



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК  
C12N 5/10 (2024.08)

(21)(22) Заявка: 2023136060, 29.12.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
29.12.2023

Дата регистрации:  
11.03.2025

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.12.2023

(45) Опубликовано: 11.03.2025 Бюл. № 8

Адрес для переписки:

119991, Москва, ул. Вавилова, 32, Федеральное  
государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А.  
Энгельгардта Российской академии наук  
(ИМБ РАН)

(72) Автор(ы):

Липатова Анастасия Валерьевна (RU),  
Воробьев Павел Олегович (RU),  
Купраш Дмитрий Владимирович (RU),  
Кочетков Дмитрий Владимирович (RU),  
Чумаков Петр Михайлович (RU),  
Макаров Александр Александрович (RU),  
Каприн Андрей Дмитриевич (RU),  
Шегай Петр Викторович (RU),  
Безбородова Ольга Алексеевна (RU),  
Панкратов Андрей Александрович (RU),  
Плотникова Екатерина Александровна (RU),  
Рерберг Андрей Георгиевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт молекулярной  
биологии им. В.А. Энгельгардта Российской  
академии наук (ИМБ РАН) (RU),  
Федеральное государственное бюджетное  
учреждение "Национальный медицинский  
исследовательский центр радиологии"  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: Н.В. Литусов, Пикорнавирусы  
Иллюстрированное учебное пособие, 2017,  
Екатеринбург, страницы 10,4. Найдено в  
интернет 22.04.2024 chrome-  
extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/  
[https://elib.usma.ru/bitstream/usma/1047/1/  
UMK\\_2017\\_019.pdf](https://elib.usma.ru/bitstream/usma/1047/1/UMK_2017_019.pdf). А.Н. Хамад, А.В. Соболева  
и т.д., РАЗРАБОТКА  
РЕКОМБИНАНТНОГО  
ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ШТАММА  
ПОЛИОВИРУСА 3-ГО ТИПА С (см.  
прод.)

(54) Оптимизированный штамм полиовируса 3 типа для терапии солидных опухолей

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии. Описан способ оптимизации вируса

полиовирусной вакцины 3 типа Сэбин для селективного уничтожения опухолевых клеток, включающий: культивирование штамма полиовирусной вакцины 3 типа Сэбин на смеси опухолевых клеток глиобластомы, при этом инициализацию репликации осуществляют в культуре клеток НЕК293Т, через 24 часа после заражения клетки промывают и инкубируют в течение 48 часов, после чего изолируют вирус из культуры; пассирование вируса в течение шести месяцев в смешанной культуре клеток глиобластомы с определением титра вируса и анализом его цитопатических свойств; модификацию внутреннего участка связывания рибосомы (IRES), путем амплификации IRES с использованием праймеров SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, амплификации ДНК-фрагмента, кодирующего геном, плазмидного остова с использованием праймеров SEQ ID NO: 3 и SEQ

ID NO: 4, с последующим созданием кольцевой плазмиды, которой индуцируют вирус. Изобретение позволяет получать высокоонкоселективный рекомбинантный онколитический полиовирус, эффективно лизирующий солидные опухоли различной гистологической принадлежности. Полученный заявленным способом штамм продемонстрировал свою эффективность и безопасность в экспериментах *in vitro* на моделях опухолевых и условно-нормальных клеточных культур. На различных моделях *in vivo* в иммунодефицитных мышцах с ксенографтами человеческих опухолей и гуманизированной модели ортотопической глиомы С6 крысы оптимизированный рекомбинантный штамм продемонстрировал высокую онколитическую активность. 1 з.п. ф-лы, 4 ил., 6 пр.

(56) (продолжение):

**ИЗМЕНЕННЫМ КЛЕТОЧНЫМ ТРОПИЗМОМ, ВЕСТНИК РГМУ, 2022, номер 2, страницы 5-11.**

Опубликован онлайн: 30.04.2022, найдено в интернет 22.04.2024 chrome-

extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://vestnik.rsmu.press/files/issues/vestnik.rsmu.press/2022/2/2022-2-965\_ru.pdf?lang=ru. US 20100247621 A1, 30.09.2010. CA 0003037573 A1, 05.04.2018. RU 2215035 C2, 27.10.2003.

RU 2836222 C1

RU 2836222 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC  
*C12N 5/10 (2024.08)*

(21)(22) Application: **2023136060, 29.12.2023**

(24) Effective date for property rights:  
**29.12.2023**

Registration date:  
**11.03.2025**

Priority:

(22) Date of filing: **29.12.2023**

(45) Date of publication: **11.03.2025** Bull. № 8

Mail address:

119991, Moskva, ul. Vavilova, 32, Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe uchrezhdenie nauki Institut molekulyarnoj biologii im. V.A. Engelgardta Rossijskoj akademii nauk (IMB RAN)

(72) Inventor(s):

Lipatova Anastasiya Valerevna (RU),  
Vorobev Pavel Olegovich (RU),  
Kuprash Dmitrij Vladimirovich (RU),  
Kochetkov Dmitrij Vladimirovich (RU),  
Chumakov Petr Mikhajlovich (RU),  
Makarov Aleksandr Aleksandrovich (RU),  
Kaprin Andrej Dmitrievich (RU),  
Shegaj Petr Viktorovich (RU),  
Bezborodova Olga Alekseevna (RU),  
Pankratov Andrej Aleksandrovich (RU),  
Plotnikova Ekaterina Aleksandrovna (RU),  
Rerberg Andrej Georgievich (RU)

