введения доз и лечения для групп мышей

Группа	Путь введения вируса или PBS	Введение вируса или PBS в D15	TCID ₅₀	Ab 1 (в/б введение)	Ab 2 (в/б введение)	Интервал введения доз антител	Кол-во
1	Внутриопухолевый	PBS	-	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D15, 19, 22 и 26	5
2	Внутриопухолевый	PBS	-	a-PD-1 250 мкг	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D15, 19, 22 и 26	5
3	Внутриопухолевый	PBS	-	a-PD-1 250 мкг	a-CTLA4 250 мкг	D15, 19, 22 и 26	6
4	Внутриопухолевый	VSV-M51R-Fluc	$5 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}$	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D15, 19, 22 и 26	5
5	Внутриопухолевый	VSV-M51R-Fluc	$5 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}$	a-PD-1 250 мкг	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D15, 19, 22 и 26	6
6	Внутриопухолевый	VSV-M51R-Fluc	$5 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}$	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	a-CTLA4 250 мкг	D15, 19, 22 и 26	6
7	Внутриопухолевый	VSV-M51R-Fluc	$5 \times 10^5 \text{ TCID}_{50}$	a-PD-1 250 мкг	a-CTLA4 250 мкг	D15, 19, 22 и 26	6

[163] Объемы опухолей контролировали с помощью измерения кронциркулем два раза в неделю до конца исследования в день 60.

[164] Средние объемы опухолей с течением времени для каждой группы показывают, что монотерапия с помощью или VSV, или анти-PD-1 антител показала

частичное ингибирование роста опухоли по сравнению с лечением с помощью PBS и получавшей изотипический контроль группой (**фигура 1**). Для статистического анализа использовали объемы отдельных опухолей в день 26 после начала лечения (**фигура 2**), поскольку это был последний момент времени в исследовании, когда все животные во всех группах были живы. Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного ANOVA с апостериорным критерием множественных сравнений Даннетта (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$). Эффективность монотерапии анти-PD-1 антителом или VSV не достигала статистической значимости. Лечение комбинацией VSV с анти-CTLA4 антителом или с анти-PD-1 антителами приводило к более эффективному ингибированию роста опухоли по сравнению с монотерапией с помощью анти-PD-1 антитела или контролем со статистически значимо меньшими опухолями в день 26 в получавшей комбинацию группе, чем в получавшей анти-PD-1 антитело группе (**фигура 3**). Лечение комбинацией анти-CTLA4 и анти-PD-1 антител приводило к статистически значимому уменьшению роста опухоли по сравнению со всеми другими моно- и двухкомпонентными комбинациями без каких-либо мышей без опухоли к дню 26. Следует отметить, что лечение трехкомпонентной комбинацией VSV с анти-CTLA4 и анти-PD-1 антителами оказалось более эффективным по сравнению со всеми другими группами, причем у всех мышей их опухоль исчезала к дню 29, и это исчезновение опухоли длилось до конца исследования в день 60 (**фигуры 1, 2, 3**). В таблице 2 сведены средние объемы опухолей, процентная выживаемость и количество мышей без опухоли в каждой группе лечения.

Таблица 2: Средний объем опухоли, процентная выживаемость и количество мышей без опухоли в каждой группе лечения

Группа лечения (n=5-6)		Объем опухоли, мм ³ среднее (±SD)	Мыши без опухоли	Выживаемость, %		
				День 26	День 29	День 60
1	PBS	1821 (±168)	0/5	100%	0%	0%
2	a-PD-1	1326 (±164)	0/5	100%	0%	0%
3	a-PD-1 + a-CTLA4	223 (±59)	1/5	100%	100%	20%
4	VSV	1364 (126)	0/6	100%	0%	0%
5	VSV + a-PD-1	1220 (±115)	0/6	100%	16,6%	0%
6	VSV + a-CTLA4	932 (±148)	0/6	100%	50%	0%
7	VSV + a-PD-1 + a-CTLA4	70 (±26)	6/6	100%	100%	100%

[165] Как показано в таблице 2, у мышей, получавших лечение трехкомпонентной комбинацией VSV с анти-PD-1 и анти-CTLA4 антителами, контроль и удаление больших опухолей в ходе исследования оказались очень эффективными, причем у шести из шести мышей не было опухоли к дню 29. Мыши, получавшие лечение с помощью или анти-PD-1, или анти-CTLA4 антител в комбинации или без комбинации с VSV, демонстрировали умеренно уменьшенный объем опухоли по сравнению с контролем в день 26 исследования. Напротив, лечение с помощью двухкомпонентной комбинации анти-PD1 и анти-CTLA4 антител демонстрировало значительную эффективность в уменьшении объема опухоли в этом исследовании по сравнению с контролем, причем одна мышь из пяти достигла исчезновения опухоли; но оно было не так эффективно, как когда в комбинации с анти-PD1 и анти-CTLA4 антителами также доставляли VSV. К дню 29 исследования должны были быть уничтожены все мыши в контрольной группе PBS, в группе анти-PD-1, в получавшей VSV группе, пять из шести в получавшей двухкомпонентную комбинацию VSV с анти-PD-1 группе, три из шести в группе двухкомпонентной комбинации VSV с анти-CTLA4, и были все еще живы все мыши в группе двухкомпонентной комбинации анти-PD1 и анти-CTLA4 антител и трехкомпонентной комбинации VSV с анти-PD-1 и анти-CTLA4 антителами. В конце исследования только группа трехкомпонентной комбинации оставалась без опухолей и выжила, при только одной мыши из пяти в группе двухкомпонентной комбинации анти-PD1 и анти-CTLA4 антител. Не наблюдали никаких признаков потери массы тела в результате трехкомпонентной комбинированной терапии.

[166] Таким образом, лечение с помощью комбинации VSV с анти-mCTLA4 и анти-PD-1 антителами приводило к уменьшению роста опухоли и увеличению выживаемости по сравнению с монотерапией или двухкомпонентной терапией с помощью любого из антител и/или VSV.

Пример 2: Противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации анти-PD-1, анти-CTLA4 и онколитического вируса VSV-M51R-GFP, доставляемого внутриопухолево, может быть достигнута с помощью только одной дозы анти-CTLA4 антитела mIgG2a

[167] В этом примере описано количество доз анти-CTLA4 антитела, необходимое для достижения противоопухолевой эффективности в трехкомпонентной комбинации с использованием онколитического вируса вирус везикулярного стоматита (VSV) с анти-PD-1 и анти-CTLA4 у мышей дикого типа, которым имплантировали опухоли MC38. VSV, используемый в этом исследовании, представляет собой генетически аттенуированный вирус, названный VSV-M51R-GFP, поскольку он кодирует мутацию в белке М (M51R)

(белок М ингибирует выработку белка клеткой-хозяином, но мутация M51R сохраняет выработку белка клеткой-хозяином), и кодирует GFP, вставленный между вирусными генами G и L. Исходным мышам линии C57BL/6 от Jackson Laboratories имплантировали подкожно клетки MC38 (3×10^5 клеток/мышь) в день 0. Опухоли измеряли с использованием кронциркуля, и объемы опухолей рассчитывали с помощью формулы $(L^2 \times W)/2$, где L представляет собой наименьший размер. Мышей равномерно рандомизировали на 5 групп лечения, когда средний размер опухоли достигал 150 мм^3 , что происходило в день 15. Мышам внутриопухолево инъецировали по 50 мкл вируса VSV-M51R-GFP в дозе 5×10^8 TCID₅₀, ресуспендированного в PBS, или PBS в качестве контроля и/или внутрибрюшинную инъекцию или 250 мкг антитела изотипического контроля и/или анти-PD-1 антитела в дни 15, 18, 22 и 25, и/или 250 мкг анти-CTLA4 антитела при различном количестве доз, или 4 дозы (в дни 15, 18, 22 и 25), или одну дозу (в день 15), или две дозы (в дни 15 и 18) (таблица 3).

Таблица 3: Экспериментальный протокол введения доз и лечения для групп мышей

Группа	Путь введения вируса или PBS	Введение вируса или PBS в D15	TCID ₅₀	Ab 1 (в/б введение)	Ab 2 (в/б введение) # дозы	Интервал введения доз антител	Кол-во
1	Внутриопухольный	PBS	-	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	Изотипическое mIgG2a 250 мкг	D15, 18, 22 и 25	7
2	Внутриопухольный	PBS	-	а-PD-1 250 мкг	а-CTLA4 mIgG2a 250 мкг 4 дозы	D15, 18, 22 и 25	7
3	Внутриопухольный	VSV-M51R-GFP	5×10^8 TCID ₅₀	а-PD-1 250 мкг	а-CTLA4 mIgG2a 250 мкг 4 дозы	D15, 18, 22 и 25	7
4	Внутриопухольный	VSV-M51R-GFP	5×10^8 TCID ₅₀	а-PD-1 250 мкг	а-CTLA4 mIgG2a 250 мкг 1 доза	D15, 18, 22 и 25	8
5	Внутриопухольный	VSV-M51R-GFP	5×10^8 TCID ₅₀	а-PD-1 250 мкг	а-CTLA4 mIgG2a 250 мкг 2 дозы	D15, 18, 22 и 25	8

[168] Объемы опухолей контролировали с помощью измерения кронциркулем два раза в неделю до конца исследования в день 60.

[169] В таблице 4 сведены средние объемы опухолей, процентная выживаемость и количество мышей без опухоли в каждой группе лечения. Противоопухолевая

эффективность трехкомпонентной комбинации VSV с анти-PD-1 антителом и анти-CTLA4 антителом в формате mIgG2a была очень сходной в группах, получавших или одну, или две, или четыре дозы анти-CTLA4 антитела (**фигуры 4А, 4В, 4С, 4D, 4Е**), причем у шести из восьми мышей (75%) не было опухоли к дню 45 в группах с одной дозой и двумя дозами по сравнению с пятью из семи мышей (71%) в группе с 4 дозами. К дню 60 в группах с одной дозой и двумя дозами 62,5% их мышей выжили и не имели опухолей по сравнению с 71,4% в группе с 4 дозами (**фигура 5**). Эти результаты позволяют предположить, что высокая противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации VSV с анти-PD-1 и анти-CTLA4 антителами может быть воспроизведена с помощью только одной дозы анти-CTLA4, вводимой одновременно с вирусом и первой дозой анти-PD-1 антитела.

Таблица 4: Средний объем опухоли, процентная выживаемость и количество мышей без опухоли в каждой группе лечения

Группа лечения (n=5-6)		Объем опухоли, мм ³ среднее (±SD)	Мыши без опухоли		Выживаемость, %		
			День 29	День 45	День 29	День 32	День 60
1	PBS	2404 (±294)	0/7	0/7	100%	0%	0%
2	a-PD-1 + a-CTLA4 mIgG2a (4 дозы)	580 (±129)	0/7	0/7	100%	100%	0%
3	VSV в/о + a-PD-1 + a-CTLA4 mIgG2a (4 дозы)	70 (±45)	3/7	5/7	100%	100%	71,4%
4	VSV в/о + a-PD-1 + a-CTLA4 mIgG2a (1 доза)	207 (±128)	0/8	6/8	100%	100%	62,5%
5	VSV в/о + a-PD-1 + a-CTLA4 mIgG2a (2 дозы)	140 (±82)	3/7	6/8	100%	100%	62,5%

Пример 3: Противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации анти-PD-1, анти-CTLA4 и онколитического вируса VSV-M51R-GFP может быть достигнута с помощью или внутриопухолевой, или внутривенной доставки вируса

[170] В этом примере описан путь доставки, которым вирус может быть доставлен для достижения противоопухолевой эффективности трехкомпонентной комбинации с использованием онколитического вируса вирус везикулярного стоматита (VSV) с анти-PD-1 и анти-CTLA4 у мышей дикого типа, которым имплантировали опухоли MC38. VSV, используемый в этом примере, представляет собой генетически аттенуированный вирус,

названный VSV-M51R-GFP, поскольку он кодирует мутацию в белке М (M51R) (белок М ингибирует выработку белка клеткой-хозяином, но мутация M51R сохраняет выработку белка клеткой-хозяином), и кодирует GFP, вставленный между вирусными генами G и L. Исходным мышам линии C57BL/6 от Jackson Laboratories имплантировали подкожно клетки MC38 (3×10^5 клеток/мышь) в день 0. Опухоли измеряли с использованием кронциркуля, и объемы опухолей рассчитывали с помощью формулы $(L^2 \times W)/2$, где L представляет собой наименьший размер. Мышей равномерно рандомизировали на 4 группы лечения, когда средний размер опухоли достигал 150 мм^3 , что происходило в день 15. Мышам внутриопухолево инъецировали по 50 мкл вируса VSV-M51R-GFP в дозе 5×10^8 TCID₅₀, ресуспендированного в PBS, или 200 мкл внутривенной инъекции вируса VSV-M51R-GFP в дозе 1×10^9 TCID₅₀, ресуспендированного в PBS, или PBS в качестве контроля и/или внутрибрюшинную инъекцию или 250 мкг антитела изотипического контроля и/или анти-PD-1 антитела, и/или 250 мкг анти-CTLA4 антитела в дни 15, 18, 22 и 25 (таблица 5). Объемы опухоли контролировали до конца исследования в день 60.

Таблица 5: Экспериментальный протокол введения доз и лечения для групп мышей

Группа	Путь введения вируса или PBS	Введение вируса или PBS в D15	TCID ₅₀	Ab 1 (в/б введение)	Ab 2 (в/б введение) # дозы	Интервал введения доз антител	Кол-во
1	Внутриопухолевый	PBS	-	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	Изотипическое mIgG2a 250 мкг	D15, 18, 22 и 25	7
2	Внутриопухолевый	PBS	-	а-PD-1 250 мкг	а-CTLA4 mIgG2a 250 мкг 4 дозы	D15, 18, 22 и 25	7
3	Внутриопухолевый	VSV-M51R-GFP	1×10^9 TCID ₅₀	а-PD-1 250 мкг	а-CTLA4 mIgG2a 250 мкг 4 дозы	D15, 18, 22 и 25	7
4	Внутривенный	VSV-M51R-GFP	1×10^9 TCID ₅₀	а-PD-1 250 мкг	а-CTLA4 mIgG2a 250 мкг 4 дозы	D15, 18, 22 и 25	8

[171] В таблице 6 сведены средний объем опухоли, процентная выживаемость и количество мышей без опухоли в каждой группе лечения в этом эксперименте.

[172] Противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации VSV с анти-PD-1 и анти-CTLA4 антителами была очень устойчивой в группах, получавших VSV либо в виде однократной дозы внутриопухолево, либо в виде однократной дозы

внутривенно, причем внутривенная доставка имела тенденцию к большей эффективности, чем внутриопухолевая (**фигура 6**), при этом восемь из восьми мышей (100%) не имели опухолей к дню 45 в группе с внутривенным введением доз по сравнению с пятью из семи мышей (71%) в группе внутриопухолевого введения. К дню 60 100% группы с внутривенным введением доз группа выжили и не имели опухолей по сравнению с 71,4% в группе внутриопухолевого введения (**фигура 7**). Внутривенная доставка VSV устойчиво усиливала терапию контрольных точек комбинацией анти-PD-1 и анти-CTLA4, и это указывает на то, что эффективность трехкомпонентной комбинации может быть достигнута при или внутриопухолевой, или внутривенной доставке вируса.

Таблица 6: Средний объем опухоли, процентная выживаемость и количество мышей без опухоли в каждой группе лечения

Группа лечения (n=5-6)		Объем опухоли, мм ³ среднее (±SD)	Мыши без опухоли		Выживаемость, %		
			День 29	День 45	День 29	День 32	День 60
1	PBS	2404 (±294)	0/7	0/7	100%	0%	0%
2	a-PD-1 + a-CTLA4 mIgG2a (4 дозы)	580 (±129)	0/7	0/7	100%	100%	0%
3	VSV в/о + a-PD-1 + a-CTLA4 mIgG2a (4 дозы)	70 (±45)	3/7	5/7	100%	100%	71,4%
4	VSV в/в + a-PD-1 + a-CTLA4 mIgG2a (4 дозы)	40 (±12)	2/8	8/8	100%	100%	100%

Пример 4: Противоопухолевая эффективность комбинированного лечения с помощью анти-PD-1, анти-CTLA4 и внутривенной доставки онколитического вируса VSV-mIFNb-NIS у мышей с опухолями MC38 со средним размером 150 мм³

[173] В этом примере описана противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации с использованием онколитического вируса вирус везикулярного стоматита (VSV), доставляемого внутривенно, с анти-PD-1 и анти-CTLA4 антителами у мышей дикого типа, которым имплантировали опухоли MC38. VSV, используемый в этом исследовании, представляет собой генетически аттенуированный вирус VSV-mIFNb-NIS (или mVV1), который кодирует мышинный интерферон-бета (IFNb), вставленный между вирусными генами M и G, и натрий/йодидный симпортер (NIS), вставленный между вирусными генами G и L.

