



(51) МПК
C12N 15/861 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 15/861 (2020.08); C07K 16/2815 (2020.08); A61K 39/395 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2018124802, 06.01.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
06.01.2017

Дата регистрации:
21.05.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
08.01.2016 US 62/276,371

(43) Дата публикации заявки: 11.02.2020 Бюл. № 5

(45) Опубликовано: 21.05.2021 Бюл. № 15

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 08.08.2018

(86) Заявка РСТ:
JP 2017/000318 (06.01.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/119499 (13.07.2017)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

**КУМОН Хироми (JP),
ЛОУЭНТАЛ Ричард (US)**

(73) Патентообладатель(и):

МОМОТАРО-ДЖИН ИНК. (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: EP 2508603, 10.10.2012. SHIMAZU
Y. And et al. Integrin antagonist augments the
therapeutic effect of adenovirus-mediated REIC/
Dkk-3 gene therapy formalignant glioma, Gene
Therapy, 2015, n.22, pp.146-154. KUMON H. And
et al. Ad-REIC Gene Therapy: Promising Results
in a Patient with Metastatic CRPC Following
Chemotherapy, 2015, CliniCal MediCine (см.
прод.)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНА REIC/DKK-3 И ИНГИБИТОРА
КОНТРОЛЬНОЙ ТОЧКИ ИММУННОГО ОТВЕТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии,
в частности комбинированному
фармацевтическому набору для лечения рака,
включающему REIC/Dkk-3 и анти-PD1 антитело.

Изобретение позволяет эффективно лечить рак
предстательной железы. 2 з.п. ф-лы, 5 ил., 4 табл.,
1 пр.

(56) (продолжение):

insights: OnCOIOgy, n.9, pp.31-38. RU 2005140664 A, 27.08.2007.

RU 2 748 231 1 C2

RU 2 748 231 1 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C12N 15/861 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C12N 15/861 (2020.08); C07K 16/2815 (2020.08); A61K 39/395 (2020.08)

(21)(22) Application: **2018124802, 06.01.2017**

(24) Effective date for property rights:
06.01.2017

Registration date:
21.05.2021

Priority:

(30) Convention priority:
08.01.2016 US 62/276,371

(43) Application published: **11.02.2020 Bull. № 5**

(45) Date of publication: **21.05.2021 Bull. № 15**

(85) Commencement of national phase: **08.08.2018**

(86) PCT application:
JP 2017/000318 (06.01.2017)

(87) PCT publication:
WO 2017/119499 (13.07.2017)

Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KUMON Hiromi (JP),
LOWENTHAL Richard (US)**

(73) Proprietor(s):

MOMOTARO-GENE INC. (JP)

(54) **COMBINATION THERAPY USING RAS/DK-3 GENE AND IMMUNE RESPONSE REFERENCE POINT INHIBITOR**

(57) Abstract:

EFFECT: biochemistry, medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biochemistry, in particular a combination pharmaceutical kit for cancer treatment, including

REIC/Dkk-3 and anti-PD1 antibody.

EFFECT: invention makes it possible to effectively treat prostate cancer.

3 cl, 5 dwg, 4 tbl, 1 ex

C 2
1
2
3
4
5
6
7
8
9
R U

R U
2
7
4
8
2
3
1
C 2

Область техники, к которой относится изобретение

[0001] Настоящее изобретение относится к комбинированной терапии лечения рака с использованием гена REIC/Dkk-3 и ингибитора контрольной точки иммунного ответа.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

5 [0002] Ген REIC/Dkk-3 известен как ген, связанный с иммортализацией клеток. Ранее сообщалось, что экспрессия этого гена подавлена в раковых клетках. Также сообщалось, что ген REIC/Dkk-3 использовали для лечения рака (патентный документ 1).

[0003] Известно, что ингибитор контрольной точки иммунного ответа (далее по тексту-«контрольной точки»), такой как антитело анти-PD-1 (Programmed cell death 1),
10 антитело анти-PD-L1 (Programmed cell-death ligand 1) и сходные с ними, могут быть использованы в терапии различных злокачественных опухолей.

[Список цитирования]

[Патентная литература]

[0004] [PTL 1] Международная патентная публикация WO01/038528

15 Сущность изобретения

Техническая задача

[0005] Целью настоящего изобретения является разработка способа лечения рака с использованием ингибитора контрольной точки в сочетании с геном REIC/Dkk-3.

Решение задачи

20 [0006] Авторы настоящего изобретения изучили эффект комбинированного применения REIC/Dkk-3 и ингибитора контрольной точки при лечении рака.

[0007] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что использование REIC/Dkk-3 в комбинации с ингибитором контрольной точки усиливает системный ответ Т-клеток и противоопухолевые процессы. Это указывает на то, что комбинированное
25 использование REIC/Dkk-3 и ингибитора контрольной точки представляет собой практический способ лечения рака.

[0008] Более конкретно, настоящее изобретение состоит в следующем.

[0009] 1. Комбинированный фармацевтический набор для лечения рака, включающий REIC/Dkk-3 в комбинации с ингибитором контрольной точки.

30 2. Комбинированный фармацевтический набор по п.1, в котором ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело.

3. Комбинированный фармацевтический набор по п.1, в который включен вектор аденовируса, содержащий ген REIC/Dkk-3.

4. Комбинированный фармацевтический набор по п.1, где рак представляет собой
35 рак предстательной железы.

5. Способ лечения рака путем введения гена REIC/Dkk-3 и ингибитора контрольной точки больному раком.

6. Способ лечения рака по п.5, где ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело.

40 7. Способ лечения рака по п.5 с введением вектора аденовируса, содержащего ген REIC/Dkk-3.

8. Способ лечения рака по п.5, где рак представляет собой рак предстательной железы.

9. Способ объединения REIC/Dkk-3 с ингибитором контрольной точки для лечения
45 рака.

10. Способ по п.9, в котором ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело.

11. Способ по п.9, в котором ингибитор контрольной точки представляет собой

анти-PD-1 антитело.

12. Способ по п.9, в котором ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-L1 антитело.

13. Применение анти-PD-1 и анти-PD-L1 антител для настройки действия иммунной системы таким образом, что рак экспрессирует PD-1 и PD-L1 на клеточной поверхности, что делает его восприимчивым к гену REIC/Dkk-3 (т.е. к REIC/Dkk-3 индуцированному противоопухолевому иммунитету, цитотоксичным Т-лимфоцитам (CTL), индуцированным REIC/Dkk-3).

14. Способ объединения REIC/Dkk-3 с ингибитором контрольной точки при изготовлении лекарственного средства для лечения рака.

15. Способ по п.14, в котором ингибитор контрольной точки представляет собой анти-PD-1 антитело или анти-PD-L1 антитело.

Значимый результат изобретения

[0010] При лечении рака ген REIC/Dkk-3 и ингибитор контрольной точки обнаруживают синергический эффект.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0011] [Фиг.1] На Фиг.1 приведен пример последовательности Ad-REIC/Dkk-3.

[Фиг.2] На Фиг.2 приведена последовательность Ad-REIC/Dkk-3.

[Фиг. 3] На Фиг.3 показан план эксперимента по выживаемости групп (см. Пример).

[Фиг.4] На Фиг.4 показана опухолевый рост после внутриопухолевой обработки MTG-201 отдельно и в сочетании с антителами к CTLA4 и PD-1.

[Фиг.5] На Фиг.5 показана общая выживаемость после внутриопухолевой обработки MTG-201 отдельно и в сочетании с антителами к CTLA4 и PD-1.

[0012] Настоящая заявка включает в себя содержание, представленное в описании и чертежах предварительной заявки США №62/277371, на основании которой испрашивается приоритет настоящей заявки.

Подробное описание настоящего изобретения

[0013] Комбинированная терапия по настоящему изобретению основана на использовании ингибитора контрольной точки в сочетании с геном REIC/Dkk-3.

[0014] Ингибитор контрольной точки включает анти-PD-1 антитело (programmed cell Death 1, анти-PD-L1 (Programmed cell Death Ligand 1) и сходные с ними.

[0015] Нуклеотидная последовательность ДНК гена REIC/Dkk-3 представлена SEQ ID NO:1 списка последовательностей. Кроме того, аминокислотная последовательность REIC, кодируемая ДНК REIC/Dkk-3, представлена SEQ ID NO:2 списка последовательностей. ДНК, имеющая по меньшей мере 85%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, или, еще более предпочтительно, по меньшей мере 95% или, особенно предпочтительно, по меньшей мере 97% идентичности с нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, и рассчитанной с использованием программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) при Национальном центре биологической информации (NCBI) или сходной с ней (с использованием, например, параметров по умолчанию (т.е. исходных) включена в ДНК REIC/Dkk-3.

[0016] Также может быть использован фрагментарный нуклеотид REIC/Dkk-3. Примеры такого нуклеотида, включающего нуклеотидную последовательность от 1-го нуклеотида до любого нуклеотида от 117-го до 234-го в нуклеотидной последовательности ДНК REIC/Dkk-3, показанной в SEQ ID NO: 1, включают полинуклеотид (SEQ ID NO: 3) длиной от 1-го до 117-го нуклеотида и полинуклеотид (SEQ ID NO: 4) длиной от 1-го до 234-го нуклеотида.