(73) Proprietor(s):

Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe uchrezhdenie nauki Institut molekulyarnoj biologii im. V.A. Engelgardta Rossijskoj akademii nauk (IMB RAN) (RU),  
Federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij issledovatel'skij tsentr radiologii" Ministerstva zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)

(54) **OPTIMIZED STRAIN OF POLIOVIRUS TYPE 3 FOR THERAPY OF SOLID TUMOURS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: described is a method for optimizing Sabin type 3 poliovirus vaccine for selective destruction of tumour cells, involving: culturing Sabin type 3 poliovirus vaccine on a mixture of glioblastoma tumour cells, wherein replication is initiated in the HEK293T cell culture, 24 hours after infection, the cells are washed and incubated for 48 hours, after which the virus is isolated from the culture; virus passaging for six months in a mixed culture of glioblastoma cells with determination of virus titre and analysis of its cytopathic properties; modification of internal ribosome binding site (IRES), by amplification of IRES using primers SEQ ID NO: 1 and SEQ ID NO: 2, amplification of a DNA fragment coding a genome of a plasmid backbone

using primers SEQ ID NO: 3 and SEQ ID NO: 4, with subsequent creation of circular plasmid, which is induced by virus. Invention enables to obtain a highly oncolytic recombinant poliovirus which effectively lyses solid tumours of various histological affiliations. Strain obtained using the disclosed method has shown its effectiveness and safety in experiments in vitro on models of tumour and conditionally normal cell cultures.

EFFECT: optimized recombinant strain has shown high oncolytic activity on various models in vivo in immunodeficient mice with xenografts of human tumours and humanized model of orthotopic rat C6 glioma.

2 cl, 4 dwg, 6 ex

## Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к инновациям в области онкологической терапии и вирусологии. В частности, оно касается разработки рекомбинантных онколитических полиовирусов, предназначенных для направленного лечения солидных новообразований.

Изобретение подробно описывает создание генетически модифицированных безопасных штаммов полиовирусов. Эти штаммы характеризуются усовершенствованными онколитическими способностями, специально предназначенными для селективного нацеливания и уничтожения злокачественных клеточных структур при одновременном сохранении здоровых клеток. Такое селективное нацеливание представляет собой значительный прогресс в области лечения рака и вирусологии, предлагая новый подход к терапии рака.

### Уровень техники

Рак продолжает быть серьезной глобальной медицинской проблемой, занимая лидирующие позиции по заболеваемости и смертности во всем мире [Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M, Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // CA: a cancer journal for clinicians. - 2021. - V. 71. - P. 209-249.]. Сольидные опухоли, представляющие один из видов рака, отличаются своей инвазивностью, устойчивостью к традиционным методам лечения и значительным влиянием на качество жизни пациентов. Несмотря на успехи в лечении рака, остро стоит задача разработки более эффективных и менее токсичных методов, способных целенаправленно воздействовать на опухолевые клетки.

Виротерапия является инновационным подходом к лечению устойчивых форм рака и обладает значительным потенциалом для исследований и разработок [Shalhout S.Z., Miller D.M., Emerick K.S., Kaufman H.L. Therapy with oncolytic viruses: progress and challenges // Nat Rev Clin Oncol. - 2023. - V. 20. - P. 160-177.]. Современные достижения в области генной инженерии позволяют преодолеть существующие ограничения и сделать виротерапию эффективным дополнением к лечению солидных опухолей.

Терапевтическая эффективность вирусов достигается за счет селективного уничтожения опухолевых клеток прямым цитотоксическим эффектом и индукцией иммуноопосредованной гибели клеток [Kaufman H.L., Kohlhapp F.J., Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. // Nat Rev Drug Discov. - 2015. - V. 14. - P. 642-662.]. Результатом является лизис злокачественных клеток, а реплицирующийся вирус распространяется на другие опухолевые клетки или отдаленные опухолевые очаги. Это приводит к уменьшению опухолевой массы, а вирус либо прекращает репликацию при исчерпании чувствительных клеток, либо нейтрализуется антителами.

Среди множества исследованных онколитических вирусов полиовирус из семейства Picornaviridae привлекает внимание благодаря своим естественным онколитическим свойствам [Merrill M.K., Bernhardt G., Sampson J.H., Wikstrand C.J., Bigner D.D., Gromeier M. Poliovirus receptor CD155-targeted oncolysis of glioma. // Neuro Oncol. - 2004. - V. 6. - P. 208-217.]. Провоцируя развитие полиомиелита [Melnick J.L. Current status of poliovirus infections. // Clin Microbiol Rev. - 1996. - V. 9. -P. 293-300.], полиовирус, тем не менее, обладает природным онколитическим потенциалом. Исследования показали, что полиовирус способен избирательно заражать определенные опухолевые клетки, вызывая их гибель [Pond A.R., Manuelidis E.E. ONCOLYTIC EFFECT OF POLIOMYELITIS VIRUS ON HUMAN EPIDERMAL CARCINOMA (HELA TUMOR) HETEROLOGOUSLY TRANSPLANTED TO GUINEA PIGS. // Am J Pathol. -1964. - V. 45. - P. 233-249.; Tsytkin L.B., Voroshilova M.K., Goryunova A.G., Lavrova I.K., Koroleva G.A. The morphology of tumors