[174] Исходным мышам линии C57BL/6 от Jackson Laboratories имплантировали подкожно клетки MC38 (3×10^5 клеток/мышь) в день 0. Опухоли измеряли с использованием кронциркуля, и объемы опухолей рассчитывали с помощью формулы $(L^2 \times W)/2$, где L представляет собой наименьший размер. Мышей равномерно рандомизировали на восемь группы лечения, когда средний размер опухоли достигал 150 мм^3 , что происходило в день 15. Мыши получали внутривенную инъекцию 200 мкл mVV1 в дозе $1 \times 10^9 \text{ TCID}_{50}$, ресуспендированного в PBS, или PBS в качестве контроля и/или внутрибрюшинную инъекцию или 250 мкг антитела изотипического контроля (mIgG2a и/или IgG2a крысы), и/или 250 мкг анти-CTLA4 антитела и/или анти-PD-1 антитела в дни 15, 18, 21, и 24 (таблица 7). Объемы опухолей контролировали с помощью измерения кронциркулем два раза в неделю до конца исследования в день 60.

Таблица 7: Экспериментальный протокол введения доз и лечения для групп мышей

Группа	Путь введения вируса или PBS	Вирус или PBS	TCID ₅₀	Ab 1 (в/б введение)	Интервал введения доз Ab 1	Ab 2 (в/б введение)	Интервал введения доз Ab 2	Кол-во
1	Внутривенный	PBS	-	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	D15, 18, 21, 24	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D15, 18, 21, 24	7
2	Внутривенный	PBS	-	a-PD-1 250 мкг	D15, 18, 21, 24	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D15, 18, 21, 24	7
3	Внутривенный	PBS	-	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	D15, 18, 21, 24	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D15, 18, 21, 24	7
4	Внутривенный	PBS	-	a-PD-1 250 мкг	D15, 18, 21, 24	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D15, 18, 21, 24	7
5	Внутривенный	VSV-mIFN β -NIS	$1 \times 10^9 \text{ TCID}_{50}$	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	D15, 18, 21, 24	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D15, 18, 21, 24	7
6	Внутривенный	VSV-mIFN β -NIS	$1 \times 10^9 \text{ TCID}_{50}$	a-PD-1 250 мкг	D15, 18, 21, 24	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D15, 18, 21, 24	7
7	Внутривенный	VSV-mIFN β -NIS	$1 \times 10^9 \text{ TCID}_{50}$	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	D15, 18, 21, 24	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D15, 18, 21, 24	7
8	Внутривенный	VSV-mIFN β -NIS	$1 \times 10^9 \text{ TCID}_{50}$	a-PD-1 250 мкг	D15, 18, 21, 24	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D15, 18, 21, 24	7

[175] В таблице 8 сведены средний объем опухоли, процентная выживаемость и количество мышей без опухоли в каждой группе лечения. Средние объемы опухолей с течением времени для каждой группы показывают, что монотерапия с помощью либо mVV1, либо анти-PD-1 или анти-CTLA4 антител показала незначительное ингибирование роста опухоли по сравнению с лечением с помощью PBS и получавшей изотипический контроль группой (**фигура 8**). Для статистического анализа использовали объемы отдельных опухолей в день 24 после начала лечения (**фигура 9**), поскольку это был последний момент времени в исследовании, когда все животные во всех группах были живы. Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного ANOVA с апостериорным критерием множественных сравнений Даннетта (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$). Монотерапия анти-PD-1 или анти-CTLA4 антителами или mVV1 не достигала статистической значимости, равно как и комбинация mVV1 с анти-PD-1 антителом. Лечение комбинацией mVV1 с анти-CTLA4 антителом приводило к более эффективному ингибированию роста опухоли по сравнению с монотерапией с помощью анти-PD-1 или анти-CTLA4 антител или mVV1 или контролем (**фигура 10**). Комбинация анти-CTLA4 и анти-PD-1 антител приводила к уменьшению роста опухоли, но не приводила к статистически значимому уменьшению в день 24 по сравнению со всеми другими моно- и двухкомпонентными комбинациями. Следует отметить, что лечение трехкомпонентной комбинацией внутривенно доставляемого mVV1 с анти-CTLA4 и анти-PD-1 антителами было высоко эффективным по сравнению со всеми другими группами, причем две из семи мышей оставались без опухолей до конца исследования к дню 60 (**фигуры 8, 9, 10**). Не наблюдали никаких признаков потери массы тела в результате трехкомпонентной комбинированной терапии. Таким образом, лечение с помощью комбинации внутривенно доставляемого mVV1 с анти-mCTLA4 и анти-PD-1 антителами приводило к уменьшению роста опухоли и улучшению выживаемости по сравнению с монотерапией или двухкомпонентной терапией с помощью любого из антител и/или mVV1.

Таблица 8: Средний объем опухоли, процентная выживаемость и количество мышей без опухоли в каждой группе лечения

Группа лечения (n=5-6)		Объем опухоли, мм ³ среднее (±SD)	Мыши без опухоли		Выживаемость, %		
			День 24	День 42	День 29	День 42	День 60
1	PBS	1468 (±189)	0/7	0/7	100%	0%	0%

2	a-PD-1	1257 (\pm 148)	0/7	0/7	100%	0%	0%
3	a-CTLA4	1164 (\pm 69)	0/7	0/7	100%	0%	0%
4	a-PD-1 + a-CTLA4	875 (\pm 148)	0/7	0/7	100%	0%	0%
5	mVV1 в/в	1146 (\pm 237)	0/7	0/7	100%	0%	0%
6	mVV1 в/в + a-PD-1	1324 (\pm 152)	0/7	0/7	100%	0%	0%
7	mVV1 в/в + a-CTLA4	773 (\pm 120)	0/7	0/7	100%	0%	0%
8	mVV1 в/в + a-PD-1 + a-CTLA4	361 (\pm 123)	0/7	2/7	100%	42,9%	28,6%

Пример 5: Противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации анти-PD-1, анти-CTLA4 и онколитического вируса VSV-M51R-GFP, доставляемого внутриопухолево, может быть достигнута при меньшей дозе анти-CTLA4 антитела mIgG2a

[176] В этом примере описано уменьшение дозы анти-CTLA4 антитела, при которой все еще достигается противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации с использованием онколитического вируса вирус везикулярного стоматита (VSV) с анти-PD-1 и анти-CTLA4 у мышей дикого типа, которым имплантировали опухоли MC38. VSV, используемый в этом исследовании, представляет собой генетически аттенуированный вирус, названный VSV-M51R-GFP, поскольку он кодирует мутацию в белке М (M51R) (белок М ингибирует выработку белка клеткой-хозяином, но мутация M51R сохраняет выработку белка), и кодирует GFP, вставленный между вирусными генами G и L. Анти-PD-1 антитело, используемое в этом исследовании, представляет собой клон 29F1.A12 IgG2a крысы от Bioxcell, используемые анти-CTLA4 антитела представляют собой клон 9D9 в формате mIgG2a, приобретенный у Invivogen. Исходным мышам линии C57BL/6 от Jackson Laboratories имплантировали подкожно клетки MC38 (3×10^5 клеток/мышь) в день 0. Опухоли измеряли с использованием кронциркуля, и объемы опухолей рассчитывали с помощью формулы $(L^2 \times W)/2$, где L представляет собой наименьший размер. Мышей равномерно рандомизировали на четыре группы лечения, когда средний размер опухоли достигал 150 мм^3 , что происходило в день 15. Мышам внутриопухолево инъецировали по 50 мкл вируса VSV-M51R-GFP в дозе 5×10^8 TCID₅₀, ресуспендированного в PBS, или PBS в качестве контроля, и/или внутрибрюшинную инъекцию или 250 мкг антитела изотипического контроля и/или антитела IgG2a крысы к PD-1 мыши (29F1.A12) в дни 15, 18, 22 и 25, и/или 250 мкг или 50 мкг антитела mIgG2a к CTLA4 мыши (клон 9D9) в 4 дозах

(в дни 15, 18, 22 и 25). Объемы опухолей контролировали с помощью измерения кронциркулем два раза в неделю до конца исследования в день 60.

[177] Противоопухолевую эффективность трехкомпонентной комбинации VSV с анти-PD-1 антителом и анти-CTLA4 антителом наблюдали в группе, получавшей более низкую дозу анти-CTLA4 антитела (**фигуры 11, 12**), причем четыре из восьми мышей (50%) не имели опухолей к дню 45 по сравнению с пятью из семи мышей (71%) в группе с более высокой дозой. К дню 60 в группе с более низкой дозой 50% мышей выжили и не имели опухолей по сравнению с 71,4% в группе с 4 дозами (**фигура 13**). Эти результаты позволяют предположить, что количество анти-CTLA4 вводимое, в трехкомпонентной комбинации VSV с анти-PD-1 и анти-CTLA4 антителами, может быть уменьшено при сохранении достижения противоопухолевой эффективности.

Таблица 9: Средний объем опухоли, процентная выживаемость и количество мышей без опухоли в каждой группе лечения при опухоли *in vivo*

Группа лечения (n=5-6)		Объем опухоли, мм ³ среднее (±SD)	Мыши без опухоли		Выживаемость, %		
			День 29	День 45	День 29	День 32	День 60
1	PBS	2404 (±294)	0/7	0/7	100%	0%	0%
2	a-PD-1 + a-CTLA4 mIgG2a (высокая доза)	580 (±129)	0/7	0/7	100%	100%	0%
3	VSV в/о + a-PD-1 + a-CTLA4 mIgG2a (высокая доза)	70 (±45)	3/7	5/7	100%	100%	71,4%
4	VSV в/о + a-PD-1 + a-CTLA4 mIgG2a (низкая доза)	240 (±117)	0/8	4/8	100%	100%	50%

[178] Как показано в таблице 9, у мышей, получавших трехкомпонентную комбинацию VSV в/о (внутриопухолевую) с анти-PD-1 и анти-CTLA4 антителами, контроль роста опухоли оказался очень эффективным, причем у пяти из семи мышей не было опухоли к дню 45. Снижение доз анти-CTLA4 в пять раз (с 250 мкг до 50 мкг) показало неожиданно значительную противоопухолевую эффективность при сочетании с VSV с анти-PD-1 антителом.

Пример 6: Противоопухолевая эффективность комбинированного лечения с помощью анти-PD-1, одной дозы анти-CTLA4 и внутривенной доставки онколитического вируса VSV-mIFN β -NIS у мышей с опухолями MC38 со средним размером 150 мм³

[179] В этом примере описана противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации с использованием онколитического вируса вирус везикулярного стоматита (VSV), кодирующего IFN β и NIS, с анти-PD-1 и одной дозой анти-CTLA4 у мышей дикого типа, которым имплантировали опухоли MC38. VSV, используемый в этом исследовании, представляет собой генетически аттенуированный вирус, названный VSV-mIFN β -NIS (или mVV1), поскольку он кодирует мышинный интерферон-бета (IFN β), вставленный между вирусными генами M и G, и натрий/йодидный симпортер (NIS), вставленный между вирусными генами G и L. Анти-PD-1 антитело, используемое в этом исследовании, представляет собой клон 29F1.A12 IgG2a крысы от Bioxcell, и используемое анти-CTLA4 антитело представляло собой клон 9D9 в формате mIgG2a от Invivogen.

[180] Исходным мышам линии C57BL/6 от Jackson Laboratories имплантировали подкожно клетки MC38 (3×10^5 клеток/мышь) в день 0. Опухоли измеряли с использованием кронциркуля, и объемы опухолей рассчитывали с помощью формулы $(L^2 \times W)/2$, где L представляет собой наименьший размер. Мышей равномерно рандомизировали на группы лечения, когда средний размер опухоли достигал 150 мм³, что происходило в день 12. Мыши получали внутривенную инъекцию 200 мкл mVV1 в дозе 1×10^9 TCID₅₀, ресуспендированного в PBS, или PBS в качестве контроля и/или внутрибрюшинную инъекцию или 250 мкг антитела изотипического контроля (mIgG2a и/или IgG2a крысы) и/или антитела IgG2a крысы к PD-1 мыши (29F1.A12) в дни 12, 15, 19 и 22, и/или 250 мкг антитела mIgG2a к CTLA4 мыши (клон 9D9) в виде однократной дозы в день 12 или 15 или четырех доз в дни 12, 15, 19 и 22. Объемы опухолей контролировали с помощью измерения кронциркулем два раза в неделю до конца исследования в день 60. Средние объемы опухолей с течением времени для каждой группы показывают, что одна доза анти-CTLA4 антител демонстрировала аналогичное ингибирование роста опухоли по сравнению с лечением с помощью четырех доз анти-CTLA4 при введении в комбинации с mVV1 и анти-PD-1 (**фигура 14**). Для статистического анализа использовали объемы отдельных опухолей в день 22 после начала лечения (**фигура 15**), поскольку это был последний момент времени в исследовании, когда все животные во всех группах были живы. Статистическую значимость определяли с помощью однофакторного ANOVA с апостериорным критерием множественных сравнений Даннетта (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$). Лечение комбинацией

mVV1 с одной дозой анти-CTLA4 антитела приводило к эквивалентной эффективности ингибирования роста опухоли по сравнению с четырьмя дозами анти-CTLA4 антител (фигуры 14, 15). Следует отметить, что лечение трехкомпонентной комбинацией внутривенно доставляемого mVV1 с одной дозой анти-CTLA4 и анти-PD-1 антител также приводило к увеличению выживаемости, аналогично группе, которая получала четыре дозы CTLA4 (фигура 16). Таким образом, лечение с помощью комбинации внутривенно доставленного mVV1 с анти-PD-1 и одной дозы анти-mCTLA4 антител приводило к эффективности, аналогичной введению четырех доз анти-mCTLA4 антител.

Таблица 10: Экспериментальный протокол введения доз и лечения для групп мышей

Группа	Путь введения вируса или PBS	Вирус или PBS	TCID ₅₀	Ab 1 (в/б введение)	Интервал введения доз Ab 1	Ab 2 (в/б введение)	Интервал введения доз Ab 2	Ab 3 (в/б введение)	Интервал введения доз Ab 3	Кол-во
1	Внутривенный	PBS	-	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	D12, 15, 19, 22			Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D12, 15, 19, 22	7
2	Внутривенный	PBS	-	a-PD-1 250 мкг	D12, 15, 19, 22	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D12, 15, 19, 22			7
3	Внутривенный	PBS	-	a-PD-1 250 мкг	D12, 15, 19, 22	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D12	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D15, 19, 22	7
4	Внутривенный	mVV1	1×10 ⁹ TCID ₅₀	a-PD-1 250 мкг	D12, 15, 19, 22	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D12, 15, 19, 22			7
5	Внутривенный	mVV1	1×10 ⁹ TCID ₅₀	a-PD-1 250 мкг	D12, 15, 19, 22	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D12	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D15, 19, 22	8
6	Внутривенный	mVV1	1×10 ⁹ TCID ₅₀	a-PD-1 250 мкг	D12, 15, 19, 22	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D15	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D12, 19, 22	8

Таблица 11: Средний объем опухоли, процентная выживаемость и количество мышей без опухоли в каждой группе лечения при опухоли in vivo

Группа лечения (n=5-6)	Объем	Мыши без	Выживаемость, %
------------------------	-------	----------	-----------------

		опухоли, мм ³ среднее (\pm SD)	опухоли			
		День 22	День 29	День 22	День 29	День 48
1	PBS	2057 (\pm 719)	0/7	100%	0%	0%
2	a-PD-1 + a-CTLA4 D12, 15, 19, 22	566 (\pm 216)	0/7	100%	85%	0%
	a-PD-1 + a-CTLA4 D12	980 (\pm 492)	0/7	100%	71%	0%
3	mVV1 + a-PD-1 + a- CTLA4 D12, 15, 19, 22	303 (\pm 158)	0/7	100%	100%	57%
4	mVV1 + a-PD-1 + a- CTLA4 D12	266 (155)	2/8	100%	100%	37,5%
5	mVV1 + a-PD-1 + a- CTLA4 D15	1130 (\pm 565)	0/8	100%	37,5%	0%

[181] Как показано в таблице 11, у мышей, получавших трехкомпонентную комбинацию mVV1 с анти-PD-1 и четырьмя дозами анти-CTLA4 антител, контроль и удаление больших опухолей в ходе исследования оказались очень эффективными. Мыши, получавшие лечение с помощью трехкомпонентной комбинации mVV1 с анти-PD-1 и одной дозой анти-CTLA4 антитела, вводимыми одновременно с вирусом, демонстрировали аналогичное уменьшение объема опухоли по сравнению с четырьмя дозами. Напротив, если одну дозу анти-CTLA4 антитела давали через три дня после вируса с анти-PD-1, эффективность трехкомпонентной комбинации исчезала. Эти данные указывают на то, что одну дозу анти-CTLA4, вводимую одновременно с mVV1, и непрерывное введение доз анти-PD-1 можно использовать для достижения сильной противоопухолевой эффективности.

