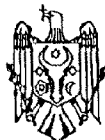




MD 4624 C1 2019.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4624** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *C12N 15/39* (2006.01)
A61K 39/285 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2016 0027 (22) Data depozit: 2014.08.22 (31) Nr.: 61/868978 (32) Data: 2013.08.22 (33) Țara: US (41) Data publicării cererii: 2016.08.31, BOPI nr. 8/2016	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2019.03.31, BOPI nr. 3/2019 (85) 2016.03.18 (86) PCT/US2014/052308, 2014.08.22 (87) WO 2015/027163 A1, 2015.02.26
(71) Solicitant: UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION, US (72) Inventator: THORNE Stephen Howard, US (73) Titular: UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION, US (74) Mandatar autorizat: LAZICOV Tatiana	

(54) Virusuri oncolitice de vaccin variolic și terapii imunooncolitice

(57) Rezumat:

1

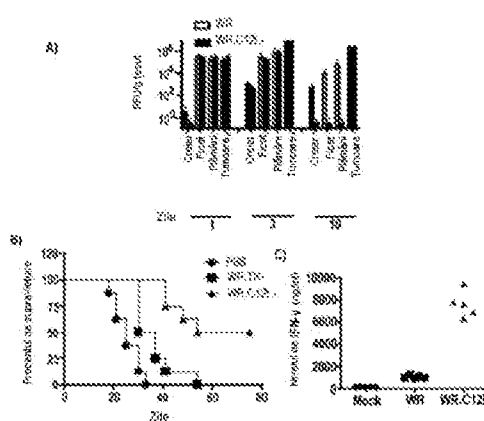
Invenția se referă la virusuri oncolitice de vaccin variolic, modificate pentru a stimula imunitatea antitumorală și/sau a diminua imunitatea gazdei și/sau răspunsul anticorpilor gazdei împotriva virusului.

Esența invenției constă în aceea, că virusul oncolitic de vaccin variolic conține un acid nucleic, care codifică domeniul Toll/IL-1R cu conținut de proteină adaptoare, care induce interferon beta (TRIF) sau un domeniu funcțional al acesteia. De asemenea invenția se referă la metode de utilizare a virusurilor oncolitice în tratamentul tumorilor maligne.

Revendicări: 15

Figuri: 30

2



(54) Oncolytic vaccinia viruses and immuno-oncolytic therapies

(57) Abstract:

1
The invention relates to oncolytic vaccinia viruses which have been modified to promote anti-tumor immunity and/or reduce host immunity and/or antibody response against the virus.

Summary of the invention consists in that the oncolytic vaccinia virus comprises a nucleic acid encoding a Toll/IL-1R domain-

2
containing adapter inducing interferon beta (TRIF) protein or a functional domain thereof. The invention also relates to methods of using oncolytic viruses in the treatment of cancers.

Claims: 15

Fig.: 30

(54) Онколитические вирусы осповакцины и иммуноонколитические терапии

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к онколитическим вирусам осповакцины, модифицированным для повышения противоопухолевого иммунитета и/или снижения иммунитета хозяина и/или ответа антител хозяина против вируса.

Сущность изобретения состоит в том, что онколитический вирус осповакцины содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую домен Toll/IL-1R с содержанием адаптирующего белка,

2
который индуцирует интерферон-бета (TRIF) или его функциональный домен. Изобретение также относится к способам применения онколитических вирусов при лечении злокачественных опухолей.

П. формулы: 15

Фиг.: 30

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

Prezenta invenție se referă la virusuri oncolitice de vaccin variolic, care au fost modificate pentru a stimula imunitatea antitumorală și/sau pentru a reduce răspunsul anticorpilor gazdei împotriva virusului.

- Virusurile oncolitice (VO) reprezintă virusuri cu replicare, care în mod natural este selectivă sau modificată, pentru a fi selectivă pentru celulele tumorale [1]; (Kirn D.H., Thorne, S.H. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9, 2009, p. 64-71; Kirn D., Martuza R.L., Zwiebel J. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nat. Med.* 7, 2001, p. 781-787). Multiple diferite structuri virale au fost examinate ca OV, inclusiv tulpinile virusului vaccinului variolic (VV) [2]; (Kirn D.H., Wang Y., Le Boeuf F., Bell J. Thorne S.H. Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS Med.* 4, 2007, e353; Thorne S.H., Hwang T.H., O'Gorman W.E., Bartlett D.L., Sei S., Kanji F., Brown C., Werier J., Cho J.H., Lee D.E., Wang Y., Bell J., Kirn D.H. Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J. Clin. Invest* 117, 2007, p. 3350-3358; McCart J.A., Ward J.M., Lee J., Hu Y., Alexander H.R., Libutti S.K., Moss B., Bartlett D.L. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res.* 61, 2001, p. 8751-8757; Guo Z.S., Naik A., O'Malley M.E., Popovic P., Demarco R., Hu Y., Yin X., Yang S., Zeh H.J., Moss B., Lotze M.T., Bartlett D.L. The enhanced tumor selectivity of an oncolytic vaccinia lacking the host range and antiapoptosis genes SPI-1 and SPI-2. *Cancer Res.* 65, 2005, p. 9991-9998; Gnant M.F., Noll L.A., Irvine K.R., Puhlmann M., Terrill R.E., Alexander H.R. Jr., Bartlett D.L. Tumor-specific gene delivery using recombinant vaccinia virus in a rabbit model of liver metastases. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1999, p. 1744-1750; Zhang Q., Yu Y.A., Wang E., Chen N., Danner R.L., Munson P.J., Marincola F.M., Szalay A.A. Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus. *Cancer Res.* 67, 2007, p. 10038-10046; Yu Y.A., Shabahang S., Timiryasova T.M., Zhang Q., Beltz R., Gentschev I., Goebel W., Szalay A.A. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat Biotechnol* 22, 2004, p. 313-320). Cel puțin pentru trei vectori oncolitici aparte în baza vaccinului variolic s-a finalizat testarea fazei I, incluzând tulpina vvDD (Thorne S.H., Hwang T.H., O'Gorman W.E., Bartlett D.L., Sei S., Kanji F., Brown C., Werier J., Cho J.H., Lee D.E., Wang Y., Bell J., Kirn D.H. Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J. Clin. Invest* 117, 2007, p. 3350-3358; McCart J.A., Ward J.M., Lee J., Hu Y., Alexander H.R., Libutti S.K., Moss B., Bartlett D.L. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res.* 61, 2001, p. 8751-8757). Pentru VV OV, JX-594 [2]; (Kirn D.H., Wang Y., Le Boeuf F., Bell J. Thorne S.H. Targeting of interferon-beta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS Med.* 4, 2007, e353; Thorne S.H., Hwang T.H., O'Gorman W.E., Bartlett D.L., Sei S., Kanji F., Brown C., Werier J., Cho J.H., Lee D.E., Wang Y., Bell J., Kirn D.H. Rational strain selection and engineering creates a broad-spectrum, systemically effective oncolytic poxvirus, JX-963. *J. Clin. Invest* 117, 2007, p. 3350-3358; McCart J.A., Ward J.M., Lee J., Hu Y., Alexander H.R., Libutti S.K., Moss B., Bartlett D.L. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res.* 61, 2001, p. 8751-8757; Guo Z.S., Naik A., O'Malley M.E., Popovic P., Demarco R., Hu Y., Yin X., Yang S., Zeh H.J., Moss B., Lotze M.T., Bartlett D.L. The enhanced tumor selectivity of an oncolytic vaccinia lacking the host range and antiapoptosis genes SPI-1 and SPI-2. *Cancer Res.* 65, 2005, p. 9991-9998; Gnant M.F., Noll L.A., Irvine K.R., Puhlmann M., Terrill R.E., Alexander H.R. Jr., Bartlett D.L. Tumor-specific gene delivery using recombinant vaccinia virus in a rabbit model of liver metastases. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 1999, p. 1744-1750; Zhang Q., Yu Y.A., Wang E., Chen N., Danner R.L., Munson P.J., Marincola F.M., Szalay A.A. Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus. *Cancer Res.* 67, 2007, p. 10038-10046; Yu Y.A., Shabahang S., Timiryasova T.M., Zhang Q., Beltz R., Gentschev I., Goebel W., Szalay A.A. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. *Nat Biotechnol* 22, 2004, p. 313-320; Park B.H., Hwang T., Liu T.C., Sze D.Y., Kim J.S., Kwon H.C., Oh S.Y., Han S.Y., Yoon J.H.,

- Hong S.H., Moon A., Speth K., Park, C., Ahn Y.J., Daneshmand M., Rhee B.G., Pinedo H.M., Bell J.C., Kirn D.H. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet. Oncol.* 9, 2008, p. 533-542) (Jennerex) s-au demonstrat recent răspunsuri extrem de promițătoare în studiile fazei II pentru carcinomul
- 5 hepatocelular (HCC), inclusiv livrarea sistemică în tumoare [3], (Breitbach C.J., Burke J., Jonker D., Stephenson J., Haas, A.R., Chow L.Q., Nieva J., Hwang T.H., Moon A., Patt R., Pelusio A., Le Boeuf F., Burns J., Evgin L., De Silva N., Cvancic S., Robertson T., Je J.E., Lee Y.S., Parato K., Diallo J.S., Fenster A., Daneshmand M., Bell J.C., Kirn, D.H. Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* 477, 2011, p. 99-102). Mai mult
- 10 decat atât, rezultate promițătoare în faza III au fost raportate pentru virusul herpetic HSV OV (T-Vec, Amgen [4]; (Senzer N.N., Kaufman H.L., Amatruda T., Nemunaitis M., Reid T., Daniels G., Gonzalez R., Glaspy J., Whitman E., Harrington K., Goldsweig H., Marshall T., Love C., Coffin R., Nemunaitis J.J. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 27, 2009, p. 5763-5771) în terapia melanomului (16% răspunsuri,
- 15 comparativ cu 2% în grupul de control). În legătură cu aceasta, a început să fie determinat adevăratul potențial al OV în tratamentul tumorilor maligne (adițional la tulpina inițială de adenovirus ONYX-015 (H-101) [5]; (Khuri F., Nemunaitis J., Ganly I., Gore M., MacDougall M., Tannock I., Kaye S., Hong W., Kirn D. A controlled trial of Onyx-015, an E1B gene-deleted
- 20 adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature Medicine* 6, 2000, p. 879-885), care rămâne singurul remediu terapeutic pe bază de OV pe orice piață (Garber K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 2006, p. 298-300).
- În pofida acestor rezultate promițătoare, răspunsurile complete cu utilizarea VO rămân a fi
- 25 rare. Este important de menționat, că, tulpinile VO de prima și de a doua generație au fost concepute, în primul rând, pentru a distruge celulele tumorale prin replicare selectivă, care conduce direct la liza celulelor. În plus, atât JX-594, cât și T-Vec exprimă o citokină transgenă (GM-CSF), care, ar fi de așteptat, stimulează limfocitele gazdei (Park B.H., Hwang T., Liu T.C., Sze D.Y., Kim J.S., Kwon H.C., Oh S.Y., Han S.Y., Yoon J.H., Hong S.H., Moon A.,
- 30 Speth K., Park, C., Ahn Y.J., Daneshmand M., Rhee B.G., Pinedo H.M., Bell J.C., Kirn D.H. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet. Oncol.* 9, 2008, p. 533-542; Schmidt C. Amgen spikes interest in live virus vaccines for hard-to-treat cancers. *Nature biotechnology* 29, 2011, p. 295-296; Liu T.C., Hwang T., Park B.H., Bell J., Kirn D.H. The targeted oncolytic poxvirus JX-594 demonstrates
- 35 antitumoral, antivascular, and anti-HBV activities in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol. Ther.* 16, 2008, p. 1637-1642; Kim M.K., Breitbach C.J., Moon A., Heo J., Lee Y.K., Cho M., Lee J.W., Kim S.G., Kang D.H., Bell J.C., Park B.H., Kirn D.H., Hwang T.H. Oncolytic and immunotherapeutic vaccinia induces antibody-mediated complement-dependent cancer cell lysis in humans. *Science translational medicine* 5, 2013, 185ra63). Cercetările preclinice au demonstrat
- 40 importanța critică a răspunsului imun în activitatea terapeutică a VV oncolitic, în care (i) toți șoarecii erau rezistenți la provocări repetate, după un răspuns complet după terapia VV, indicând o necesitate absolută de inducere a unei imunități adaptive antitumorale (Contag C.H., Sikorski R., Negrin R.S., Schmidt T., Fan A.C., Bachiredy P., Felsner D.W., Thorne S.H. Definition of an enhanced immune cell therapy in mice that can target stem-like lymphoma cells. *Cancer Research* 70, 2010, p. 9837-9845); (ii) efectele vaccinului VV asigură un beneficiu terapeutic mai mare,
- 45 decat vaccinurile echivalente DC (Yang Y., Huang C.T., Huang X., Pardoll D.M. Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nature immunology* 5, 2004, p. 508-515); (iii) infecția tumorii VV produce un profil specific de citokine ("constanta imunologică de respingere" (Worschech A., Chen N., Yu Y.A., Zhang Q., Pos Z., Weibel S., Raab V., Sabatino M., Monaco A., Liu H., Monsurro V., Buller R.M., Stronck D.F., Wang E., Szalay A.A., Marincola F.M. Systemic treatment of xenografts with vaccinia virus GLV-1h68 reveals the immunologic facet of oncolytic therapy. *BMC genomics* 10, 2009, p. 301); (iv) terapia VV reduce numărul de celule imunosupresive în tumoare (MDSC, T-reg și macrofage M2) (Thorne S.H., Liang W., Sampath P., Schmidt T., Sikorski R., Beilhack A., Contag C.H. Targeting
- 50 localized immune suppression within the tumor through repeat cycles of immune cell-oncolytic virus combination therapy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 2010, p. 1698-1705); (v) răspunsul imun, Indus de terapia VV, este capabil de eradicarea tumorii reziduale și a metastazelor cu mult mai târziu după eliminarea virusului, asigurând o supraveghere imunologică pe termen lung pentru a preveni recidiva (Contag C.H.,

- Sikorski R., Negrin R.S., Schmidt T., Fan A.C., Bachireddy P., Felsher D.W., Thorne S.H. Definition of an enhanced immune cell therapy in mice that can target stem-like lymphoma cells. *Cancer Research* 70, 2010, p. 9837-9845; Thorne S.H., Liang W., Sampath P., Schmidt T., Sikorski R., Beilhack A., Contag C.H. Targeting localized immune suppression within the tumor through repeat cycles of immune cell-oncolytic virus combination therapy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 18, 2010, p. 1698-1705; Thorne S.H. Enhancing biological therapy through conditional regulation of protein stability. *Expert reviews in molecular medicine* 12, 2010, e2) și (vi) în unele studii se pare că o replicare virală sigură nu este de fapt necesară pentru un efect terapeutic (Wang L.C., Lynn R.C., Cheng G., Alexander E., Kapoor V., Moon E.K., Sun J., Fridlender Z.G., Isaacs S.N., Thorne S.H., Albelda S.M. Treating Tumors With a Vaccinia Virus Expressing IFN β Illustrates the Complex Relationships Between Oncolytic Ability and Immunogenicity. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 2011; Prestwich R.J., Ilett E.J., Errington F., Diaz R.M., Steele L.P., Kottke T., Thompson J., Galivo F., Harrington K.J., Pandha H.S., Selby P.J., Vile R.G., Melcher, A.A. Immune-mediated antitumor activity of reovirus is required for therapy and is independent of direct viral oncolysis and replication. *Clin. Cancer Res.* 15, 2009, p. 4374-4381). Astfel, efectele imunoterapeutice ale VO, în particular VV, sunt, cel puțin, la fel de importante ca și efectele oncolitice directe, și acești vectori, probabil, trebuie să fie luați în considerare în primul rând în calitate de remedii imunoterapeutice.
- Este necesar de remarcat, că vectorii clinici actuali nu au fost concepuți ca remedii imunoterapeutice (cu excepția expresiei unor citokine aparte) și această zonă a rămas relativ insuficient explorată. De aceea, există un potențial imens nerealizat pentru îmbunătățirea vectorilor oncolitici prin optimizarea interacțiunilor lor cu sistemul imun al gazdei și pentru crearea vectorilor capabili de vaccinare *in situ* împotriva antigenelor tumorale respective. În mod alternativ, majoritatea metodelor tradiționale pentru vaccinerile terapeutice împotriva tumorilor maligne au avut un succes limitat în clinică, în special împotriva tumorilor mai mari, în pofida dovezilor de imunizare eficientă (Banchereau J., Palucka A.K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 2005, p. 296-306; Nestle F.O., Tonel G. & Farkas A. Cancer vaccines: the next generation of tools to monitor the anticancer immune response. *PLoS Med.* 2, 2005, e339; Rosenberg S.A., Yang J.C., Restifo N.P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat. Med.* 10, 2004, p. 909-915). Astfel, sunt necesare, de asemenea, metode noi pentru vaccineri, care în mod ideal vor media inducerea răspunsurilor împotriva antigenelor respective în fiecare tumoră, care vor depăși supresia chiar și în interiorul tumorilor mari și vor îmbunătăți homing-ul celulelor T în tumorile-țintă.
- Prezenta invenție se referă la virusuri "imunooncolitice" de vaccin variolic, care au fost modificate pentru a stimula imunitatea antitumorală și/sau pentru a reduce răspunsul imun și răspunsul anticorpilor gazdei împotriva virusului. Aceasta se bazează, cel puțin în parte, pe descoperirea inhibării îmbunătățite a creșterii tumorii cu virusul oncolitic al vaccinului variolic, care este un remediu tratat cu un agent, care reduce nivelul de glicozilare, și/sau tratat cu enzima sialidaza (care se consideră, că reduce activarea TLR2 și reduce răspunsul anticorpilor gazdei împotriva virusului); și/sau poartă modificări sau deleții ale acidului nucleic genomic viral, care codifică un produs, care reduce imunitatea celulară T (proteina virală de legare a interleukinei-18); și/sau poartă acidul nucleic care codifică un produs care (i) amplifică inducția limfocitelor T citotoxice (TRIF) și/sau (ii) reduce numărul de celule supresoare, derivate din mieloide, în tumoare (MDSC) prin reducerea cantității de prostaglandină E2. Respectiv, prezenta invenție se referă la virusuri oncolitice de vaccine variolic și la metode de utilizare a acestora în tratamentul tumorilor maligne.
- Invenția se explică prin desenele din fig. 1-fig. 30, care reprezintă:
- fig. 1A-C, (A) pentru virusul WR. Δ C12L – selectivitatea pentru tumorile *in vivo*, comparativ cu virusul WR parental. Șoarecii C57BL/6, purtători de tumori CMT-93, au fost tratați *i/v* cu 5e8 PFU de virusuri și șoarecii au fost sacrificați la interval predeterminate de timp după tratament. PFU viral au fost cuantificate în diferite țesuturi post mortem după omogenizare. (B) Efecte antitumorale îmbunătățite ale WR. Δ C12L. Șoarecii C57BL/6, purtători de tumori subcutanate CMT-93, au fost tratați *i/v* cu o singură doză (1e8 PFU) de virus și s-a urmărit supraviețuirea (definită ca timp până când volumul tumorii atinge 1000 mm³, determinat prin măsurare cu șubler). (C) Producția de IFN- Γ (ca un marker al producției de celule T efector) din splenocite, recuperate de la șoarecii tratați în prealabil cu virusul indicat și după expunerea *ex vivo* cu WR.
- fig. 2A-E, deglicozilarea învelișului virusului variolic. (A) Imunoblotarea, care arată deglicozilarea proteinei învelișului virusului variolic. Virusurile WR purificate și WR deglicozilat

au fost distruse și supuse blotting-ului folosind un anticorp anti-B5R. Reducerea masei de proteină corespunde deglicozilării proteinei B5R. (B) Deglicozilarea învelișului virusului nu exercită nici un efect asupra infectivității virusului variolic. Diferite linii de celule tumorale murine au fost infectate cu TK sau cu versiunea sa deglicozilată la MOI 1 și exprimarea luciferazei virale a fost măsurată la 3 ore după infectare prin imagistică bioluminescentă. Valorile medii +SD din 3 experimente independente sunt reprezentate pe grafic. (C) Deglicozilarea reduce activarea TLR2 *in vitro*. Celulele HEK293, care exprimă TLR2 murine au fost transfectate cu pNiFty (o plasmidă reporter pentru transmiterea semnalului TLR). Peste 24 de ore după transfecție, celulele au fost infectate la MOI 1 cu WR sau WR deglicozilat și activarea TLR2 a fost cuantificată peste 24 de ore după infectare prin imagistică bioluminescentă. Sunt afișate valorile medii +SD din 3 experimente independente (efectuate în cvadruplicat). (D) Fosforilarea STAT3 este epuizată în limfocitele splenice ale șoarecilor, injectați cu virusul variolic deglicozilat. Conținutul procentual de pSTAT1 -pSTAT3+ în limfocite a fost determinat prin citometrie de flux. PBS și PAM (3) CSK (4) au fost utilizați în calitate de control. Valorile pentru șoareci individuali și mediile ±SEM pentru diferite tratamente sunt reprezentate grafic. (E) Deglicozilarea membranei virusului vaccinului variolic amplifică expresia genelor virale în tumori *in vivo*. Șoarecii BALB/c, purtători de xenogrefe subcutanate de celule Renca (adenocarcinom renal murin), au fost aleatoriu randomizați și li s-a injectat o singură doză intravenoasă de 1×10^8 PFU per șoarece de TK- sau TK- deglicozilate. Cinetica expresiei genelor virale în interiorul tumorii a fost monitorizată prin imagistica bioluminescentă pentru expresia luciferazei virale. Valorile medii pentru 12...13 animale +SD sunt reprezentate grafic. *, $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu PBS sau cu controlul. #, $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK- sau WR. ϕ , $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu PAM (3) CSK (4).