of the human gastrointestinal tract in short-term organ culture and the reaction of these tumors to infection with poliovirus. // *Cancer*. - 1976. - V. 38. - P. 1796-1806.]. Это связано с использованием вирусом уязвимостей опухолевых клеток, особенно в отношении нарушений в сигнальных путях и способности индуцировать синтез интерферонов 1 типа [Bidwell B.N., Slaney C.Y., Withana N.P., Forster S., Cao Y., Loi S., Andrews D., Mikeska T., Mangan N.E., Samarajiwa S.A., de Weerd N.A., Gould J., Argani P., Moller A., Smyth M.J., Anderson R.L., Hertzog P.J., Parker B.S. Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. // *Nat Med*. - 2012. - V. 18. - P. 1224-1231.; Katsoulidis E., Kaur S., Plataniias L.C. Deregulation of interferon signaling in malignant cells. // *Pharmaceuticals*. - 2010. - V. 3. - P. 406-418.; Stojdl D.F., Lichty B., Knowles S., Marius R., Atkins H., Sonenberg N., Bell J.C. Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. // *Nat Med*. - 2000. - V. 6. - P. 821-825.], а также отвечать на интерферон [Pikor L.A., Bell J.C., Diallo J.-S. Oncolytic viruses: exploiting cancer's deal with the Devil. // *Trends in Cancer*. - 2015. - V. 1. - P. 266-277.; Zitvogel L., Galluzzi L., Kepp O., Smyth M.J., Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. // *Nat Rev Immunol*. - 2015. - V. 15. - P. 405-414.; Groner B., von Manstein V. Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition. // *Mol Cell Endocrinol*. - 2017. - V. 451. - P. 1-14.]. Важным аспектом является запуск иммунных процессов при инфекции опухолевой ткани, включая развитие воспалительной реакции и привлечение иммунной системы к опухоли, что снимает иммунную супрессию [Koks C.A., De Vleeschouwer S., Graf N., Van Gool S.W. Immune Suppression during Oncolytic Virotherapy for High-Grade Glioma; Yes or No? // *J Cancer*. - 2015. - V. 6. - P. 203-217.; Hwang J.K., Hong J., Yun C.O. Oncolytic Viruses and Immune Checkpoint Inhibitors: Preclinical Developments to Clinical Trials. // *Int J Mol Sci*. - 2020. - V. 21. - P.; Mundy G.R. Mechanisms of bone metastasis. // *Cancer*. - 1997. - V. 80. - P. 1546-1556.; Duan Q., Zhang H., Zheng J., Zhang L. Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. // *Trends Cancer*. - 2020. - V. 6. - P. 605-618.; Wang X., Zhong L., Zhao Y. Oncolytic adenovirus: A tool for reversing the tumor microenvironment and promoting cancer treatment (Review). // *Oncol Rep*. - 2021. - V. 45. - P.; Zhang Y., Li Y., Chen K., Qian L., Wang P. Oncolytic virotherapy against the tumor microenvironment and its potential in pancreatic cancer. // *J Cancer Res Ther*. - 2022. - V. 18. - P. 1247-1255.; Ma R., Li Z., Chiocca E.A., Caligiuri M.A., Yu J. The emerging field of oncolytic virus-based cancer immunotherapy. // *Trends Cancer*. - 2023. - V. 9. - P. 122-139.]. Однако использование полиовируса дикого типа ограничено из-за вирулентности в не опухолевых клетках, что требует разработки рекомбинантных онколитических полиовирусов с повышенной безопасностью и специфичностью.

Таким образом, проблема использования полиовируса для терапии рака остается актуальной проблемой.

Раскрытие сущности изобретения

Техническим результатом изобретения является создание оптимизированного рекомбинантного штамма полиовируса, сконструированного на основе штамма живой полиовирусной вакцины 3 типа.

Для реализации настоящего изобретения представлен метод создания оптимизированного рекомбинантного штамма полиовируса.

В различных вариантах реализации настоящего изобретения представлены методы для селективного уничтожения опухолевых клеток первичного очага и его метастазов путем введения оптимизированного онколитического штамма полиовируса. Также описан метод его создания.

Краткое описание фигур и таблиц

Фигура 1. Эффективность цитопатического действия адаптированного штамма полиовирусной вакцины 3 типа.

Фигура 2. Эффективность цитопатического действия рекомбинантного оптимизированного штамма полиовирусной вакцины 3 типа.

5 Фигура 3. Онколитическая активность рекомбинантного оптимизированного штамма полиовирусной вакцины 3 типа на модели подкожных ксенографтов опухолей молочной железы в иммунодефицитных мышцах линии balb/c<sup>nu/nu</sup>.

10 Фигура 4. Онколитическая активность рекомбинантного оптимизированного штамма полиовирусной вакцины 3 типа на гуманизированной ортотопической модели глиобластомы крысы С6 в крысах линии Wistar

Осуществление изобретения

Изобретение направлено на решение проблем, связанных с использованием полиовируса в терапии рака, путем применения обратной генетической инженерии. Модификация генома полиовирусной вакцины приводит к созданию вариантов, сохраняющих способность целенаправленно заражать клетки и уничтожать опухоли, снижая при этом риск вирулентности в здоровых тканях. Эти рекомбинантные вирусы представляют собой новый подход к более безопасному и эффективному лечению солидных опухолей, что улучшает результаты терапии пациентов.