Пример 7: Противоопухолевая эффективность комбинированного лечения с помощью анти-PD-1 и одной дозы анти-CTLA4, вводимой одновременно с внутривенной доставкой онколитического вируса VSV-mIFN β -NIS, у мышей с опухолями MC38 со средним размером 150 мм³

[182] В этом примере описана противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации с использованием онколитического вируса вирус везикулярного стоматита (VSV), кодирующего IFN β и NIS, с анти-PD-1 и одной дозой анти-CTLA4 у мышей дикого типа, которым имплантировали опухоли MC38. VSV,

используемый в этом исследовании, представляет собой генетически аттенуированный вирус, названный VSV-mIFN β -NIS (или mVV1), поскольку он кодирует мышинный интерферон-бета (IFN β), вставленный между вирусными генами M и G, и натрий/йодидный симпортер (NIS), вставленный между вирусными генами G и L. Анти-PD-1 антитело, используемое в этом исследовании, представляет собой клон 29F1.A12 IgG2a крысы от Bioxcell, и используемое анти-CTLA4 антитело представляло собой клон 9D9 в формате mIgG2a от Invivogen.

[183] Исходным мышам линии C57BL/6 от Jackson Laboratories имплантировали подкожно клетки MC38 (3×10^5 клеток/мышь) в день 0. Опухоли измеряли с использованием кронциркуля, и объемы опухолей рассчитывали с помощью формулы $(L^2 \times W)/2$, где L представляет собой наименьший размер. Мышей равномерно рандомизировали на четыре группы лечения, когда средний размер опухоли достигал 150 мм³, что происходило в день 12. Мыши получали внутривенную инъекцию 200 мкл mVV1 в дозе 1×10^9 TCID₅₀, ресуспендированного в PBS, или PBS в качестве контроля и/или внутрибрюшинную инъекцию или 250 мкг антитела изотипического контроля (mIgG2a и/или IgG2a крысы) и/или антитела IgG2a крысы к PD-1 мыши (29F1.A12) в дни 12, 15, 19 и 22, и/или 250 мкг антитела mIgG2a к CTLA4 мыши (клон 9D9) в виде однократной дозы в день 12 или 15. Объемы опухолей контролировали с помощью измерения кронциркулем два раза в неделю до конца исследования в день 60. Средние объемы опухолей с течением времени для каждой группы показывают, что одну дозу анти-CTLA4 антител необходимо вводить одновременно с вирусом, поскольку группа, которая получала а-CTLA4 в день 15, имела пониженный противоопухолевый контроль по сравнению с группой, получившей его в день 12 (фигура 17).

[184] Таким образом, лечение с помощью комбинации внутривенно доставляемого mVV1 с анти-PD-1 и одной дозой анти-mCTLA4 антител, вводимых одновременно с вирусом, приводило к сильной противоопухолевой эффективности.

Пример 8: Противоопухолевая эффективность комбинированного лечения с помощью анти-PD-1, одной дозы анти-CTLA4 и внутривенной доставки онколитического вируса VSV-mIFN β -NIS у мышей с опухолями B16F10 со средним размером 100 мм³

[185] В этом примере описана противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации с использованием онколитического вируса вирус везикулярного стоматита (VSV), кодирующего IFN β и NIS, с анти-PD-1 и одной дозой анти-CTLA4 у мышей дикого типа, которым имплантировали опухоли B16F10. VSV,

используемый в этом исследовании, представляет собой генетически аттенуированный вирус, названный VSV-mIFN β -NIS (или mVV1), поскольку он кодирует мышинный интерферон-бета (IFN β), вставленный между вирусными генами M и G, и натрий/йодидный симпортер (NIS), вставленный между вирусными генами G и L. Анти-PD-1 антитело, используемое в этом исследовании, представляет собой клон 29F1.A12 IgG2a крысы от Bioxcell, и используемое анти-CTLA4 антитело представляло собой клон 9D9 в формате mIgG2a от Invivogen.

[186] Исходным мышам линии C57BL/6 от Jackson Laboratories имплантировали подкожно клетки B16F10 (5×10^5 клеток/мышь) в день 0. Опухоли измеряли с использованием кронциркуля, и объемы опухолей рассчитывали с помощью формулы $(L^2 \times W)/2$, где L представляет собой наименьший размер. Мышей равномерно рандомизировали на семь групп лечения, когда средний размер опухоли достигал 100 мм³, что происходило в день 10. Мыши получали внутривенную инъекцию 200 мкл mVV1 в дозе или 1×10^9 , или 5×10^7 , или 1×10^7 , или 1×10^6 TCID₅₀, ресуспендированного в PBS, или PBS в качестве контроля и/или внутрибрюшинную инъекцию или 250 мкг антитела изотипического контроля (mIgG2a и/или IgG2a крысы) и/или антитела IgG2a крысы к PD-1 мыши (29F1.A12) в дни 12, 15, 19 и 22, и/или 250 мкг антитела mIgG2a к CTLA4 мыши (клон 9D9) в виде однократной дозы в день 10. Объемы опухолей контролировали с помощью измерения кронциркулем два раза в неделю до конца исследования в день 60. Средние объемы опухолей с течением времени для каждой группы показывают, что одна доза анти-CTLA4 антител демонстрировала сильное ингибирование роста опухоли на модели B16F10 по сравнению с PBS или одним средством (**фигура 18**). Следует отметить, что лечение трехкомпонентной комбинацией внутривенно доставляемого mVV1 с одной дозой анти-CTLA4 и анти-PD-1 антител также приводило к увеличению выживаемости с аналогичной эффективностью, когда дозу вируса снижали с 1×10^9 до 5×10^7 , или 1×10^7 , или 1×10^6 TCID₅₀ (**фигура 18**).

[187] Таким образом, лечение с помощью комбинации внутривенно доставляемого mVV1 с анти-PD-1 и одной дозой анти-mCTLA4 антител приводило к сильной противоопухолевой эффективности на модели опухоль B16F10, резистентной к анти-PD-1, и большой диапазон титров вируса сохраняет способность обеспечивать высокую комбинация эффективность.

Таблица 12: Экспериментальный протокол введения доз и лечения для групп мышей

Группа	Путь введения	Вирус или	TCID ₅₀	Ab 1 (в/б введение)	Интервал введения доз	Ab 2 (в/б введение)	Интервал введения	Кол-во
--------	---------------	-----------	--------------------	---------------------	-----------------------	---------------------	-------------------	--------

	вируса или PBS	PBS			Ab 1		доз Ab 2	
1	Внутривенный	PBS	-	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	D10, 14, 17, 21	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D10	5
2	Внутривенный	PBS	-	a-PD-1 250 мкг	D10, 14, 17, 21, 24, 28	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D10	6
3	Внутривенный	mVV1	1×10^9 TCID ₅₀	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	D10, 14, 17, 21	Изотипическое IgG2a мыши 250 мкг	D10	6
4	Внутривенный	mVV1	1×10^9 TCID ₅₀	a-PD-1 250 мкг	D10, 14, 17, 21, 24, 28	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D10	7
5	Внутривенный	mVV1	5×10^7 TCID ₅₀	a-PD-1 250 мкг	D10, 14, 17, 21, 24, 28	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D10	7
6	Внутривенный	mVV1	1×10^7 TCID ₅₀	a-PD-1 250 мкг	D10, 14, 17, 21, 24, 28	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D10	6
7	Внутривенный	mVV1	1×10^6 TCID ₅₀	a-PD-1 250 мкг	D10, 14, 17, 21, 24, 28	a-CTLA4 mIgG2a 250 мкг	D10	7

Таблица 13: Средний объем опухоли, процентная выживаемость и количество мышей без опухоли в каждой группе лечения при опухоли *in vivo* при использовании модель опухоль меланомы B16F10

Группа лечения (n=5-6)		Объем опухоли, мм³	Выживаемость, %		
		среднее (\pmSD)	День 17	День 24	День 28
1	PBS	774 (\pm 143)	100%	80%	0%
2	mVV1 1e9 TCID50	758 (\pm 259)	100%	66%	0%
3	a-PD-1 + a-CTLA4	592 (\pm 249)	100%	66%	16,6%
4	mVV1 1e9 TCID50 + a-PD-1 + a-CTLA4	200 (\pm 142)	100%	100%	71%
5	mVV1 5e7 TCID50 + a-PD-1 + a-CTLA4	203 (\pm 65)	100%	100%	100%
6	mVV1 1e7 TCID50 + a-PD-1 + a-CTLA4	277 (\pm 66)	100%	100%	100%
7	mVV1 1e6 TCID50 + a-PD-1 + a-CTLA4	356 (\pm 138)	100%	100%	85%

[188] Как показано в таблице 13, при использовании модели подкожной опухоли B16F10 у мышей, получавших лечение с помощью или mVV1, или анти-PD-1 в комбинации с одной дозой анти-CTLA4 антител, было очень умеренное воздействие на рост опухоли в этой предъявляющей повышенные требования резистентной к иммунным контрольным точкам модели опухоли. Однако трехкомпонентная комбинация mVV1 с анти-PD-1 в сочетании с одной дозой анти-CTLA4 антител существенно увеличивала противоопухолевую эффективность по сравнению с другими группами. Эти данные указывают на то, что VSV может делать резистентные к контрольным точкам опухоли чувствительными к иммунотерапии.

Пример 9: Противоопухолевая эффективность комбинированного лечения с помощью анти-PD-1, одной дозы анти-CTLA4 и внутривенной доставки онколитического вируса VSV-mIFN β -NIS у мышей с опухолями легкого CMT64 со средним размером 150 мм³

[189] В этом примере описана противоопухолевая эффективность трехкомпонентной комбинации с использованием онколитического вируса вирус везикулярного стоматита (VSV), кодирующего IFN β и NIS, с анти-PD-1 и одной дозой анти-CTLA4 у мышей дикого типа, которым имплантировали опухоли CMT64, которые резистентны к лечению анти-PD-1. VSV, используемый в этом исследовании, представляет собой генетически аттенуированный вирус, названный VSV-mIFN β -NIS (или mVV1), поскольку он кодирует мышинный интерферон-бета (IFN β), вставленный между вирусными генами M и G, и натрий/йодидный симпортер (NIS), вставленный между вирусными генами G и L. Анти-PD-1 антитело, используемое в этом исследовании, представляет собой клон 29F1.A12 IgG2a крысы от Bioxcell, и используемое анти-CTLA4 антитело представляло собой клон 9D9 в формате mIgG2a от Invivogen.

[190] Исходным мышам линии C57BL/6 от Jackson Laboratories имплантировали подкожно клетки B16F10 (5×10^5 клеток/мышь) в день 0. Опухоли измеряли с использованием кронциркуля, и объемы опухолей рассчитывали с помощью формулы $(L^2 \times W)/2$, где L представляет собой наименьший размер. Мышей равномерно рандомизировали на четыре группы лечения, когда средний размер опухоли достигал 100 мм³, что происходило в день 10. Мыши получали внутривенную инъекцию 200 мкл mVV1 в дозе 1×10^9 TCID₅₀, ресуспендированного в PBS, или PBS в качестве контроля и/или внутривенную инъекцию или 250 мкг антитела изотипического контроля (mIgG2a и/или IgG2a крысы) и/или антитела IgG2a крысы к PD-1 мыши (29F1.A12) в дни 12, 15, 19

и 22, и/или 50 мкг антитела mIgG2a к CTLA4 мыши (клон 9D9) в виде однократной дозы в день 10. Объемы опухолей контролировали с помощью измерения кронциркулем два раза в неделю до конца исследования в день 60. Средние объемы опухолей с течением времени для каждой группы показывают, что одна доза анти-CTLA4 антител демонстрировала сильное ингибирование роста опухоли на модели опухоли CMT64 по сравнению с PBS или анти-PD-1 с анти-CTLA4 (фигура 19). На фигура 20 показано среднее количество пятнообразующих единиц (SFU) IFN γ , высвобождаемого CD8 TIL, собранными из опухолей и повторно подвергнутыми воздействию в течение ночи указанного опухолевого антигена или VSV-NP в каждой группе лечения в день 17 после получения VSV в день 12 вместе с двумя дозами анти-PD-1 и а-CTLA4 в день 12 и 14. DMSO и PMA/иономицин служат отрицательным и положительным контролем соответственно в нескольких временных точках после имплантации опухоли, причем дни лечения указаны стрелками.

[191] Таким образом, лечение с помощью комбинации внутривенно доставляемого mVV1 с анти-PD-1 и одной дозой анти-mCTLA4 антител приводило к неожиданно высокой противоопухолевой эффективности на модели резистентной к анти-PD-1 опухоли CMT64, что указывает на то, что эффективность этой трехкомпонентной комбинации распространяется на условия различных опухолей.

Таблица 14: Экспериментальный протокол введения доз и лечения для групп мышей

Группа	Путь введения вируса или PBS	Вирус или PBS	TCID ₅₀	Ab 1 (в/б введение)	Интервал введения доз Ab 1	Ab 2 (в/б введение)	Интервал введения доз Ab 2	Кол-во
1	Внутривенный	PBS	-	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	D9, 12, 16, 20, 24, 27, 31	Изотипическое IgG2a мыши 50 мкг	D9	8
2	Внутривенный	VSV-mIFN γ -NIS	1 \times 10 ⁹ TCID ₅₀	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	D10, 14, 17, 21, 24, 28	Изотипическое IgG2a мыши 50 мкг	D9	8
3	Внутривенный	PBS	-	а-PD-1 250 мкг	D10, 14, 17, 21, 24, 28	а-CTLA4 mIgG2a 50 мкг	D9	8
4	Внутривенный	VSV-mIFN γ -NIS	1 \times 10 ⁹ TCID ₅₀	а-PD-1 250 мкг	D10, 14, 17, 21, 24, 28	а-CTLA4 mIgG2a 50 мкг	D9	8

Таблица 15: Средний объем опухоли, процентная выживаемость и количество мышей без опухоли в каждой группе лечения при опухоли *in vivo* при фокусировке на

тестировании трехкомпонентной комбинации mVV1 внутривенно с анти-CTLA4 + анти-PD-1 антителами на модели аденокарциномы легкого CMT64

Группа лечения (n=8)		Объем опухоли, мм ³ среднее (±SD)	Выживаемость, %		
			День 31	День 41	День 59
1	PBS	1516 (±280)	100%	0%	0%
2	mVV1	1514 (±193)	100%	0%	0%
5	a-PD-1 + a-CTLA4	1355 (±568)	100%	37,5%	12,5%
10	mVV1 + a-PD-1 + a-CTLA4	814 (±381)	100%	75%	12,5%

[192] Как показано в таблице 15, у мышей, получавших трехкомпонентную комбинацию mVV1 внутривенно с анти-PD-1 и одной дозой анти-CTLA4 антител, контроль роста опухоли CMT64 оказался очень эффективным.

Пример 10: Комбинированное лечение анти-PD-1, анти-CTLA4 и внутривенной доставкой онколитического вируса VSV-mIFN β -NIS у мышей с опухолями легкого CMT64 со средним размером 150 мм³ вызывает широкий поликлональный противоопухолевый T-клеточный ответ

[193] В этом примере описан механизм действия трехкомпонентной комбинации с использованием онколитического вируса вирус везикулярного стоматита (VSV), кодирующего IFN β и NIS, с анти-PD-1 и одной дозой анти-CTLA4 у мышей дикого типа, которым имплантировали С опухоли МТ64, которые резистентны к лечению анти-PD-1. VSV, используемый в этом исследовании, представляет собой генетически аттенуированный вирус, названный VSV-mIFN β -NIS (или mVV1), поскольку он кодирует мышинный интерферон-бета (IFN β), вставленный между вирусными генами М и G, и натрий/йодидный симпортер (NIS), вставленный между вирусными генами G и L. Анти-PD-1 антитело, используемое в этом исследовании, представляет собой клон 29F1.A12 IgG2a крысы от Bioxcell, и используемое анти-CTLA4 антитело представляло собой клон 9D9 в формате mIgG2a от Invivogen.

[194] Исходным мышам линии C57BL/6 от Jackson Laboratories имплантировали подкожно клетки CMT64 (5×10^6 клеток/мышь) в день 0. Опухоли измеряли с использованием кронциркуля, и объемы опухолей рассчитывали с помощью формулы $(L^2 \times W)/2$, где L представляет собой наименьший размер. Мышей равномерно рандомизировали на семь групп лечения, когда средний размер опухоли достигал 100 мм³,

что происходило в день 10. Мыши получали внутривенную инъекцию 200 мкл mVV1 в дозе 1×10^9 TCID₅₀, ресуспендированного в PBS, или PBS в качестве контроля и/или внутрибрюшинную инъекцию или 250 мкг антитела изотипического контроля (mIgG2a и/или IgG2a крысы) и/или антитела IgG2a крысы к PD-1 мыши (29F1.A12), и/или 10 мкг антитела mIgG2a к CTLA4 мыши (клон 9D9) в дни 10 и 14. Опухоли собирали в день 17. Очищенные CD8 TIL и наивные спленоциты совместно инкубировали в соотношении 1:1 путем посева 10000 клеток на лунку и инкубировали в течение ночи с соответствующим пептидным антигеном для анализа IFNg ELISPOT. Была обнаружена большая реактивность CD8 TIL, специфическая к антигену VSV-NP, в группах, которые получали VSV. Следует отметить, что многие из опухолевых неоантигенов индуцировали сигнал в повторно подвергавшихся воздействию CD8 TIL, собранных у группы, которая получала VSV, и очень ограниченный ответ был обнаружен в группах, которые получали лечение с помощью только анти-PD-1 и анти-CTLA4. Трехкомпонентная комбинация VSV с а-PD-1 и а-CTLA4 индуцировала большой поликлональный противоопухолевый Т-клеточный ответ по сравнению с другими группами с некоторой реактивностью к неоантигену, детектируемой только в трехкомпонентной комбинации, такой как NAIP2 и ZHX2.