fig. 3A-D, stoparea activării TLR2 prin deglicozilare conduce la accentuarea efectelor terapeutice. (A) Tratarea tulpinii de vaccin variolic WR cu enzima sialidaza (DS) rezultă cu pierderea activării căii de semnalizare TLR2 într-un model *in vitro* (activarea NF- κ B în celulele HEK293, transfectate pentru a exprima TLR2). (B) Pentru virusul WR DS este arătată o livrare sistemică îmbunătățită în mod semnificativ în tumorile murine (tumorile subcutanate 4T1 la șoarecii BALB/c cu virusul livrat i/v și exprimarea transgenei virale a luciferazei în tumoare, determinată peste 24 de ore prin imagistica bioluminescentă (notă: pentru țesuturile netumorale nu se relevă deosebiri de absorbție virală). (C) Efectul antitumoral în același model a demonstrat un avantaj terapeutic al virusului DS. (D) Pierderea activării TLR2 (la șoarecii transgenici cu knock out TLR2) după infecție cu vaccin variolic conduce la o inducere semnificativ mai redusă de anticorpi neutralizanți antivirali (anticorp neutralizant, măsurată ca abilitate a diferitor diluții de ser de șoarece, colectate peste 14 zile după tratare cu WR, de a împiedica exprimarea luciferazei transgenice virale după amestecare cu WR. TK-Luc+ și infectarea stratului de celule BSC-1).

fig. 4A-C, (A) diagrama schematică, reprezentând construcția virusului TK-TRIF și diagrama schematică, reprezentând construcția virusului TK-DAI. (B) Analizele ELISA au fost utilizate pentru a determina concentrațiile de TRIF în celule infectate cu TK- și TK-TRIF. (C) Western blot, care prezintă expresia DAI în controlul TK-DAI.

fig. 5A-C, (A) expresia TRIF de la virusul vaccinului variolic amplifică producerea IFN de tip I *in vitro*, chiar și depășind exprimarea în tulpina B18R-. (B) Expresia TRIF amplifică producerea de CTL *in vivo*. (C) Un efect terapeutic amplificat suplimentar *in vivo* după o unică livrare i/v de 1×10^8 PFU de virus la șoarecii BALB/c, purtători de tumori subcutanate Renca.

fig. 6A-D, virusul oncolitic de vaccine oncolitic, care exprimă proteina TRIF murină, amplifică activarea căilor responsabile de TLR și eliberarea citokinelor și chemokinelor proinflamatorii. (A-B) Activarea căilor NF- κ B (A) și IRF3 (B) după infecția cu TK-TRIF și TK-DAI. Testele ELISA au fost utilizate pentru a determina concentrațiile de pIK β și IRF3 în extracte citoplasmice și nucleare, respectiv, de celule 4T1 sau MEF, infectate cu TK-, TK-TRIF sau TK-DAI la MOI 1. Analizele s-au efectuat peste 24 de ore după infecție. Datele au fost obținute în cvadruplicat din 2 experimente independente și reprezentate grafic ca o multiplicitate a modificării, comparativ cu TK- +SD. Linia punctată indică nivelul de activare TK-. (C) Eliberarea de citokine și chemokine *in vitro* după infecție TK-TRIF și TK-DAI. Concentrațiile de IL-6, IP-10, TNF- α și IFN- δ în supernatantul celulelor Renca, 4T1, MC38 și MEF au fost evaluate prin testul Luminex peste 24 de ore după infectare cu TK-, TK-TRIF sau TK-DAI (MOI 1). Datele sunt reprezentate ca multiplicitate a modificării, comparativ cu TK- + SD (2 experimente independente). Linia punctată indică concentrațiile de TK-. (D) Concentrația intratumorală de citokine și chemokine *in vivo*. Șoarecii BALB/c cu xenogrefe subcutanate Renca stabilite au fost aleatoriu randomizați și injectați intravenos cu o singură doză 1×10^8 PFU per șoarece de TK- sau TK-TRIF. Multiplicitatea

modificării, comparativ cu TK- pentru 4...5 șoareci, +SD este reprezentată grafic. Linia punctată indică concentrațiile de TK-. *, $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK-. #, $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK-DAI.

fig. 7A-E, testele ELISA au fost utilizate pentru determinarea concentrației de NF- κ B (A), HMGB1 (B) și HSP-70 (C) în celulele infectate cu TK-, TK-TRIF sau TK-DAI la MOI 1. Analizele au fost efectuate peste 24 ore după infectare. Datele au fost obținute și reprezentate grafic ca multiplicitate a modificării, comparative cu TK- + SD. Linia punctată indică nivelul de activare pentru TK-. Nivelul de celule T helper (D) și celule T reglatoare (E) au fost analizate ca răspuns la infecția cu virusul TK- sau TK-TRIF.

fig. 8A-D, replicarea și activitatea antitumorală a TK-TRIF și TK-DAI. (A) Producția virusurilor TK-TRIF și TK-DAI în celulele tumorale de șoarece. Diferite linii de celule tumorale au fost infectate la MOI 1 și producerea virusului a fost măsurată prin analiza rozetelor la diferite intervale de timp. Randamentul viral a fost evaluat în cvadruplicat pentru fiecare linie celulară, prin efectuarea a două experimente independente. Mediile +SD sunt reprezentate grafic. (B) Citotoxicitatea comparativă a TK-TRIF și TK-DAI. Celulele au fost infectate cu virusurile indicate în doze variind de la 75 până la 0,00025 PFU/celulă. Sunt afișate valorile EC_{50} (MOI, necesară pentru a produce o reducere de 50% din viabilitatea culturii de celule) în ziua 4 după infectare. Patru replici diferite au fost cuantificate pentru fiecare linie celulară și este arătată media pentru fiecare MOI. (C-D) Expresia genelor virale și eficacitatea antitumorală *in vivo*. Xenogrefele de Renca sau MC38 au fost implantate șoarecilor BALB/c sau C57BL/6, respectiv, și șoarecii au fost injectați cu PBS sau 1×10^8 PFU de TK-, TK-TRIF sau TK-DAI prin vena caudală. Expresia luciferazei virale în tumori (C) și volumul tumorilor (D) au fost măsurate la momente de timp indicate. $n = 12-15$ șoareci/grupă + SE. *, $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu PBS. #, $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK-. ϕ , $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK-DAI.

fig. 9A-F, (A) expresia genelor virale TK-TRIF și TK-DAI în celulele tumorale de șoarece. Diferite linii de celule tumorale au fost infectate la MOI 1 și exprimarea luciferazei virale a fost cuantificată prin imagistica bioluminescentă la diferite momente de timp. Expresia luciferazei a fost evaluată în cvadruplicat pentru fiecare linie de celule, prin efectuarea a două experimente independente. Mediile +SD sunt reprezentate grafic. (B) Procentul de celule apoptotice după infectare cu TK-TRIF și TK-DAI. O grupă de linii de celule tumorale de șoarece a fost infectată cu virusurile indicate folosind MOI 1. Peste 48 de ore după infectare, procentul de celule necrotice și apoptotice a fost determinat prin citometrie în flux prin colorare cu PI și anexină V. Au fost efectuate două experimente independente și mediile +SD sunt reprezentate grafic. (C-D) TK-TRIF îmbunătățește eficacitatea antitumorală a TK-GMCSF într-un model semiortotopic pe glanda mamară. Celulele 4T1 au fost implantate în stratul adipos al glandei mamare la șoarecii BALB/c și după stabilirea tumorii, șoarecii au fost injectați cu PBS sau 1×10^8 PFU de TK-, TK-TRIF sau TK-GMCSF prin vena caudală. Expresia luciferazei virale din interiorul tumorilor (C) și volumul tumorii (D) au fost măsurate la momente de timp indicate. $n = 12...14$ șoareci/grupă +SE. (E-F) TK-TRIF îmbunătățește supraviețuirea șoarecilor purtători de tumori. Șoarecii BALB/c sau C57BL/6, purtători de xenogrefe Renca (E) sau MC38 (F), respectiv, au fost tratați ca în fig. 3d și punctul final s-a stabilit la un volum al tumorii de ≥ 750 mm³. Curbele de supraviețuire Kaplan-Meier sunt reprezentate grafic. $n = 12-15$ șoareci/grupă. *, $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu PBS sau control. #, $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu lotul cu -. ϕ , $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK-GMCSF. Ω , $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK-DAI.

fig. 10A-E, (A) variațiile masei corporale după administrarea intravenoasă a TK-TRIF deglicozilată. Șoarecilor BALB/C l-a fost injectat intravenos 1×10^8 PFU per șoarece de TK-, TK-TRIF sau TK-TRIF deglicozilată. Administrarea tamponului fosfat-salin (PBS) a fost utilizată în grupa de control. Șoarecii injectați cu TK- au prezentat o reducere depășind 10% din masa corporală în ziua 6 după injectarea virusului, în timp ce șoarecii la care s-a injectat TK-TRIF și TK-TRIF deglicozilată au prezentat un profil de masă, similar cu profilul pentru șoarecii la care s-a injectat PBS. (B) Expresia genelor virale *in vivo* după administrarea TK-TRIF deglicozilată. Tumorile RENCA au fost implantate la șoarecii BALB/c și șoarecii le-a fost injectat PBS sau 1×10^8 PFU de TK-, TK-TRIF sau TK-TRIF deglicozilată prin vena caudală. Expresia luciferazei virale din interiorul tumorilor a fost măsurată la momentele de timp indicate. $n = 12...14$ șoareci/grupă +SE. (C-D) Supraviețuirea șoarecilor purtători de tumori, tratați cu TK-TRIF deglicozilată. (C-D) Xenogrefele Renca (C) sau MC38 (D) au fost stabilite la șoarecii BALB/C sau C57BL/6, respectiv, și au fost tratați cu o singură doză intravenoasă de 1×10^8 PFU de

virusuri indicate sau PBS. Punctul final a fost stabilit la volumul tumorii de $\geq 750 \text{ mm}^3$ și curbele de supraviețuire Kaplan-Meyer sunt reprezentate grafic. $n = 12 \dots 15$ șoareci/grupă. (E) TK-TRIF deglicozilată îmbunătățește supraviețuirea, comparativ cu grupa tratată cu TK-GMCSF. Șoarecii (BALB/c purtători de tumori subcutanate RENCA) au fost tratați prin injecție în vena caudală a PBS sau a unei doze unice de 1×10^8 PFU de TK-GMCSF sau TK-TRIF deglicozilată ($n = 10 \dots 12$ per grup). Curbele de supraviețuire Kaplan-Meyer au fost obținute după stabilirea unui punct final $\geq 750 \text{ mm}^3$ pentru volumul tumorii. *, $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu PBS. #, $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu lotul cu TK-. ϕ , $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK-deglicozilată. Ω , $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK-TRIF. ψ , $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK-GMCSF.

fig. 11A-F, combinarea de membrană deglicozilată și de exprimare TRIF murină stimula marcant răspunsurile celulare antitumorale și prezenta o eficacitate antitumorală înaltă. (A-B) Răspunsurile imune celulare la virusul vaccinului variolic și celulele tumorale au fost evaluate prin testul ELISpot IFN- γ . În ziua 7 după administrarea virusului, splinele au fost recoltate de la șoarecii injectați intravenos cu 1×10^8 PFU de virusuri indicate sau de PBS (șoareci BALB/c, purtători de xenogrefe Renca) și a fost estimat numărul de CTL, care recunosc virusul vaccinului variolic sau (A) sau celule Renca (B). Sunt prezentate valorile pentru șoareci individuali și mediile $\pm$ SEM. (C) Titrele de anticorpi neutralizanți în ser. Analiza neutralizării s-a efectuat pentru a determina nivelele de anticorpi împotriva virusului variolic pentru șoarecii, l-a care s-au injectat 1×10^8 PFU TK-, TK-TRIF sau TK-TRIF deglicozilată. Titrele de Nab au fost determinate prin cea mai mare diluție a serului care a condus la cel puțin 50% de inhibare a infecției. Valorile pentru șoareci individuali și mediile $\pm$ SEM sunt reprezentate grafic. (D-E) Activitatea antitumorală *in vivo* în diferite modele. BALB/c, care poartă xenogrefe de tumori Renca (D) sau C57BL/6 purtând xenogrefe de tumori MC38 (E) au fost tratați intravenos cu o doză unică de virusuri indicate (1×10^8 UFP/șoarece). Creșterea tumorii a fost urmărită prin măsurări cu șublerul. Sunt prezentate mediile pentru $12 \dots 15$ șoareci per grupă $\pm$ SE. (F) Pentru TK-TRIF deglicozilată s-a înregistrat o activitate antitumorală mai mare, decât pentru TK-GMCSF. Șoarecilor BALB/c, purtători de xenogrefe RENCA, le-a fost injectată intravenos o doză de 1×10^8 PFU/șoarece de TK-GMCSF sau TK-TRIF deglicozilată. Volumul relativ al tumorii după administrarea virusului este reprezentat grafic ($n = 12 \dots 15$ șoareci/grupă $\pm$ SE). *, $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu PBS. #, $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK-. ϕ , $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK-deglicozilată. Ω , $P < 0,05$ concludentă, comparativ cu grupa cu TK-TRIF.

fig.12A-C, (A) pentru tulpina de vaccin variolic WR cu tratare cu DS, deleția C12L și exprimarea mTRIF (denumită UPCI-1812) sunt arătate efectele antitumorale îmbunătățite la șoarecii BALB/c, purtători de tumori 4T1, comparativ cu tulpinile clinice actuale WR.TK-GM-CSF+ (în calitate de model al tulpinii JX-594). Pentru virusul UPCI-1812 este prezentată, de asemenea, creșterea producerii de citokine imunoterapeutice în micromediul tumorii, inclusiv (B) de gamma interferon și (C) de interleucină-12.

fig. 13A-C, (A) supraviețuirea diferitor linii de celule tumorale a fost analizată după infecția cu virus TK-. (B) Expresia genelor virale în tumorile, derivate de la șoarecii BALB/C și C57BL/6 după implantarea anumitor linii de celule tumorale, și volumul tumorilor obținute de la BALB/c și C57BL/6 după implantare cu anumite linii de celule tumorale și infecția cu TK-. (C) Detectarea Sp6 fosforilată în celulele mieloidale în tumorile, derivate de la șoarecii BALB/c și C57BL/6 după implantare cu anumite linii de celule tumorale și tratare cu TK-.

fig. 14A-B, (A) șoarecii care nu poartă tumori sau care poartă tumori subcutanate derivate din celule LLC sau B16 ($50 \dots 100 \text{ mm}^3$) au fost tratați cu o singură injecție intravenoasă de 1×10^7 PFU WR.TK-. Șoarecii ($n = 3$ per grupă și perioada de timp) au fost sacrificați în perioadele de timp indicate și au fost prelevate splinele și serul. Splenocitele au fost fixate rapid și permeabilizate (conform protocolului inventatorilor prezentei invenții, publicat anterior) și apoi colorate pentru phosflow pentru a detecta activarea căilor de semnalizare. Aceasta s-a realizat pentru celule T reglatoare (CD3+ CD4+ CD8-FoxP3+ CD25+) cu analiza pSTAT5, pS6 și Ki67; pentru celulele T CD4 (CD3+ CD4+ CD8- FOXP3-) cu analiza pS6, Ki67, CD44 și CD62L și pentru celulele T CD8 (CD3+ CD4-CD8+ FoxP3-) cu analiza pS6, Ki67, CD44 și CD62L. (B) Nivelurile de anticorpi neutralizanți antivirali au fost de asemenea verificate în ser.

fig. 15A-B, (A) concentrația de celule T reglatoare și de celule MDSC în diferite modele de tumori la șoarecii infectați cu TK-. (B) Concentrația de celule T reglatoare, celule MDSC și de celule T CD8+ în modele de tumori 4T1 și MC38 la șoarecii infectați cu TK-.

fig. 16A-B, (A) metodele de selectare pentru detectarea MDSC (stânga) și celulele T și T-reg (dreapta) pentru splenocite sau celulele, recuperate din tumori dezagregate. (B) Nivelurile de MDSC și T-reg în splină sunt prezentate pentru șoareci purtători de tumori diferite.

fig. 17A-C, (A) pentru tulpina de vaccin variolic TK- este arătată capacitatea foarte redusă de a crește supraviețuirea mediană (comparativ cu controlul cu PBS) în modele de tumori la șoarecii, care prezintă un nivel ridicat de MDSC la momentul inițial. De asemenea, terapia TK- virală poate reduce nivelul de (B) T-reg în tumorile tratate, dar nu are nici un impact asupra nivelurilor de MDSC (C).

fig. 18, analiza răspunsului imun la șoareci cu celule implantate de tumori MC38 după tratare cu tulpini imunogene de vaccin variolic, GM-CSF, WR.TK-GM-CSF, WR.B18R-IFN α +, WR.B18R-IFN β + și WR.B18R-IFN γ + în comparație cu răspunsul imun provocat de infecție cu TK-.

fig. 19, analiza răspunsului imun la șoareci cu celule implantate de tumori 4T1 după tratare cu tulpini imunogene de vaccin variolic, GM-CSF, WR.TK-GMCSF și WR.B18R-IFN β + în comparație cu răspunsul imun provocat de infecție cu TK-.

fig. 20, exprimarea COX2 și HPGD după exprimarea WR.TK-HPGD sau tratare cu inhibitorul Cox 2, celecoxib. Beta-actina a fost detectată ca un control de aplicare. Exprimarea PGE2 a fost determinată în celule RENCA după infecția cu WR.TK-HPGD sau WR TK- sau tratare cu celecoxib.