20 Оптимизация кодонов - это сложный метод молекулярной биологии, который стал мощным инструментом в изучении биологии энтеровирусов. Несмотря на их малый размер и простую геномную структуру, энтеровирусы проявляют замечательную степень генетической пластичности. В процессе репликации в опухолевых клетках эти вирусы могут претерпевать генетическую адаптацию, которая усиливает их способность реплицироваться и размножаться на специфическом субстрате. В частности, оптимизация кодонов включает модификацию нуклеотидной последовательности вирусного генома для повышения эффективности трансляции и адаптации к пулу тРНК клетки зараженной клетки. Этот процесс может привести к более эффективному синтезу белка, включая вирусные белки, критически важные для репликации и обхода защитных механизмов хозяина. Селективное давление, отдающее предпочтение определенному репертуару использования кодонов, приводит к более эффективному использованию биосинтетического потенциала клетки, облегчая репликацию вируса и его устойчивость внутри опухоли.

35 Более того, оптимизация кодонов может влиять на иммуногенность вируса. Отдавая предпочтение определенным кодоном, вирус может модулировать экспрессию вирусных антигенов и в некоторой степени уклоняться от иммунного надзора. Такая стратегия иммунного вторжения может потенциально увеличить продолжительность вирусной инфекции внутри опухоли, обеспечивая устойчивую онколитическую активность.

40 Таким образом, оптимизация кодонов, происходящая в процессе пассажа энтеровирусов в опухолевых клетках, представляет собой интересное направление исследований, изучающее динамическое взаимодействие между вирусной генетикой и микроокружением опухоли. Этот процесс может привести к разработке более эффективных онколитических штаммов, использующих врожденную генетическую адаптируемость энтеровирусов для селективной целенаправленной атаки и борьбы с твердыми опухолями.

45 Пассирование вирусов в смешанных культурах опухолевых клеток и последующий анализ их адаптации является полезной техникой для оптимизации вирусов. Этот подход включает несколько ключевых шагов и соображений. Во-первых, смешанная культура опухолевых клеток имитирует гетерогенность опухолей *in vivo*. Выбор подходящих

клеточных линий имеет решающее значение для точного моделирования сложности рассматриваемой опухоли. Во-вторых, повторяющийся последовательный пассаж приводит к значительному улучшению онколитических свойств, а обратная генетика позволяет рационально использовать анализ данных.

5 Адаптированные вирусы могут проявлять увеличенный онколитический потенциал или специфичность к определенным субпопуляциям опухолей, прокладывая путь к разработке более эффективных и персонализированных методов лечения рака.

Вакцинный штамм полиовируса 3 типа пассировался в течение шести месяцев в смешанной культуре клеток глиомы, состоящей из равной смеси 16 первичных клеточных культур, полученных от пациентов с рецидивирующей глиобластомой во время повторного хирургического лечения. Эта техника используется для имитации гетерогенной природы глиом. На протяжении всего эксперимента оценивалась кинетика репликации вируса, титры вируса и цитотоксические эффекты на культивируемых клетках глиомы. Постепенная адаптация к конкретным условиям репликации привела к появлению важных 5 нуклеотидных замен в начале сегмента генома, кодирующего вирусный полипептид. Для всесторонней оценки мутаций проводилось высокопроизводительное РНК-секвенирование вирусного генома.

Для снижения потенциальной патогенности, связанной с оптимизацией полипептида типа 3 полиовируса, был получен штамм, содержащий рекомбинантный 5'-нетранслируемый геномный сегмент, заимствованный у вируса, демонстрирующего абсолютную непатогенность - штамма, родственного вирусу Коксаки В5. Результат этих генетических манипуляций был исследован на безопасность как у здоровых животных, так и у животных с чувствительными к вирусу опухолями. В результате признаков повышенной патогенности не наблюдалось; напротив, токсические эффекты при введении в мозг новорожденных мышей Balb/c продемонстрировали ожидаемую сниженную токсичность.

Полученный штамм может быть использован для лечения человеческих опухолей, включая как детские, так и взрослые опухоли. Опухоль может располагаться в любом органе, например, в мозге, простате, молочной железе, легких, толстой кишке и прямой кишке. Можно лечить различные типы опухолей, включая, например, глиобластому, медуллобластому, карциному, аденокарциному и т.д. Другие примеры опухолей включают аденокарциному, анальный рак, рак аппендикса, астроцитому I степени (анапластическую), астроцитому II степени, астроцитому III степени, астроцитому IV степени, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль центральной нервной системы, базальноклеточную карциному, рак мочевого пузыря, саркому молочной железы, бронхиальный рак, бронхиолоальвеолярную карциному, рак шейки матки, краниофарингиому, рак эндометрия, рак эндометрия матки, эпендимобластому, эпендимому, рак пищевода, эстезионейробластому, саркому Юинга, внечерепную зародышевую опухоль, внегонадальную зародышевую опухоль, рак внепеченочного желчного протока, фиброзный гистиоцитому, рак желчного пузыря, желудочный рак, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, гастроинтестинальную стромальную опухоль, гестационную трофобластическую опухоль, глиому, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, холангиокарциному, гипофарингеальный рак, меланому глаза, опухоль островковых клеток, саркому Калоши, гистиоцитоз клеток Лангерганса, недифференцированный крупноклеточный рак легкого, рак гортани, рак губ, аденокарциному легкого, злокачественную фиброзную гистиоцитому, медуллоэпителиому, меланому, карциному Меркель, мезотелиому, нейроэндокринную неоплазию, рак полости носа, рак носоглотки, нейробластому, рак полости рта, рак