[195] Эти данные указывают на то, что эффективность трехкомпонентной комбинации обусловлена образованием поликлональных противоопухолевых Т-клеток, которые функционируют внутри опухоли и индуцируют противоопухолевые Т-клеточные ответы.

Таблица 16: Экспериментальный протокол введения доз и лечения для групп мышей

Группа	Путь введения вируса или PBS	Вирус или PBS	TCID ₅₀	Ab 1 (в/б введение)	Интервал введения доз Ab 1	Ab 2 (в/б введение)	Интервал введения доз Ab 2	Кол -во
1	Внутривенный	PBS	-	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	D10, 14	Изотипическое IgG2a мыши 10 мкг	D10, 14	8
2	Внутривенный	VSV-mIFNb-NIS	1×10^9 TCID ₅₀	Изотипическое IgG2a крысы 250 мкг	D10, 14	Изотипическое IgG2a мыши 10 мкг	D10, 14	8
3	Внутривенный	PBS	-	а-PD-1 250 мкг	D10, 14	а-CTLA4 mIgG2a 10 мкг	D10, 14	8
4	Внутривенный	VSV-mIFNb-NIS	1×10^9 TCID ₅₀	а-PD-1 250 мкг	D10, 14	а-CTLA4 mIgG2a 10 мкг	D10, 14	8

Таблица 17: Данные IFNg Elispot, полученные от TIL, выделенных из опухолей СМТ64, собранных у мышей через семь дней после лечения (10000 TIL: 10000 спленоцитов)

	Изотип		a-PD-1/a-CTLA4		mVV1		mVV1/a-PD-1/a-CTLA4	
	Среднее	±SD	Среднее	±SD	Среднее	±SD	Среднее	±SD
Антигены Elispot								
DMSO	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	1,7	0,0	0,0
AIM1	0,0	0,0	0,0	0,0	4,3	3,5	8,0	1,7
LYST	0,0	0,0	0,0	0,0	8,3	1,5	13,7	4,5
RPP40	0,0	0,0	0,0	0,0	8,0	6,1	19,3	4,6
NAIP2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	1,2	22,3	4,9
ZHX2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	21,3	3,2
CEP192	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,0	12,7	5,5
NDUFS1	0,7	0,6	3,7	1,5	6,7	2,5	30,0	3,5
ARHGEF11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	1,2	0,7	0,6
NES	0,0	0,0	0,0	0,0	4,7	2,9	9,7	3,1
RAB13	0,0	0,0	0,0	0,0	11,3	2,1	18,7	9,6
AKAP9	0,0	0,0	0,0	0,0	9,3	4,9	14,0	2,0
ARHGEF10	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	5,2	14,7	3,2
ARHGEF10 (2)	0,0	0,0	0,0	0,0	10,3	5,1	12,3	1,5
VSV-NP	0,0	0,0	0,3	0,6	22,3	5,7	30,3	1,5
PMA/иономицин	1,0	1,0	13,3	9,2	93,0	15,7	135,0	17,3

[196] Объем настоящего раскрытия не ограничивается конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе станут очевидны для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и прилагаемых фигур. Предполагается, что такие модификации попадают в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или ингибирования роста опухоли, предусматривающий:
 - (a) выбор пациента с раком; и
 - (b) введение нуждающемуся в этом пациенту: (i) терапевтически эффективного количества онколитического вируса в комбинации с (ii) терапевтически эффективным количеством ингибитора пути запрограммированной гибели 1 (PD-1) и (iii) терапевтически эффективным количеством ингибитора антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA4).
2. Способ по п. 1, в котором онколитический вирус содержит онколитический везикуловирус.
3. Способ по п. 1 или 2, в котором онколитический везикуловирус содержит онколитический вирус везикулярного стоматита (VSV).
4. Способ по п. 3, в котором VSV содержит рекомбинантный VSV.
5. Способ по п. 4, в котором рекомбинантный VSV содержит замену M51R.
6. Способ по любому из пп. 3-5, в котором рекомбинантный VSV экспрессирует цитокин.
7. Способ по п. 6, в котором цитокин содержит интерферон-бета (IFN β).
8. Способ по п. 7, в котором последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая IFN β , расположена между вирусными генами M и G.
9. Способ по любому из пп. 4-8, в котором рекомбинантный VSV дополнительно экспрессирует натрий/йодидный симпортер (NIS).
10. Способ по п. 9, в котором последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая NIS, расположена между вирусными генами G и L.
11. Способ по любому из пп. 1-10, в котором онколитический вирус представляет

с собой Voyager V1.

12. Способ по любому из пп. 1-11, в котором онколитический вирус, ингибитор пути PD-1 и ингибитор CTLA4 вводят пациенту одновременно.

13. Способ по любому из пп. 1-11, в котором одну или несколько доз онколитического вируса вводят последовательно в комбинации с одной или несколькими дозами ингибитора пути PD-1 и одной или несколькими дозами ингибитора CTLA4.

14. Способ по п. 13, в котором одна или несколько доз ингибитора CTLA4 предусматривают однократную дозу ингибитора CTLA4 и в котором введение однократной дозы ингибитора CTLA4 приводит к противоопухолевой эффективности, сравнимой с противоопухолевой эффективностью при комбинированной терапии, содержащая две или более дозы ингибитора CTLA4.

15. Способ по п. 14, в котором противоопухолевая эффективность характеризуется уменьшением среднего или усредненного объема опухоли, процентной выживаемости, количества пациентов без опухолей в каждой группе лечения или их комбинации.

16. Способ по любому из пп. 1-15, в котором онколитический вирус вводят пациенту в виде одной или нескольких доз 10^4 - 10^{14} TCID₅₀, 10^4 - 10^{12} TCID₅₀, 10^6 - 10^{12} TCID₅₀, 10^8 - 10^{14} TCID₅₀, 10^8 - 10^{12} TCID₅₀ или 10^{10} - 10^{12} TCID₅₀.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором ингибитор пути PD-1 вводят пациенту в виде одной или нескольких доз от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг массы тела пациента.

18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором ингибитор пути PD-1 вводят пациенту в виде одной или нескольких доз от приблизительно 1 мг до приблизительно 1000 мг.

19. Способ по любому из пп. 1-18, в котором ингибитор CTLA4 вводят пациенту в виде одной или нескольких доз от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг массы тела пациента.

20. Способ по любому из пп. 1-19, в котором ингибитор CTLA4 вводят пациенту в

виде однократной дозы от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг массы тела пациента.

21. Способ по любому из пп. 1-20, в котором ингибитор CTLA4 вводят пациенту в виде одной или нескольких доз от приблизительно 1 мг до приблизительно 600 мг.

22. Способ по любому из пп. 1-21, в котором онколитический вирус вводят пациенту внутривенно или внутривенно.

23. Способ по любому из пп. 1-22, в котором ингибитор пути PD-1 и ингибитор CTLA4 вводят пациенту внутривенно, подкожно или внутривенно.

24. Способ по любому из пп. 1-23, причем рак выбирают из опухолей надпочечников, рака желчных путей, рака мочевого пузыря, рака головного мозга, рака молочной железы, карциномы, рака ткани центральной или периферической нервной системы, рака шейки матки, рака толстой кишки, эндокринного или нейроэндокринного рака или гемопоэтического рака, рака пищевода, фибромы, желудочно-кишечного рака, глиомы, рака головы и шеи, опухолей Ли-Фраумени, рака печени, рака легких, лимфомы, меланомы, менингиомы, множественных нейроэндокринных опухолей типа I и типа II, рака носоглотки, рака полости рта, рака ротоглотки, опухолей остеогенных сарком, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака островковых клеток поджелудочной железы, рака паращитовидной железы, феохромоцитомы, опухолей гипофиза, рака предстательной железы, рака прямой кишки, рака почки, рака дыхательных путей, саркомы, рака кожи, рака желудка, тестикулярного рака, рака щитовидной железы, рака трахеи, рака мочеполовой системы и рака матки.

25. Способ по любому из пп. 1-24, причем рак устойчив к лечению с помощью по меньшей мере одного анти-PD-1 средства или терапии.

26. Способ по любому из пп. 1-25, в котором ингибитор пути PD-1 содержит анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент или анти-PD-L2 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

27. Способ по п. 26, в котором анти-PD-1 антитело выбирают из цемиплимаба,

ниволумаба, пембролизумаба, пидилизумаба, MEDI0608, BI 754091, PF-06801591, спартализумаба, камрелизумаба, JNJ-63723283 и MCLA-134.

28. Способ по любому из пп. 26-27, в котором анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) варибельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) варибельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2.

29. Способ по любому из пп. 26-28, в котором анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащие соответствующие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 3, 4 и 5; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащие соответствующие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 6, 7 и 8.

30. Способ по любому из пп. 26-29, в котором анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1; и варибельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2.

31. Способ по любому из пп. 26-30, в котором анти-PD-1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи согласно SEQ ID NO: 9 и 10.

32. Способ по п. 26, в котором анти-PD-L1 антитело выбирают из REGN3504, авелумаба, атезолизумаба, дурвалумаба, MDX-1105, LY3300054, FAZ053, STI-1014, CX-072, KN035 и CK-301.

33. Способ по п. 26, в котором анти-PD-L1 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат варибельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 11; и варибельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID

NO: 12.

34. Способ по любому из пп. 26-33, в котором анти-PD-L1 антитело содержит REGN3504.

35. Способ по любому из пп. 1-34, в котором ингибитор CTLA4 содержит анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

36. Способ по п. 35, в котором анти-CTLA4 антитело выбирают из ипилимумаба, тремелимумаба и REGN4659.

37. Способ по п. 35 или 36, в котором анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) вариабельной области тяжелой цепи (HCVR), содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13, и определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) вариабельной области легкой цепи (LCVR), содержащей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14.

38. Способ по любому из пп. 35-37, в котором анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащие соответствующие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 15, 16 и 17; и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащие соответствующие аминокислотные последовательности согласно SEQ ID NO: 18, 19 и 20.

39. Способ по любому из пп. 35-38, в котором анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 13; и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 14.

40. Способ по любому из пп. 35-39, в котором анти-CTLA4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи согласно SEQ ID NO: 21 и 22.

41. Способ по любому из пп. 1-40, причем лечение оказывает терапевтический эффект, выбранный из одного или нескольких эффектов из: задержки роста опухоли, уменьшения количества опухолевых клеток, регрессии опухоли, увеличения выживаемости, частичного ответа и полного ответа.

42. Способ по любому из пп. 1-41, в котором рост опухоли ингибируется по меньшей мере на 50% по сравнению с не получавшим лечения пациентом.

43. Способ по любому из пп. 1-42, в котором рост опухоли ингибируется по меньшей мере на 50% по сравнению с пациентом, которому вводили онколитический вирус, ингибитор пути PD-1 или ингибитор CTLA4 в качестве монотерапии.

44. Способ по любому из пп. 1-43, в котором рост опухоли ингибируется по меньшей мере на 50% по сравнению с пациентом, которому вводили любые два средства из онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и ингибитора CTLA4.

45. Способ по любому из пп. 1-44, дополнительно предусматривающий введение дополнительного терапевтического средства или терапии пациенту.

46. Способ по п. 45, в котором дополнительное терапевтическое средство или терапию выбирают из: лучевой терапии, хирургического вмешательства, химиотерапевтического средства, противораковой вакцины, ингибитора B7-H3, ингибитора B7-H4, ингибитора гена активации лимфоцитов 3 (LAG3), ингибитора белка, содержащего домен иммуноглобулина T-клеток и домен муцина 3 (TIM3), ингибитора галектина 9 (GAL9), ингибитора содержащего V-домен иммуноглобулина (Ig) супрессора активации T-клеток (VISTA), ингибитора иммуноглобулиноподобного рецептора клеток-киллеров (KIR), ингибитора B- и T-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), ингибитора T-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), ингибитора CD47, ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), антагониста фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ингибитора ангиопоэтина-2 (Ang2), ингибитора трансформирующего фактора роста бета (TGF β), ингибитора рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), антитела к опухолеспецифическому антигену, вакцины бацилл Кальметта-Герена, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), цитотоксина, ингибитора рецептора интерлейкина-6 (IL-6R), ингибитора рецептора интерлейкина-4 (IL-4R), ингибитора IL-10, IL-2, IL-7, IL-12, IL-21, IL-15, конъюгата антитело-лекарственное

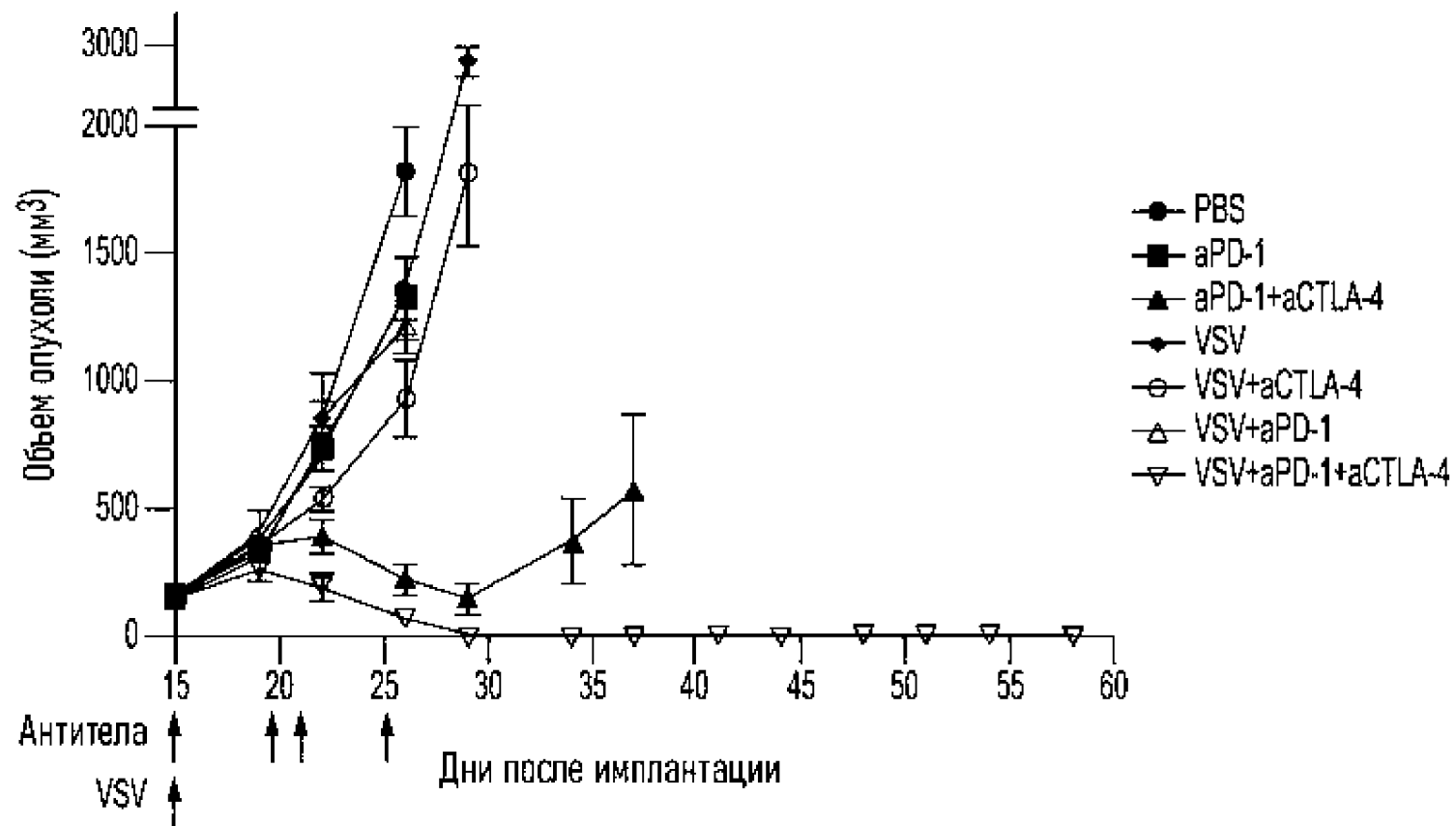
средство, противовоспалительного лекарственного средства и их комбинаций.