[0017] Ген REIC/Dkk-3 может быть введен пациенту в соответствии с традиционной

методикой. Примеры способов введения гена пациенту включают способы введения вирусных и невирусных векторов.

[0018] Ген REIC/Dkk-3 может быть введен в клетку или ткань без использования вышеуказанных вирусов, а с помощью рекомбинантного экспрессирующего вектора, в который включен вектор экспрессии гена, такой как плазмидный вектор.

[0019] Типичные примеры вирусных векторов, используемых для введения генов, включают вектор на основе аденовируса, адено-ассоциированный вирусный вектор и ретровирусный вектор. Желаемый ген может быть введен в клетку путем его встраивания в ДНК- или РНК-содержащий вирус, такой как например детоксифицированные производные ретровируса, вируса герпеса, вируса вакцинии, вируса коровьей оспы, поксвируса, полиовируса, вируса Синдбиса, вируса Сендай, SV40 или вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) с последующим инфицированием клеток таким рекомбинантным вирусом. Предпочтительно используется вектор аденовируса.

[0020] Вектор содержит конструкцию, включающую ген REIC/Dkk-3. Конструкция, включающая ДНК REIC/Dkk-3, может соответственно включать промотор или энхансер для транскрипции гена, поли(А)-хвост и маркерный ген для маркировки и/или выбора клетки, в которую вводится ген, и тому подобное. В таком случае может быть использован известный промотор.

[0021] Конструкция имеет структуру, в которой ДНК-конструкция, содержащая ген REIC/Dkk-3 и добавленную поли-А последовательность (далее по тексту поли(А)-хвост), расположены ниже 1-го промотора по ходу транскрипции, а энхансер или 2-й промотор залигирован уже после конструкции ДНК.

[0022] Промотор представляет собой специфическую нуклеотидную последовательность ДНК для инициации транскрипции на ДНК-матрице и, как правило, имеет определенную общую структуру. Например, прокариоты, такие как *Escherichia coli*, как правило, имеют последовательность TATAATG на участке из 10 н.п., служащим сайтом инициации транскрипции, и последовательность TTGACA на участке из 35 н.п. Кроме того, эукариоты обычно имеют TATA-блок на участке с 20 н.п. Кассета экспрессии по настоящему изобретению может стандартно содержать 1-й промотор расположенный перед геном, подлежащим экспрессии, и 2-й промотор на участке, расположенном после гена, подлежащего экспрессии. Эти промоторы, используемые как 1-й промотор и 2-й промотор, ничем не ограничены (в рамках данной заявки), и могут быть одинаковыми или отличаться друг от друга. Также могут быть использованы неспецифичные промоторы, способные ускорять экспрессию чужеродных генов во всех клетках или тканях, ткане- или органо-специфичные промоторы, опухоль-специфичные промоторы и другие специфические или селективные промоторы, как, например, специфичные для стадий развития или дифференциации. Так например, возможно применение специфичного промотора в качестве 1-го промотора и неспецифичного промотора в качестве второго. Промоторы для использования в настоящем изобретении перечислены ниже. Примеры опухолеспецифического промотора (специфичных для злокачественных и незлокачественных опухолей) включают: hTERT (обратная транскриптаза теломеразы человека), PSA (простато-специфический антиген), с-тус и GLUT- промоторы. Примеры промоторов, специфичного для раковых стволовых клеток, ES-клеток, включают промоторы OCT3/4 и NANOG. Примером промотора, специфичного для нейронных стволовых клеток, является промотор Nestin. Примеры клеточного стресс-чувствительного промотора включают промоторы HSP70, HSP90 и p53. Примером промотора, специфического для гепатоцитов служит промотор альбумина. Примером радиочувствительного промотора служит промотор TNF-альфа.

Примером промотора для увеличения количества копий инфицирующей плазмиды является промотор SV40 и сходные с ним. Примером промотора, специфичного для клеток в состоянии пролиферации, является промотор EF1-альфа. Более конкретно, например, в качестве 1-го промотора используют промотор CMV-i (hCMV+ промотор интрона), промотор β -актина, CAG промотор, CMV промотор или сходные с ними, а в качестве второго промотора используется промотор CMV или сходный с ним. Виды животных, на основе которых получен промотор β -актина, не ограничены в рамках данной заявки. Используются промоторы β -актина млекопитающих, такие как промотор β -актина человека и промотор β -актина куриных. Кроме того, применяется искусственный гибридный промотор, такой как вышеупомянутый промотор CMV-i. Промотор CMV-i может быть синтезирован в соответствии с описанием патента США № 5168062 или с описанием патента США № 5385839. В качестве промотора как такового может быть использован фрагмент промотора (core-промотор), состоящий из минимальной последовательности, обладающей промоторной активностью. Термин «core-промотор» относится к области промотора, способной обеспечивать точную инициацию транскрипции, эта область может содержать ТАТА-бокс. Среди вышеуказанных промоторов, рак- и/или опухолеспецифичные промоторы, такие как промотор hTERT, могут быть предпочтительно использованы в генной терапии для лечения или диагностики рака с использованием экспрессии генов.

[0023] Примеры происхождения поли(A) последовательности (последовательность полиаденилирования, polyA. или поли(A)-хвост) включают, но не ограничиваются, поли(A)-хвостами гена гормона роста (например, поли(A)-хвост бычьего гормона роста, полученную из крупного рогатого скота (BGA polyA), поли(A)-хвост гормона роста человека, поли(A)-хвост вируса SV40 и поли(A)-хвост гена β -глобина человека или кролика. Эффективность транскрипции увеличивается за счет вставки такого поли(A)-хвоста в конструкцию ДНК. Нуклеотидная последовательность поли(A)-хвоста BGA (поли(A)-хвост бычьего гормона роста) показана в SEQ ID NO: 5, начиная с 13-го нуклеотида и включает последующие нуклеотиды.

[0024] Примеры энхансера не ограничены (рамками данной заявки) при условии, что результатом является увеличение количества информационной РНК (мРНК) в процессе транскрипции. Энхансер представляет собой нуклеотидную последовательность с эффектом ускорения действия промотора и, в большинстве случаев, обычно имеет длину около 100 н.п. Энхансер может ускорить транскрипцию независимо от собственной ориентации. В настоящем изобретении можно использовать один тип энхансера. Более специфично, могут использоваться два или более (несколько) одинаковых энхансеров или комбинация различных энхансеров. Кроме того, при использовании множества различных энхансеров, порядок их расположения не ограничен (рамками данной заявки). Так например, можно использовать энхансер CMV, энхансер SV40, энхансер hTERT (энхансер обратной транскриптазы теломеразы) и сходные с ними. Таким примером является продукт, полученный в результате соединения энхансера hTERT, энхансера SV40 и энхансера CMV именно в таком порядке.

[0025] Кроме того, несколько энхансеров (например, в количестве от 1 до 4) могут быть залигированы перед конструкцией ДНК, содержащей ДНК, кодирующую экспрессируемый белок и последовательность поли(A)-хвоста. Энхансеры, подлежащие лигированию выше по направлению транскрипции, не ограничены (рамками данной заявки), однако энхансер CMV является предпочтительным. Примером этого является 4x кратный CMV-энхансер, полученный путем соединения четырех энхансеров CMV.

[0026] Если энхансер встроен непосредственно после конструкции ДНК, состоящей

из «промотора, гена, подлежащего экспрессии, и поли(А)-хвоста», белок гена (с целью усиленной экспрессии) может быть экспрессирован сильнее, чем в случае использования обычной традиционной системы экспрессии генов.

[0027] В частности, при использовании комбинации CMV_i промотора и CMV_i энхансера почти во всех клетках (клетках-хозяевах) сильная экспрессия белка экспрессируемого гена становится возможной для любого встроеного гена, независимо от типа используемого здесь трансфекционного реагента.

[0028] Более того, RU5' может быть залигирован непосредственно перед ДНК, кодирующей белок, подлежащий экспрессии. Выражение «...непосредственно перед (выше по ходу транскрипции от...» означает, что соответствующая последовательность непосредственно встраивается/лигируется там, где нет никаких других элементов, обладающих определенными функциями. Однако, короткая последовательность может находиться между ними в качестве вставки. RU5' представляет собой LTR вируса HTLV и является элементом, усиливающим экспрессию белка при встраивании в конструкцию последнего. (Mol. Cell. Biol., Том 8 (1), стр. 466-472, 1988). Встраивание RU5' в ориентации, противоположном отмеченному ранее, может свести к нулю влияние промотора на усиление экспрессии из-за встраивания энхансера.

[0029] Более того, UAS можно лигировать непосредственно перед энхансером и/или промотором. UAS является белок-связывающим-участком (сайтом посадки) гена GAL4. Встраивание гена GAL4 ниже по направлению транскрипции от UAS может привести к увеличению экспрессии белка.

[0030] Более того, SV40-ori может быть залигирован в самой начальной части кассеты экспрессии. SV40-ori является белок-связывающим-участком (сайтом посадки) гена SV40. Встраивание гена SV40 после SV40-ori приводит к увеличению экспрессии белка.

[0031] Каждый из вышеуказанных элементов должен быть залигирован с сохранением функциональности. Здесь термин «залигированный с сохранением функциональности» означает, что каждый элемент лигируют так, что он способен проявлять свои функции, и таким образом, усиливать экспрессию гена, подлежащего экспрессии.