fig. 21A-D, expresia HPGD de la virusul oncolitic de vaccin variolic a redus cantitatea de MDSC în tumoare și a sensibilizat tumorile restante la terapia virală. (A) Efectul expresiei HPGD asupra nivelurilor de T-reg și MDSC în tumori. Șoarecii purtători de tumori Renca au fost tratați cu injecții intratumorale cu o doză mică (1×10^7 PFU) de virus indicat și șoarecii erau sacrificați în perioadele de timp indicate, tumorile erau recuperate, dezagregate și analizate prin citometrie de flux, ca și mai înainte. Expresia HPGD reduce nivelurile de MDSC și T-reg (* $p < 0,05$, comparativ cu controlul). (B) Activitatea terapeutică amplificată a WR.TK-HPGD+. Șoarecii purtători de tumori subcutanate Renca sau MC38 au fost tratați cu o singură injecție intratumorală de PBS sau 1×10^7 PFU sau WR.TK- sau WR.TK-HPGD+ și creșterea ulterioară a tumorii a fost urmărită prin măsurarea cu un șubler ($n = 15$ per grupă; WR.TK- HPGD+ concludent ($p < 0,05$) reținea creșterea tumorii din ziua a 3 (RENCA) sau ziua a 7 (MC38) , comparativ cu WR.TK-, și a condus la 3 răspunsuri complete pentru RENCA și 2 pentru MC38. Nici pentru un șoarece din orice altă grupă nu este arătat CR). (C) Compararea creșterii tumorii și expresiei genelor virale în tratamentul cu WR.TK-HPGD+. Creșterea tumorii la șoareci individuali cu tumori Renca și după tratare cu WR.TK-HPGD+ este reprezentată grafic, comparativ cu controlul cu PBS (bara gri) și se împarte în cei cu răspuns bun (linie continuă) și cu cel mai bun răspuns (linie punctată). Semnalul bioluminescenței (expresia genelor virale) din tumoare în ziua 1 și 5 s-a normalizat după volumul tumorii și s-a demonstrat atât pentru cei cu răspuns bun, cât și pentru cei cu cel mai bun răspuns. (D) Expresia HPGD nu a redus expresia genelor virale. Este prezentată expresia genei luciferazei virale în interiorul tumorii peste 24 de ore după tratare cu WR.TK sau WR.TK-HPGD +.

fig. 22, volumul tumorii în funcție de zile după tratamentul cu control cu PBS (CTL, cerc), negativ după timidinkinaza Western Reserve VV (WR TK-; pătrate) sau negativ timidinkinaza (TK) Western Reserve VV, purtătoare de HPGD (WR TK- HPGD, triunghiuri) (HPGD reprezintă echivalentul murin de proteină 15-PGDH umană).

fig. 23A-D, procentul de MDSC în (A) splina șoarecilor infectați cu WR TK-; (B) splina șoarecilor infectați cu WR TK- HPGD; (C) tumoarea șoarecilor infectați cu WR TK-; și (D) tumoarea șoarecilor infectați cu WR TK- HPGD.

fig. 24A-D, expresia HPGD amplifică răspunsul imun și modifică transportul de celule imune la tumoare. (A) Profilul citokinelor și chemokinelor în tumoare după diferite tratamente. Șoarecii purtători de tumori Renca au fost tratați, cum a fost indicat, cu 1×10^7 PFU de diferite tulpini virale IT și sacrificați peste 3 zile. Omogenatele tumorale au fost analizate cu Luminex pentru cuantificarea diferite citokine și chemokine (* $p < 0,05$). (B) Răspunsul anti-tumoral CTL crește la expresia HPGD. În splenocitele, colectate de la șoarecii purtători de tumoare RENCA peste 7 zile după tratamentele menționate, au fost cuantificate răspunsurile antitumorale CTL, determinate prin ELISPOT (* $p < 0,06$). (C) Modificările sistemice ale nivelurilor de chemokine după diferite tratamente. În serul, colectat de la șoarecii purtători de tumori RENCA peste 3 zile după tratamentele menționate, au fost cuantificate nivelurile de chemokine prin ELISA ($p < 0,05$). (D) Celulele imune activate ținesc preponderent tumorile, infectate cu virusul care exprimă HPGD. Șoarecilor le-au fost implantate tumori bilaterale RENCA și când acestea atingeau 50-100

mm³, șoarecilor le-au fost injectate 1x10⁷ PFU WR.TK- pe un flanc și WR.TK-HPGD+ pe flancul opus, peste 24 de ore 1x10⁷ celule NK T (CIK) activate și marcate Cy5.5 au fost livrate prin injecție în vena caudală. Peste 24 de ore pentru șoareci au fost primite imaginile prin bioluminescență (expresia genelor virale) și fluorescență (transportul de celule T NK la tumori) (*p<0,05). Este prezentat un exemplu reprezentativ de imagistică fluorescentă.

fig. 25, expresia COX2 în tumorile infectate cu WR.TK-, comparativ cu tumorile netratate.

fig. 26A-B, (A) supraviețuirea diferitor linii celulare după infecție cu TK-. (B) Producerea virusului și expresia genelor virale TK- în diferite linii de celule tumorale.

fig. 27, expresia genelor virale în modele, infectate cu TK-, de tumori MC-38, LLC și AB12 la șoareci peste 4 zile sau 5 zile după infecție.

fig. 28, creșterea tumorii în funcție de zile după tratamentul cu PBS sau infecție cu WR.TK-TRIF+- deglicozilată (UPCI-1812), Western Reserve TK-, purtătoare de HPGD (VV-HPGD) sau UPCI-1812 în combinație cu expresia HPGD.

fig. 29, producerea de EEV ameliorat (mutația A34R K151E) conduce la un nivel mai redus de anticorpi neutralizanți antivirali (14 zile de la livrarea IP a WR sau EEV).

fig. 30, domeniile TRIF. În secvența aminoacidică TRIF umană există trei domenii legând TRAF și domeniul RHIM, care leagă RIP1.

Pentru claritatea descrierii, și nu pentru a limita, descrierea detaliată a invenției este divizată în următoarele subcapitole:

- (I) mutațiile virale ale carcasei virale;
- (ii) modificarea glicozilării virale;
- (iii) modificarea, care stimulează răspunsul celulelor T;
- (iv) modificarea, care inhibă imunosupresia;
- (v) modificarea, care îmbunătățește răspândirea și activitatea virusului;
- (vi) virusuri modificate;
- (vii) metode de tratament; și
- (viii) kituri.

Termenul "omologie", în contextual prezentei invenții, se referă la gradul de omologie între secvențele de acizi nucleici sau secvențele aminoacide, cum este definit cu utilizarea metodelor cunoscute în domeniu, în calitate de exemple nerestrictive, de software, cum ar fi BLAST sau FASTA.

Mutații ale carcasei virale

În anumite realizări nelimitative ale invenției, VV conține una sau mai multe mutații ale genomului său, care favorizează replicarea virusului într-o celulă de cancer și/sau care amplifică inducerea unui răspuns imun al limfocitelor T citotoxice (CTL). O mutație poate reprezenta o inserție, deleție sau substituție a unui sau mai multor acizi nucleici ai virusului nativ.

În realizări particulare nelimitative, mutația conduce la reducerea exprimării proteinei care leagă funcțional interleucina-18 ("IL-18BP"). Ca exemple nelimitative, (i) mutația poate avea ca rezultat o proteină cu legare mai slabă la IL-18, decât proteina nativă VV; (ii) mutația poate conduce la exprimarea unei proteine trunchiate cu o activitate funcțională redusă sau absentă sau (iii) mutația poate șterge gena IL-18BP. Într-un anumit exemplu nelimitativ mutația poate fi o deleție C12L (de exemplu, (Symons et al., J. Gen.Virol. 83, 2002, p. 2833-2844). În anumite variante de realizare deleția C12L poate reprezenta o eliminare totală sau parțială a C12L. În calitate de exemplu nerestrictiv, o eliminare parțială a C12L poate include o mutație, care conduce la eliminarea cel puțin a aproximativ 10%, cel puțin a aproximativ 20%, cel puțin a aproximativ 30% sau cel puțin a aproximativ 40% sau mai mult din secvențele aminoacide ale proteinei C12L.

În alte exemple de realizare nelimitative, carcasa virală poate conține, separat sau adițional la una sau mai multe mutații în (incluzând deleția) în acidul nucleic care codifică IL-18BP, descris mai sus, o mutație în acidul nucleic care codifică B8R (proteina de legare a IFN gamma, (Symons J.A., Alcamì A., Smith G.L. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. Cell 81, 1995, p. 551-60), B18R (proteina de legare a IFN tip I, de exemplu, (Colamonici et al., J. Biol. Chem. 270(27), 1995, p. 15974-15978)), A35R (inhibitor al prezentării MHC II, de exemplu, (Rehm et al. Virology. 397(1), 2010, p. 176-186; Roper et al. J. Virol. 80(1), 2006, 306-313)), B15R (proteina de legare a IL-1β, de exemplu, (Alcamì et al. Cell. 71(1), 1992, p. 153-167), Chemokine binding proteins (B29R, G3R, H5R), STAT1 inhibitor (H1L); dsRNA of PKR inhibitors such as E3L)), proteinele de legare a chemokinei (B29R, G3R, H5R), inhibitorul STAT1 (H1L); inhibitorii ARNdc sau PKR, cum ar fi E3L (de exemplu, (Chang et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 89(11), 1992, p. 4825-4829)) sau K3L (de exemplu, (Davies et al. J. Virol. 67(3), 1993, p. 1688-1692; Langland et al. Virology. 299(1),

2002, p.133-141)); proteinele similar Bcl-2 (cum ar fi N1, N2, B14, F1, C6, A46 și K7), sau o combinație a acestora.

Modificarea glicozilării virale

În anumite variante nelimitative de realizare a invenției VV este tratat cu un agent care modifică glicozilarea. De exemplu, în celula producătoare de VV poate fi administrat un inhibitor de glicozilare și/sau ea poate fi cultivată în prezența unui inhibitor de glicozilare, sau VV poate fi tratat cu un agent care reduce sau modifică glicozilarea. În variante concrete de realizare VV poate fi supus unui tratament cu acid pentru a reduce glicozilarea virusului. În anumite variante de realizare VV, conform prezentei invenții, poate fi produs într-o linie celulară care nu are activitate de glicozilare, de exemplu, datorită mutațiilor în una sau în mai multe enzime de glicozilare.

În variante concrete de realizare VV, tratat cu un agent care reduce sau elimină, sau modifică glicozilarea, de exemplu, un virus deglicozilat, poate avea mai puțin de aproximativ 90%, mai puțin de aproximativ 80%, mai puțin de aproximativ 70%, mai puțin de aproximativ 60%, mai puțin de aproximativ 50%, mai puțin de aproximativ 40%, mai puțin de aproximativ 30%, mai puțin de aproximativ 20% sau mai puțin de aproximativ 10% din glicozilarea unui VV, care nu a fost tratat cu agent care modifică glicozilarea.

În variantele concrete nerestrictive VV, conform prezentei invenții, poate fi tratat cu o enzimă sialidaza, care reduce cantitățile de reziduuri sau elimină reziduurile de acid sialic de pe suprafața virusului (de exemplu, de înveliș). În exemplele de realizare nelimitative VV este tratat cu o enzimă sialidaza înainte de administrare la un pacient. Într-o variantă concretă nelimitativă enzima sialidaza reprezintă sialidaza A (Glyko Sialidase A, cod WS0042), de exemplu, ca parte a kitului pentru deglicozilare enzimatică Glycopro (Cod de produs: GK80110, Prozyme). În anumite realizări VV poate fi tratat cu sialidază A în combinație cu N- și O-glicanaze. Alte enzime, care elimină acidul sialic sau scindează reziduurile de glicozil de la virus, pot fi, de asemenea, utilizate în prezenta invenție, incluzând, dar nefiind exhaustive, neuraminidazele, PNG-azele (de exemplu, PNGază A sau PNGază F), galactozidaza β 1-4, β -v-acetilglucozaminidaza sau utilizarea unor tratamente chimice, cum ar fi b-eliminarea sau hidroliza alcalină sau hidrazinoliza.

Fără legătură cu o anumită teorie, se presupune, că reducerea glicozilării, de exemplu prin tratarea virusului vaccinului cu sialidază, reduce activarea TLR2 și, astfel, întârzie activarea sistemică a sistemului imunitar în timpul perioadei de livrare a virusului și/sau reduce producerea de anticorpi de neutralizare virală.

Modificări, care stimulează răspunsul celulelor T

În variante concrete nerestrictive de realizare a invenției VV este modificat pentru a include unul sau mai mulți acizi nucleici, care codifică peptida sau proteina care stimulează răspunsul celulelor T. În anumite realizări peptida sau proteina, care stimulează răspunsul celulelor T poate stimula exprimarea unei sau a mai multor citokine proinflamatorii. De exemplu, și fără restricții, citokinele proinflamatorii pot include IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , CCL5 și IP-10.

Exemplele nelimitative de peptide sau proteine, care stimulează răspunsul celulelor T includ: adaptorul conținând domeniul Toll/IL-1R, care induce IFN- β ("TRIF") sau un domeniu funcțional al acestuia. În anumite realizări nelimitative acidul nucleic poate codifica TRIF uman având o secvență de aminoacizi, cum este indicat în UniProtKB Nr. Q8IUC6, sau o secvență de aminoacizi cel puțin în aproximativ 90%, cel puțin în aproximativ 95% sau cel puțin în aproximativ 98% fiind omoloagă ei, sau TRIF murin având o secvență de aminoacizi, cum este indicat în UniProtKB Nr. Q80UF7, sau o secvență de aminoacizi cel puțin în aproximativ 90%, cel puțin în aproximativ 95% sau cel puțin în aproximativ 98% fiind omoloagă ei.

În variante concrete nerestrictive de realizare a prezentei invenții acidul nucleic poate codifica unul sau mai multe domenii TRIF, cum este prezentat în fig. 30. În anumite variante de realizare acidul nucleic, care codifică o peptidă sau o proteină, care stimulează răspunsul celulelor T, de exemplu, TRIF, pot fi clonate în locusul genei timidinkinazei (TK) a virusului, cum este prezentat în fig. 4A. Acidul nucleic, care codifică o peptidă sau o proteină, care stimulează răspunsul celulelor T, poate fi funcțional legat cu orice promotor care poate conduce la exprimarea acidului nucleic. Cum este utilizat în acest context, "funcțional legat" înseamnă, că un promotor este într-o locație și/sau orientare funcțional corectă în raport cu o secvență de acid nucleic pentru a controla inițierea transcripției și/sau expresia acestei secvențe. În variante concrete de realizare promotorul reprezintă un promotor al virusului vaccinului variolic și/sau un promotor virusului sintetic al vaccinului variolic. În anumite variante de realizare promotorul reprezintă promotorul pSE/L al virusului sintetic al vaccinului variolic. În anumite realizări acidul nucleic, care codifică o peptidă sau o proteină, care stimulează răspunsul celulelor T este funcțional legat cu promotorul viral p7.5.

În alte realizări nelimitative acidul nucleic poate codifica factorul de stimulare a coloniilor de granulocite-macrofage ("GM-CSF"), IL-12, IFN- γ sau IL-18. În anumite realizări mai mult de un astfel de acid nucleic poate fi incorporat în VV.

Modificări care inhibă imunosupresia

5 În variante concrete nerestrictive de realizare a prezentei invenții VV este modificat pentru a include unul sau mai mulți acizi nucleici, care codifică o peptidă sau o proteină, sau acizi ribonucleici sau micro-ARN, care inhibă sau reduc imunosupresie. Exemplele nelimitative de măsurări ale imunosupresiei includ: nivelul de celule supresoare derivate din mieloide ("MDSC"); nivelul macrofagelor M2 și nivelul celulelor T helper, comparativ cu celulele T

10 reglatoare supresoare.
În variante concrete de realizare a prezentei invenții una sau mai multe peptide sau proteine, care inhibă sau reduc imunosupresia, pot conduce la o exprimare redusă a unei sau mai multor chemokine supresive, cum ar fi, dar nefiind exhaustivă, CXCL12. În variante concrete de realizare a invenției una sau mai multe peptide sau proteine, care inhibă sau reduc imunosupresia, pot

15 conduce la expresia crescută a unei sau mai multor chemokine imunoactive, cum ar fi, dar nefiind exhaustive, CXCL9, CXCL10 și CCL5.
În următoarele exemple de realizare nelimitative virusul imuno-oncolitic al prezentei invenții poate fi administrat împreună cu un agent care inhibă sau reduce numărul de MDSC, incluzând, de exemplu, dar nefiind exhaustivi, un anticorp care țintește markerul suprafață MDSC, cum ar fi

20 anticorpul anti-CD33 sau regiunea variabilă a acestuia; un anticorp anti-CD11b sau regiunea variabilă a acestuia; un inhibitor al COX2, de exemplu, celecoxib; sunitinib și/sau acidul transretinoic complet (Falkner & Moss. J. Virol. 64(6), 1990, p. 3108–3111).

Modificări care îmbunătățesc răspândirea și activitatea virusului

În variante concrete nerestrictive de realizare a prezentei invenții VV este modificat pentru a

25 îmbunătăți răspândirea și/sau activitatea virusului. În realizări particulare nelimitative VV este modificat pentru a crește numărul formei de virus extracelular cu înveliș produs.

Virusuri modificate

În exemplele de realizare nelimitative prezenta invenție se referă la VV imuno-oncolitic conținând una sau mai multe, sau două sau mai multe, sau trei sau mai multe, sau patru sau mai

30 multe dintre următoarele modificări, cum este descris mai sus:

- (i) mutații ale carcasei virale;
- (ii) modificarea glicozilării virale;
- (iii) modificarea, care stimulează răspunsul celulelor T;
- (iv) modificarea, care inhibă imunosupresia;
- 35 (v) modificarea, care îmbunătățește răspândirea și activitatea virusului.

În exemplele de realizare nelimitative prezenta invenție se referă la VV conținând o modificare a glicozilării virale și una sau mai multe dintre următoarele modificări, cum este descris în subcapitolele de mai sus:

- (i) mutațiile virale ale carcasei virale;
- 40 (ii) modificarea, care stimulează răspunsul celulelor T;
- (iii) modificarea, care inhibă imunosupresia; și/sau
- (iv) modificarea, care îmbunătățește răspândirea și activitatea virusului.

În exemplele de realizare nelimitative prezenta invenție se referă la VV care este tratat cu un agent care reduce nivelul de glicozilare (de exemplu, sialilarea) înainte de administrare la o gazdă

45 și include sau poartă, sau conține una sau mai multe dintre următoarele modificări, cum este descris în subcapitolele de mai sus:

- (i) mutațiile virale ale carcasei virale;
- (ii) modificarea, care stimulează răspunsul celulelor T;
- (iii) modificarea, care inhibă imunosupresia; și/sau
- 50 (iv) modificarea, care îmbunătățește răspândirea și activitatea virusului.

În exemplele de realizare nelimitative prezenta invenție se referă la VV care manifestă o glicozilare redusă (de exemplu, sialilare) în raport cu virusul nemodificat și care include sau poartă, sau conține una sau mai multe dintre următoarele modificări, cum este descris în subcapitolele de mai sus:

- 55 (i) mutațiile virale ale carcasei virale;
- (ii) modificarea, care stimulează răspunsul celulelor T;
- (iii) modificarea, care inhibă imunosupresia; și/sau
- (iv) modificarea, care îmbunătățește răspândirea și activitatea virusului.

În variantele de realizare nelimitative prezenta invenție se referă la VV care este tratat cu un agent, care reduce nivelul de glicozilare, înainte de administrare la o gazdă sau care într-un alt mod reduce glicozilarea în raport cu virusul nemodificat.

5 În exemplele de realizare nelimitative prezenta invenție se referă la VV care este tratat cu sialidază înainte de administrare la o gazdă sau care într-un alt mod posedă o cantitate redusă de reziduuri ale acidului sialic, în raport cu virusul nemodificat.

În exemplele de realizare nelimitative prezenta invenție se referă la VV care include sau poartă, sau conține un acid nucleic care codifică TRIF.