47. Комбинация онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и ингибитора CTLA4 для применения в способе лечения или ингибирования роста опухоли, причем данный способ предусматривает:

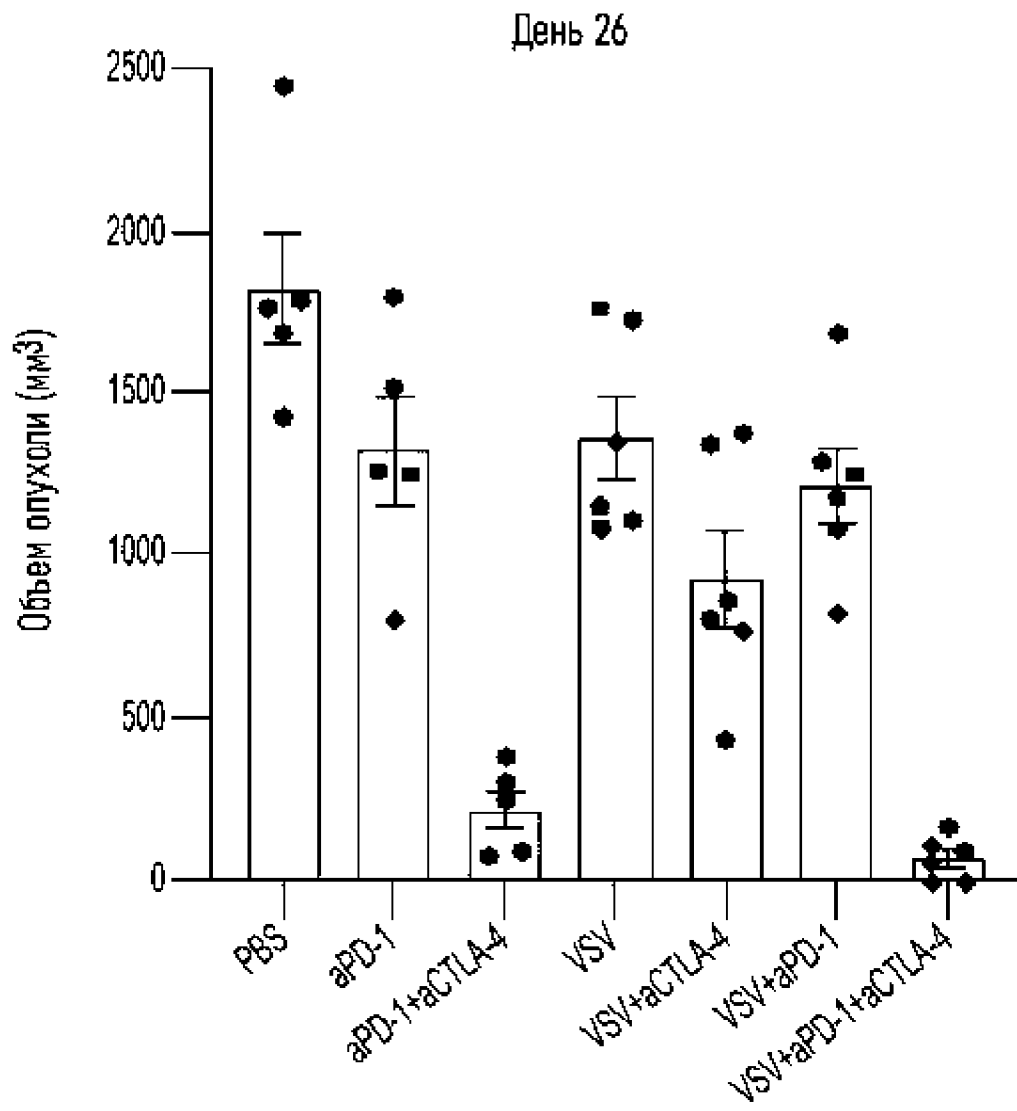
(a) выбор пациента с раком; и

(b) введение нуждающемуся в этом пациенту: (i) терапевтически эффективного количества онколитического вируса в комбинации с (ii) терапевтически эффективным количеством ингибитора пути PD-1 и (iii) терапевтически эффективным количеством ингибитора CTLA.

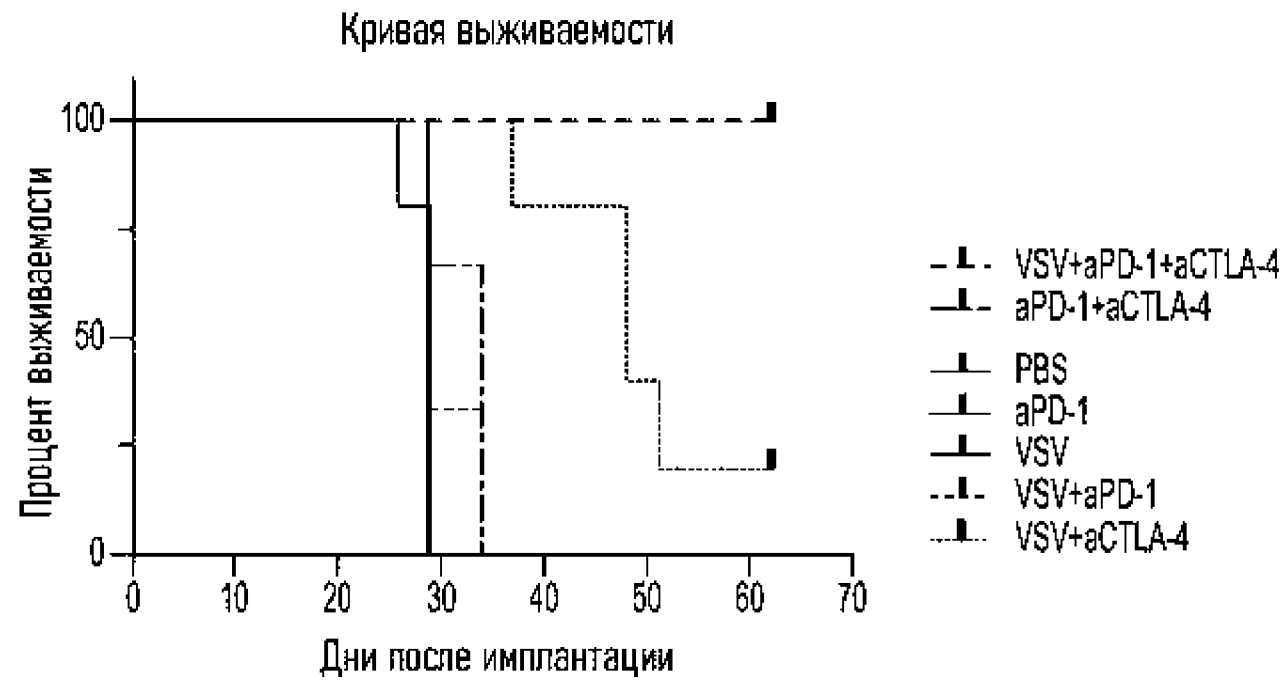
48. Набор, содержащий онколитический вирус, ингибитор пути PD-1 и ингибитор CTLA4 в сочетании с письменными инструкциями по применению терапевтически эффективного количества комбинации онколитического вируса, ингибитора пути PD-1 и ингибитора CTLA4 для лечения и ингибирования роста опухоли у пациента.



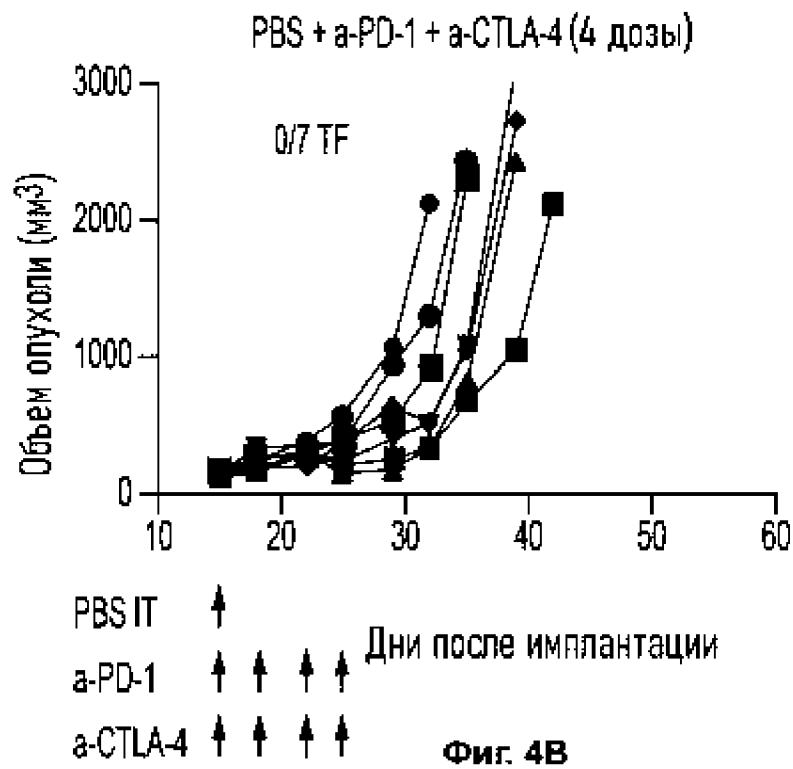
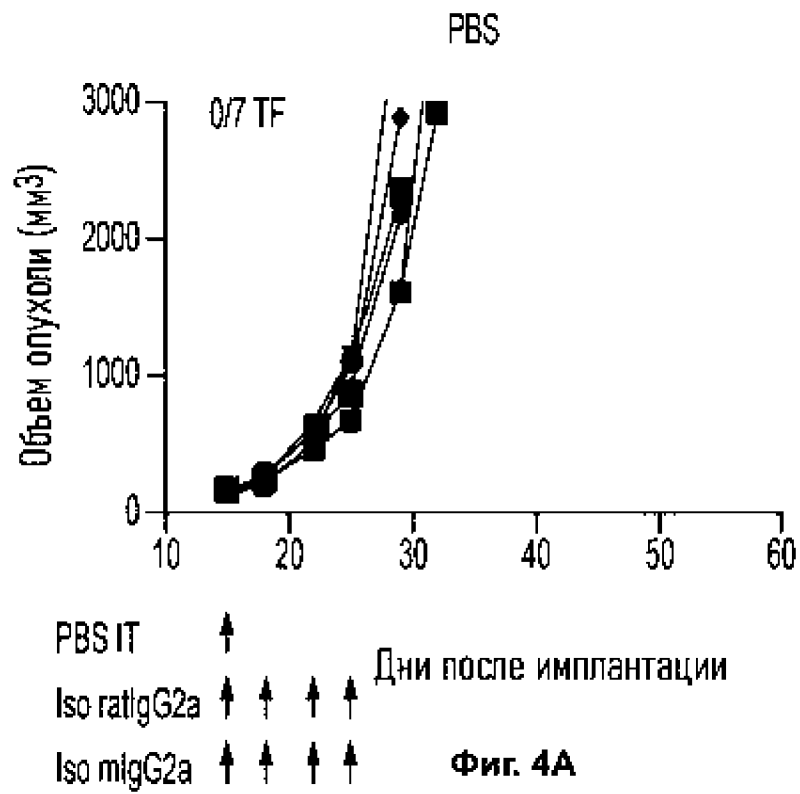
Фиг. 1

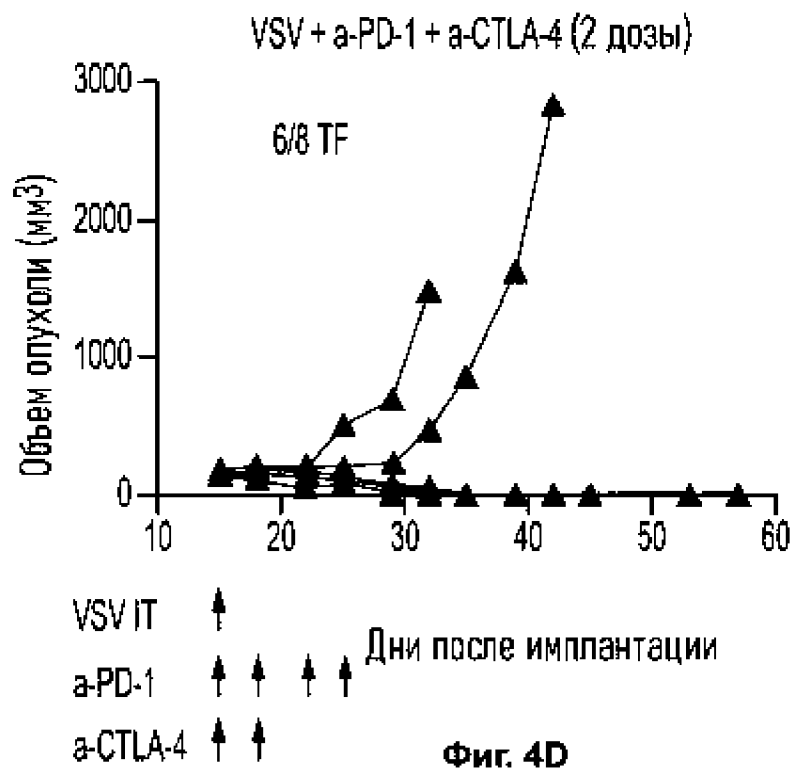
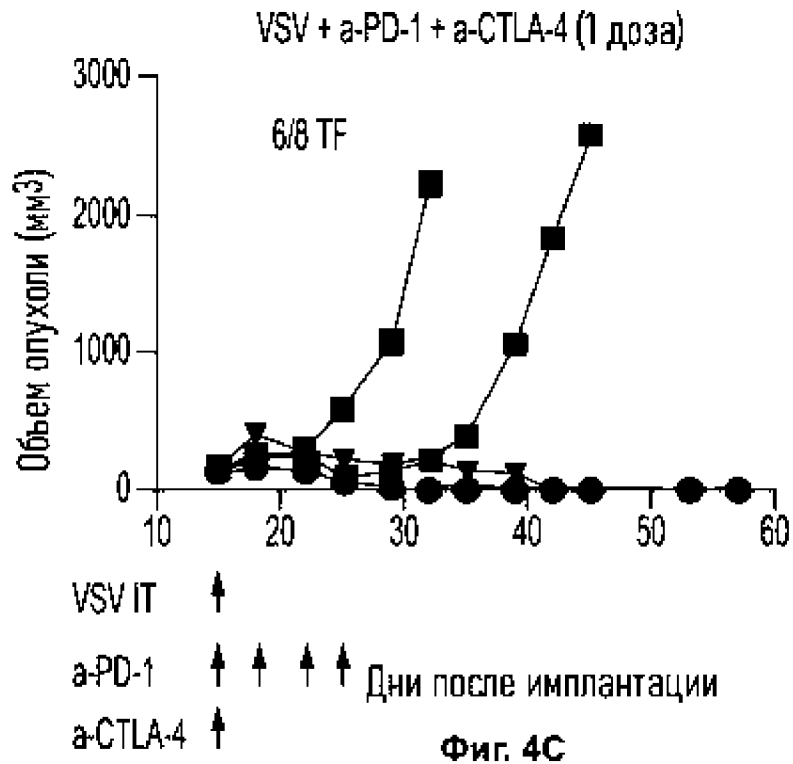