орофарингеальный, остеосаркому, светлоклеточную карциному яичника, эпителиальный рак яичника, зародышевую опухоль яичника, рак поджелудочной железы, папилломатоз, рак околоносовых пазух, рак паращитовидной железы, рак пениса, фарингеальный рак, опухоль паренхимы шишковидной железы, пинеобластому, опухоль гипофиза, 5  
плевропульмональную бластому, рак почки, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, мягкотканную саркому, плоскоклеточный рак, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак шеи, супратенториальную первичную нейроэктодермальную опухоль, супратенториальную первичную нейроэктодермальную опухоль, рак яичка, 10  
рак горла, тимическую карциному, тимому, рак щитовидной железы, рак почечной лоханки, рак уретры, утеринную саркому, рак влагалища, рак вульвы и опухоль Вильмса.

Далее изобретение будет проиллюстрировано примерами, которые предназначены для обеспечения лучшего понимания сущности заявленного изобретения, но не должны рассматриваться как ограничивающие данное изобретение.

15 Пример 1. В качестве первого этапа модификации, штамм полиовирусной вакцины 3 типа (Сэбин) культивируют на смеси опухолевых клеток глиобластомы. Инициализацию репликации осуществляют в культуре клеток НЕК293Т, выращенных в среде DMEM (ПанЭко) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone) и антибиотиков (100 МЕ/мл пенициллина, 100 МЕ/мл стрептомицина) при температуре 20  
37°C и 5% содержании CO<sub>2</sub> до получения субконфлюэнтного монослоя. Через 24 часа после заражения клетки промывают и инкубируют в течение дополнительных 48 часов, после чего процедуру изоляции вируса из культуральной среды проводят 32 раза. При каждом пассаже осуществляют определение титра вируса и анализ его цитопатических свойств на смешанной культуре и культуре эмбриональных астроцитов. Серия 25  
экспериментов считалась завершенной, когда адаптированная полиовирусная вакцина обрела способность лизировать 98% опухолевых клеток, при этом литическая активность по отношению к нормальным астроцитам не увеличилась, а значительно снизилась (Фигура 1).

30 Пример 2. Полная последовательность генома адаптированной полиовирусной вакцины определяют методом высокопроизводительного секвенирования. Общая длина определенного генома составила 7428 нуклеотидов без учета поли А-хвоста. 5'-Нетранслируемый участок (5' NTR) идентифицированного штамма содержит 742 нуклеотида и предшествует кодирующей области. Кодирующая часть генома начинается со стартового кодона (AUG) на позиции 743, кодирует 2206 аминокислот и завершается 35  
стоп-кодоном (UAG).

Пример 3. В контексте повышения безопасности полиовирусной вакцины, снижение ее нейровирулентности было признано необходимым для создания терапевтического штамма. Для этой цели осуществляют модификацию внутреннего участка связывания рибосомы (IRES). Конструирование химерного штамма полиовируса включает 40  
следующие этапы: амплификация фрагмента с IRES живой энтеровирусной вакцины 14 (петли 2,3,4,5) с использованием праймеров SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 (Перечень последовательностей), амплификация ДНК-фрагмента, кодирующего полиовирусный геном, плазмидного остова с устойчивостью к хлорамфениколу и T7-промотором с использованием праймеров SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 (Перечень 45  
последовательностей). С последующим созданием кольцевой рекомбинантной плазмиды методом безлигазного клонирования с использованием T4-ДНК полимеразы, для индукции вируса. Линеаризованную рекомбинантную плазмиду используют в качестве матрицы для транскрипции *in vitro*, а полученная РНК служит для трансфекции клеток

НЕК293Т методом липофекции (Lipofectamine 3000, Thermo-Fisher Scientific, США). После проявления цитопатического эффекта вирус извлекают и размножают на клетках рабдомиосаркомы RD, выращенных в среде ДМЕМ с добавлением 1% фетальной бычьей сыворотки. Выделение и ревертирование геномной РНК проводят  
5 соответственно с использованием набора GeneJET Viral DNA/RNA Purification Kit (Thermo-Fisher Scientific, США) и обратной транскриптазы Mint (Евроген, Россия). В итоге получают рекомбинантный штамм полиовируса с усиленными онколитическими свойствами (Фигура 2), который после оценки литической активности и эффективности вирусной репликации на различных опухолевых клеточных линиях продемонстрировал  
10 потенциал для использования в качестве противоопухолевого средства.

Пример 4. Исследование острой токсичности показало, что однократное внутривенное введение мышам-самцам и самкам рекомбинантного штамма вируса в дозах  $5,0 \times 10^{11}$ ,  $2,5 \times 10^{11}$  и  $5,0 \times 10^{10}$  вирусных частиц на килограмм массы тела хорошо переносилось. Летального исхода, связанного с токсичностью вируса, не  
15 наблюдалось, признаки интоксикации отсутствовали. Патологоанатомическое исследование (аутопсия с макроскопической оценкой состояния внутренних органов и тканей) проводят на 15-е сутки после введения, макроскопические патологические изменения внутренних органов и тканей не выявлены, изменения массы внутренних органов не обнаружены.