10 În exemplele de realizare nelimitative prezenta invenție se referă la VV care este tratat cu un agent care reduce nivelul de glicozilare înainte de administrare la o gazdă sau care într-un alt mod posedă o glicozilare redusă, în raport cu virusul nemodificat și include suplimentar sau poartă, sau conține un acid nucleic care codifică TRIF sau un domeniu funcțional al acestuia.

15 În exemplele de realizare nelimitative prezenta invenție se referă la VV care este tratat cu un agent care reduce nivelul de glicozilare (de exemplu, sialilarea) înainte de administrare la o gazdă sau care într-un alt mod posedă o glicozilare redusă (de exemplu, sialilare redusă), în raport cu virusul nemodificat și include suplimentar sau poartă, sau conține un acid nucleic care codifică un antagonist al PGE2 (de exemplu, 15-PGDH sau HPGD).

20 În exemplele de realizare nelimitative prezenta invenție se referă la VV care este tratat cu un agent care reduce nivelul de glicozilare (de exemplu, sialilarea) înainte de administrare la o gazdă sau care într-un alt mod posedă o glicozilare redusă (de exemplu, sialilare redusă), în raport cu virusul nemodificat și include suplimentar sau poartă, sau conține un acid nucleic care codifică TRIF sau un domeniu funcțional al acestuia.

25 Modificările descrise mai sus pot fi produse într-un VV (virus al vaccinului variolic), care este cunoscut în domeniu. Exemple nelimitative include: tulpina Western Reserve, tulpina Copenhagen; tulpina Wyeth (NYCBOH); tulpina Tian Tian sau tulpina USSR. Tulpina de bază VV modificată, cum este indicat în prezentul context, poate cuprinde în sine una sau mai multe mutații, comparativ cu tulpina inițială, de exemplu, dar fără a se limita la acestea, una sau mai multe dintre următoarele: deleția în TK (adică, notată aici ca "TK-"); deleția în VGF; deleția SPI-1 și/sau deleția SPI-2.

30 Prezenta invenție se referă la o metodă de reducere a creșterii celulelor de cancer, care prevede administrarea în celula de cancer a pacientului, a unei cantități eficiente de VV imunooncologic, cum este descris mai sus. Reducerea creșterii unei celule de cancer se poate manifesta, de exemplu, prin moartea celulelor sau o rată mai lentă de replicare sau o rată de creștere redusă a tumorii, care conține celule tumorale, sau o supraviețuire prelungită a pacientului, care conține celulele canceroase.

35 "Subiect" sau "pacient", cum este utilizat interschimbabil aici, se referă la un om sau un subiect neuman. Exemplele nelimitative de subiecți neumani include: primat neuman, câini, pisici, șoareci, șobolani, porci de Guineea, iepuri, porci, găini, cai, vaci, capre, oi, etc.

40 Prezenta invenție se referă la o metodă de reducere a creșterii unei tumori care prevede administrarea în tumoare a unei cantități eficiente de VV imunooncologic, cum este descris mai sus. Reducerea creșterii unei tumori se poate manifesta, de exemplu, prin rata de creștere redusă sau o supraviețuire prelungită a unui subiect care conține o tumoare.

45 Prezenta invenție se referă la o metodă de tratare a unui pacient, care are o tumoare malignă, care prevede administrarea la subiect, a unei cantități eficiente de VV imunooncologic, cum este descris mai sus.

"Cantitate eficientă" într-o astfel de metodă include o cantitate, care reduce rata de creștere sau răspândirea cancerului sau care prelungeste supraviețuirea pacientului. În anumite forme de realizare o cantitate eficientă poate include o cantitate, care este suficientă pentru a produce un efect anticanceros la un pacient.

50 "Efectul anticanceros", cum este utilizat aici, se referă la una sau câteva dintre reducerea agregării masei de celule canceroase, reducerea ratei de creștere a celulelor de cancer, reducerea proliferării celulelor canceroase, reducerea masei tumorale, reducerea volumului tumorii, reducerea proliferării celulelor tumorale, reducerea ratei de creștere a tumorii și/sau reducerea metastazelor tumorii.

55 În anumite realizări prezenta invenție se referă la o metodă de producere a unui efect anticanceros la un pacient care are o tumoare malignă, care prevede administrarea la subiect a unei cantități eficiente de VV imunooncologic, cum este descris mai sus.

În exemplele de realizare concrete nelimitative cantitatea de VV administrată (de exemplu, doza) poate varia între circa 10^3 și 10^{11} unități formatoare de plăci (PFU) sau între aproximativ

10⁸ și 10¹⁰ PFU, sau între aproximativ 10⁸ și 10⁸ PFU, sau între aproximativ 10⁸ și 10¹¹ PFU, sau între aproximativ 10⁸ și 10¹¹ PFU (Najjar and Finke. *Frontiers in Oncology*, 3(49), 2013, p. 1-9). Este necesar de menționat, că în prezentul context 10⁸ este exprimat în mod alternativ ca 1eX. În anumite variante de realizare virusul oncolitic poate fi administrat într-o singură doză sau

poate fi administrat în doze multiple. În anumite variante, în care virusul se administrează în doze multiple, dozele pot fi administrate consecutiv, de exemplu, cu intervale zilnice, săptămânale sau lunare, sau pentru satisfacerea unei necesități concrete a subiectului.

În anumite variante de realizare a prezentei invenții virusul imuno-oncolitic poate fi administrat într-o compoziție farmaceutică, în care virusul este prezent într-o cantitate eficientă și în

combinație cu un purtător farmaceutic acceptabil.

"Farmaceutic acceptabil", cum este utilizat aici, include orice purtător care nu interferează cu eficiența activității biologice a ingredientelor active și/sau care nu este toxic pentru pacientul, la care se administrează. Exemple nelimitative de purtători farmaceutici adecvați include: soluții de tampon salin-fosfat, apă, emulsii, cum ar fi emulsii ulei/apă, diferite tipuri de agenți de umectare și soluții sterile. Alte exemple nelimitative de purtători compatibili farmaceutici pot include: geluri, materiale matrice bioadsorbabile, elemente de implantare cu conținut de VV oncolitic sau orice alt vehicul adecvat, agenți sau materiale de livrare sau de dispersare. Asemenea purtători pot fi formulați prin metode uzuale și pot fi administrați la subiect într-o cantitate eficientă.

VV, conform prezentei invenții, pot fi produse prin metode cunoscute unui specialist în domeniu. În anumite realizări VV poate fi propagat în celule gazdă potrivite, izolat din celulele gazdă și depozitat în condiții care contribuie la stabilitatea și integritatea virusului, astfel încât pierderea de infectivitate de-a lungul timpului este redusă la minimum. De exemplu, VV poate fi păstrat prin congelare sau uscare, cum ar fi prin liofilizare. În anumite realizări înainte de administrare VV stocat poate fi reconstituit (dacă a fost uscat pentru păstrare) și diluat într-un purtător farmaceutic acceptabil pentru administrare.

Virusul oncolitic poate fi administrat la pacient folosind metode standard de administrare. În anumite variante nelimitative de realizare virusul oncolitic poate fi administrat sistemic. În mod alternativ sau suplimentar virusul oncolitic poate fi administrat prin injectare în regiunea cancerului, de exemplu, în locul tumorii. În calitate de exemple nerestrictive, calea de administrare poate reprezenta o administrare prin inhalare, intranasală, intravenoasă, intraarterială, intratecală, intratumorală, intraperitoneală, intramusculară, subcutanată, topică, intradermică, locală-regională, orală sau o combinație a acestora. În anumite variante de realizare virusul oncolitic poate fi administrat pacientului dintr-o sursă implantată în corpul pacientului. În anumite variante de realizare a prezentei invenții administrarea virusului oncolitic poate avea loc prin infuzie continuă pentru o anumită perioadă de timp selectată. În anumite realizări compozițiile farmaceutice pot fi administrate direct în locul unei tumori, de exemplu, prin injectare directă intratumorală.

Cancerle, care pot fi tratate prin terapie cu VV imuno-oncolitic, includ, dar nefiind exhaustive, adenocarcinom, osteosarcom, carcinom de col uterin, melanom, carcinom hepatocelular, cancer mamar, cancer pulmonar, cancer de prostată, cancer ovarian, leucemie, limfom, cancer renal, cancer pancreatic, cancer gastric, carcinom de colon, cancer duodenal, glioblastom multiform, astrocitom și sarcom.

În anumite variante de realizare a prezentei invenții tratamentul cu utilizarea VV imuno-oncolitic, cum este descris mai sus, poate fi utilizat separat sau în combinație cu unul sau mai mulți agenți anti-cancer. "Agent anti-cancer" cum este utilizat aici, poate fi orice moleculă, compus, substanță chimică sau compoziție, care exercită un efect anticanceros. Agenții anti-cancer includ, dar nefiind exhaustivi, agenți chimioterapeutici, agenți radioterapeutici, citokine, inhibitori ai punctelor de control imune, agenți antiangiogeni, agenți care induc apoptoza, anticorpi anti-cancer și/sau agenți împotriva kinazelor ciclin-dependente.

În anumite variante de realizare a prezentei invenții tratamentul cu utilizarea VV imuno-oncolitic poate fi utilizat solitar sau în combinație cu unul sau câțiva agenți imunomodulatori. Un agent imunomodulator poate include orice compus, moleculă sau substanță capabilă de a suprima imunitatea antivirală asociată cu o tumoare sau cu cancer. În anumite realizări ale prezentei invenții agentul imunomodulator este capabil să suprimă imunitatea înăscută și/sau imunitatea adaptivă împotriva virusului oncolitic. Exemplele nelimitative de agenți imunomodulatori include: anticorpi anti-CD33 sau o regiune variabilă a acestuia, un anticorp anti-CD11b sau regiune variabilă a acestuia, un inhibitor al COX2, de exemplu, celecoxib, citokine, cum ar fi IL-12, GM-CSF, IL-2, IFN β și IFN γ și chemokine, cum ar fi MIP-1, MCP-1 și IL-8. În anumite realizări agentul imunomodulator include inhibitori ai punctelor de

control ale sistemului imun, cum ar fi, dar nefiind exhaustive, anti-CTLA4, anti-PD-1, anti-PDL1 și agoniști ai TLR (de exemplu, poli 1:C).

În anumite variante de realizare a prezentei invenții metodele pot include adițional administrarea la subiect a unei cantități eficiente din unul sau mai mulți agenți. În calitate de exemplu nerestrictiv, agentul poate fi un agent anticanceros și/sau un agent imunomodulator, cum este descris mai sus.

Kituri

Prezenta invenție adițional se referă la kituri care furnizează VV imunooncologic, cum este descris mai sus. În anumite realizări un kit, conform prezentei invenții, poate include VV imunooncologic sau o compoziție farmaceutică care conține VV imunooncologic, cum este descris mai sus. În anumite realizări un kit, conform prezentei invenții, poate include unul sau mai multe componente, cum ar fi instrucțiunile de utilizare, dispozitive și reagenți suplimentari și componente, cum ar fi eprubete, containere și seringi pentru realizarea metodelor descrise mai sus. În anumite realizări un kit, conform prezentei invenții, poate include unul sau mai mulți agenți, de exemplu, agenți anticancer și/sau agenți imunomodulatori, care poate fi administrați în combinație cu un VV imunooncologic.

În variante concrete de realizare un kit, conform prezentei invenții, poate include instrucțiuni de utilizare, un dispozitiv pentru administrarea VV imunooncologic la un subiect sau un dispozitiv pentru administrarea unui agent sau compus adițional la un subiect. În calitate de exemple nerestrictive instrucțiunile pot include o descriere a VV imunooncologic și, în mod opțional, alte componente incluse în kit, precum și metodele de administrare, inclusiv metodele de determinare a stării corespunzătoare a subiectului, doza corectă necesară și metoda de administrare potrivită pentru administrarea VV imunooncologic. Instrucțiunile pot include, de asemenea, îndrumări pentru monitorizarea pacientului pe durata perioadei de tratament.

În variante concrete de realizare un kit, conform prezentei invenții, poate include un dispozitiv pentru administrarea VV imunooncologic la un pacient. Oricare din multitudinea de dispozitive cunoscute în domeniu pentru administrarea medicamentelor și compozițiilor farmaceutice pot fi incluse în kiturile prezentei invenții. În calitate de exemple nerestrictive asemenea dispozitive includ un ac hipodermic, un ac pentru administrare intravenoasă, un cateter, un dispozitiv de injectare fără ac, un inhalator și un distribuitor de lichid, cum ar fi o pipetă. În anumite realizări ale prezentei invenții VV imunooncologic pentru administrare sistemică, de exemplu, prin injectare intravenoasă, în kit poate fi inclus un ac hipodermic și o seringă.

Următoarele exemple sunt prezentate pentru a ilustra mai complet descrierea, dar ele nu trebuie considerate ca o limitare a volumului invenției.

EXEMPLUL 1: Efectul mutației carcasi C12L

Virusul vaccinului variolic cu timidinkinază negativă ("TK-") Western Reserve (VV) a fost modificat pentru deleția C12L. Tulpina de vaccin variolic Western Reserve a fost furnizată de la BEI Resources (Manassas, VA) și toate virusurile de vaccin variolic recombinante utilizate sau construite au fost bazate pe această tulpină.

Un virus mutant cu deleție cu lipsa a 40% din ORF C12L a fost construit folosind selecția dominantă tranzitorie (Sampath P et al. Mol. Ther., 21, 2013, 620-628). Celulele au fost infectate cu virusul vaccinului variolic WR de tip sălbatic și simultan transfectate cu o plasmidă, care conține regiunile 3' și 5' ale genei C 12L. Recombinarea a fost lăsată să se producă și s-a utilizat un marker de selecție pentru a determina evenimentele de recombinare. Virusurile au fost titrate prin analiza de formare a plăcilor pe celule BSC-1, au fost izolate și purificate cum s-a descris anterior pentru utilizare *in vivo*.

Șoarecilor C57BL/6 purtători de tumoare CMT-93 li s-au administrat 5×10^8 unități formatoare de placă ("PFU") fie de virus WR nemodificat, sau de virus care transportă deleția C12L (WRΔC12L). Pentru a testa specificitatea virusului pentru tumori, cantitatea de virus în creier, ficat, plămân și tumoare a fost evaluată peste 1, 3 și 10 zile după infectare. Rezultatele, în fig. 1 A, arată că, deși s-au găsit cantități aproximativ echivalente de virusuri WR și WRΔC12L în ficat, plămân și în tumoare peste 1 zi după infectare, peste zece zile foarte puțin virus WRΔC12L a fost detectat în țesutul netumoral, în raport cu cantitatea detectată în tumoare, cu diferență de expresie în tumoare/extratumoral mult mai mică pentru virusul WR nemodificat.

Pentru a evalua efectul mutației C12L asupra supraviețuirii, șoarecii C57BL/6 (achiziționați de la The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), purtători de tumori subcutanate CMT-93, au fost tratați intravenos cu o doză unică 1×10^8 PFU de virus WR sau WRΔC12L și apoi monitorizați. În timp ce toți șoarecii care au primit virusul WR au murit înainte de 60 de zile după infectare, peste 70 de zile 50% din animale la care s-a administrat WRΔC12L erau încă în viață (fig. 1B).

Animalele în primul rând au fost imunizate cu WR sau cu WRAC12L și celulele T de la acești șoareci (sau șoarecii de control) au fost amestecate cu WR și nivelurile de producere de IFN- γ obținute au fost determinate prin ELISA. Rezultatele sunt prezentate în fig. 1C și indică că deleția CI 2L conducea la o mai mare producere de CTL sau de splenocite producătoare de IFN- γ .

5 EXEMPLUL 2. Efectul tratării prin deglicozilare

Pentru a testa efectul modificării glicozilării proteinelor de suprafață virală, WR TK- VV, glicanii N-legați și glicanii simpli O-legați, de exemplu, acidul sialic, au fost eliminați din învelișul viral folosind sialidaza A (glicosialidaza A, Cod WS0042) sau un cocktail de N- și O-glicanaze și sialidază A (kitul pentru deglicozilarea enzimatică Glycopro, Cod produs: GK80110, 10 Prozyme). Metoda nedenantantă de deglicozilare a unui virus reprezenta o colectare de (i) 20 μ l de preparat viral inițial; (ii) adăugarea a 17 μ l de apă deionizată; (iii) adăugarea a 10 μ l de tampon de reacție 5X; (iv) adăugarea a 1 μ l de fiecare dintre N-glicanază, sialidaza A și O-glicanază (sau orice enzimă, utilizată în monoterapie cu 19 μ l de apă deionizată) și (v) incubarea la 37°C timp de 16 ore înainte de utilizare. Deglicozilarea virusului a fost confirmată prin analiză Western blot (fig. 15 2A).

Efectul deglicozilării asupra infectivității virusului a fost evaluată în diferite linii de celule tumorale murine, infectate cu TK- ("WR" sau "WR.TK-") sau cu versiunea lui deglicozilată ("TK-deglic", "WR-deglic" și "DS WR.TK-") cu MOI 1. Liniile celulare HeLa (adenocarcinom de col uterin uman), Bsc-1 (celule de rinichi normale de la maimuță verde), 143B (osteosarcom uman), 20 CV-1 (fibroblaste de rinichi de maimuță verde), Renca (adenocarcinom renal murin) și 4T1 (cancer mamar murin) au fost obținute de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Celulele HEK293-mTLR2 au fost achiziționate de la InvivoGen (San Diego, CA). Liniile celulare MC38 (adenocarcinom de colon murin) și MEF (fibroblaste embrionare murine) au fost, respectiv, livrate de Dr. David Bartlett și Dr. Robert Sobol (University of Pittsburgh Cancer Center). Toate 25 liniile celulare au fost menținute în medii de cultură recomandate conținând 5...10% ser bovin fetal și antibiotice la 37°C, 5% CO₂. Infectivitatea virală a fost determinată prin analiza expresiei genelor virale. Expresia genelor virale a fost măsurată peste 3 ore după infectare prin imagistica bioluminescentă a expresiei luciferazei in vitro. Pentru celulele cultivate s - au adăugat 10 μ l de 30 mg/ml D-luciferină (GoldBio, St Louis, MO) la 1 ml de mediu de cultură. După cum se observă în fig. 2B, deglicozilarea învelișului virusului nu a avut un efect asupra infectivității virusului. 30

Efectul deglicozilării asupra activării TLR2 a fost evaluat într-un sistem model, în care s-a măsurat activarea NF- κ B în celulele HEK293, construite pentru a exprima TLR2 (HEK293/mTLR2) și transfectate cu pMFTy, o plasmidă reporter pentru transmiterea semnalului TLR. pMFTy (plasmida reporter pentru transmiterea semnalului TLR-luciferază) a fost obținută din 35 InvivoGen și transfectată în celulele HEK293/mTLR2 utilizând reactivul de transfecție FuGENE HD (Promega, Madison, WI). Celulele HEK293/mTLR2 au fost infectate la MOI 1 cu WR sau WR deglicozilat și activarea TLR2 a fost cuantificată peste 24 de ore după infectare prin imagistică bioluminescentă. Cum se arată în fig. 2C, deglicozilarea virusului a condus la o activare mai redusă a TLR2 in vitro, comparativ cu virusul, care nu a fost deglicozilat. Mai mult decât atât, 40 cum se poate observa și în fig. 3A, virusul deglicozilat se asocia cu o activare TLR2 semnificativ mai redusă, decât virusul WR.