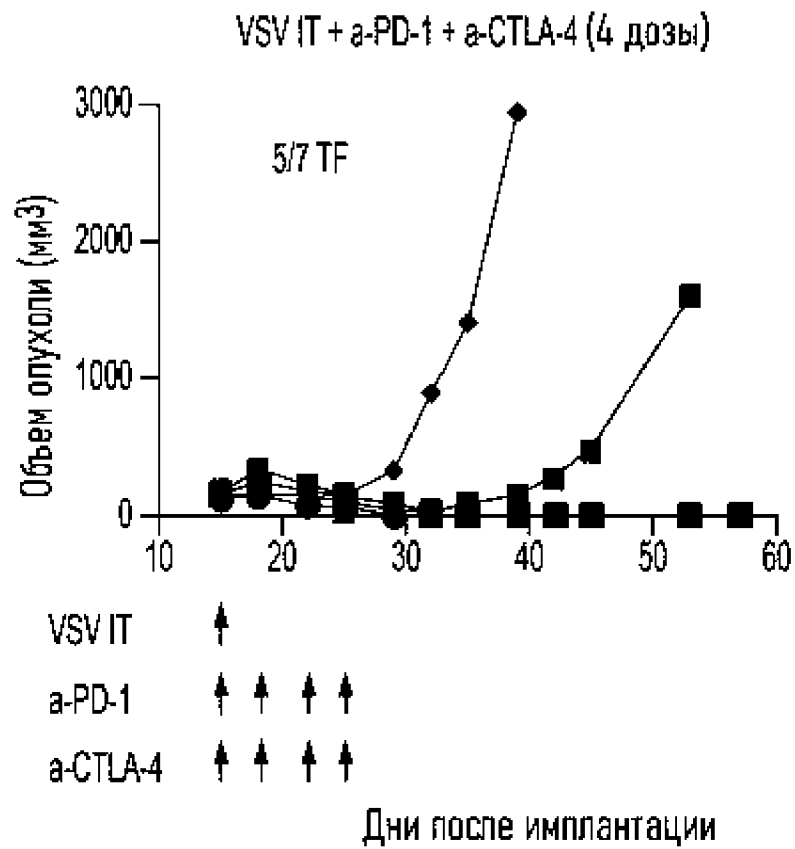
Фиг. 2



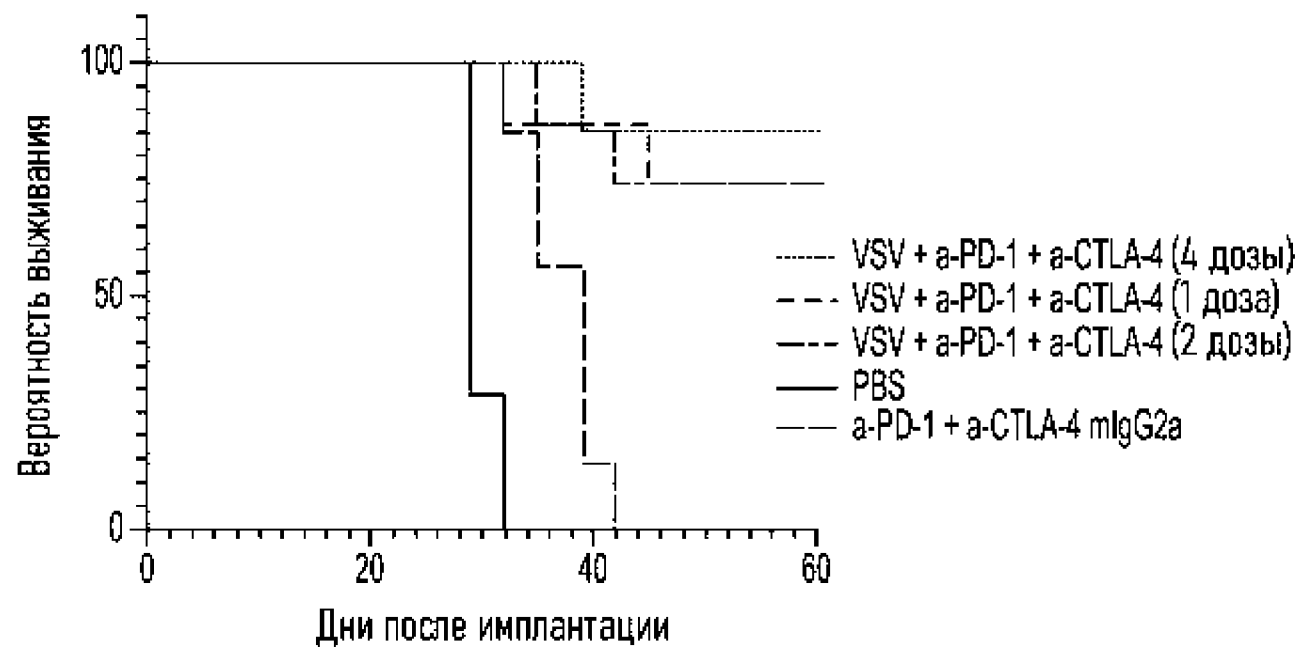
Фиг. 3



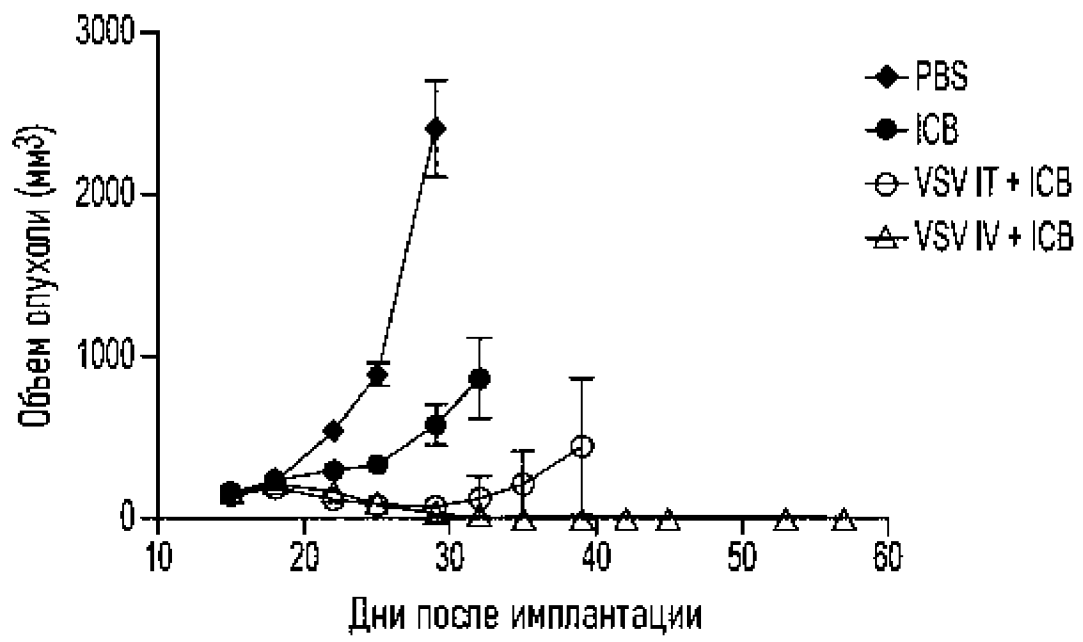




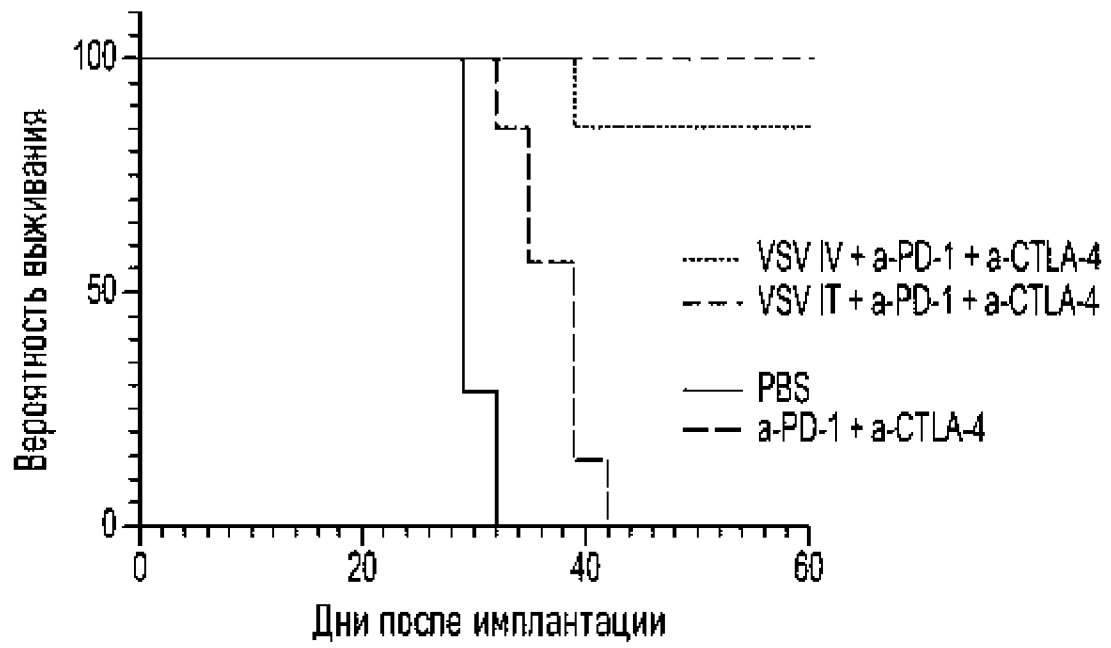
Фиг. 4Е



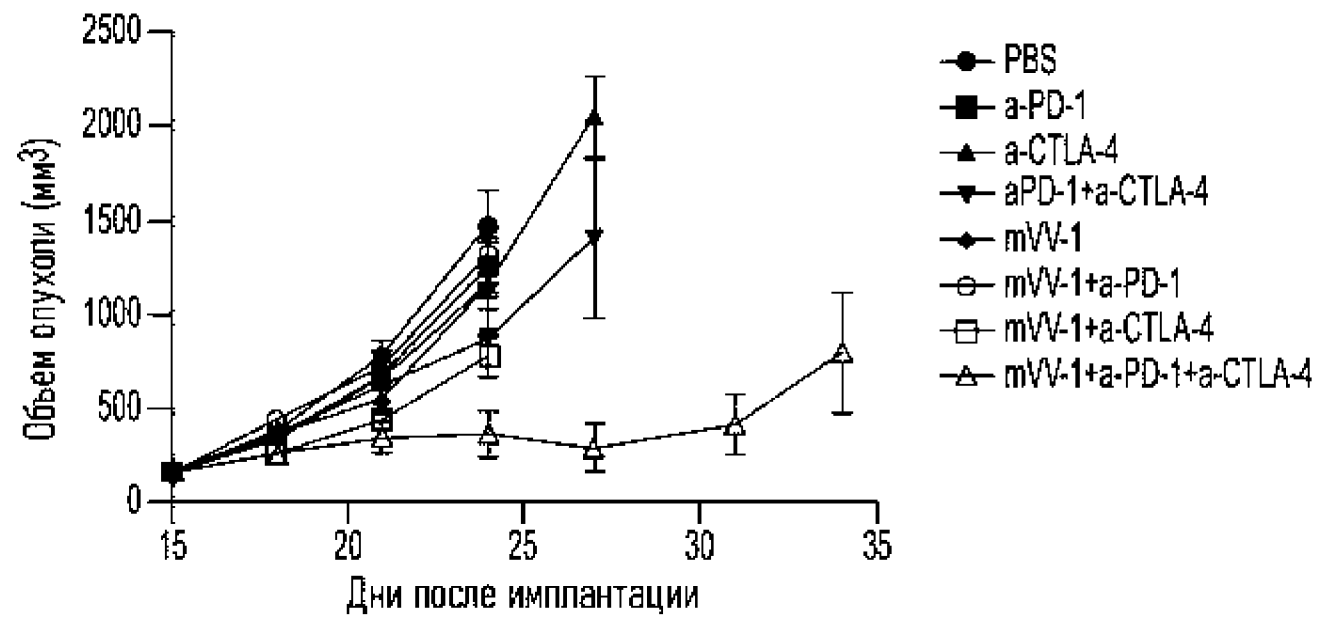
Фиг. 5



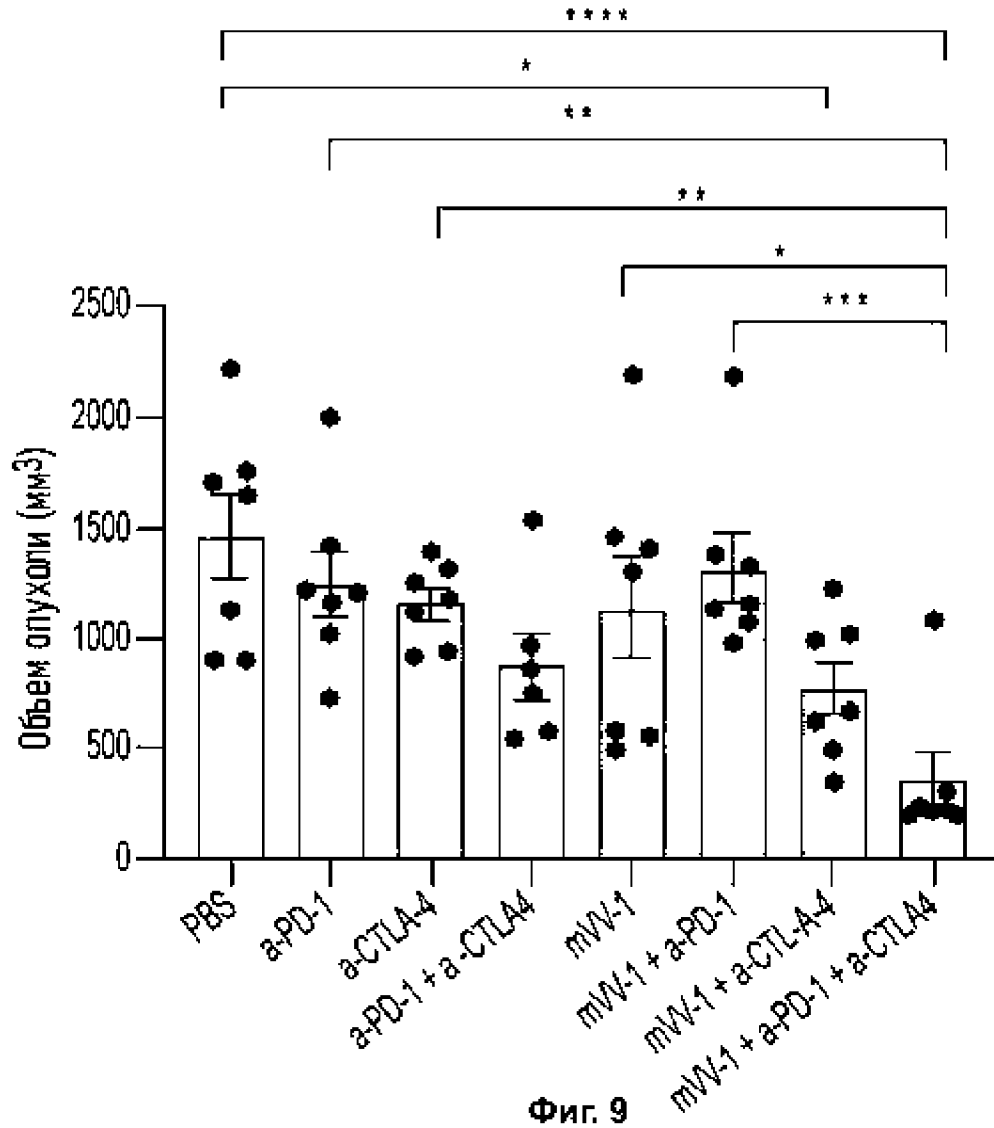
Фиг. 6

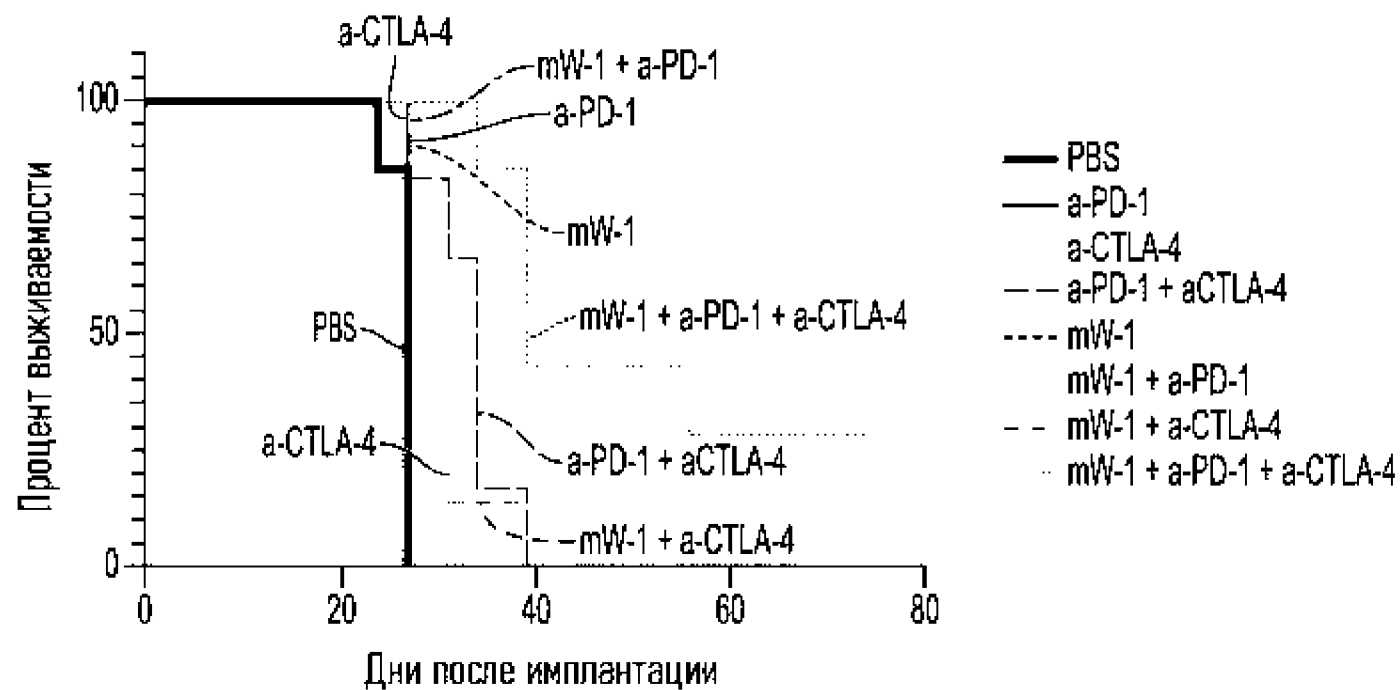


Фиг. 7

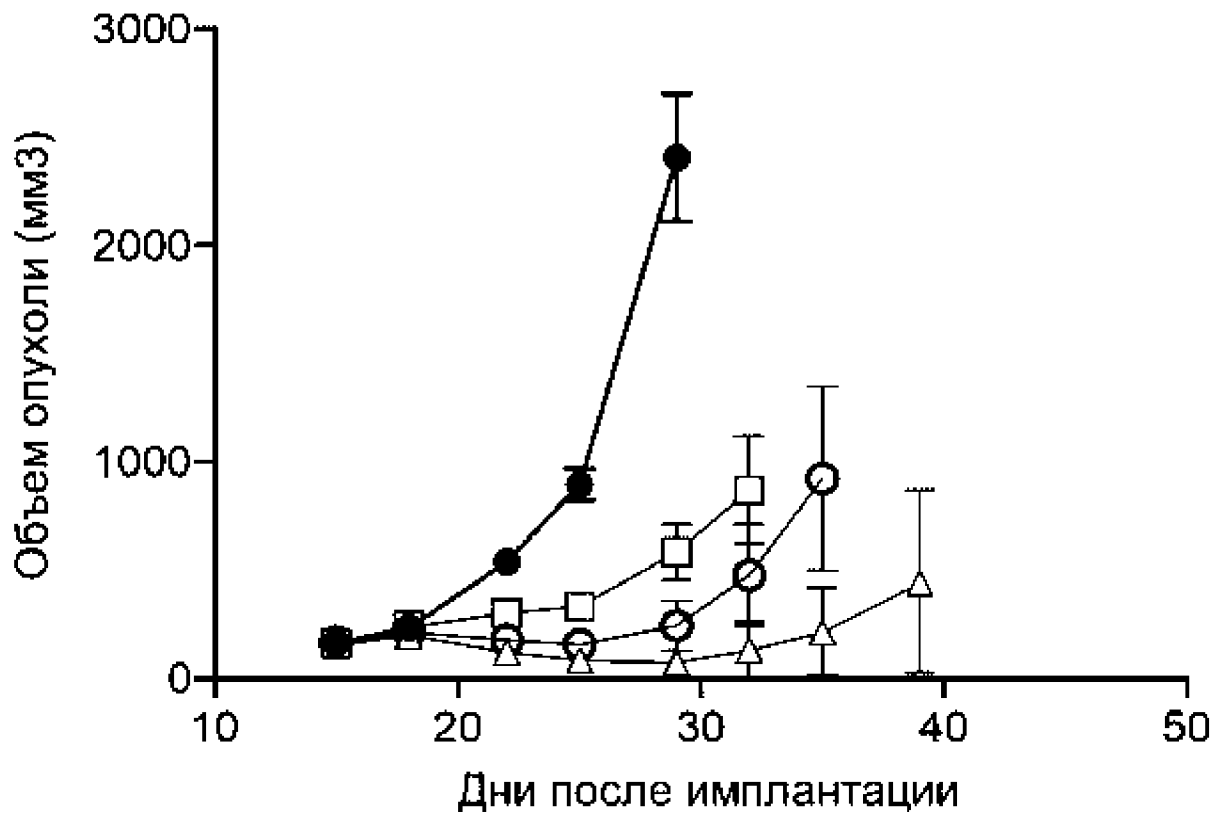


Фиг. 8