[0032] В частности, конструкцию ДНК получают при лигировании промотора CMV (цитомегаловируса) перед ДНК REIC/Dkk-3, а поли(А)-хвоста-после ДНК REIC/Dkk-3. Кроме того, энхансеры (3 X enh), полученные путем последовательного соединения энхансера hTERT (обратной транскриптазы теломеразы), энхансера SV40 и энхансера CMV (цитомегаловируса) в таком порядке, встраивают лигированием после поли(А)-хвоста. В частности, конструкцию ДНК получают путем лигирования, начиная с 5'-конца: (i) промотора CMV, (ii) ДНК REIC/Dkk-3, (iii) поли(А)-хвоста и (iv) энхансеров, полученных путем соединения энхансера hTER (обратной транскриптазы теломеразы), энхансера SV40 и энхансера CMV, именно в таком порядке.

[0033] Структура части ДНК-конструкции, содержащей ДНК REIC/Dkk-3 по настоящему изобретению, и не имеющая промотора CMV, показана на Фиг.2, а ее последовательность представлена SEQ ID NO: 6. На Фиг. 2, последовательность поли(А)-хвоста бычьего гормона роста (BGA polyA) содержится между ДНК REIC/Dkk-3 и тремя энхансерами. Конструкция ДНК, содержащая ДНК REIC/Dkk-3 по настоящему изобретению, имеет промотор CMV (в районе 5'-конца) перед последовательностью, представленной SEQ ID NO: 4. SEQ ID NO: 7 представляет нуклеотидную последовательность участка, включающего поли(А)-хвост бычьего гормона роста и три энхансера (содержащихся в вышеприведенной конструкции). На Фиг.2 части (1) и (2), заключенные в рамки в нуклеотидной последовательности, указывают ДНК, кодирующую белок REIC/Dkk-3 и три энхансера, соответственно.

[0034] Вышеупомянутые элементы должны быть функционально связаны (лигированы) друг с другом. Используемое здесь выражение, «функционально связанные (лигированные) друг с другом», означает, что элементы связаны или лигированы друг с другом так, что каждый элемент способен проявлять свои функции для усиления экспрессии гена, подлежащего экспрессии.

[0035] Вышеприведенную экспрессирующую кассету можно получить, вставив ДНК REIC/Dkk-3 в вектор pShuttle (Clonetech), содержащий сайт введения чужеродного гена, расположенный после коммерческого промотора CMV, и последовательность поли(A)-хвоста бычьего гормона роста (BGA polyA) после сайта введения гена, с последующим введением (лигированием) энхансеров hTERT (обратная транскриптаза теломеразы), SV40 и CMV именно в таком порядке в сайт, расположенный после последовательности поли(A)-хвоста бычьего гормона роста (BGA polyA).

[0036] Конструкция ДНК, содержащая ДНК REIC/Dkk-3, представляет собой:

[1] ДНК-конструкция для экспрессии ДНК REIC/Dkk-3, получаемая путем лигирования, начиная с 5'-конца, следующих элементов:

(i) промотор CMV;

(ii) ДНК REIC/Dkk-3 как указано ниже:

(a) ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 1,

(b) ДНК последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 95%, 97% или 98% идентичности с нуклеотидной последовательностью, представленной SEQ ID NO: 1,

(iii) поли(A)-хвост; а также

(iv) энхансеры, полученные путем соединения энхансера hTERT (обратной транскриптазы теломеразы), энхансера SV40 и энхансера CMV именно в таком порядке;

[0037] [2] ДНК-конструкция согласно вышеописанному пункту 1, где поли(A)-хвост представляет собой последовательность поли(A)-хвост гена бычьего гормона роста (BGA poly(A)); а также

[0038] [3] ДНК-конструкция согласно вышеописанным пунктам 1 и 2, содержащая нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 6, где залигированы (ii) ДНК REIC/Dkk-3, (iii) поли(A)-хвост и (iv) энхансеры, полученные путем соединения энхансеров hTERT (обратной транскриптазы теломеразы), SV40 и CMV, именно в таком порядке.

[0039] Конструкцию ДНК можно получить в соответствии с описаниями WO2011/062298, US2012-0309050, WO2012/161352 и US2014-0147917, которые включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте.

[0040] Согласно настоящему изобретению, вектор аденовируса, содержащий ДНК REIC/Dkk-3, называется «Ad-REIC» или «Ad-REIC/Dkk-3». Векторная система, содержащая описанную выше конструкцию ДНК, называется системой SGE (Super Gene Expression/Системой Супер Экспрессии). Так, например, вектор аденовируса, содержащий ДНК-конструкцию, которая содержит ДНК REIC/Dkk-3, упоминается как «Ad5-SGE-REIC/Dkk-3». На Фиг. 1 приведен пример конструкции Ad-REIC/Dkk-3, а на Фиг. 2 представлена последовательность Ad-REIC/Dkk-3.

[0041] Вышеуказанный вектор аденовируса, содержащий ДНК-конструкцию, получен путем создания рекомбинантного аденовируса при введении ДНК-конструкции в вектор аденовируса. Введение ДНК-конструкции в аденовирус может быть сделано, например, путем введения ДНК-конструкции сначала в вектор pShuttle, с последующим введением вектора pShuttle, содержащего ДНК-конструкцию по настоящему изобретению, в аденовирус.

[0042] Аденовирусный вектор характерен тем, что он: (1) позволяет перенос генов во многие типы клеток; (2) обеспечивает эффективный перенос гена даже в клетки находящиеся в стационарной фазе; (3) может быть сконцентрирован центрифугированием для получения вируса с высоким титром (10-11 PFU/мл или более); (4) подходит для прямого переноса гена в клетки *in vivo*.

[0043] Для применения в генной терапии были разработаны аденовирусный вектор первого поколения, полученный путем удаления области E1/E3 (Miyake, S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1320, 1996), аденовирусный вектор второго поколения, полученный путем удаления, в дополнение к области E1/E3, области E2 или E4 (Lieber, A., et al., J. Virol., 70, 8944, 1996; Mizuguchi, H. & Kay, MA, Hum. Gene Ther., 10, 2013, 1999) и аденовирусный вектор третьего поколения, полученный почти полным удалением генома аденовируса (GUTLESS) (Steinwaerder, DS, et al., J. Virol., 73, 9303, 1999). Любой из этих аденовирусных векторов может применяться для переноса генов в соответствии с настоящим изобретением без особых ограничений.

[0044] Рекомбинантный вектор аденовируса, содержащий ДНК-конструкцию, включающую ДНК REIC/Dkk-3, вводится человеку или другому млекопитающему и, таким образом, ген для лечения рака транспортируется в раковые клетки пациента, экспрессируется в раковых клетках, рост опухолевых клеток подавляется и проявляются противораковые терапевтические эффекты.

[0045] Вектор аденовируса по настоящему изобретению можно вводить способами, используемыми в генной терапии, например, путем внутрисосудистого введения (включая внутривенное и внутриартериальное введение), перорального введения, внутрибрюшинного введения, внутритрахеального введения, внутривентриального введения, подкожного введения или трансдермального введения. В частности, вектор аденовируса по настоящему изобретению имеет сильную специфичность по отношению к определенной ткани или типам клеток и, таким образом, способен эффективно доставлять желаемый ген в определенную ткань или клетки. Поэтому эффективную диагностику и лечение можно проводить даже при внутрисосудистом введении аденовирусного вектора.

[0046] Вектор аденовируса можно вводить в терапевтически эффективной дозе, легко определяемой специалистами в области генной терапии. Кроме того, доза может адекватно варьироваться в зависимости от тяжести патологического состояния, пола, возраста, массы тела, образа жизни и других данных пациента. Так например, вектор аденовируса можно вводить в дозах от $0,5 \times 10^{11}$ до $2,0 \times 10^{12}$ вирусного генома/кг массы тела, предпочтительно в диапазоне от $1,0 \times 10^{11}$ до $1,0 \times 10^{12}$ вирусного генома/кг массы тела и, более предпочтительно, от $1,0 \times 10^{11}$ до $5,0 \times 10^{11}$ вирусного генома/кг массы тела. Термин «вирусный геном» представляет собой число молекул генома аденовируса (число вирусных частиц), а также упоминается как «частица(ы)». Таким образом, термин «вирусный геном» совпадает с термином «вирусные частицы (вч)».

[0047] Ингибитор контрольной точки иммунного ответа, такой как анти-PD-1 антитело (Programmed cell death 1) и анти-PD-L1 антитело (Programmed cell-death ligand 1), функционирует как контрольная точка иммунного ответа для снижения активности иммунной системы, предотвращая активацию Т-клеток. Ингибиторный эффект ингибитора контрольной точки достигается путем содействия апоптозу (процесс запрограммированной гибели клеток) в антиген-специфичных Т-клетках лимфатических узлов и уменьшении апоптоза регуляторных Т-клеток (Treg).

[0048] Ингибитор контрольной точки можно вводить уже известным способом. Так

например, доза подбирается в зависимости от симптомов, возраста, массы тела и других условий. Дозу от 0,001 мг до 100 мг можно вводить с интервалом в несколько дней, несколько недель или несколько месяцев путем подкожной инъекции, внутримышечной инъекции или внутривенной инъекции.