Pentru virusul deglicozilat s-a constatat, de asemenea, o mai mare absorbție de către tumori. Pentru aceste experimente gena luciferazei sub controlul promotorului pSE/L al virusului sintetic al vaccinului variolic a fost încorporată în virusul vaccinului variolic WR.TK- sau DS 45 WR.TK- ("WR.TK-Luc+" și "DS WR.TK-Luc+", respectiv) și s-a introdus intravenos la șoarecii BALB/c (achiziționate de la The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)) purtători de tumori subcutanate 4T1. Expresia genelor virale în tumori poate fi măsurată prin imagistica bioluminescentă a expresiei luciferazei in vivo. Pentru modelele pe animale o doză de 4,5 mg de D-luciferină a fost injectată intraperitoneal șoarecilor înainte de obținerea imaginilor. Modelele 50 IVIS 2000 (PerkinElmer, Waltham, MA) au fost utilizate pentru obținerea imaginilor și imaginile au fost analizate cu software LivingImage (PerkinElmer).

În fig. 3B se arată că peste 24 de ore după infectare expresia virusului DS WR.TK-Luc+ a fost semnificativ mai înaltă în tumori, în raport cu echivalentul lui glicozilat. Această diferență de absorbție nu a fost observată în țesuturile netumorale. În fig. 3C se arată că infecția cu virusul 55 desializat conduce la un volum mai mic al tumorii. În plus, șoarecii BALB/c cu xenogrefe subcutanate de celule Renca (adenocarcinom renal murin) au fost randomizați și injectați cu o singură doză intravenoasă de 1×10^8 PFU per șoarece de virus TK- sau TK- deglicozilat. Cinetica expresiei genelor virale în interiorul tumorii a fost monitorizată prin imagistica bioluminescentă

pentru expresia luciferazei virale. Cum se arată în fig. 2E, deglicozilarea învelișului viral a amplificat expresia genelor în tumori *in vivo*.

Efectul deglicozilării virusului asupra prezenței limfocitelor pSTAT1-pSTAT3+ a fost analizat la șoarecii C57BL/6, injectați intravenos cu 1×10^7 PFU de virus WR sau WR deglicozilat. Splinele au fost recoltate de la șoarecii C57BL/6 peste 1 oră după injectarea virusurilor menționate și splenocitele au fost izolate, fixate în 1,6% PFA și permeabilizate cu metanol. Analizele imunocolorării intracelulare bicolore au fost realizate utilizând citometrul de flux LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, California). Splenocitele au fost colorate folosind anticorpii PacificBlue anti-pSTAT1 murini și anticorpii AlexaFluor647 anti-pSTAT3+ murini (BD Biosciences). Procentul de limfocite pSTAT1-pSTAT3+ a fost determinat prin citometrie în flux, PBS și PAM(3)CSK(4) fiind utilizați în calitate de control. În fig. 2D se arată că fosforilarea STAT3 a fost epuizată în limfocitele splenice de la șoarecii injectați cu virusul deglicozilat al vaccinului variolic.

Pentru a determina răspunsul imun împotriva virusului *in vivo*, s-au efectuat analize ale anticorpilor neutralizanți. Succint, serul cu conținut de anticorp a fost obținut de la șoarecii tratați, cum este indicat, în ziua 14 după injectarea virusului și diluțiile în serie de ser (începând de la 1/20) au fost utilizate pentru a neutraliza 1000 PFU de virus TK-al vaccinului variolic. 2×10^4 celule HeLa au fost placcate în fiecare godeu pe o placă cu 96 godeuri și infectate cu amestec de ser-virus. În ziua 4 postinfecție plăcile au fost spălate cu PBS și absorbanta a fost cuantificată după colorarea culturilor folosind un kit pentru analiza neradioactivă a proliferării celulare (Promega, Madison, WI). Valorile IC_{50} (diluția serului, necesară pentru neutralizarea virusului vaccinului variolic, capabilă să inducă 50% de inhibare a celulelor) au fost estimate din curbele doză-răspuns prin regresie neliniară standard folosind o ecuație Hill adaptată. Cum este prezentat în fig. 3D, cantitatea de anticorpi neutralizanți împotriva virusului este mai mare la șoarecii C57BL/6 de tip sălbatic, comparativ cu șoarecii care poartă o mutație knock-out TLR2. Respectiv, o activare inferioară TLR2 poate fi asociată cu producere mai redusă de anticorpi anti-virus și un răspuns îmbunătățit antitumoral.

EXEMPLUL 3. Efectul expresiei TRIF

Acidul nucleic, care codifică TRIF murin, a fost introdus în virusul WR.TK- și a fost evaluat efectul asupra celulelor T. TRIF a fost exprimat din locusul timidinkinazei, exprimat din promotorul timpuriu/tardiv p7.5 al virusului vaccinului variolic ("TK-TRIF" sau "WR.TK-TRIF"; fig. 4A). S-a obținut virusul A WR.TK-, care conține acidul nucleic, care codifică DAI murin (DLM-1/ZBP1), exprimat cu p7.5, și clonat în locusul genei timidinkinazei virale ("TK-DAI"; fig. 4A).

ELISA a fost realizată pentru a confirma exprimarea TRIF din virusul TK-TRIF (fig. 4B). Pentru ELISA, kitul pentru ELISA TRIF a fost utilizat pentru a determina concentrația de TRIF în supernatant sau în extractele celulare din celule infectate la un MOI 1 (PFU/celulă) de TK-TRIF. Cum este prezentat în fig. 4B, virusul TK-TRIF exprima în mod specific TRIF, comparativ cu TK-. Western blottingul a fost folosit pentru a confirma expresia DAI din virusul TK-DAI (fig. 4C). Pentru analiza Western blotting, culturile de celule au fost cultivate în plăci cu 6 godeuri și infectate la MOI 5 (PFU/celulă) și peste 24 de ore după infecție extractele de proteină din celulele întregi au fost incubate în tampon pentru liză celulară (Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA) timp de 1 oră la 4°C. Mostrele transparente (15 μg/bandă) au fost separate cu SDS-PAGE în 10% gel și transferate pe o membrană de nitroceluloză. Proteina DAI murină a fost detectată prin imunoblottingul membranelor folosind un anticorp primar policlonal anti-DAI (iepure, Abcam, Cambridge, MA) și un anticorp policlonal anti-iepure conjugat cu HRP (capră, Thermo Scientific, Waltham, MA). Un anticorp monoclonal de șoarece anti-β actină (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) și un anticorp anti-șoarece conjugat cu peroxidază (capră, Thermo Scientific) au fost utilizate pentru imunoblottingul β-actinei în calitate de control de încărcare. Cum este prezentat în fig. 4C, virusul TK-DAI a exprimat în mod specific DAI, comparativ cu TK-.

Cum se arată în fig. 5 A, expresia TRIF a condus la o creștere a producerii de interferon de tip I de limfocite *in vitro*. Exprimarea TRIF amplifică, de asemenea, producerea de CTL *in vivo*, cum se arată prin analiza ELISpot (fig. 5B). Pentru testele ELISpot, splenocitele au fost preparate de la șoareci. Splenocitele au fost amestecate cu celule tumorale sau splenocitele, anterior infectate cu virusul inactivat cu UV al vaccinului variolic la un raport de 5:1. Splenocitele native de la fiecare șoarece au fost utilizate în calitate de control. Pentru analize s-au folosit plăcile cu 96 de godeuri de filtrare cu membrană (EMD Millipore, Billerica, MA), acoperite cu 15 μg/ml de anticorp monoclonal anti-IFN-γ murin AN18 (Mabtech, Inc., Cincinnati, OH). Celulele au fost menținute

timp de 48 ore la 37°C și petele au fost detectate folosind 1 µg/ml de anticorp biotinitat anti-IFN-Γ de șoarece R4-6A2-biotină (Mabtech). Plăcile au fost dezvoltate folosind un kit ABC și un kit de substrat AEC pentru peroxidază (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Petele specifice au fost numărate și analizate folosind un analizator și software ImmunoSpot (CTL, Shaker Heights, OH).

Analiza eliberării citokinelor și chemokinelor *in vitro* și *in vivo* peste 24 de ore de la infectare cu TK-, TK-TRIF sau TK-DAI (MOI 1) a fost realizată printr-un test Luminex. Pentru supernatantele de cultură de celule, s-a utilizat un kit cu o placă 20-plex de citokine murine (5-plex) de la Milipore (Billerica, MA) și un kit 2-plex pentru analiza proteinelor murine de la Panomics (Redwood City, CA). Pentru lizatele tumorale, kitul cu placă de 20-plex de citokine murine de la Invitrogen (Carlsbad, CA) s-a utilizat pentru determinarea concentrațiilor în tumorile recoltate în ziua 4 după administrarea virusului vaccinului variolic. Tumorile au fost omogenizate utilizând eprubetele Lysing Matrix D și dispozitivul FastPrep-24. Așa cum se arată în fig. 6A și C, concentrațiile de pIKKβ, IL-6, IP-10, TNF-α și IF-β au crescut semnificativ după infecție cu TK-TRIF, comparativ cu TK- în diferite linii de celule tumorale. În plus, șoarecii BALB/c cu xenogrefe subcutanate stabilite Renca, care au fost injectați cu o singură doză intravenoasă 1x10⁸ PFU *per* șoarece de TK- sau TK-TRIF, au fost analizați pentru determinarea concentrației intratumorale de citokine și chemokine *in vivo*. Peste 4 zile de la injectare, tumorile au fost recoltate și concentrația de diferite citokine și chemokine a fost determinată în lizatele tumorale prin Luminex sau ELISA. În fig. 6D se arată, că concentrațiile intratumorale de INF-Γ, IL-12, IP-10, TNF-α, IL-1β, GM-CSF și KC au crescut semnificativ ca răspuns la TK-TRIF, comparativ cu TK-.

Activarea căilor NF-κβ și IRF3 au fost analizate după infectare cu TK-TRIF și TK-DAI. Testele ELISA au fost utilizate pentru a determina concentrațiile de pIKKβ și IRF3 în extractele citoplasmice și nucleare, respectiv, de celulele 4T1 sau MEF, infectate cu TK-, TK-TRIF sau TK-DAI la MOI 1. Așa cum se arată în fig. 6A și B, TK-TRIF amplifică activarea căilor de semnalizare NF-κβ și IRF3, cum s-a observat printr-o creștere a concentrației de pIKKβ și IRF3 la exprimare peste 24 de ore de la infectare. În fig. 7A se arată, că fosforilarea NF-κβ a crescut ca urmare a infecției cu TK-TRIF și TK-DAI. Pentru HMGB1 și Hsp-70, care funcționează ca regulatori ai NF-κβ, de asemenea, este înregistrată expresie alterată în urma infecției cu TK-TRIF (fig. 7B și 7C). Prezența celulelor T helper CD4+ și celulelor T citotoxice CD8+ au fost analizate după infectare cu TK-, TK-TRIF. Așa cum se arată în fig. 7D și E, numărul de celule T citotoxice și celule T helper a fost mai mare la șoarecii infectați cu TK-TRIF.

Analiza activității de replicare și antitumorale a TK-TRIF s-a realizat în diferite celule tumorale murine. Diferite linii de celule tumorale au fost infectate cu MOI 1 și producția virusului a fost măsurată prin analiza petelor ELISpot, așa cum este descris mai sus, la diferite intervale de timp. Așa cum se arată în fig. 8A, producția de virus atât TK-TRIF, cât și TK-DAI, a fost semnificativ mai redusă în celulele RENCA rezistente, comparativ cu TK-, dar producția de virus atât TK-TRIF, cât și TK-DAI în celulele MC38 și 4T1a fost la niveluri similare cu TK- {a vedea de asemenea și fig. 9A).

Analizele suplimentare ale expresiei virale în tumori și ale volumelor tumorilor au fost realizate la șoarecii BALB/c sau C57BL/6 implantați cu xenogrefe Renca sau MC38, respectiv, și la șoarecii BALB/c implantați cu xenogrefe 4T1. Șoarecii BALB/c sau C57BL/6 le-a fost injectat PBS sau 1x10⁸ PFU de TK-, TK-TRIF sau TK-DAI prin vena caudală. Pentru modelul semiortotopic 4T1, 2x10⁵ celule 4T1 au fost implantate în stratul adipos al glandei mamare la șoarecii femele BALB/C. În fig. 8C se arată, că expresia genelor virale TK-TRIF și TK-DAI a fost la un nivel mai redus în tumorile din xenogrefe Renca sau MC38, implantate șoarecilor BALB/c sau C57BL/6, respectiv, comparativ cu expresia genelor virale ale TK-. În fig. 9C se arată, că producția virală și expresia virală TK-DAI și TK-TRIF au fost mai reduse în tumori, comparativ cu expresia virală pentru virusul TK- sau TK-, care exprimă GM-CSF ("TK-GMCSF"). Șoarecii BALB/c cu tumori RENCA, implantate subcutanat, au fost tratați i/v cu o doză 1x10⁸ PFU imediat ce tumorile atingeau 50-100 mm³. Virusurile utilizate reprezentau WR.TK- și WR.TK-TRIF+ (sau controlul cu PBS). Răspunsul tumoral ulterior a fost urmărit prin măsurare cu șublerul și o reducere a creșterii tumorii a fost observată la șoarecii infectați cu TK-TRIF (fig. 5C și fig. 8D). Un răspuns similar a fost observat la șoarecii implantați cu tumori MC38 (fig. 8D) și tumori 4T1, comparativ cu tumorile infectate cu TK-GMCSF (fig. 9D).

Citotoxicitatea virusului modificat, comparativ cu TK-, a fost determinată prin efectuarea analizei citotoxicității. Testele de citotoxicitate au fost efectuate prin cultivarea 2x10⁴ celule per godeu în plăci cu 96 de godeuri în DMEM cu 5% FBS. Celulele au fost infectate cu diluții în serie,

incepand de la MOI 75 și, în ziua 4 postinfecție, plăcile au fost spălate cu PBS și densitatea optică a fost cuantificată după colorarea culturilor folosind un kit pentru analiza neradioactivă a proliferării celulare (Promega, Madison, WI). Valorile IC_{50} (PFU per celulă, necesară pentru a produce o inhibare de 50%) au fost estimate din curbele doză-răspuns prin regresie neliniară standard folosind o ecuație Hill adaptată. În fig. 8B este prezentată citotoxicitatea comparativă a TK-TRIF și TK-DAI în celulele, infectate cu virusurile menționate în doze variind de la 750 până la 0,0025 PFU/celulă. Modificarea virusului TK- pentru expresia TRIF sau DAI nu a avut ca rezultat o modificare a citotoxicității, comparativ cu TK-. Determinarea numărului de celule apoptotice prin colorare cu anexină V, cum se arată în fig. 9B, indică, că infecția celulelor Renca și 4T1 conducea la o creștere a numărului de celule apoptotice. Pentru evaluarea apoptozei/necrozei liniilor celulare, celulele au fost infectate la MOI 1 cu virusurile menționate și colorate folosind un kit pentru detecția apoptozei cu anexină VFITC (Abcam, Cambridge, MA) peste 48 de ore după infecție. Analizele au fost efectuate cu utilizarea citometrului de flux Accuri C6 (BD Biosciences).

Experimentele au fost realizate pentru a determina influența TK-TRIF asupra supraviețuirii șoarecilor cu xenogrefe Renca sau MC38, comparativ cu șoarecii tratați cu TK sau PBS. A fost asigurată stabilirea xenogrefelor Renca sau MC38 la șoarecii BALB/C sau C57BL/6, respectiv, și au fost tratați cu o singură doză intravenoasă de 1×10^8 PFU de virusuri menționate sau PBS. Așa cum se arată în fig. 9E și F, TK-TRIF a îmbunătățit semnificativ supraviețuirea, comparativ cu tratamentul cu TK-.

EXEMPLUL 4. Efectele expresiei combinate a TRIF și deglicozilării.

Virusul TK-, modificat pentru a exprima TRIF, așa cum s-a discutat mai sus, a fost deglicozilat ("TK-TRIF deglic") pentru a analiza efectul, care o astfel de combinație ar exercita asupra răspunsurilor antitumorale celulare și eficacității antitumorale a virusului.

Pentru a determina toxicitatea virusului, care exprimă TK-TRIF, a fost analizată masa corporală a șoarecilor BALB/C, injectați intravenos cu PBS în calitate de control sau 1×10^8 PFU *per* șoarece de TK-, TK-TRIF sau TK-TRIF deglicozilat. În fig. 10A se arată, că șoarecii injectați cu TK- au prezentat o pierdere în greutate depășind 10% în ziua 6 după injectarea virusului, în timp ce șoarecii la care s-a injectat TK-TRIF și TK-TRIF deglic- au prezentat un profil de greutate, similar cu profilul șoarecilor injectați cu PBS, ceea ce indică că TK-TRIF și TK-TRIF deglic sunt mai puțin toxice, decât TK-.

A fost analizată expresia genelor virale TK-TRIF-deglic *in vivo*, comparativ cu TK- și TK-TRIF. Tumorile RENCA au fost implantate la șoareci BALB/c, și șoarecii au fost injectați cu PBS sau 1×10^8 PFU de TK-, TK-TRIF sau TK-TRIF deglic prin vena caudală. Expresia genelor virale a fost determinată prin detectarea exprimării luciferazei virale din interiorul tumorilor, măsurată la punctele temporale indicate. În fig. 10B se arată, că peste 24 de ore după infecție era prezentă o expresie mai redusă a TK-TRIF și TK-TRIF deglic în tumori, comparativ cu TK-.

Experimentele au fost efectuate pentru a determina influența TK-TRIF sau TK-TRIF deglic asupra supraviețuirii șoarecilor cu xenogrefe Renca sau MC38, comparativ cu șoarecii tratați cu TK- sau PBS. A fost asigurată stabilirea xenogrefelor Renca sau MC38 la șoarecii BALB/C sau C57BL/6, respectiv, și au fost tratați cu o singură doză intravenoasă de 1×10^8 PFU de virusuri menționate sau PBS. După cum se arată în fig. 10C și D, TK-TRIF și TK-TRIF deglic îmbunătățeau semnificativ supraviețuirea șoarecilor, comparativ cu tratamentul cu TK-. De asemenea, TK-TRIF deglic îmbunătățeau supraviețuirea șoarecilor cu tumori RENCA, comparativ cu tratarea cu TK-GMCSF (fig. 10E).

Răspunsurile imune celulare la virusul vaccinului variolic și celulele tumorale au fost evaluate prin analiza IFN- γ ELISpot, așa cum este descris mai sus. În ziua 7 după administrarea virusului, splinele au fost recoltate de la șoarecii injectați intravenos cu 1×10^8 PFU de virusuri menționate sau cu PBS (șoareci BALB/c purtători de xenogrefe Renca) și s-a evaluat numărul de CTL, care recunosc virusul vaccinului variolic sau celulele Renca. În fig. 11A se arată, că deglicozilarea și exprimarea TRIF a condus la o creștere semnificativă a producției de CTL, care recunosc virusul vaccinului variolic, comparativ cu unele modificări aparte, de exemplu, TK-TRIF sau TK-deglic. În particular, virusul deglicozilat care exprimă TRIF a condus la o creștere a producției CTL, care depășea creșterea producției CTL, observată pentru modificările individuale. În plus, în fig. 11B se arată, că deglicozilarea și exprimarea TRIF a condus la o creștere a cantității de producție a CTL, care recunoaște celulele Renca *in vivo*, comparativ numai cu modificările aparte, de exemplu, TK-TRIF sau TK-deglic.

Analiza neutralizării s-a realizat pentru a determina nivelurile circulante de anticorpi anti-virus de vaccin variolic la șoarecii injectați cu 1×10^8 PFU de TK-, TK-TRIF sau TK-TRIF deglicozilat.

Titururile de Nabs au fost determinate după cea mai mare diluție a serului, care a condus la o inhibare a infecției de cel puțin 50%. În fig. 11C se arată, că cantitatea de anticorpi de neutralizare este mai mare la șoarecii C57BL/6 în tip sălbatic, infectați cu TK-, comparativ cu șoarecii infectați cu TK-TRIF, TK-deglic sau TK-TRIF-deglic. Pentru șoarecii, infectați cu TK-TRIF-deglic, s-a constatat cea mai mare reducere a cantității de anticorpi neutralizanți în ser.