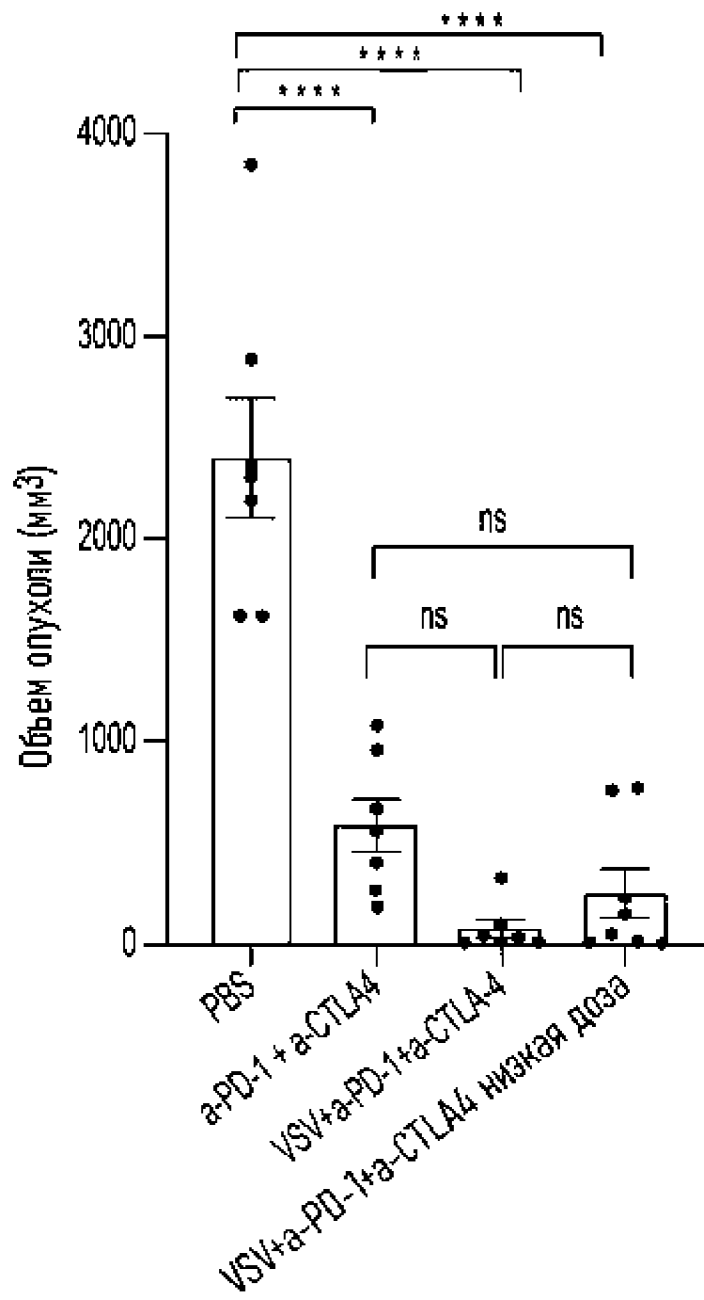


Фиг. 10

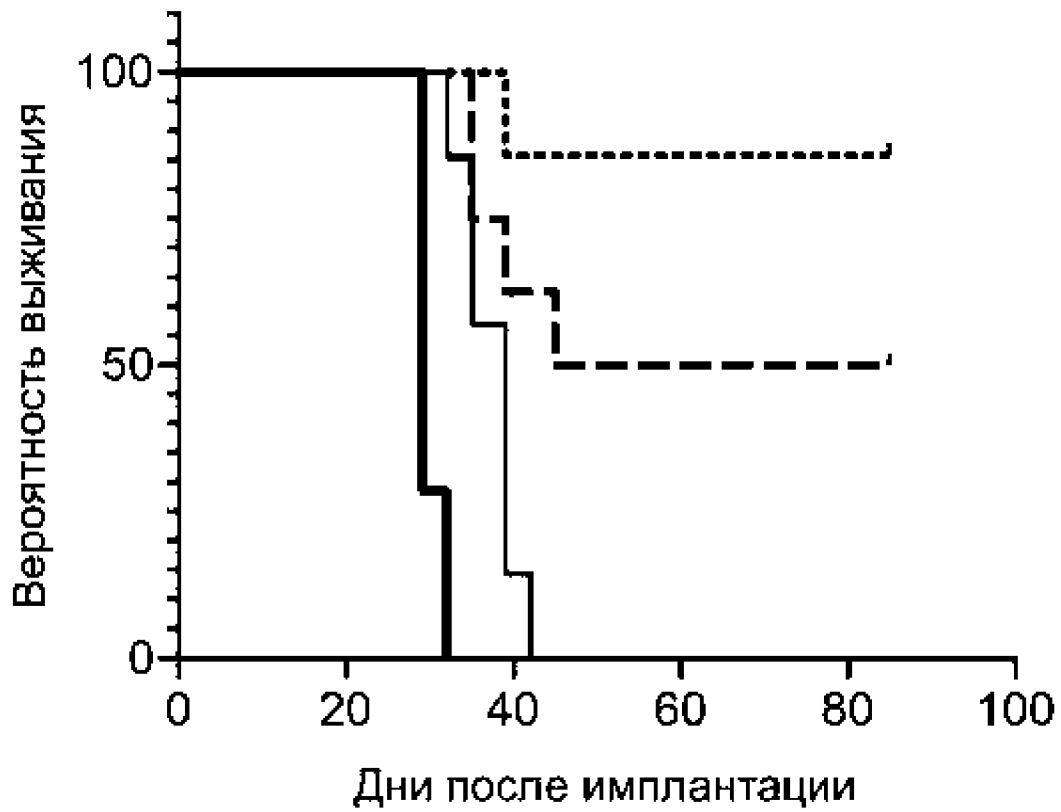


- PBS
- PBS+α-PD-1+α-CTLA-4 mIgG2a
- △ VSV+α-PD-1+α-CTLA-4 mIgG2a
- ⊖ VSV+α-PD-1+α-CTLA-4 mIgG2a низкая доза

Фиг. 11



Фиг. 12



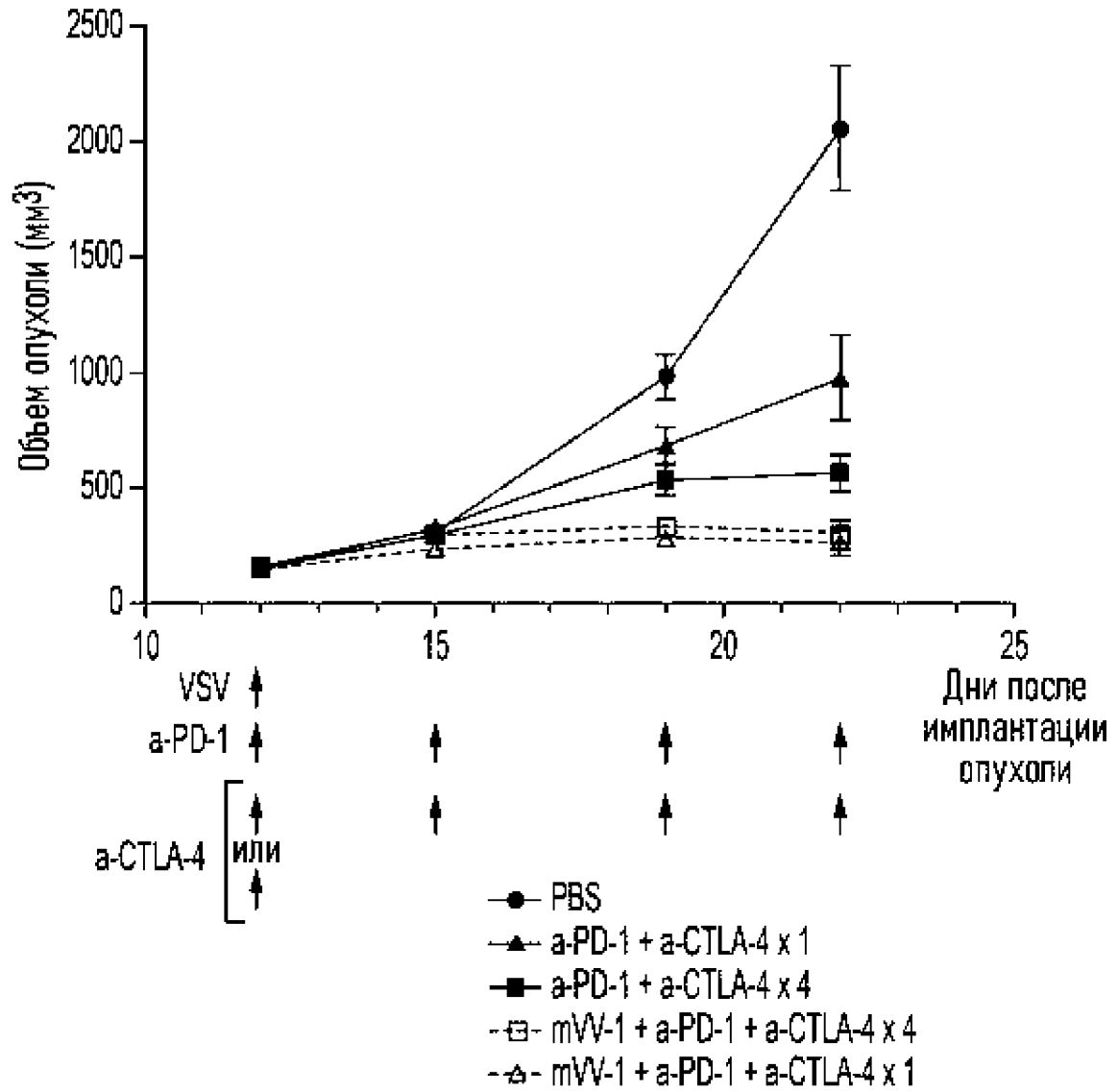
--- VSV+α-PD-1+α-CTLA-4 (высокая доза)

- - - VSV+α-PD-1+α-CTLA-4 (низкая доза)

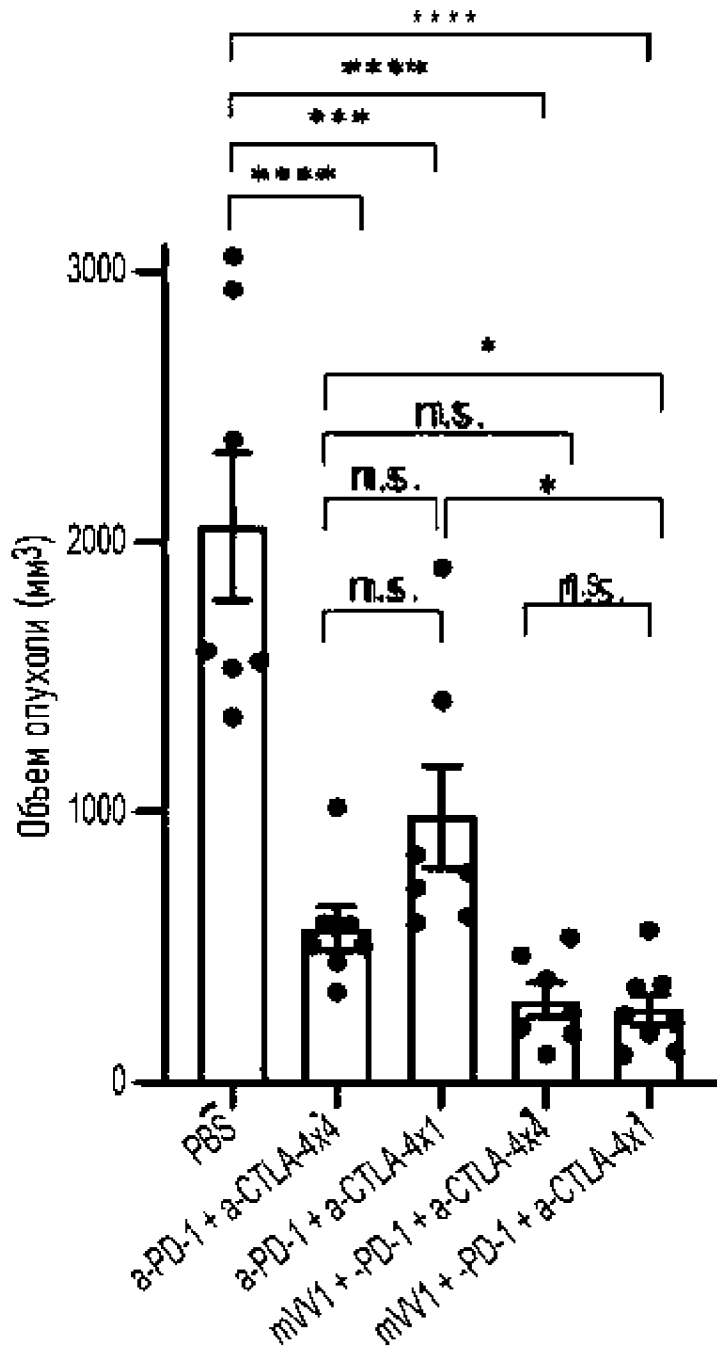
- + - PBS+α-PD-1+α-CTLA-4 (высокая доза)