5 [0049] Вектор аденовируса или ингибитор контрольной точки содержит носитель, разбавитель и эксципиент, которые традиционно используются при составлении лекарственных форм. Например, лактоза, стеарат магния и тому подобное используются в качестве носителей или эксципиентов в таблетках. Для инъекции используют водный
10 раствор, как, например, физиологический или изотонический раствор, содержащий декстрозу или другой адъювант, который может использоваться в комбинации с соответствующим солюбилизующим агентом (например, спиртом, полиспиртом, таким как пропилен гликоль, или неионным поверхностно-активным веществом). В качестве маслянистой жидкости используют кунжутное или соевое масло или сходные с ними. В качестве солюбилизующего агента также могут быть использованы
15 бензилбензоат, бензиловый спирт или сходные с ними.

[0050] Белок REIC/Dkk-3, кодируемый геном REIC/Dkk-3, может способствовать лечению или предотвращению рака путем активации противораковой иммунной системы. Более того, он вызывает апоптоз раковых клеток. В частности, белок REIC/Dkk-3 индуцирует CTL (цитотоксические Т-лимфоциты) и CTL атакуют раковые клетки
20 системным образом. Раковые клетки, подвергшиеся атаке CTL, включают функцию защиты и экспрессируют PD-L1. Ингибитор контрольной точки ингибирует защитную функцию раковых клеток.

[0051] Сам по себе ген REIC/Dkk-3 усиливает системную активацию Т-клеток CD8. Кроме того, ген REIC/Dkk-3 сам по себе активирует PD-1 на опухоль-инфильтрирующих
25 Т-клетках CD8 и, предположительно, PD-L1 в микроокружении инъекции. Это снижает интенсивность экспансии клеток CD8 и опухоль-специфичных Т-клеток. Более того, ген REIC/Dkk-3 сам по себе приводит к более высоким уровням истощения Т-клеток памяти CD4. Объединение гена REIC/Dkk-3 с анти-PD-1 или анти-PD-L1 усиливает системный ответ Т-клеток и противоопухолевые реакции. Эта комбинация также
30 активировала макрофаги M2 в микроокружении введения опухоли, что может привести к снижению общей эффективности комбинации. Не было обнаружено никаких дифференциальных эффектов на регуляторные Т-клетки (Tregs).

[0052] Хотя ген REIC/Dkk-3 может индуцировать адаптивную резистентность, препятствующую эффективности терапии, комбинационная терапия с блокадой PD-1
35 может способствовать ингибированию опухолей при раке предстательной железы у мышей. Комбинированная терапия (ген REIC/Dkk-3 с ингибитором контрольной точки) может стимулировать клетки Spas-1+CD8 как в ипсилатеральных, так и в контралатеральных опухолях. Однако комбинационная терапия оказывала минимальное влияние на регуляторные Т-клетки (Treg). Несмотря на то, что комбинационная терапия
40 способна преодолеть адаптивную резистентность, она может потенциально рекрутировать или увеличивать количество опухолевых инфильтрирующих миелоидных клеток.

[0053] Ген REIC/Dkk-3 и ингибитор контрольной точки обладают синергическим эффектом при лечении рака. Анти-PD-1 и анти-PD-L1-антитела влияют на иммунную
45 систему таким образом, что раковые клетки экспрессируют PD-1 и PD-L1 на клеточной поверхности, что делает их восприимчивыми к генам REIC/Dkk-3 (индуцированный REIC/Dkk-3 анти-опухолевый иммунитет; цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), индуцированные REIC/Dkk-3). Комбинированное применение гена REIC/Dkk-3 и

ингибитора контрольной точки является более эффективным при лечении рака, чем использование гена REIC/Dkk-3 или ингибитора контрольной точки по отдельности.

[0054] Ген REIC/Dkk-3 можно вводить одновременно, отдельно или последовательно с введением ингибитора контрольной точки. Ген REIC/Dkk-3 также можно вводить до или после введения ингибитора контрольной точки. Предпочтительно, ген REIC/Dkk-3 вводят перед введением ингибитора контрольной точки. При введении ингибитора контрольной точки отдельно, ингибитор контрольной точки вводят от 1 до 24 часов, от 1 до 30 дней до или после введения гена REIC/Dkk-3. Более того, ингибитор контрольной точки можно вводить в том же интервале, что и ген REIC/Dkk-3. Ингибитор контрольной точки вводят один раз, тогда как ген REIC/Dkk-3 вводят несколько раз. Альтернативно, ген REIC/Dkk-3 вводят один раз, а ингибитор контрольной точки вводят несколько раз.

[0055] Примеры рака, подлежащего лечению, включают, но не ограничиваются ими: рак предстательной железы, опухоль головного мозга/нерва, рак кожи, рак желудка, рак легкого, рак печени, лимфома/лейкоз, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, анальный/ректальный рак, рак пищевода, рак матки, рак молочной железы, рак почек, рак почечной лоханки и рак мочеточника, рак мочевого пузыря, рак уретры, рак полового члена, рак яичек, остеома/остеосаркома, лейомиома, рабдомиома и мезотелиома.

[0056] Настоящее изобретение также включает комбинацию, комбинированный препарат или комбинированный фармацевтический набор, содержащий ген REIC/Dkk-3 и ингибитор контрольной точки.

[0057] Настоящее изобретение также включает способ объединения REIC/Dkk-3 с ингибитором контрольной точки при изготовлении лекарственного средства для лечения рака.

[0058] Настоящее изобретение также включает фармацевтическую композицию, содержащую REIC/Dkk-3 и ингибитор контрольной точки.

ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0059] В дальнейшем, некоторые варианты осуществления будут описаны более детально посредством примеров, при этом варианты осуществления не ограничены последующими примерами.

[0060] Эффективность комбинации MTG-201 и ингибитора контрольной точки (анти-PD-1, анти-PD-L1 и анти-CTLA-4 антитела) на модели трансгенной аденокарциномы предстательной железы мыши (TRAMP)

[0061] 1. Краткое изложение

Целью этого примера является оценка потенциальных иммунологических эффектов и эффективности применения MTG-201 (Ad5-SGE-REIC/Dkk-3) в сочетании с тремя ингибиторами контрольных точек; анти-PD-1 и анти-CTLA-4 антитела на модели трансгенной аденокарциномы мышшиной простаты (TRAMP). В исследовании оценивали рост опухоли и общую выживаемость при применении противоопухолевой терапии MTG-201 самостоятельно и в сочетании с антителами к CTLA4 и PD-1.

[0062] После однократной внутриопухолевой инъекции MTG-201 при дозе 5×10^{10} в.ч. на мышшь наблюдалось статистически значимое уменьшение объема опухоли в группе MTG-201+ α -PD-1, по сравнению с другими группами лечения и контрольной группой ($p < 0,01$) и довольно значительное уменьшение по сравнению с контролем ad-LacZ ($p < 0,001$). Кроме того, общая выживаемость мышшей, получавших MTG-201+ α -PD-1, была значительно выше по сравнению с другими группами лечения и контрольной группой ($p < 0,01$ - $p < 0,001$).

[0063] 2. Введение

2.1. Цель исследования

Целью данного исследования является оценка потенциальных иммунологических эффектов и эффективности MTG-201 (Ad5-SGE-REIC/Dkk-3) в сочетании с тремя ингибиторами контрольных точек, анти-PD1, анти-PD-L1 и анти-CTLA-4 антителами на модели трансгенной аденокарциномы мышшиной простаты (TRAMP)

[0064] 3. ФОРМУЛИРОВКА ДОЗЫ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ

3.1. Тестируемое изделие и средство доставки

Тестируемое изделие, средство доставки и меры контроля применялись следующим образом.

3.1.1. Тестируемое изделие

Название тестируемого изделия: MTG-201 (Ad5-SGE-REIC/Dkk3) - вирусный вектор, включающий человеческий трансген (ген Dikkopf-3), который производит белок REIC при заражении клеток-мишеней.

Хранение: в замороженном состоянии (от -60 до -90 °С)

MTG-201 (Ad5-SGE-REIC/Dkk3) может быть изготовлен в соответствии с описаниями WO2011/062298, US2012-0309050, WO2012/161352 и US2014-0147917.

3.1.2. Средство доставки

Название средства доставки: Трис-буфер/NaCl/pH 8,0/2,5% Глицерин

Трис-буфер/NaCl/pH 8,0/2,5% Глицерин

3.1.3. Контроль

Контроль: Ad-LacZ (аденовирус, экспрессирующий β-галактозидазу)

Хранение: в замороженном состоянии (от -60 до -90 °С)

[0065] 4. РЕЦЕПТУРА ТЕСТИРУЕМОГО ИЗДЕЛИЯ

4.1. Приготовление

Тестируемое изделие было поставлено замороженным. В день дозирования тестируемое изделие оттаивали и выдерживали на льду до 6 часов до дозирования.

[0066] 4.2. Концентрация

Концентрации препарата тестируемого изделия рассчитывали, исходя из количества вирусных частиц (в.ч.) на мл. Корректировка на чистоту не проводилась. Перед дозированием тестируемое изделие разбавляли холодным солевым раствором для достижения желаемых концентраций дозы (Таблица 1). Тестируемое изделие не подвергалось фильтрации. Свежие составы готовили для каждой концентрации перед использованием.