Efectul virusului deglicozilat, care exprimă TRIF, asupra creșterii tumorii a fost analizată la șoareci BALB/c purtători de xenogrefe tumorale Renca sau la șoarecii C57BL/6 purtători de xenogrefe tumorale MC38. Pentru xenogrefele tumorale RENCA sau MC38, linii de celule tumorale au fost implantate subcutanat la 5×10^5 celule *per* șoarece la șoarecii BALB/c sau C57BL/6, respectiv. Când tumoarea a atins $\sim 50\text{--}100 \text{ mm}^3$, șoarecii au fost tratați intravenos cu o singură doză de virusuri menționate (1×10^8 PFU/șoarece) în vena caudală. Creșterea tumorii a fost monitorizată prin măsurarea cu un șubler și a fost determinată prin ecuația $V (\text{mm}^3) = \pi/6 \times W^2 \times L$, în care W și L reprezintă lățimea și lungimea tumorii, respectiv. Datele au fost exprimate ca dimensiune relativă a tumorii la începutul terapiei, care a fost stabilită ca 100%. Surprinzător, virusul TK-TRIF deglicozilat a condus la o reducere mai mare a dimensiunii tumorii la șoarecii purtători de xenogrefe RENCA și MC38, comparativ cu efectul aditiv al modificărilor individuale combinate sau virusul TK- (fig. 11D și E). În plus, pentru TK-TRIF deglicozilat s-a constatat o activitate antitumorală îmbunătățită, comparativ cu TK-GMCSF, observată în baza reducerii semnificative a mărimii tumorii la șoarecii BALB/c, purtătoare de xenogrefe RENCA (fig. 11F) sau de tumori subcutanate 4T1 la șoarecii BALB/c (fig. 9D). Respectiv, virusul TK- deglicozilat al vaccinului variolic, care exprimă TRIF, prezintă un răspuns îmbunătățit în mod semnificativ antitumoral și conduce la o reducere a producției de anticorpi antivirali.

EXEMPLUL 5. Efectul combinat al expresiei TRIF, DE-sialilării și deleției C12L în UPCI-1812

Modificările descrise mai sus, și anume deleția C12L, desialilarea și introducerea TRIF, au fost încorporate împreună pentru a crea o tulpină nouă W UPCI-1812, și efectul acestui virus cu modificare triplă a fost evaluat în baza efectelor lui terapeutice și imunologice. Așa cum se arată în fig. 12A, infecția UPCI-1812 a condus la supraviețuirea semnificativ mai bună, decât WR.T-, care codifică GM-CSF. În ceea ce privește virusul desialilat cu deleția C12L ("vvDD"), UPCI-1812 produce niveluri semnificativ mai înalte de interferon gamma (IFN- Γ) (fig. 12B) și interleukină-12 (IL-12) (fig. 12C).

EXEMPLUL 6. Efectul țintării pe PGE2

Pentru terapiile virale oncolitice au început în cele din urmă să demonstreze eficiența clinică în studii randomizate, evidențiind potențialul real al acestei platforme. Cu toate acestea, printre actuala generație de vectori clinici, acei, care au dovedit a fi cei mai de succes, exprimau o citokină care activa sistemul imun (GM-CSF), consolidând o serie de date preclinice, care indică că răspunsul imun este un mediator cheie al eficienței virusului. Însă, în pofida acestei observații, este încă neclar modul și cauzele din care unii pacienți răspund bine, iar alții par rezistenți la terapia cu virusuri oncolitice.

Experimentele inițiale au fost realizate pentru a corela sensibilitatea *in vitro* a unei linii de celule tumorale la infecția virală și replicarea cu răspunsuri *in vivo* ale aceleiași linii celulare atunci când sunt utilizate pentru a forma tumori singure la șoarecii imunocompetenți. 14 linii diferite de celule tumorale murine din diferite tipuri de tumori și tulpini diferite murine au fost analizate *in vitro* prin infectarea liniilor celulare cu TK- (fig. 26A). Producția virusului și expresia genelor virale a fost observată în cele 14 linii diferite de celule tumorale murine. Producția virusului a fost analizată prin cultivarea a 2×10^5 celule în plăci cu 24 de godeuri, cu infectarea ulterioară la MOI 1 (PFU/celule) cu virusurile menționate de vaccin variolic. Peste patru ore după infectare, culturile au fost spălate de două ori cu PBS și incubate în mediu proaspăt fără virus. La momentele de timp indicate după infectare, culturile au fost recoltate și congelate-dezghetate de trei ori pentru a obține extract de celule (CE). Titururile virale s-au determinat prin analiza de formare a plăcilor pe celulele BSC-1.

Șapte din cele 14 linii au fost testate în continuare *in vivo* folosind injecția intratumorală directă a TK- (fig. 13A și B și fig. 26A și B). Injecția intratumorală directă a fost utilizată pentru a reduce variabilitatea, care poate apărea din cauza diferențelor de livrare a virusului. Cum se arată în fig. 13A și B, nu s-a observat nici o corelație directă fie între replicarea virusului, sau uciderea celulelor mediată de virus, și efectul antitumoral *in vivo*, ceea ce indică, că factorii, alții decât activitatea oncolitică directă, mediază efectele antitumorale.

Virusurile oncolitice de vaccin variolic, care exprimă luciferaza, au fost utilizate în cadrul acestor experimente, pentru a permite analiza expresiei genelor virale pe parcursul timpului la

șoareci individuali (în calitate de surogat pentru replicarea și persistența virusului), și pentru a permite compararea cu răspunsul ulterior. Două modele distincte păreau să rezulte din date. Pentru modelele de tumori mai rezistente, definite ca acele, în care terapie virală creștea supraviețuirea generală globală cu cel mult 2 săptămâni, cum se releva pentru Renca, B16, PAN02 și 4T1, o corelație directă poate fi constatată în cadrul fiecărui model individual de tumoare, astfel încât nivelul de expresie a genelor virale peste 24 ore corespundea răspunsului ulterior (fig. 13B). Astfel, chiar dacă *in vitro* replicarea nu corelează cu activitatea *in vivo* la compararea modelelor de tumori (probabil datorită influenței unor așa factori, cum ar fi celulele ECM și celulele netumorale din tumoare), în limitele oricărui unui model individual de tumoare există o corelație între expresia genelor virale precoc și răspunsul ulterior. Fără vre-o legătură cu o anumită teorie, se presupune, că replicarea virusului și activitatea oncolitică directă este mediatorul principal al răspunsului limitat în modelele de tumori mai rezistente. Cu toate acestea, un alt model se observa în tumorile care au răspuns bine la terapia cu virus, care include modelele de tumori AB12, LLC, MC38. În aceste modele pentru tumorile cu cel mai bun răspuns în cadrul fiecărui model s-a demonstrat o eliminare rapidă și activă a virusului după infecția inițială și replicarea precocă (fig. 13B și fig. 27). Această eliminare activă sugerează inducerea unui răspuns imun puternic pentru a amplifica efectele virale oncolitice directe în modelele tumorale cu cele mai bune răspunsuri.

Pentru o verificare mai minuțioasă a acestei observații, inițial au fost selectate două modele de tumori cu același fond genetic, pentru care au fost afișate răspunsuri comparabile după tratare cu virus *in vivo*, dar pentru unul din care (LLC) sunt relevate indicatori de inducție activă a imunității (eliminarea precocă a virusului) și uciderea limitată a celulelor mediată de virus *in vitro* (fig. 13B și fig. 26A și B). Celălalt (B16) s-a dovedit a fi mai sensibil la uciderea de către virus *in vitro* și orice răspuns *in vivo*, probabil, corela cu expresia genelor virale precoc (fig. 13B și fig. 26A și B). Verificarea completă a activării markerilor imuni sistemici după infecția cu virus a fost comparată între șoarecii fără tumori, șoarecii cu tumori B16 și șoarecii cu tumori LLC. Aceștia au inclus markerii de activare a transmiterii precoc congenitale a semnalelor, cum ar fi pS6, pSTAT1, pSTAT3, pSTAT5, în diferite populații de celule (fig. 13C și fig. 14A) și markerii de proliferare a celulelor T, cum ar fi pS6 și Ki67 (fig. 14A) și markerii de activare, cum ar fi CD44 și CD62L (fig. 14A) și răspunsurile anticorpilor neutralizanți (fig. 14D). Diferențe minore au fost observate în răspunsul imun sistemic în terapia virală între animalele purtătoare de tumori și animalele fără tumori, singura excepție fiind fosforilarea S6 în unele celule mieloidă în perioadă precocă după infectare (fig. 13C). S-a observat reducerea nivelurilor de pS6 la animalele purtătoare de tumori, dar reducerea activarea sistemului imunitar a fost cea mai pronunțată la șoarecii purtători de tumori B16 (fig. 13C și fig. 14A). Aceasta a fost verificată în alte modele de tumori, din nou confirmând, că nivelurile de pS6 erau reduse în modelele de tumori mai rezistente (inclusiv 4T1 și RENCA), ceea ce indică un defect al răspunsului celulelor dendritice (DC), care poate media rezistența la acești șoareci (fig. 13C).

Deoarece au existat diferențe mici, observate în răspunsul imun sistemic, au fost studiate efectele unei imunosupresii mai localizate în interiorul tumorii. Diferite celule ale sistemului imunitar sunt asociate cu un fenotip de supresie, inclusiv celule supresoare derivate din mieloidă (MDSC) și celule T reglatoare (T-reg) (și M2 mac). S-au analizat nivelurile de aceste tipuri diferite de celule, atât în splină, cât și în tumoare, pentru toate modelele de tumori, comparativ cu animalele netratate. Pentru evaluarea populațiilor imune în tumori, tumorile au fost recoltate de la șoarecii tratați, cum s-a indicat, și mecanic dezagregate și scindate cu un amestec de trei enzime (colagenază de tip IV, ADNază de tip IV și hialuronidază de tip V (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)). Analizele imunocolorării cu patru culori a suprafeței celulare s-au efectuat cu citometrul de flux Gallios (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). Celulele tumorale dezagregate au fost colorate folosind anticorpi anti-CD3 murini cu PE-Cy7 (BD Biosciences, San Jose, CA), anticorpi anti-CD4 murini cu FITC, anticorpi anti-CD8 murini cu PerCP-Cy5.5 și anticorpi anti-CD25 murini cu PE (eBioscience, San Diego, CA).

Nivelul de MDSC, găsit în tumoare pentru modele diferite de tumori, corela strâns cu rezistența sau sensibilitatea modelului respectiv la terapia cu virus (fig. 15A și B și fig. 16). De exemplu, Renca, care prezintă o rezistență la terapia cu virus, conducea la tumori cu un nivel înalt de MDSC. În fig. 17A este prezentată cantitatea de MDSC în tumorile netratate în funcție de creșterea supraviețuirii după tratamentul intravenos cu 1e8 PFU de WR.TK- pentru un șir de sisteme de modele de tumori diferite. Pentru tulpinile de vaccine variolice este relatată o capacitate foarte minoră de creștere a ratei de supraviețuire în modele de tumori murine, care prezintă un nivel înalt de MDSC la momentul inițial. Celulele din fiecare dintre liniile celulare tumorale

enumerate pentru modelele de tumori (fig. 17A) au fost implantate la șoareci imunocompetenți singenici. Șoarecii au fost apoi fie sacrificați în scopul de a determina nivelul mediu de referință al MDSC în tumorile rezultate pentru fiecare model, sau șoarecii au fost tratați cu WR.TK- (sau PBS pentru control) (1e8 PFU, administrate intratumoral) și creșterea speranței de viață (pentru 50% de supraviețuire) era determinată după tratament (în zile). Graficul reprezintă "cantitățile relative de MDSC în tumori la momentul inițial" vs "creșterea mediană a supraviețuirii după tratare cu WR.TK- (în raport cu martorul netratat)". O cantitate mai mare de MDSC la momentul inițial corela cu o eficiență redusă a terapiei.

Au fost studiate modificările ulterioare, produse în tumoare după terapia cu virus, și s-a constatat că pentru multiple modele de tumori, cum ar fi 4T1, RENCA și MC38, adăugarea terapiei cu virusul variolic conducea la pierderea T-reg, dar că nivelurile MDSC nu au fost afectate și a continuat să crească în timp, cum ele creșteau în grupurile de control (fig. 15A și B și fig. 16A și B). Terapia cu virus a redus nivelurile de T-reg în tumorile tratate, dar nu a avut nici un impact asupra nivelurilor de MDSC. În modelul de tumoare Renca (implantat subcutanat la șoarecii BALB/c), cantitățile relative de T-reg sau MDSC în tumoare/mg de tumoare au fost determinate la diferite momente înainte sau după tratare cu WR.TK- (1e8 PFU administrate intratumoral) (fig. 17B și C). Astfel, se pare că incapacitatea virusului oncolitic al vaccinului variolic de a ținta MDSC reducea activitatea terapeutică a acestuia în unele tumori, în care nivelurile de MDSC sunt înalte. S-a mai constatat, că în tumorile cu nivele inițiale reduse de MDSC (MC38), terapia cu virus a majorat nivelul de celule T CD8+ în tumoare, în timp ce pentru modelele tumorale mai rezistente (4T1) nu a fost înregistrată nici o creștere (fig. 15B).

S-a efectuat analiza tulpinii imunogene de vaccine variolic GM-CSF, care exprimă citokina factor de stimulare a coloniilor (CSF). Anterior s-a demonstrat, că GM-CSF conduce la răspunsuri clinice mai semnificative, de asemenea s-a asociat cu proliferarea MDSC. În fig. 18 și 19 se arată că, deși tulpinile de vaccine variolic mai imunogene (WR.TK-GMCSF și WR.B18R-IFNβ+) ameliorau suplimentar unele aspecte ale răspunsului imun în modelele tumorale sensibile, cum ar fi reducerea suplimentară a nivelurilor de T-reg și creșterea nivelurilor de celule T CD8+, nici un astfel de avantaje nu au fost observate în modelele tumorale rezistente altfel. Fără vre-o legătură cu o anumită teorie, se pare că principala diferență între tumorile sensibile și rezistente se referă la incapacitatea virusului de a induce un efect imunoterapeutic puternic în tumorile cu niveluri înalte de imunosupresie mediată de MDSC în micromediul tumorii.

În comunicările recente a fost identificată o producere de prostaglandine PGE2 mediată cu COX2 în calitate de determinantă cheie a infiltrației MDSC și menținerii fenotipului MDSC. Au fost folosite două abordări pentru a ținti această cale. O abordare a fost folosirea unui inhibitor al COX2. A doua abordare a fost expresia enzimei HPGD, care realizează degradarea prostaglandinei direct din vectorii virali. Acidul nucleic, care codifică hidroxiprostaglandindehidrogenaza 15 (HPGD), o enzimă murină, care degradează PGE2, a fost introdus în WR.T - prin introducerea inserției în locusul timidinkinazei prin recombinare omoloagă și sub controlul promotorului p7.5 viral ("TK - HPGD" sau "WR.TK-HPGD"). Cum este prezentat în fig. 20, HPGD s-a exprimat în mod specific de la TK-HPGD și a redus semnificativ nivelurile de PGE2 în celulele Renca, infectate cu TK-HPGD. Cum se arată în fig. 25, se pare, că infecția cu WR.TK- poate modifica expresia COX2 în tumori local la locul infecției, fără a produce niveluri semnificative de exprimare a COX2 în tumori în general, sau virusul poate să se reproducă selectiv în regiunile cu niveluri reduse de COX2. În experimentele inițiale *in vitro* și *in vivo* s-a constatat că, chiar la niveluri toxice, inhibitorii COX-2 erau incapabili să reducă nivelurile de PGE2 într-o măsură oarecare aproape de nivelul atins la expresia HPGD (fig. 20).

Virusurile oncolitice ale vaccinului variolic, care exprimă HPGD, a fost apoi testați în mai câteva modele de tumori la șoareci. S-a observat, că numărul de celule MDSC în tumoare s-a redus rapid și semnificativ în splină și în tumori după tratamentul numai cu WR-TK-HPGD (fig. 21 și fig. 23A-D). S-a constatat, de asemenea, că includerea HPGD a redus cantitatea de MDSC în tumoare și în splină în raport cu virusul WR.TK- nemodificat. Aceasta era specific pentru tumori, fără o toxicitate sistemică observată (fig. 21 A). Interesant, că TK-HPGD, de asemenea, a indus o reducere mai rapidă și mai semnificativă a numărului de T-reg în tumoare. Cum se arată în fig. 2 B și C, și în fig. 22, infecția cu WR-TK-HPGD corela cu un efect terapeutic îmbunătățit în câteva modele de tumori la șoareci *in vivo* și conducea la volume mai mici ale tumorilor. Este necesar de menționat, că pentru modelul de tumoare, care anterior era cea mai rezistentă la terapia cu virus, RENCA, cu fenotip "numai oncolitic" afișat și niveluri inițiale înalte de MDSC, în mod surprinzător s-a relevat cea mai mare creștere a beneficiului terapeutic după expresia HPGD (fig. 21B).

Tiparele de exprimare a genelor virale au fost comparate, de asemenea, pentru WR.TK- și WR.TK-HPGD în tumoarea RENCA. S-a relevat, că, în timp ce pentru WR.TK- se observa fenotip "numai oncolitic" (o expresie mai înaltă a genei în ziua 1 corela cu cel mai mare beneficiu terapeutic), pentru WR.T-HPGD+ s-a constatat fenotip "oncolitic și imunoterapeutic", în care

5 pentru tumorile cu cel mai bun răspuns se arată o eliminare activă și rapidă a virusului spre ziua a 5 (fig. 21D). Fără legătură cu o anumită teorie, se pare, că expresia HPGD este capabilă de a întoarce activitatea imunoterapeutică a vectorului în aceste modele mai rezistente și, astfel, poate sensibiliza într-un alt mod tumorile rezistente la terapia cu virus oncolitic. Aceasta se producea în pofida pierderii generale a potențialului oncolitic al expresiei HPGD.

10 S-a realizat analiza mecanismelor, care mediază avantajele terapeutice observate pentru WR.T-HPGD+. Peste 3 zile după tratare, timp în care nivelurile de MDSC și T-reg au fost deja reduse semnificativ în jurul tumorii, s-a remarcat, că au avut loc numai schimbări modeste în nivelurile de citokine și chemokine în tumoare (fig. 24A). Însă, nivelul de chemokine în ser s-a modificat semnificativ (fig. 24B). În special, chemokinele asociate cu atragerea celulelor T activate, inclusiv

15 CCL5, au fost supuse unei reglări de creștere, în timp ce nivelul de CXCL12 (sdf-1, asociat cu un fenotip imunosupresor și un prognostic nefavorabil) a fost redus semnificativ (fig. 24A și B). Această modificare a efectului sistemic al chemokinelor poate fi responsabilă pentru medierea schimbărilor din repertoriul celulelor imune în tumoare. Acestea au fost studiate în continuare utilizând analiza tumorii bilaterale, în care într-o tumoare a fost injectat WR.TK- și în tumoarea de

20 pe flancul opus s-a injectat WR.TK-HPGD. S-a observat un transport mai semnificativ de celule T activate pentru tumoarea care exprimă HPGD (fig. 24D). Mai mult decât atât, la momente de timp mai tardive s-a observat, că expresia WR.TK-HPGD conducea în splină la niveluri majorate semnificativ de CTL țintite asupra tumorii. Aceste date indică, că exprimarea HPGD acționează nu numai pentru a limita mediul supresiv în interiorul tumorii, dar, de asemenea, amplifică atragerea celulelor T, ceea ce conduce la un răspuns imun adaptiv antitumoral mai activ. În plus,

25 incorporarea HPGD în UPCI-1812 a condus la un virus, care inhiba creșterea tumorii mai semnificativ, decât UPCI-1812 ("combinat"; fig. 28). Cum se arată în fig. 28, virusul combinat a dus la o reducere mai marcantă a creșterii tumorii, decât efectul aditiv al virusului UPCI-1812 și al virusul VV-HPGD. Direcționarea asupra PGE2, mediata de virus, a fost capabilă să depășească imunosupresia localizată, conducând la modificări profunde în micromediul tumorii și, drept

30 rezultat, sensibilizarea tumorilor anterior rezistente la terapia cu virus.