— PBS

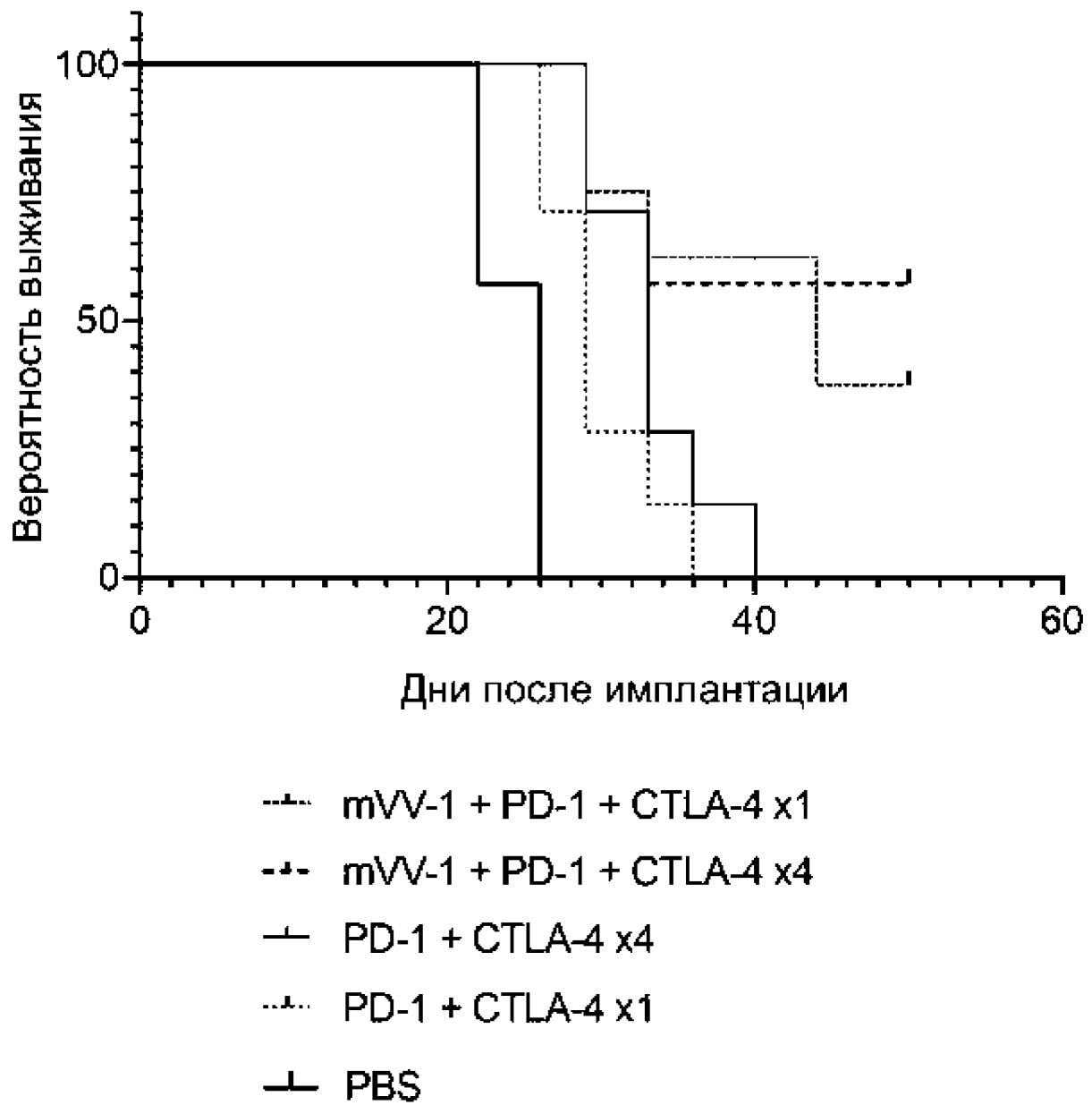
Фиг. 13



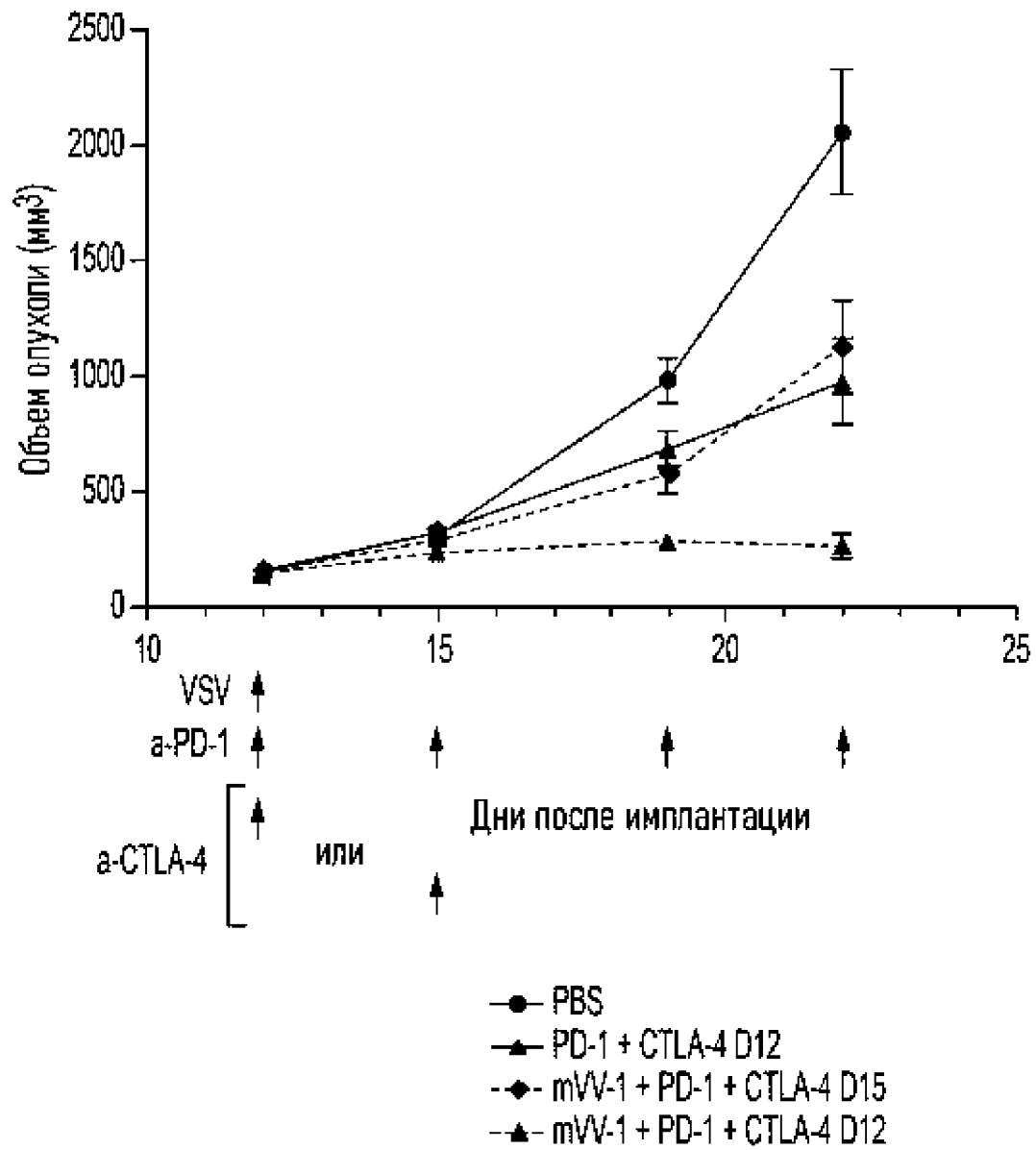
Фиг. 14



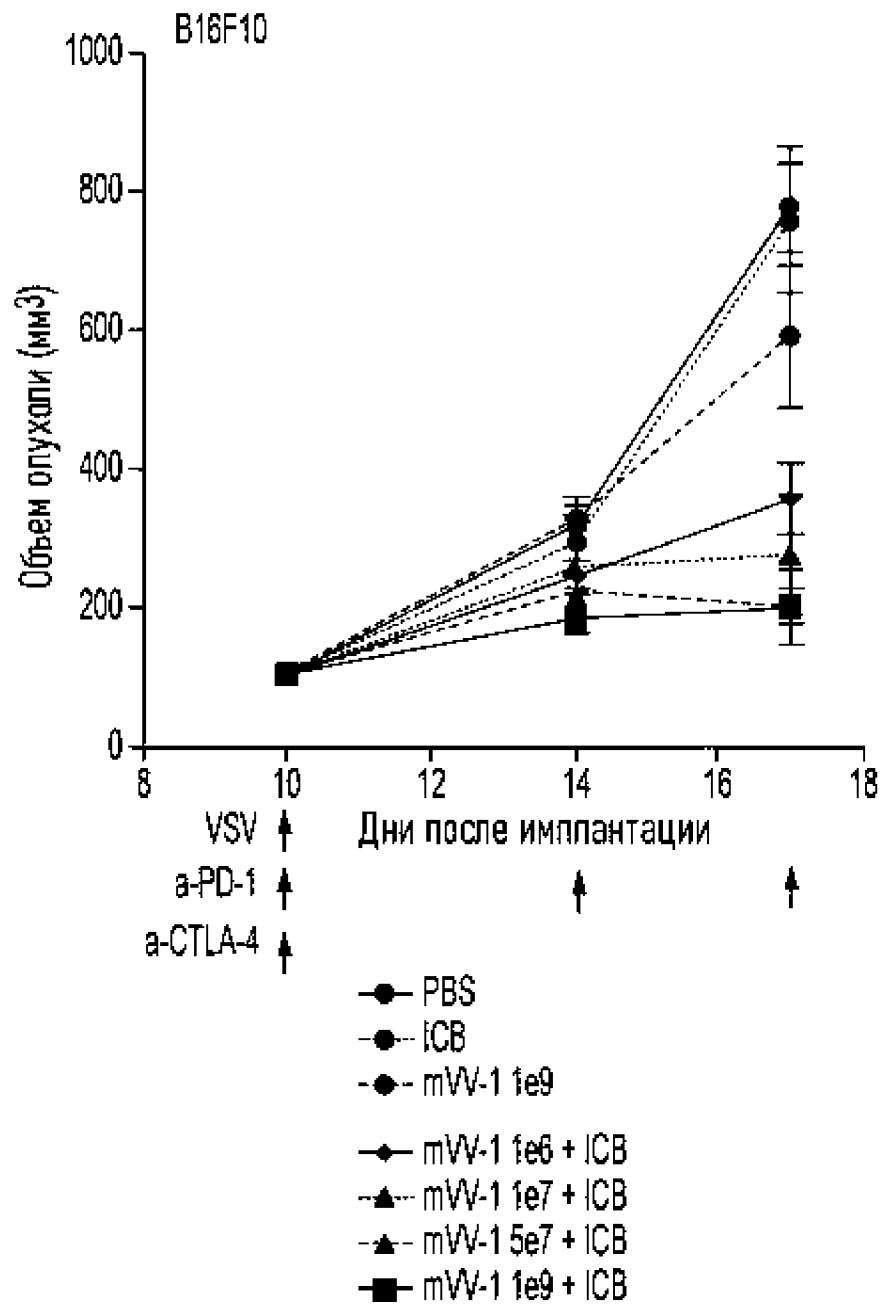
Фиг. 15



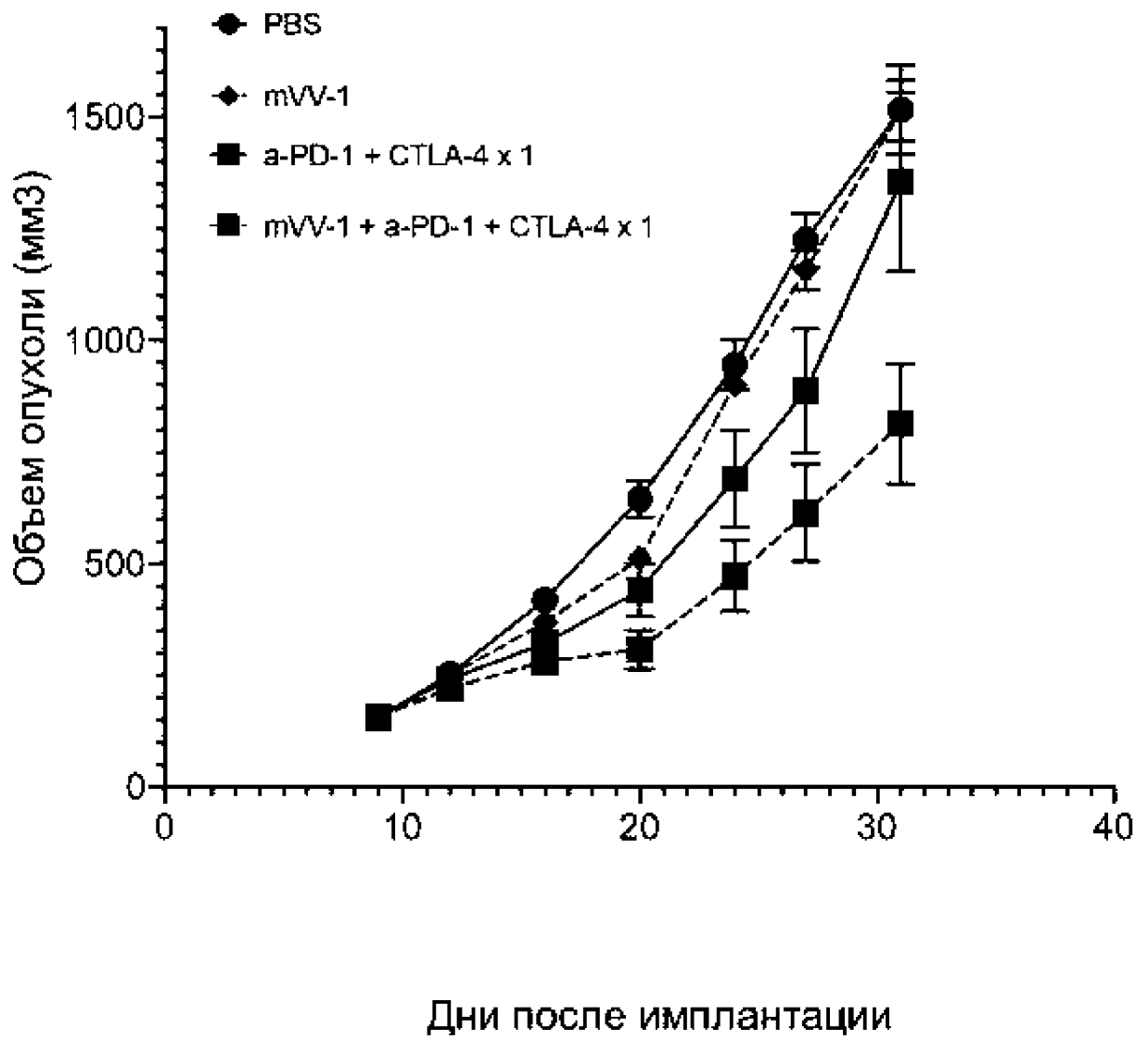
Фиг. 16



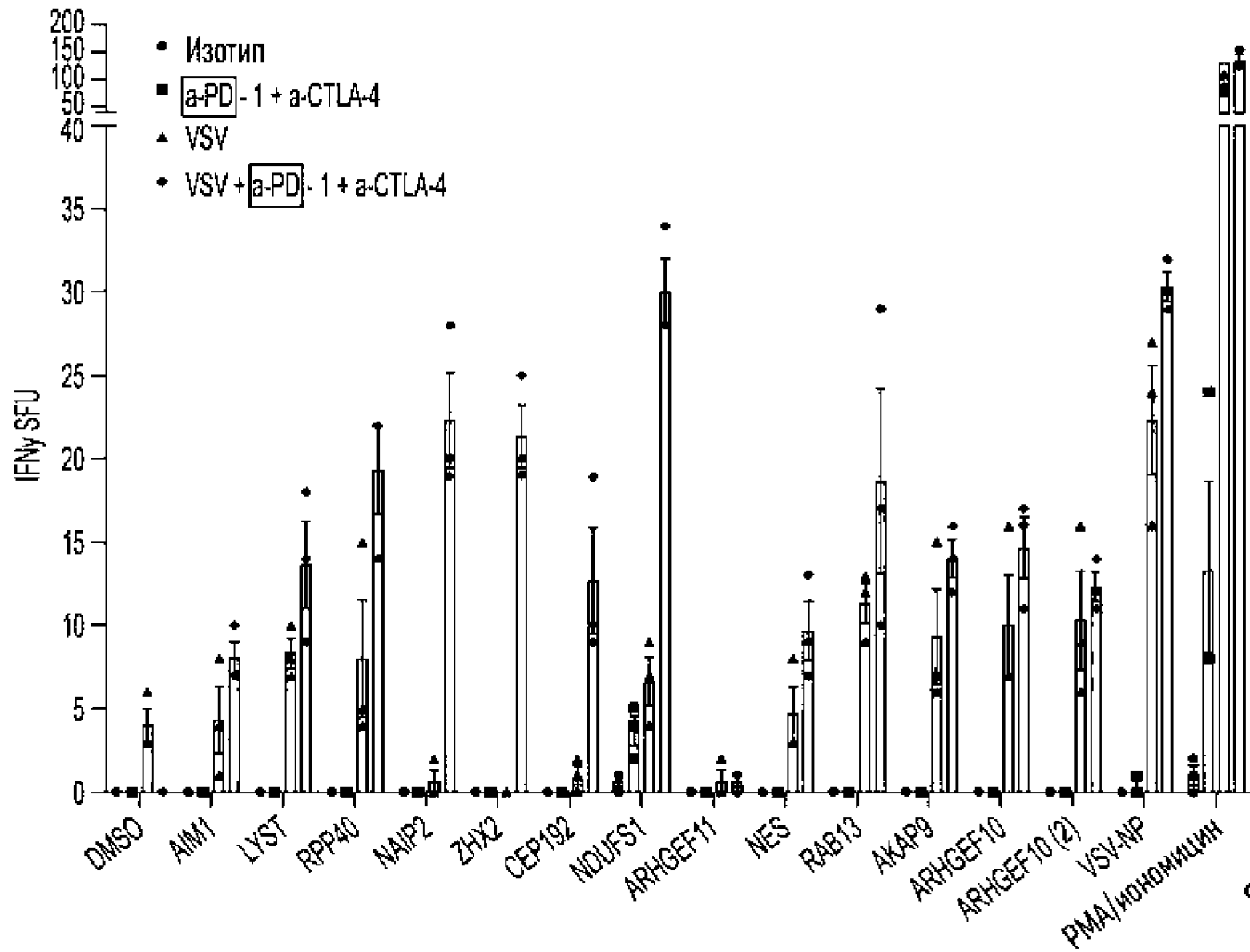
Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20