[0067] [Таблица 1]

Группы	Концентрация испытуемого изделия	Объем инъекции	Целевая доза	Конечная Концентрация
1, 5-7, 8-9, 12-13	$1,01 \times 10^{12}$ вч/мл	50 мкл	5×10^{10} вч	1×10^{12} вч

[0068] 4.3. Хранение

После приготовления препарат хранился в холодильнике (от 2 до 8 °С) или на ледяной бане.

[0069] 4.4. Стабильность

Было подтверждено, что тестируемое изделие было стабильным в течение времени дозирования. Тестируемое изделие использовалась в течение 4 часов после оттаивания.

[0070] 5. ТЕСТОВАЯ СИСТЕМА

5.1. Виды, линия и поставщик

Восемьдесят шесть (86) самцов мышей линии C57BL/6 получали из лабораторий

Jackson Laboratories для использования в данном исследовании. Семьдесят восемь (78) мышей были использованы в исследовании.

[0071] 5.2. Спецификация

Мыши были в возрасте 8-9 недель по прибытии. Опухоль вводили инъекцией 8-10 недельным мышам. Мышей обрабатывали MTG в возрасте около 20 недель (в зависимости от кинетики роста опухоли).

[0072] Мыши весили от 20 до 30 г при замере в течение 3 дней после прибытия. Фактический диапазон варьировался, данные были задокументированы.

[0073] 5.3. Содержание

Мышей размещали по 5 штук на клетку. Температура и влажность поддерживались как стандартная комнатная температура и влажность. Люминесцентное освещение обеспечивалось с помощью автоматического таймера примерно по 12 часов в день. В некоторых случаях, темный цикл, возможно, прерывался прерывисто из-за связанных с исследованием процедур.

[0074] Водопроводная вода предоставлялась *ad libitum* всем животным с помощью автоматической системы водоснабжения, если не указано иначе. Основное питание представлено продуктом PicoLab (R) Mouse Diet 20, продукт 5058, каталог # 0007689, лабораторная диета (Сент-Луис, Миссури). Это питание было доступно *ad libitum*, если не указано иначе.

[0075] 5.4. Обоснование тестовой системы

Для исследования рака предстательной железы у мышей, сингенные трансплантируемые клеточные линии рака предстательной железы были разработаны на основе опухоли предстательной железы, возникающей у мышей из трансгенной аденокарциномы мышинной простаты (TRAMP) в результате экспрессии большого Т-антигена SV40 под специфичным промотором предстательной железы. Группа Фонга (Dr. Fong) использовала эту модель для тестирования иммунотерапии рака предстательной железы. Эти клеточные линии не экспрессируют большой Т-антиген SV40 *in vitro* или *in vivo*, что делает их пригодными для иммунотерапевтических исследований. Клетки TRAMP вводили подкожно билатерально (2 опухоли/мышь, каждый сайт опухоли содержал 5×10^5 опухолевых клеток) в спину самцов мышей дикого типа C57BL/6, который является сингенным хозяином для клеток TRAMP. Одну из опухолей затем обрабатывали либо Ad-LacZ, либо MTG-201. В определенных группах мышей также обрабатывали комбинацией MTG-201 с каждым из двух ингибиторов контрольных точек (анти-PD-1 антитело и анти-CTLA-4 антитело мыши) в течение от 3 до 7 дней после обработки Ad-LacZ или MTG-201. В исследовании оценивали рост опухоли и общую выживаемость при применении внутриопухолевой терапии MTG-201 самостоятельно и в сочетании с антителами к CTLA4 и PD-1. Для анти-CTLA-4 и анти-PD-1 дозировка составляет 200 мкг/мышь, внутривентрально.

[0076] 6. Дизайн исследования

6.1. Ксенографическая модель

Группы выживаемости: клетки TRAMP-C2 (5×10^5) вводили подкожно (1 опухоль/мышь) в спины самцов мышей дикого типа C57BL/6, являющегося сингенным хозяином для клеток TRAMP.

[0077] Группы иммунного ответа: клетки TRAMP-C2 (5×10^5) вводили подкожно (2 опухоли/мышь) в спины самцов мышей дикого типа C57BL/6, являющегося сингенным хозяином для клеток TRAMP.

[0078] 6.2. Разбиение по группам

Объем каждой опухоли предстательной железы мог достигать до ~150 мм³. Опухолевые мыши были случайным образом назначены в контрольные или лечебные группы (Таблица 2 и Таблица 3).

[0079] [Таблица 2]

Группа	Обработка	Количество Животных*
1	Ad-LacZ Контроль	8
2	MTG-201	8
3	Анти-CTLA-4	8
4	Ad-LacZ+анти-CTLA-4**	8
5	MTG-201+анти-CTLA-4**	8
6	MTG-201+анти-PD-1**	8

*см. Раздел 6.3.3 для расписания забоя

**ингибиторы контрольной точки (анти-PD-1 и анти-CTLA-4 мышинные антитела) будут введены в День 0 и День 7 после обработки Ad-LacZ или MTG-201.

[0080] Схема исследования групп выживаемости показана на Фиг.3.

[Таблица 3] Группы по назначению -Группы иммунного ответа

Группа	Обработка	Количество Животных	
		Всего	Забито на 15 день после обработки антителами
7	Ad-LacZ Контроль	5	5
8	MTG-201	5	5
9	анти-CTLA-4	5	5
10	Ad-LacZ+анти-CTLA-4*	5	5
11	MTG-201+анти-CTLA-4*	5	5
12	MTG-201+анти-PD-1*	5	5

*ингибиторы контрольной точки (анти-PD-1 и анти-CTLA-4 антитела мыши) были введены в День 0 и День 7 после обработки Ad-LacZ или MTG-201. Забой мышей проведен в День 15.

[0081] 6.3. Введение тестируемого изделия и средства доставки

6.3.1 Обоснование уровня дозы

Уровень дозы был выбран на основе имеющихся данных предыдущих исследований. Этот уровень дозы подтверждается тремя другими исследованиями токсичности GLP у крыс и собак. Одно исследование (1718-003) включало Ad-SGE-REIC/Dkk-3 с инъекцией в простату с той же дозой, что и в данном исследовании (5×10^{10} в.ч./животное). Другие два исследования (1718-001 и 1718-002) проводились на крысах в тех же дозах и на собаках в дозах $1,0 \times 10^{12}$ в.ч. с аналогичным вирусным вектором, продуцирующим белок REIC (Ad-CAG-REIC/Dkk-3), в котором промоторная последовательность была другой.

[0082] 6.3.1. Обоснование способов введения

Инъекция в опухоль является одним из предполагаемых путей введения у людей.

[0083] 6.3.2. Введение

В День 0 одна из опухолей обрабатывалась либо Ad-LacZ, либо MTG-201 прямой инъекцией в опухоль в объеме 50 мкл. 5×10^{10} бляшко-образующих единиц вектора аденовируса (Ad-LacZ и MTG-201), приведенных к объему 0,05 мл в буфере PBS, вводили инъекцией прямо в опухоль. Перед инъекцией животных анестезировали изофлураном.

[0084] В указанных группах (Таблица 2 и Таблица 3) мышей также обрабатывали анти-CTLA-4 антителом мыши и комбинацией MTG-201 с каждым из двух ингибиторов

контрольной точки (анти-PD-1 и мыши анти-CTLA-4 антитела) через 0 и 7 дней после обработки Ad-LacZ или MTG-201.

[0085] 6.4. Оценка исследования

6.4.1 Внешнее наблюдение

5 Мышей обследовали 3 раза в неделю на предмет заболеваемости, смертности, наличия травм и достаточности пищи и воды. Всех животных в плохом состоянии идентифицировали для дальнейшего наблюдения и возможной эвтаназии.

[0086] 6.4.2. Оценка роста опухоли

10 Опухоли измеряли и описывали каждые 3-4 дня при помощи калипера, а объем опухоли рассчитывали по формуле $V=0,52(L*W*W)$, где V-объем, L-длина (более длинный диаметр), а W-ширина (диаметр покороче).

[0087] 6.5. Анализ данных

Индивидуальные данные с указанием времени сообщаются вместе с средними значениями группы \pm стандартная ошибка.

15 [0088] 7. СТАТИСТИКА

Исходные данные были сведены в таблицу в течение каждого временного интервала, а среднее и стандартное отклонение вычислялось для каждой конечной точки для каждой группы. Для каждой конечной точки, обработанную группу сравнивали с контрольной группой и каждой из других групп лечения с использованием анализа, описанного в Таблице 4.

[0089] При сравнении двух групп для статистического анализа использовался t-критерий Стьюдента, и разница считалась значительной при $p < 0,05$. Для сравнения между группами использовался однонаправленный ANOVA-тест с post-hoc коррекцией Бонферрони.

25 [0090] [Таблица 4]

Статистические Сравнения

Контрольная Группа	Группы сравнения						
	Группы Выживания						
	1	2	3	4	5	6	7
30	2	1	3	4	5	6	7
	3	1	2	4	5	6	7
	4	1	2	3	5	6	7
	5	1	2	3	4	6	7
	6	1	2	3	4	5	7
35	7	1	2	3	4	5	6
	Группы Иммунного Ответа						
	8	9	10	11	12	13	14
	9	8	10	11	12	13	14
	10	8	9	11	12	13	14
	11	8	9	10	12	13	14
40	12	8	9	10	11	13	14
	13	8	9	10	11	12	14
	14	8	9	10	11	12	13

[0091] Конечные точки были следующими:

45 Эксперимент 1: рост опухоли и общая выживаемость. Мышей с опухолями, достигающими 300 мм³, подвергали эвтаназии.