EXEMPLUL 7. Modificarea, care sporește activitatea și răspândirea

În fig. 29 este prezentat nivelul de anticorpi neutralizanți împotriva virusului vaccinului variolic, prezenți în serul șoarecilor vaccinați (1e4 PFU) fie cu WR, sau cu WR cu o mutație punctiformă EEV de ameliorare în gena virală A34R (Lys151 până la Glu). Tulpina mutantă A34R cauzează o producere a unei cantități mai mici de anticorpi neutralizanți contra virusului vaccinului variolic, comparativ cu WR-.

35

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Guo Z.S., Thorne S.H., Bartlett D.L. Oncolytic virotherapy: Molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. *Biochim. Biophys. Acta*, 2008
2. Kim J.H., Oh L.Y., Park B.H., Lee D.E., Kim J.S., Park H.E., Roh M.S., Je J.E., Yoon J.H., Thorne S.H., Kirn D., Hwang T.H. Systemic Armed Oncolytic and Immunologic Therapy for Cancer with JX-594, a Targeted Poxvirus Expressing GM-CSF. *Mol. Ther.* 14, 2006, p. 361-370
3. Schmidt C. Amgen spikes interest in live virus vaccines for hard-to-treat cancers. *Nature biotechnology* 29, 2011, p. 295-296
4. Coffin R. Clinical Updates with oncolytic HSV. In 7th International Oncolytic Virus meeting , Quebec City, 2013
5. Bischoff J.R., Kirn D.H., Williams A., Heise C., Horn S., Muna M., Ng L., Nye J.A., Sampson-Johannes A., Fattacy A., McCormick F. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274, 1996, p. 373-376

(57) Revendicări:

1. Virus oncolitic de vaccin variolic, care conține un acid nucleic, care codifică domeniul Toll/IL-1R cu conținut de proteină adaptoare, care induce interferon beta (TRIF) sau un domeniu funcțional al acesteia.
2. Virus oncolitic de vaccin variolic, care conține un acid nucleic, care codifică domeniul Toll/IL-1R cu conținut de proteină adaptoare, care induce interferon beta (TRIF) sau un domeniu funcțional al acesteia și suplimentar conține un acid nucleic care codifică factorul macrofagal-granulocitar de stimulare a coloniei sau un domeniu funcțional al acestuia.
3. Virus oncolitic de vaccin variolic, conform revendicării 1 sau 2, în care virusul oncolitic de vaccin variolic este timidin-kinază negativ.
4. Virus oncolitic de vaccin variolic, conform revendicării 1, 2 sau 3, în care acidul nucleic care codifică TRIF este clonat în locusul genei timidin-kinazei.
5. Metodă de reducere a creșterii celulelor de cancer, care prevede administrarea în celulele canceroase a unei cantități eficiente de virus oncolitic de vaccin variolic, conform oricăreia din revendicările 1-4.
6. Metodă de reducere a creșterii tumorii, care prevede administrarea în tumoare a unei cantități eficiente de virus oncolitic de vaccin variolic, conform oricăreia din revendicările 1-4.
7. Metodă de tratare a unui pacient care are un cancer, care prevede administrarea la pacient a unei cantități eficiente de virus oncolitic de vaccin variolic, conform oricăreia din revendicările 1-4.
8. Metodă de producere a unui efect anticanceros la un pacient, care prevede administrarea la pacient a unei cantități eficiente de virus oncolitic de vaccin variolic, conform oricăreia din revendicările 1-4.
9. Metodă, conform oricăreia din revendicările 5-8, care suplimentar prevede administrarea unui sau a câțiva agenți selectați din grupa constând dintr-un agent anticanceros, un agent imunomodulator, și o combinație a acestora.
10. Metodă, conform revendicării 9, în care agentul imunomodulator cuprinde un agent capabil să suprimă imunitatea antivirală.
11. Metodă, conform revendicării 9, în care agentul imunomodulator cuprinde un inhibitor al punctului de control imun.
12. Metodă, conform revendicării 11, în care inhibitorul punctului de control imun cuprinde anticorpul anti-CTLA4, un anticorp anti-PD-1, un anticorp anti-PDL1 sau un agonist TLR.
13. Metodă, conform revendicării 9, în care agentul imunomodulator este selectat din grupa constând din: anticorp anti-CD33 sau un fragment al acestuia, un anticorp anti-CD11b sau un fragment al acestuia, un inhibitor al COX2 și un inhibitor al punctului de control imun.
14. Metodă, conform revendicării 13, în care inhibitorul COX2 conține celecoxib, o citokină sau o chemokină.
15. Metodă, conform oricăreia din revendicările 9-14, în care agentul anticanceros cuprinde un agent chimioterapeutic, un agent radioterapeutic, un agent antiangiogen, un agent de inducere a apoptozei, un anticorp anti-cancer, un agent kinazic dependent de anti-ciclină sau o combinație a acestora.