Пример 5. Оценка онколитической активности химерного штамма рекомбинантного полиовируса проводят на модели ксенографта человеческой опухоли молочной железы ВТ-474. Опухолевые клетки ВТ-474 вводят подкожно иммунодефицитным мышам Balb/c Nude. Животные с развитыми ксенографтами были разделены на две группы, одна из  
20 которых получала химерный вирус, а другая - контрольный физиологический раствор. Оценка эффективности терапии включала измерение линейных размеров опухоли и вычисление объема по соответствующей формуле. Результаты демонстрировали значительное торможение роста опухоли и увеличение средней продолжительности жизни животных в опытной группе по сравнению с контролем (Фигура 3).

Пример 6. Для оценки онколитической активности химерного штамма полиовируса  
30 используют модель злокачественной глиомы. Крысам-самкам стереотаксически в область стриатума вводили клетки линии С6, экспрессирующие полиовирусный рецептор. Оценку объема опухоли проводят с помощью МРТ. Животных разделяют на три группы для введения рекомбинантного оптимизированного полиовируса, физиологического раствора и контрольного штамма полиовирусной вакцины. Используют внутривенное  
35 введение  $10^9$  и.е. Результаты валуомерии (Фигура 4) подтвердили высокую онколитическую активность химерного штамма, что указывает на перспективность его использования в качестве терапевтического агента.

Рекомбинантный оптимизированный штамм полиовируса может быть использован в качестве способа лечения солидных опухолей человека, включая злокачественные  
40 опухоли головного мозга, предстательной железы, молочной железы, легких, толстого кишечника, почек, надпочечников, щитовидной железы, а также для различных типов опухолей, включая глиобластому. Другие примеры опухолей включают аденокарциному, анальный рак, рак аппендикса, астроцитому I степени (анпластическую), астроцитому II степени, астроцитому III степени, астроцитому IV  
45 степени, атипичную тератоидную/рабдоидную опухоль центральной нервной системы, базальноклеточную карциному, рак мочевого пузыря, саркому молочной железы, бронхиальный рак, бронхиолоальвеолярную карциному, рак шейки матки, краниофарингиому, рак эндометрия, рак эндометрия матки, эпендимобластому,

эпендимому, рак пищевода, эстезионеробластому, саркому Юинга, внечерепную зародышевую опухоль, внегонадальную зародышевую опухоль, рак внепеченочного желчного протока, фиброзный гистиоцитому, рак желчного пузыря, желудочный рак, карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта, гастроинтестинальную стромальную опухоль, гестационную трофобластическую опухоль, глиому, рак головы и шеи, гепатоцеллюлярный рак, холангиокарциному, гипофарингеальный рак, меланому глаза, опухоль островковых клеток, саркому Калоши, гистиоцитоз клеток Лангерганса, недифференцированный крупноклеточный рак легкого, рак гортани, рак губ, аденокарциному легкого, злокачественную фиброзную гистиоцитому, медуллоэпителиому, меланому, карциному Меркель, мезотелиому, нейроэндокринную неоплазию, рак полости носа, рак носоглотки, неробластому, рак полости рта, рак орофарингеальный, остеосаркому, светлоклеточную карциному яичника, эпителиальный рак яичника, зародышевую опухоль яичника, рак поджелудочной железы, папилломатоз, рак околоносовых пазух, рак паращитовидной железы, рак пениса, фарингеальный рак, опухоль паренхимы шишковидной железы, пинеобластому, опухоль гипофиза, плевропульмональную бластому, рак почки, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнных желез, мелкоклеточный рак легкого, рак тонкой кишки, мягкотканную саркому, плоскоклеточный рак, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный рак шеи, супратенториальную первичную нейроэктодермальную опухоль, супратенториальную первичную нейроэктодермальную опухоль, рак яичка, рак горла, тимическую карциному, тимому, рак щитовидной железы, рак почечной лоханки, рак уретры, утеринную саркому, рак влагалища, рак вульвы и опухоль Вильмса. Введение может осуществляться внутриопухолево, интракраниально, внутриартериально, перорально, интранозально, интратекально, внутривенно, интранодально, паратуморально или паравертебрально, подкожно и внутрикожно, внутримышечно в дозе  $10^7$ - $10^{11}$  инфекционных единиц в зависимости от метода введения. Введение вируса может осуществляться с использованием клеток-носителей, инфицированных *ex vivo* в множественности инфекции 0,5-100, и введенных системно. Рекомбинантный оптимизированный вирус может использоваться для лечения солидных опухолей как у взрослых, так и у детей. Эффективная терапия данным вирусом может быть проведена в комбинации с химиотерапией и лучевой терапией (проведенными последовательно или одновременно). Хирургическое удаление опухоли до или после введения оптимизированного рекомбинантного полиовируса также может приводить к повышению эффективности лечения солидной опухоли.

```

35 <?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
    <!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing
    1.3//EN" "ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
    <ST26SequenceListing dtdVersion="V1_3" fileName="Оптимизированный
40 штамм полиовируса 3 типа для терапии солидных опухолей.xml"
    softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.2.0"
    productionDate="2023-12-28">
      <ApplicationIdentification>
        <IPOfficeCode>RU</IPOfficeCode>
        <ApplicationNumberText></ApplicationNumberText>
45 <FilingDate>2023-12-27</FilingDate>
      </ApplicationIdentification>
      <ApplicantFileReference>-</ApplicantFileReference>
      <ApplicantName languageCode="ru">Федеральное государственное