[0092] Оценка дисперсии (средняя квадратическая ошибка или MSE) внутри групп была рассчитана по одностороннему анализу дисперсии (ANOVA) с коррекцией Бонферрони. Проверка равенства средних значений двух выборок (данных обработок)

проводился с использованием t-критерия Стьюдента.

[0093] Результаты всех парных сравнений соответствовали 0,05 и 0,01 уровням значимости. Все конечные точки анализировали с использованием двухсторонних тестов, если не указано иначе.

5 [0094] 8. РЕЗУЛЬТАТЫ

8.1. Оценка роста опухоли

Была проведена оценка опухолевого роста после обработки внутриопухолевой инъекцией MTG-201 отдельно и в сочетании с антителами к CTLA4 и PD-1. На Фиг. 4 показаны результаты. На Фиг. 4 светлым квадратом (\square) показаны предварительные
10 данные анти-PD-1 (α -PD1) которые были получены той же лабораторией с использованием той же самой мышиной модели. Как видно из Фиг. 4, статистически значимое уменьшением объема опухоли наблюдалось в группе MTG-201+ α -PD-1 по сравнению с другими группами и контрольной группой ($p < 0,01$), а также весьма значительным уменьшением по сравнению с ad-LacZ ($p < 0,001$). Кроме того, наблюдалось
15 значительное уменьшение объема опухоли, наблюдаемое в группе MTG-201+ α -PD-1, по сравнению с группой обработанной только α -PD-1. Эти результаты показывают, что MTG-201+анти-PD-1 ингибирует рост опухоли.

[0095] 8.2. Общая выживаемость

Была проведена оценка общей выживаемости после обработки внутриопухолевой
20 инъекцией MTG-201 отдельно и в сочетании с антителами к CTLA4 и PD-1. Как видно из Фиг. 5, общая выживаемость мышей в группе MTG-201+ α -PD-1 была значительно выше по сравнению с другими группами и контрольной группой ($p < 0,01$ - $p < 0,001$). Эти результаты показывают, что MTG-201+anti-PD-1 обеспечивает преимущества для выживания.

25 [0096] 9. Заключение

В исследовании проводили оценку роста опухоли и общей выживаемости при введении внутриопухолевой обработке MTG-201 отдельно и в комбинации с антителами к CTLA4 и PD-1.

[0097] После однократной внутриопухолевой инъекции MTG-201 дозы 5×10^{10} вч на
30 мышь в группе MTG-201+ α -PD-1 наблюдалось статистически значимое уменьшение объема опухоли по сравнению с другими группами и контрольной группой ($p < 0,01$) и очень значительное уменьшение по сравнению с контролем ad-LacZ ($p < 0,001$). Кроме того, общая выживаемость мышей, обработанных MTG-201+ α -PD-1, была значительно
35 выше по сравнению с другими группами лечения и контрольной группой ($p < 0,01$ - $p < 0,001$).

[0098] Все публикации, патенты и заявки на патент, приведенные здесь, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей их полноте.

СПИСКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- 40 <110> Момотаро-Ген Инкорпорэйтед.
<120> Комбинированная терапия с использованием гена REIC/Dkk-3 и ингибитора контрольной точки (иммунного ответа).
<130> PH-6456-PCT
<150> US62/276,371
<151> 2016-01-08
45 <160> 9
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 1053

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(1053)

<400> 1

```

atg cag cgg ctt ggg gcc acc ctg ctg tgc ctg cta ctg gcg gcg gcg      48
Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala Ala
   1             5             10             15
10 gtc ccc acg gcc ccc gcg ccc gct ccg acg gcg acc tcg gct cca gtc      96
Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val
           20           25           30
   aag ccc ggc ccg gct ctc agc tac ccg cag gag gag gcc acc ctc aat      144
Lys Pro Gly Pro Ala Leu Ser Tyr Pro Gln Glu Glu Ala Thr Leu Asn
           35           40           45
15 gag atg ttc cgc gag gtt gag gaa ctg gtg gag gac acg cag cac aaa      192
Glu Met Phe Arg Glu Val Glu Glu Leu Val Glu Asp Thr Gln His Lys
   50           55           60
   ttg cgc agc gcg gtg gaa gag atg gag gca gaa gaa gct gct gct aaa      240
Leu Arg Ser Ala Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Ala Lys
   65           70           75           80
   gca tca tca gaa gtg aac ctg gca aac tta cct ccc agc tat cac aat      288
Ala Ser Ser Glu Val Asn Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Tyr His Asn
           85           90           95
25 gag acc aac aca gac acg aag gtt gga aat aat acc atc cat gtg cac      336
Glu Thr Asn Thr Asp Thr Lys Val Gly Asn Asn Thr Ile His Val His
           100          105          110
   cga gaa att cac aag ata acc aac aac cag gct cga caa atg gtc ttt      384
Arg Glu Ile His Lys Ile Thr Asn Asn Gln Ala Arg Gln Met Val Phe
           115          120          125
30 tca gag aca gtt atc aca tct gtg gga gac gaa gaa ggc aga agg agc      432
Ser Glu Thr Val Ile Thr Ser Val Gly Asp Glu Glu Gly Arg Arg Ser
   130          135          140
   cac gag tgc atc atc gac gag gac tgt ggg ccc agc atg tac tgc cag      480
His Glu Cys Ile Ile Asp Glu Asp Cys Gly Pro Ser Met Tyr Cys Gln
   145          150          155          160
   ttt gcc agc ttc cag tac acc tgc cag cca tgc ccg ggc cag agg atg      528
Phe Ala Ser Phe Gln Tyr Thr Cys Gln Pro Cys Arg Gly Gln Arg Met
           165          170          175
40 ctc tgc acc cgg gac agt gag tgc tgt gga gac cag ctg tgt gtc tgg      576
Leu Cys Thr Arg Asp Ser Glu Cys Cys Gly Asp Gln Leu Cys Val Trp
           180          185          190
   ggt cac tgc acc aaa atg gcc acc agg ggc agc aat ggg acc atc tgt      624
Gly His Cys Thr Lys Met Ala Thr Arg Gly Ser Asn Gly Thr Ile Cys
           195          200          205
45 gac aac cag agg gac tgc cag ccg ggg ctg tgc tgt gcc ttc cag aga      672
Asp Asn Gln Arg Asp Cys Gln Pro Gly Leu Cys Cys Ala Phe Gln Arg
           210          215          220

```

RU 2748231 C2

ggc ctg ctg ttc cct gtg tgc ata ccc ctg ccc gtg gag ggc gag ctt 720
 Gly Leu Leu Phe Pro Val Cys Ile Pro Leu Pro Val Glu Gly Glu Leu
 225 230 235 240
 tgc cat gac ccc gcc agc cgg ctt ctg gac ctc atc acc tgg gag cta 768
 5 Cys His Asp Pro Ala Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ile Thr Trp Glu Leu
 245 250 255
 gag cct gat gga gcc ttg gac cga tgc cct tgt gcc agt ggc ctc ctc 816
 Glu Pro Asp Gly Ala Leu Asp Arg Cys Pro Cys Ala Ser Gly Leu Leu
 260 265 270
 10 tgc cag ccc cac agc cac agc ctg gtg tat gtg tgc aag ccg acc ttc 864
 Cys Gln Pro His Ser His Ser Leu Val Tyr Val Cys Lys Pro Thr Phe
 275 280 285
 gtg ggg agc cgt gac caa gat ggg gag atc ctg ctg ccc aga gag gtc 912
 Val Gly Ser Arg Asp Gln Asp Gly Glu Ile Leu Leu Pro Arg Glu Val
 15 290 295 300
 ccc gat gag tat gaa gtt ggc agc ttc atg gag gag gtg cgc cag gag 960
 Pro Asp Glu Tyr Glu Val Gly Ser Phe Met Glu Glu Val Arg Gln Glu
 305 310 315 320
 ctg gag gac ctg gag agg agc ctg act gaa gag atg gcg ctg ggg gag 1008
 20 Leu Glu Asp Leu Glu Arg Ser Leu Thr Glu Glu Met Ala Leu Gly Glu
 325 330 335
 cct gcg gct gcc gcc gct gca ctg ctg gga ggg gaa gag att tag 1053
 Pro Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Glu Glu Ile
 340 345 350
 25 <210> 2
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 30 Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val
 20 25 30
 Lys Pro Gly Pro Ala Leu Ser Tyr Pro Gln Glu Glu Ala Thr Leu Asn
 35 35 40 45
 Glu Met Phe Arg Glu Val Glu Glu Leu Val Glu Asp Thr Gln His Lys
 50 55 60
 Leu Arg Ser Ala Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Ala Lys
 65 70 75 80
 40 Ala Ser Ser Glu Val Asn Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Tyr His Asn
 85 90 95
 Glu Thr Asn Thr Asp Thr Lys Val Gly Asn Asn Thr Ile His Val His
 100 105 110
 Arg Glu Ile His Lys Ile Thr Asn Asn Gln Ala Arg Gln Met Val Phe
 45 115 120 125
 Ser Glu Thr Val Ile Thr Ser Val Gly Asp Glu Glu Gly Arg Arg Ser
 130 135 140
 His Glu Cys Ile Ile Asp Glu Asp Cys Gly Pro Ser Met Tyr Cys Gln