```

бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский  
 центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской  
 Федерации</ApplicantName>

5 <ApplicantNameLatin>National Medical Research Radiological Centre of  
 the Ministry of Health of the Russian Federation</ApplicantNameLatin>

<InventionTitle languageCode="ru">Оптимизированный штамм полиовируса  
 3 типа для терапии солидных опухолей</InventionTitle>

<SequenceTotalQuantity>4</SequenceTotalQuantity>

<SequenceData sequenceIDNumber="1">

10 <INSDSeq>

<INSDSeq\_length>24</INSDSeq\_length>

<INSDSeq\_moltype>DNA</INSDSeq\_moltype>

<INSDSeq\_division>PAT</INSDSeq\_division>

<INSDSeq\_feature-table>

15 <INSDFeature>

<INSDFeature\_key>source</INSDFeature\_key>

<INSDFeature\_location>1..24</INSDFeature\_location>

<INSDFeature\_qual>

<INSDQualifier>

20 <INSDQualifier\_name>mol\_type</INSDQualifier\_name>

<INSDQualifier\_value>other DNA</INSDQualifier\_value>

</INSDQualifier>

<INSDQualifier id="q2">

<INSDQualifier\_name>organism</INSDQualifier\_name>

25 <INSDQualifier\_value>synthetic construct</INSDQualifier\_value>

</INSDQualifier>

</INSDFeature\_qual>

</INSDFeature>

<INSDFeature>

30 <INSDFeature\_key>misc\_difference</INSDFeature\_key>

<INSDFeature\_location>1..24</INSDFeature\_location>

<INSDFeature\_qual>

<INSDQualifier id="q3">

<INSDQualifier\_name>standard\_name</INSDQualifier\_name>

35 <INSDQualifier\_value>LEV14 IRES2 forward

primer</INSDQualifier\_value>

</INSDQualifier>

</INSDFeature\_qual>

</INSDFeature>

40 </INSDSeq\_feature-table>

<INSDSeq\_sequence>agctatatggcaacaatctctcaa</INSDSeq\_sequence>

</INSDSeq>

</SequenceData>

<SequenceData sequenceIDNumber="2">

45 <INSDSeq>

<INSDSeq\_length>23</INSDSeq\_length>

<INSDSeq\_moltype>DNA</INSDSeq\_moltype>

<INSDSeq\_division>PAT</INSDSeq\_division>

```

<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
5    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
10    <INSDQualifier id="q5">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
15 </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..23</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
20    <INSDQualifier id="q6">
      <INSDQualifier_name>standard_name</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>LEV14 IRES5 reverse
primer</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
25    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>cagtataagaataaaaaggaaaca</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
30 </SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>61</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
35    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..61</INSDFeature_location>
40    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
45    <INSDQualifier id="q8">
      <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
      <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>

```

```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
5    <INSDFeature_location>1..61</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier id="q9">
        <INSDQualifier_name>standard_name</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>polio3 forward
10 primer</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
15 <INSDSeq_sequence>ttagcgagcgctgtgtgtctagaactagtggatcttaaacagctctg
gggttggtccca</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
20 <INSDSeq>
  <INSDSeq_length>60</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>DNA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
25 <INSDFeature>
  <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..60</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier>
30 <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>other DNA</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q11">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
35 <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
<INSDFeature>
40 <INSDFeature_key>misc_difference</INSDFeature_key>
  <INSDFeature_location>1..60</INSDFeature_location>
  <INSDFeature_qual>
    <INSDQualifier id="q12">
      <INSDQualifier_name>standard_name</INSDQualifier_name>
45 <INSDQualifier_value>polio3 reverse
primer</INSDQualifier_value>
    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>

```

```

    </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>tttagaggccccaagggttatgctagtcctccgaattaaagaaaaatt
5   taccctacaa</INSDSeq_sequence>
    </INSDSeq>
    </SequenceData>
</ST26SequenceListing>

```

## (57) Формула изобретения

10 1. Способ оптимизации вируса полиовирусной вакцины 3 типа Сэбин для селективного уничтожения опухолевых клеток, включающий:

- культивирование штамма полиовирусной вакцины 3 типа Сэбин на смеси опухолевых клеток глиобластомы, при этом инициализацию репликации осуществляют в культуре клеток НЕК293Т, через 24 часа после заражения клетки промывают и инкубируют в  
15 течение 48 часов, после чего изолируют вирус из культуры;

- пассирование вируса в течение шести месяцев в смешанной культуре клеток глиобластомы с определением титра вируса и анализом его цитопатических свойств;

- модификацию внутреннего участка связывания рибосомы (IRES), путем  
20 амплификации IRES с использованием праймеров SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, амплификации ДНК-фрагмента, кодирующего геном, плазмидного остова с геномом оптимизированного вируса с использованием праймеров SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, с последующим созданием кольцевой плазмиды, которой индуцируют вирус.

2. Способ по п.1, где селективное уничтожение опухолевых клеток осуществляется в отношении клеток опухоли молочной железы, злокачественной глиомы.