RU 2748231 C2

	145		150		155		160									
	Phe	Ala	Ser	Phe	Gln	Tyr	Thr	Cys	Gln	Pro	Cys	Arg	Gly	Gln	Arg	Met
					165					170					175	
	Leu	Cys	Thr	Arg	Asp	Ser	Glu	Cys	Cys	Gly	Asp	Gln	Leu	Cys	Val	Trp
5				180						185					190	
	Gly	His	Cys	Thr	Lys	Met	Ala	Thr	Arg	Gly	Ser	Asn	Gly	Thr	Ile	Cys
			195						200					205		
	Asp	Asn	Gln	Arg	Asp	Cys	Gln	Pro	Gly	Leu	Cys	Cys	Ala	Phe	Gln	Arg
			210						215					220		
10	Gly	Leu	Leu	Phe	Pro	Val	Cys	Ile	Pro	Leu	Pro	Val	Glu	Gly	Glu	Leu
						225								235		240
	Cys	His	Asp	Pro	Ala	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Ile	Thr	Trp	Glu	Leu
						245					250				255	
	Glu	Pro	Asp	Gly	Ala	Leu	Asp	Arg	Cys	Pro	Cys	Ala	Ser	Gly	Leu	Leu
15				260							265				270	
	Cys	Gln	Pro	His	Ser	His	Ser	Leu	Val	Tyr	Val	Cys	Lys	Pro	Thr	Phe
				275						280					285	
	Val	Gly	Ser	Arg	Asp	Gln	Asp	Gly	Glu	Ile	Leu	Leu	Pro	Arg	Glu	Val
						290								300		
20	Pro	Asp	Glu	Tyr	Glu	Val	Gly	Ser	Phe	Met	Glu	Glu	Val	Arg	Gln	Glu
						305								315		320
	Leu	Glu	Asp	Leu	Glu	Arg	Ser	Leu	Thr	Glu	Glu	Met	Ala	Leu	Gly	Glu
						325								330		335
	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Gly	Glu	Glu	Ile		
25				340										345		350
	<210> 3															
	<211> 117															
	<212> ДНК															
	<213> Homo sapiens															
30	<400> 3															
	atgcagcggc ttggggccac cctgctgtgc ctgctactgg cggcggcggc cccacggcc 60															
	cccgcgcccg ctccgacggc gacctcggct ccagtcaagc cggccccggc tctcagc 117															
	<210> 4															
	<211> 234															
35	<212> ДНК															
	<213> Homo sapiens															
	<400> 4															
	atgcagcggc ttggggccac cctgctgtgc ctgctactgg cggcggcggc cccacggcc 60															
	cccgcgcccg ctccgacggc gacctcggct ccagtcaagc cggccccggc tctcagctac 120															
40	ccgcaggagg aggccaccct caatgagatg ttccgcgagg ttgaggaact ggtggaggac 180															
	acgcagcaca aattgcgcag cgcggtggaa gagatggagg cagaagaagc tgct 234															
	<210> 5															
	<211> 262															
	<212> ДНК															
45	<213> Искусственная															
	<220>															
	<223> Синтезированная															
	<400> 5															

	tgactgactg	acgtttaaac	ccgctgatca	gcctcgactg	tgccttctag	ttgccagcca	60
	tctgttgttt	gccccctccc	cgtgccttcc	ttgaccctgg	aaggtgccac	tcccactgtc	120
	ctttccta	aaaatgagga	aattgcatcg	cattgtctga	gtaggtgtca	ttctattctg	180
	gggggtgggg	tggggcagga	cagcaagggg	gaggattggg	aagacaatag	caggcatgct	240
5	ggggatg	cggtctctat	gg				262
	<210>	6					
	<211>	2355					
	<212>	ДНК					
	<213>	Искусственная					
10	<220>						
	<223>	Синтезированная					
	<400>	6					
	tctagagcac	catgcagcgg	cttggggcca	cctgctgtg	cctgctgctg	gcggcggcgg	60
	tccccacggc	ccccgcgccc	gctccgacgg	cgacctcggc	tccagtcaag	cccggcccgg	120
15	ctctcagcta	cccgcagggag	gaggccaccc	tcaatgagat	gttccgcgag	gttgaggaac	180
	tgatggagga	cacgcagcac	aaattgcgca	gcgcggtgga	agagatggag	gcagaagaag	240
	ctgctgctaa	agcatcatca	gaagtgaacc	tggcaaacct	acctcccagc	tatcacaatg	300
	agaccaacac	agacacgaag	gttggaata	ataccatcca	tgtgcaccga	gaaattcaca	360
	agataaccaa	саaccagact	ggacaaaatg	tcttttcaga	gacagttatc	acatctgtgg	420
20	gagacgaaga	aggcagaagg	agccacgagt	gcatcatcga	cgaggactgt	gggccagca	480
	tgtactgcca	gtttgccagc	ttccagtaca	cctgccagcc	atgccggggc	cagaggatgc	540
	tctgcacccg	ggacagtgag	tgctgtggag	accagctgtg	tgtctggggg	cactgcacca	600
	aaatggccac	caggggcagc	aatgggacca	tctgtgacaa	ccagagggac	tgccagccgg	660
	ggctgtgctg	tgccttccag	agaggcctgc	tgttccctgt	gtgcacaccc	ctgcccgtgg	720
25	agggcgagct	ttgccatgac	cccgcacgcc	ggcttctgga	cctcatcacc	tgggagctag	780
	agcctgatgg	agccttgagc	cgatgccctt	gtgccagtgg	cctcctctgc	cagccccaca	840
	gccacagcct	ggtgtatgtg	tgcaagccga	ccttcgtggg	gagccgtgac	caagatgggg	900
	agatcctgct	gcccagagag	gtccccgatg	agtatgaagt	tggcagcttc	atggaggagg	960
	tgcgccagga	gctggaggac	ctggagagga	gcctgactga	agagatggcg	ctgggggagc	1020
30	ctgcggctgc	cgccgctgca	ctgctgggag	gggaagagat	ttagggggta	ccccggctag	1080
	atgactaacg	tttaaaccgg	ctgatcagcc	tcgactgtgc	cttctagtgt	ccagccatct	1140
	gttgtttgcc	cctcccccg	gccttccttg	accctggaag	gtgccactcc	cactgtcctt	1200
	tcctaataaa	atgaggaaat	tgcatcgcat	tgtctgagta	ggtgtcattc	tattctgggg	1260
	ggtgggggtg	ggcaggacag	caaggggggag	gattgggaag	acaatagcag	gcatgctggg	1320
35	gatgcgggtg	gctctatggc	ggagtactgt	cctccgcttc	ccacgtggcg	gagggactgg	1380
	ggacccgggg	accggtcctg	ccccttcacc	ttccagctcc	gcctcctccg	cgcggacccc	1440
	gccccgtccc	gacccctccc	gggtccccgg	cccagcccc	tccgggacct	cccagcccct	1500
	cccttcctt	tccgcggccc	cgccctctcc	tcgcggcgcg	agttttggaa	agtccccagg	1560
	ctccccagca	ggcagaagta	tccaaagcat	ccatctcaat	tagtcagcaa	ccagggtgtg	1620
40	aaagtcccca	ggctccccag	caggcagaag	tatccaaagc	atccatctca	attagtacgc	1680
	aaccatagtc	ccgcccctaa	ctccgcccct	cccgccccta	actccgcccc	gttccgcccc	1740
	ttctccgccc	catggctgac	taattttttt	tatttatgca	gaggccgagg	ccgcctctgc	1800
	ctctgagcta	ttccagaagt	agtgaggagg	cttttttggg	ggccaaggct	tttgcaaaaa	1860
	gctccgttac	ataacttacg	gtaaatggcc	cgctggctg	accgcccac	gacccccgcc	1920
45	cattgacgtc	aataatgacg	tatgttccca	tagtaacgcc	aatagggact	ttccattgac	1980
	gtcaatgggt	ggagtattta	cggtaaacctg	cccacttggc	agtacatcaa	gtgtatcata	2040
	tgccaagtac	gccccctatt	gacgtcaatg	acggtaaatg	gccccctgg	cattatgccc	2100
	agtacatgac	cttatgggac	tttcctactt	ggcagtacat	ctacgtatta	gtcatcgcta	2160

	ttaccatggg gatgcggttt tggcagtaca tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac	2220
	ggggatttcc aagtctccac cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc	2280
	aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc	2340
	gtggtgcccg aattc	2355
5	<210> 7	
	<211> 1285	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
10	<223> Синтезированная	
	<400> 7	
	gtttaaacc gctgatcagc ctcgactgtg ctttctagtt gccagccatc tgttgtttgc	60
	ccctcccccg tgccttcctt gaccctggaa ggtgccactc cactgtcct tcctaataa	120
	aatgaggaaa ttgcatcgc ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg gggtaggggtg	180
15	gggcaggaca gcaaggggga ggattgggaa gacaatagca ggcatgctgg ggatgcggtg	240
	ggctctatgg cggagtactg tcctccgctt cccacgtggc ggagggactg gtccctcget	300
	tcccacgtgg cggagggact ggggaccggy gcacccgtcc tgccccttca cttccagct	360
	ccgcctcctc cgcgcggacc ccgccccgtc ccgaccctc ccgggtccc gccccagccc	420
	cctccgggcc ctcccagccc ctccccttcc tttccgcygc ccgcccctc cctcgcggcg	480
20	cgagttttgg aaagtcccca ggctcccag caggcagaag tatccaaagc atccatctca	540
	attagtcagc aaccaggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatccaaa	600
	gcatccatct caattagtca gcaaccatag tcccgcctc aactccgccc atcccgcctc	660
	taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg	720
	cagaggccga gggcgcctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg	780
25	gaggccaagg cttttgcaaa aagctccgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc	840
	tgaccgcca acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg	900
	ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg	960
	gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa	1020
	tggcccgctt ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac	1080
30	atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcygt tttggcagta catcaatggg	1140
	cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg	1200
	agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaaaa ctccgcccc	1260
	ttgacgcaaa tgggcygtag gcgtg	1285
	<210> 8	
35	<211> 21	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Праймер	
40	<400> 8	
	atgagacata ttatctgcca c	21
	<210> 9	
	<211> 22	
	<212> ДНК	
45	<213> Искусственная	
	<220>	
	<223> Праймер	
	<400> 9	

gtaagtcaat cccttcctgc ac

(57) Формула изобретения

5 1. Комбинированный фармацевтический набор для лечения рака, включающий REIC/Dkk-3 и анти-PD1 антитело, причем ген REIC/Dkk-3 состоит из нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO:1.

2. Комбинированный фармацевтический набор по п. 1, в который включен вектор аденовируса, содержащий ген REIC/Dkk-3.

10 3. Комбинированный фармацевтический набор по п. 1, где рак представляет собой рак предстательной железы.

15

20

25

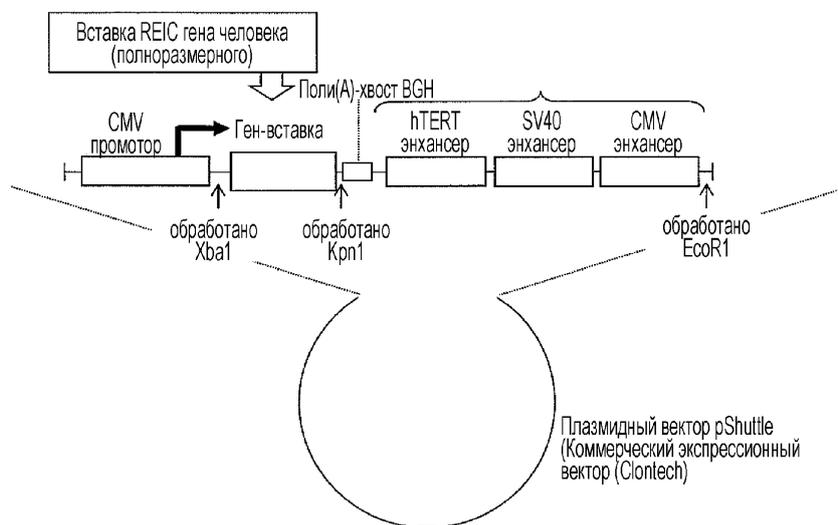
30

35

40

45

ФИГ. 1



ФИГ. 2

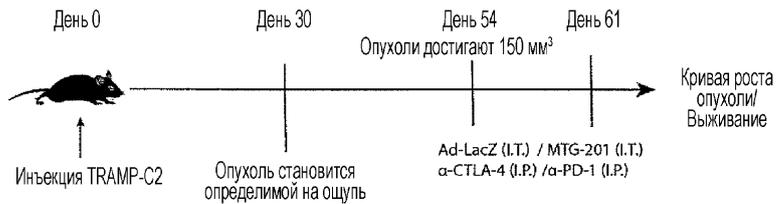
pshuttle- REIC-TSC

XbaI-⁽¹⁾REIC-KpnI-⁽²⁾3xenh-EcoRI

```

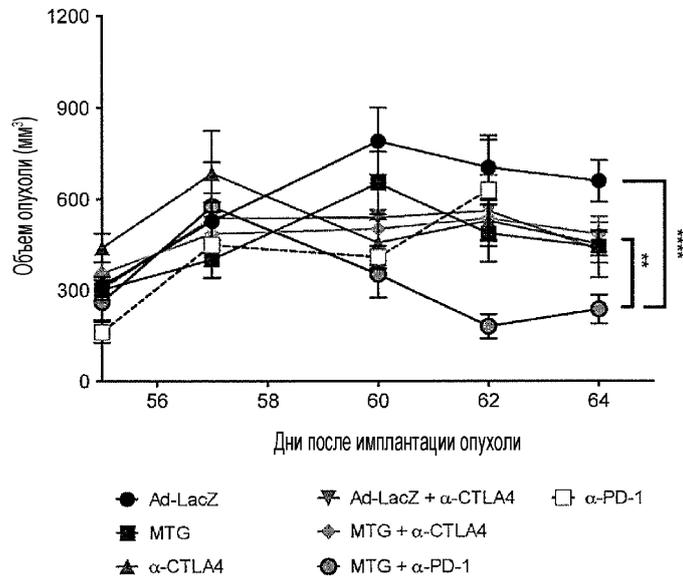
T/CTAGAACCattgacagcggcttggggccaacctgctgtgctgctgctggcggcgcggt(1)
ccccacggccccgcgccccctccgacggcgacctcggctccagtcaggccccggcgtc
tcagctaccgcagggaggggccacctcaatgagatgttccgcgaggttgaggaaactgatg
gaggacacgcagcacaattgcgcagcgggtggaagagatggaggcagaagaagctgctgc
taaaagcatcatcagaagtgaacctggcaaacctacctcccagctatcacaatgagaccaaca
cagacacgaaggttggaaataataccatccatgtgcaccgagaaattcacaagataaccaac
aaccagactggacaaatggtcttttcagagacagttatcacatctgtgggagacgaagaagg
cagaaggagccacgagtgcatcatcgacgaggaactgtgggccacagctgtactgocagtttg
ccagcttccagtacacctgccagcctgcccggggccagaggatgctctgcaccgggacagt
gagtgtgtggagaccagctgtgtgtctggggcactgcacaaaaatggcccacggggcag
caatgggaccatctgtgacaaccagagggaactgccagccggggctgtgctgtcctccaga
gaggcctgctgttccctgtgtgcacacctgcccgtggaggcagcttggcaatgacccc
ggcagccggcttctggacctcatcactgggagctagagcctgatggaccctggaccgatg
ccctgtgcccagtgccctcctctgcccagccccacagccacagcctggtgtatgtgtgcaagc
cgaccttcgtggggagccgtgaccaagatggggagatcctgctgccacagagaggtcccgat
gagtatgaagttggcagcttcatggagggtgcgccaggagctggaggacctggagaggag
ctgactgaagagatggcgtggggagcctgcccgtgcccgcctgcactgctggggagggg
aagagatttagggcctac/cccggctagatgactaacGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGA
CTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCAGCCCTG
GAAAGGTGCCACTCCCAGTCTTCCCTAATAAAATGAGGAATTCATCGCATTGCTGAG
TAGGTGTCTATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG
ACAAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGcggagactgtctctccgcttccc(2)
acgtggcggagggaactggggacccgggacccgctcctgccccttcaacctccagctccgct
cctccgcgggaccccgccccgtcccagccccctcccgggtcccggcccagccccctccggg
ccctcccagccccctccccttcccttccggggccccgcctctcctcggggcggagtttGG
AAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATCCAAAGCATCCATCTCAATAGTCAGCAA
CCAGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATCCAAAGCATCCATCTCAAT
TAGTCAGCAACATAGTCCCAGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTC
CGCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCT
CTCCCTCAGCTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCAAGGCTTTTCCAAA
AAGCTCcgttacataaacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccacagccccggcc
cattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaatagggacttccattgacgt
caatgggtggagtatttacggtaaactgcccaactggcagtcacatcaagtgtatcatatgcc
aagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtaea
tgacctatgggacttccacttggcagtcacatcactgattagtcacgctattaccatg
gtgatggcgttttggcagtaacatcaatggcgtggatagcgggttgactcaggggatttcc
aagtctcccccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatcaacgggacttcc
caaatgtcgtacaacctcccgccattgacgcaaatggcggtaggcgtgttGCCCG/AAAT
TC
    
```

ФИГ. 3



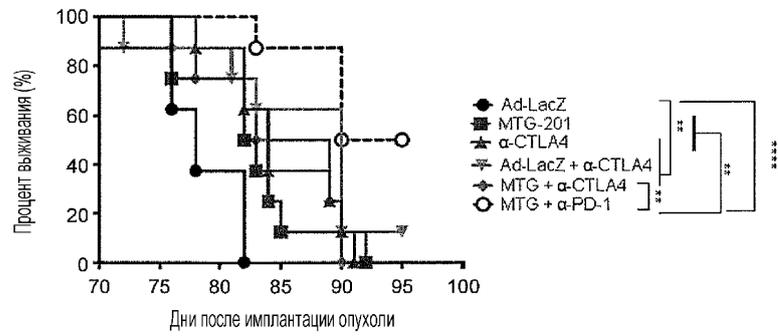
3/3

ФИГ. 4



** = p < 0.01; *** = p < 0.001

ФИГ. 5



** = p < 0.01; **** = p < 0.001