25

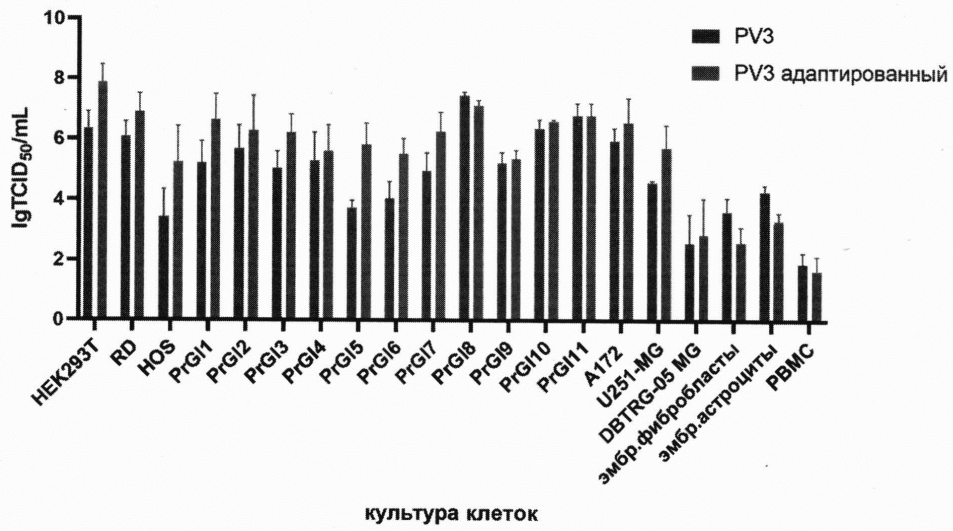
30

35

40

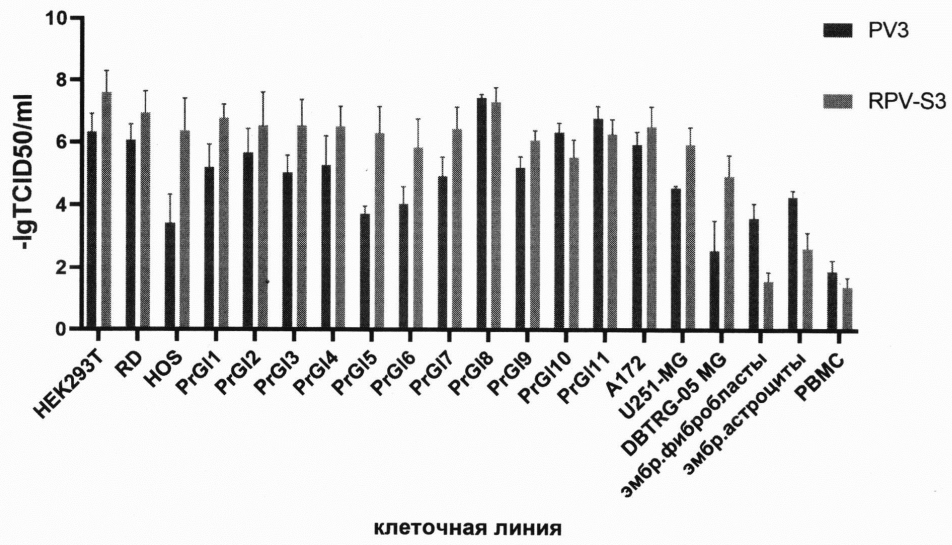
45

1

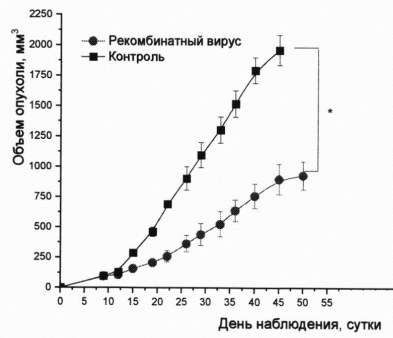
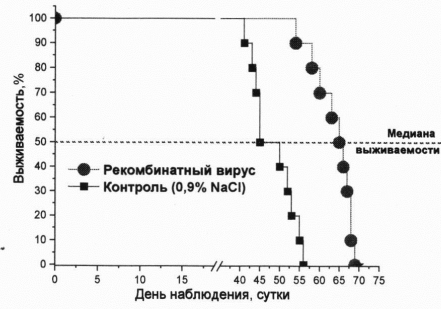


Фигура 1

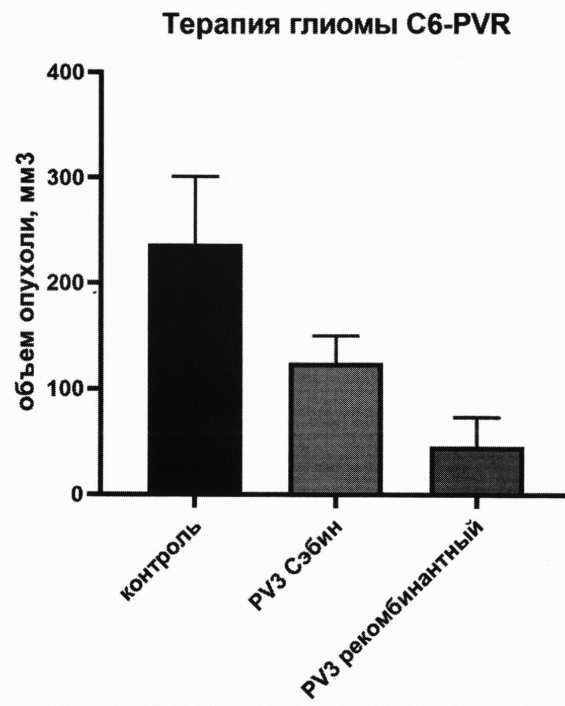
2



Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4