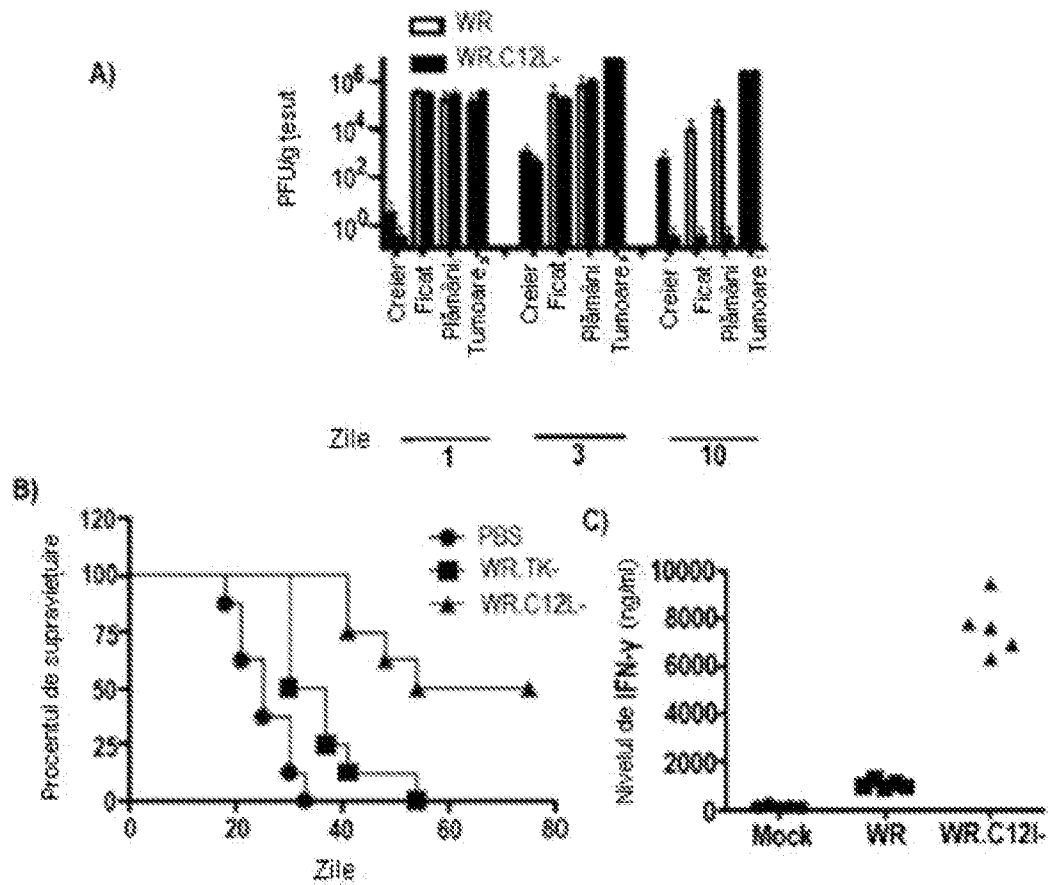


Fig. 1

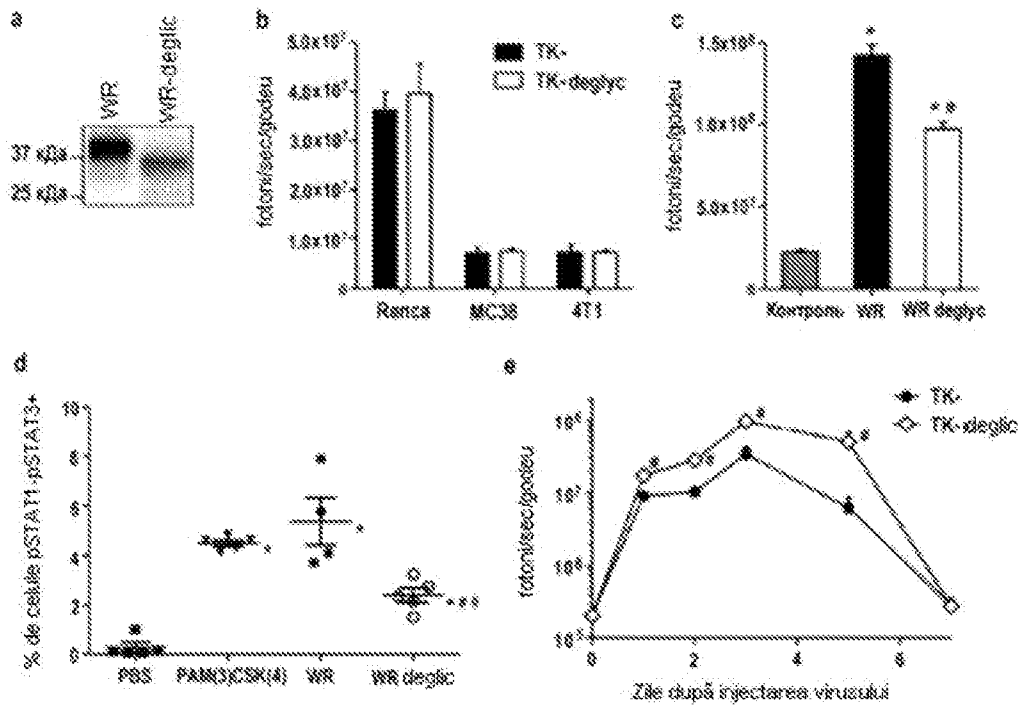


Fig. 2

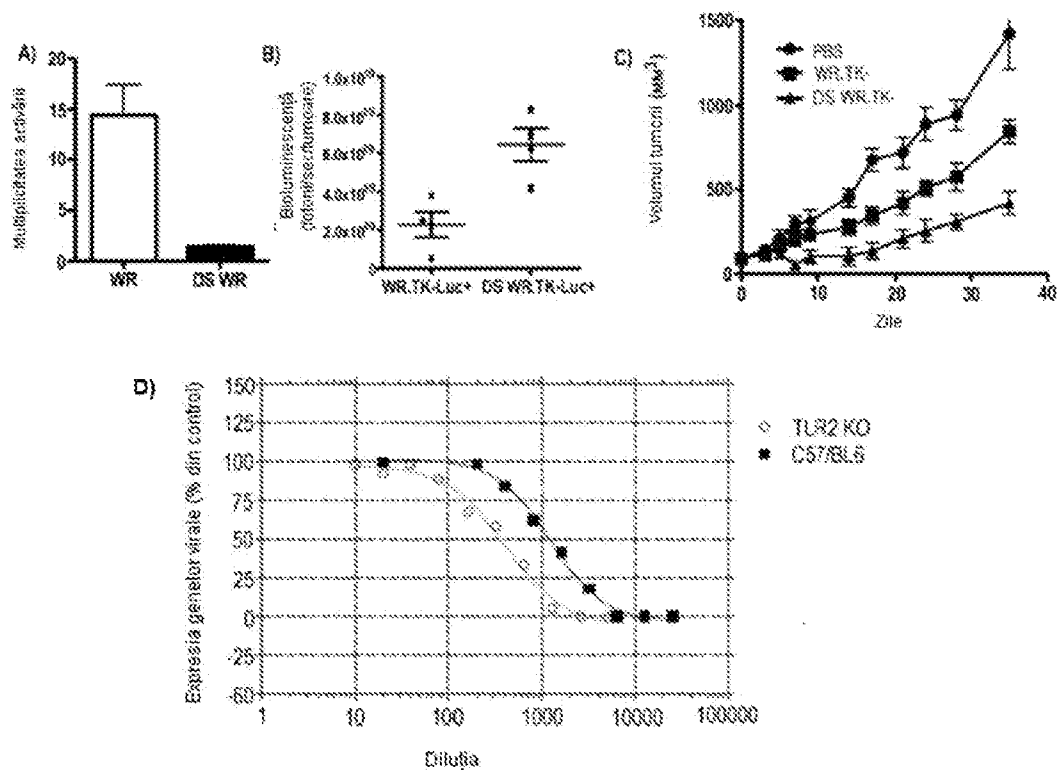


Fig. 3

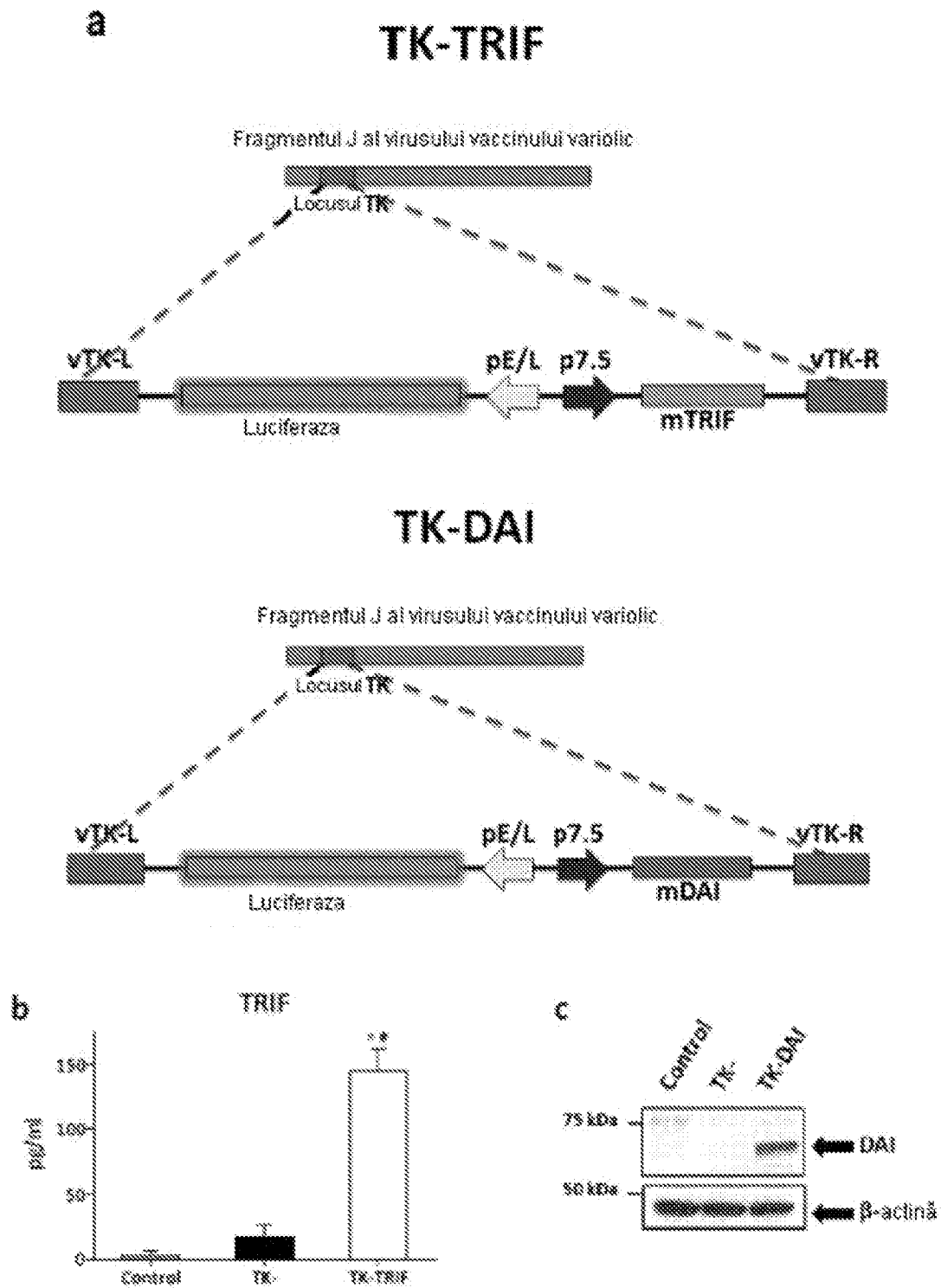


Fig. 4

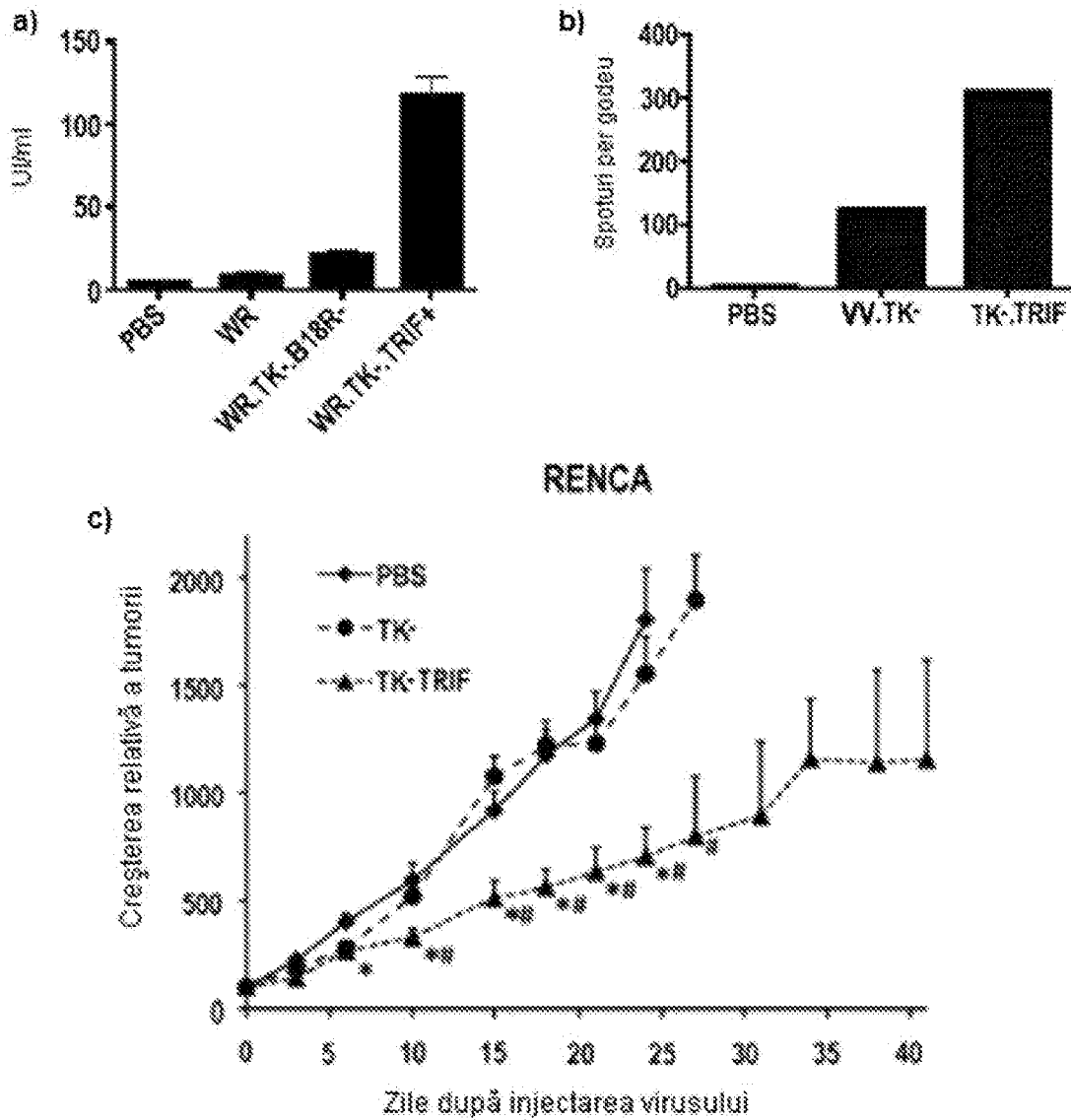


Fig. 5

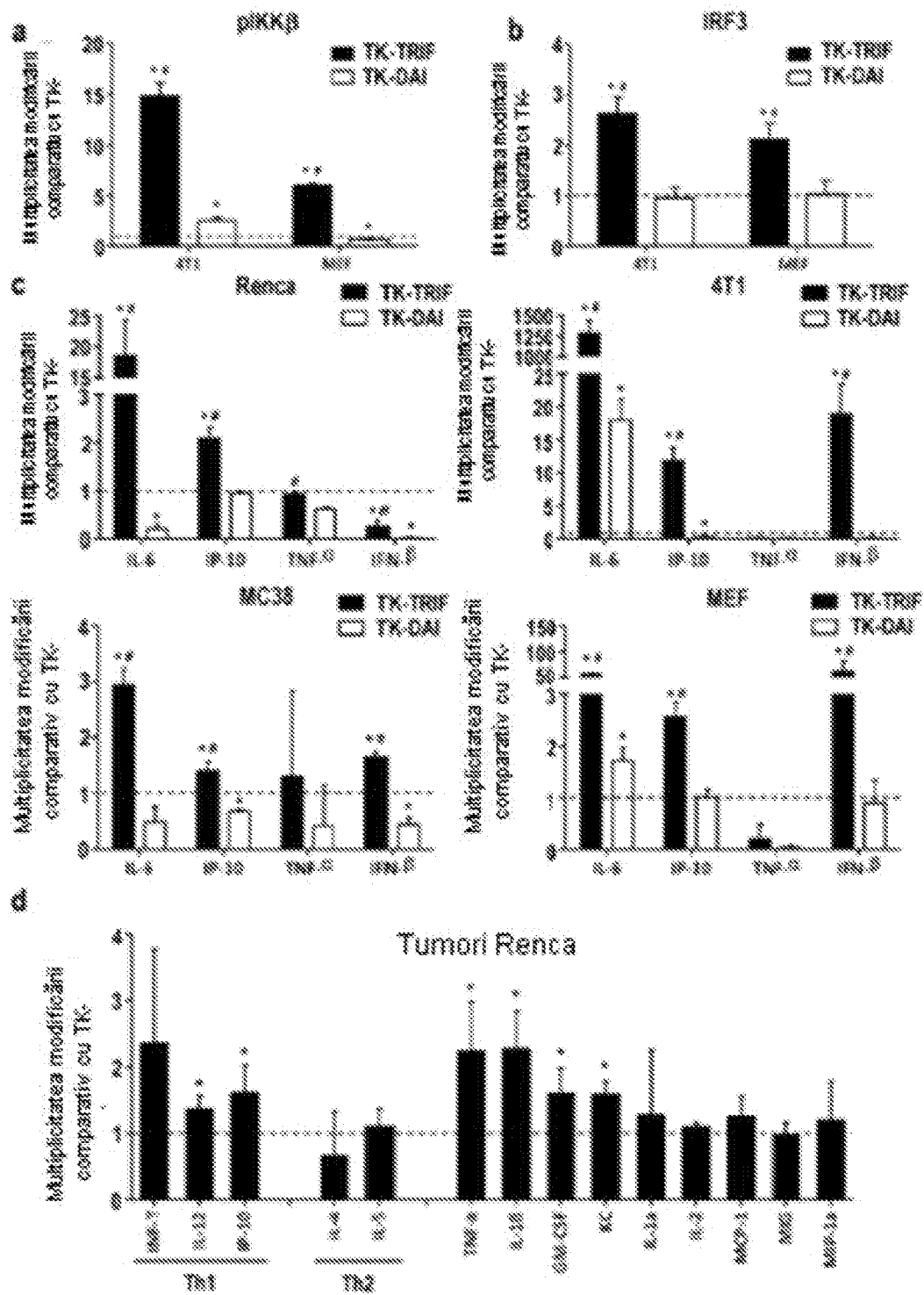


Fig. 6

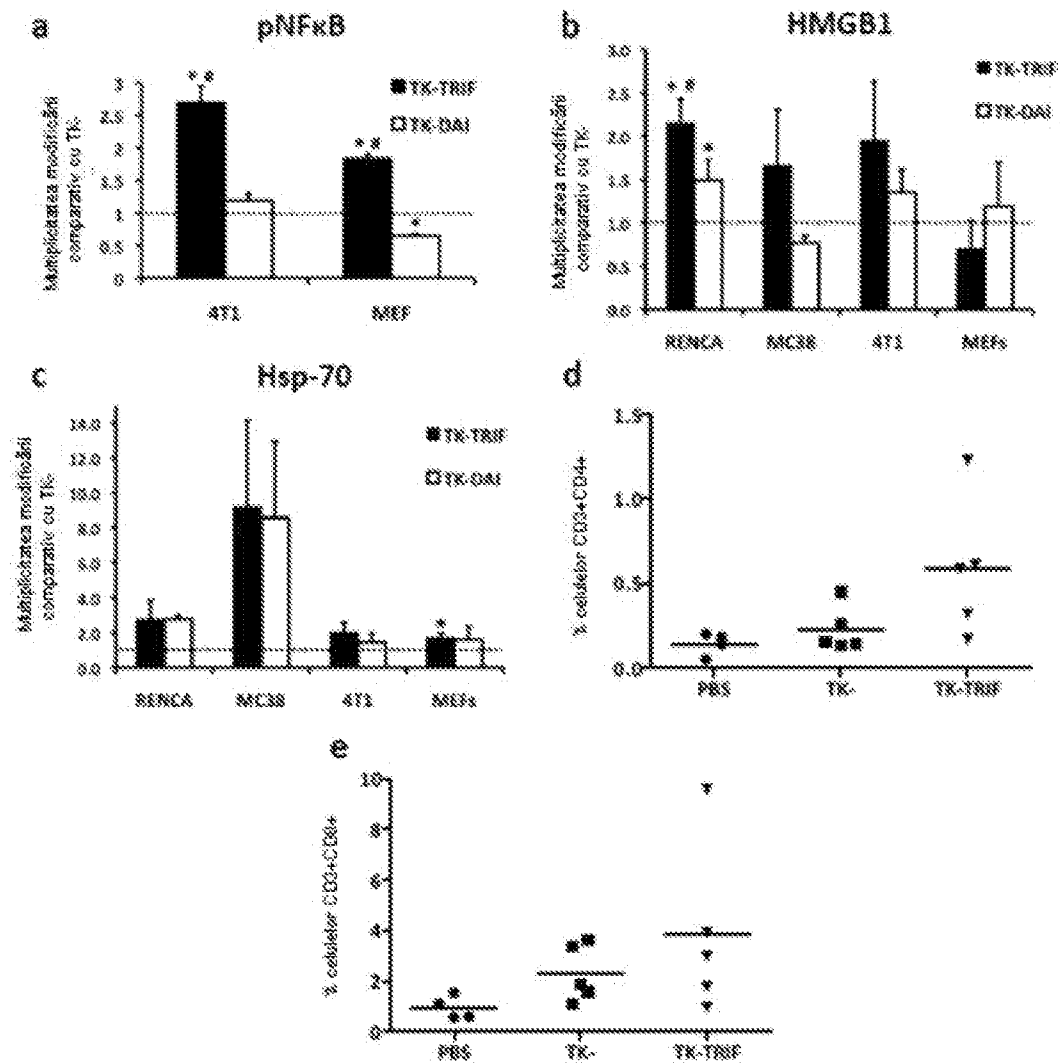


Fig. 7

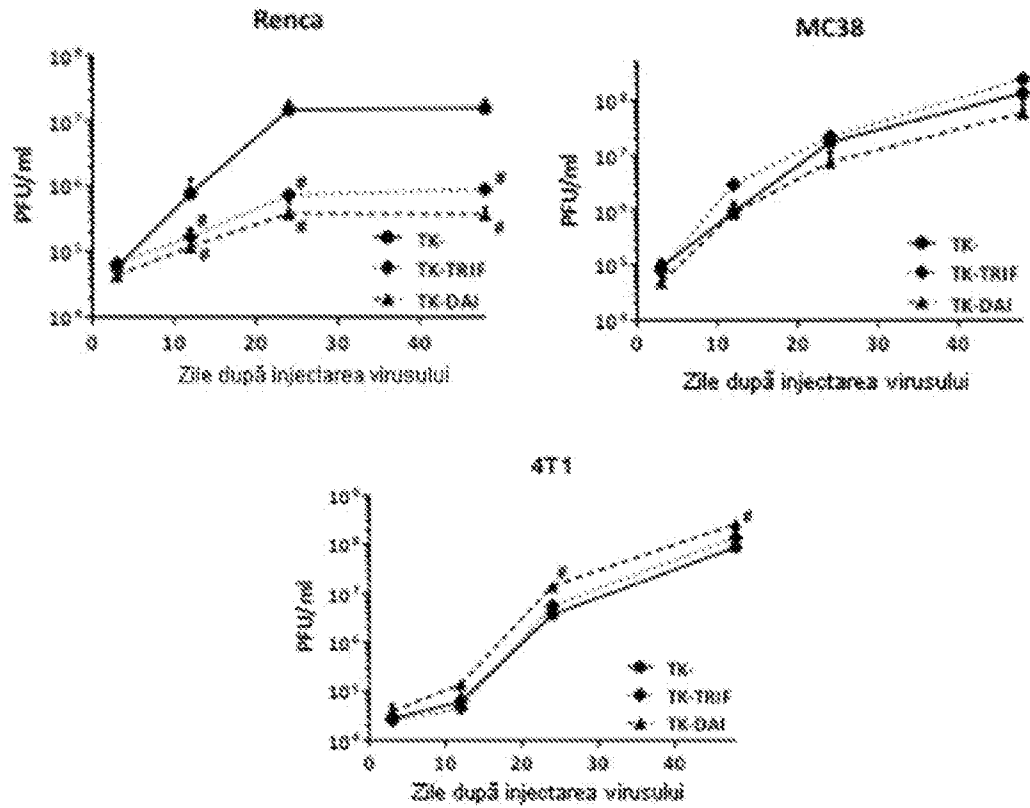


Fig. 8A

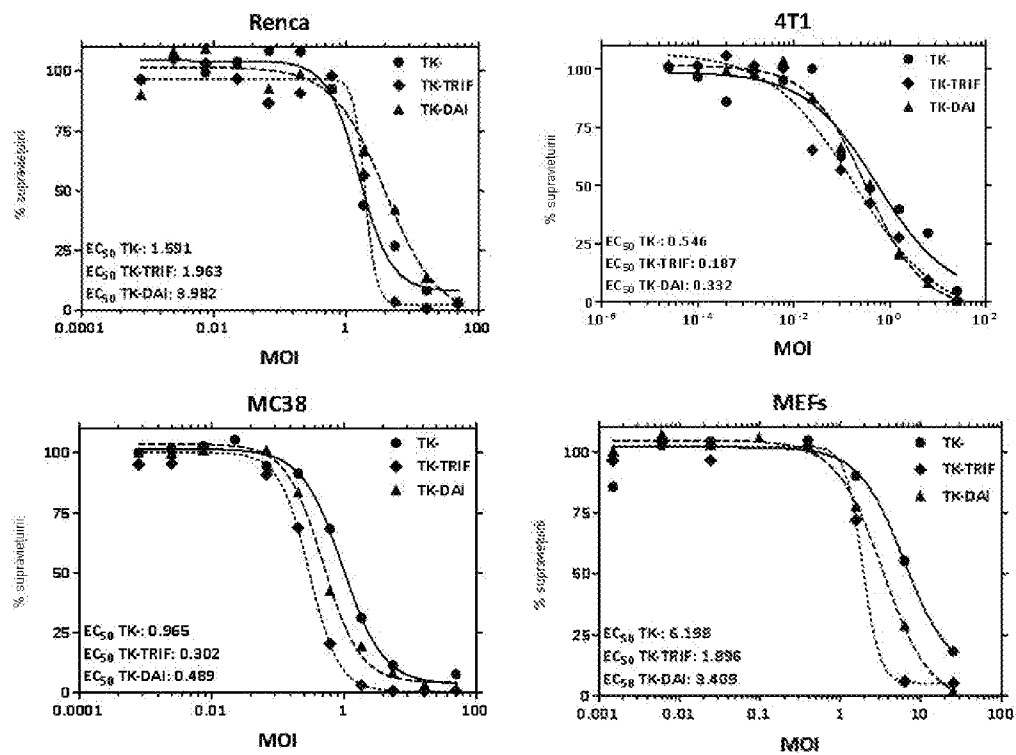


Fig. 8B

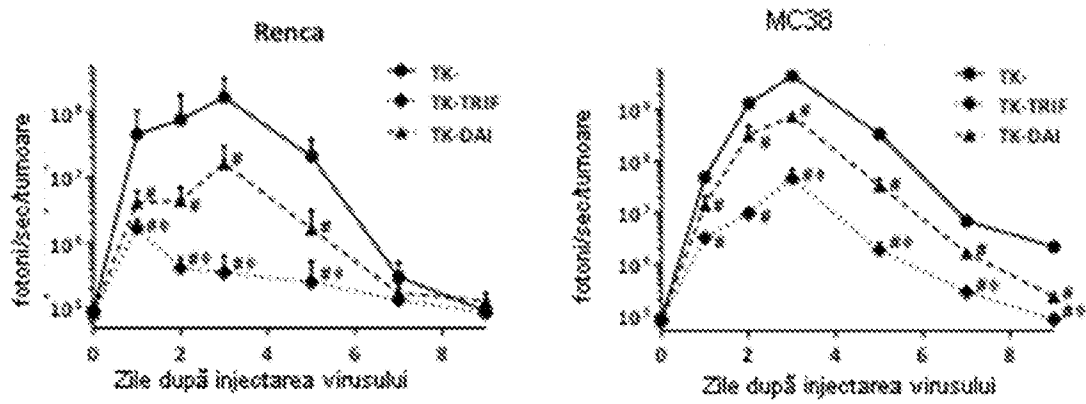


Fig. 8C

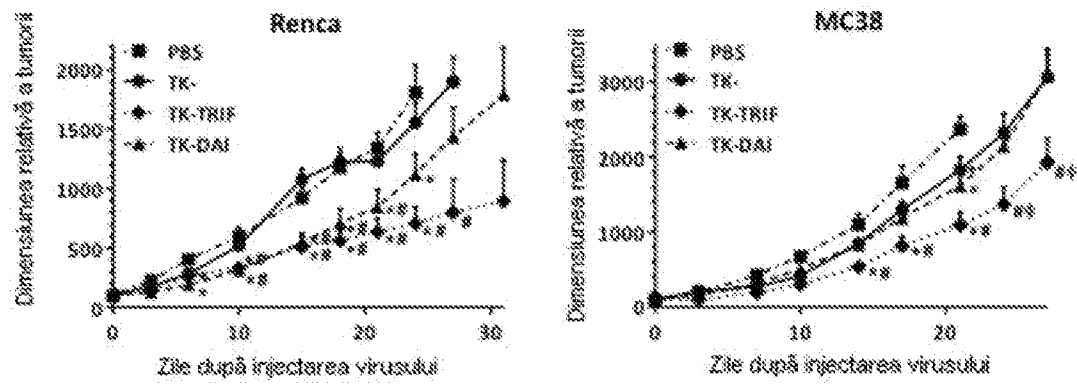


Fig. 8D

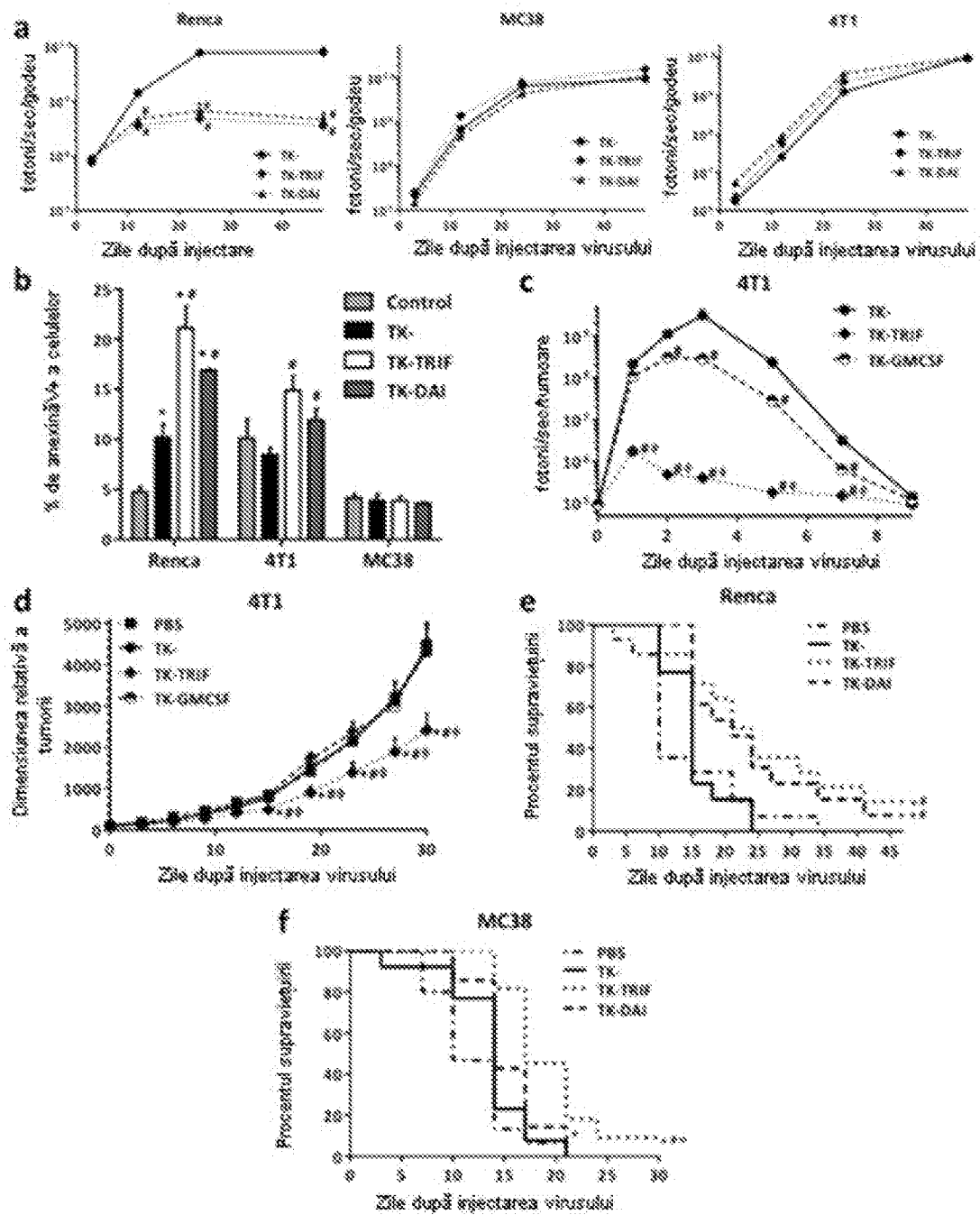


Fig. 9

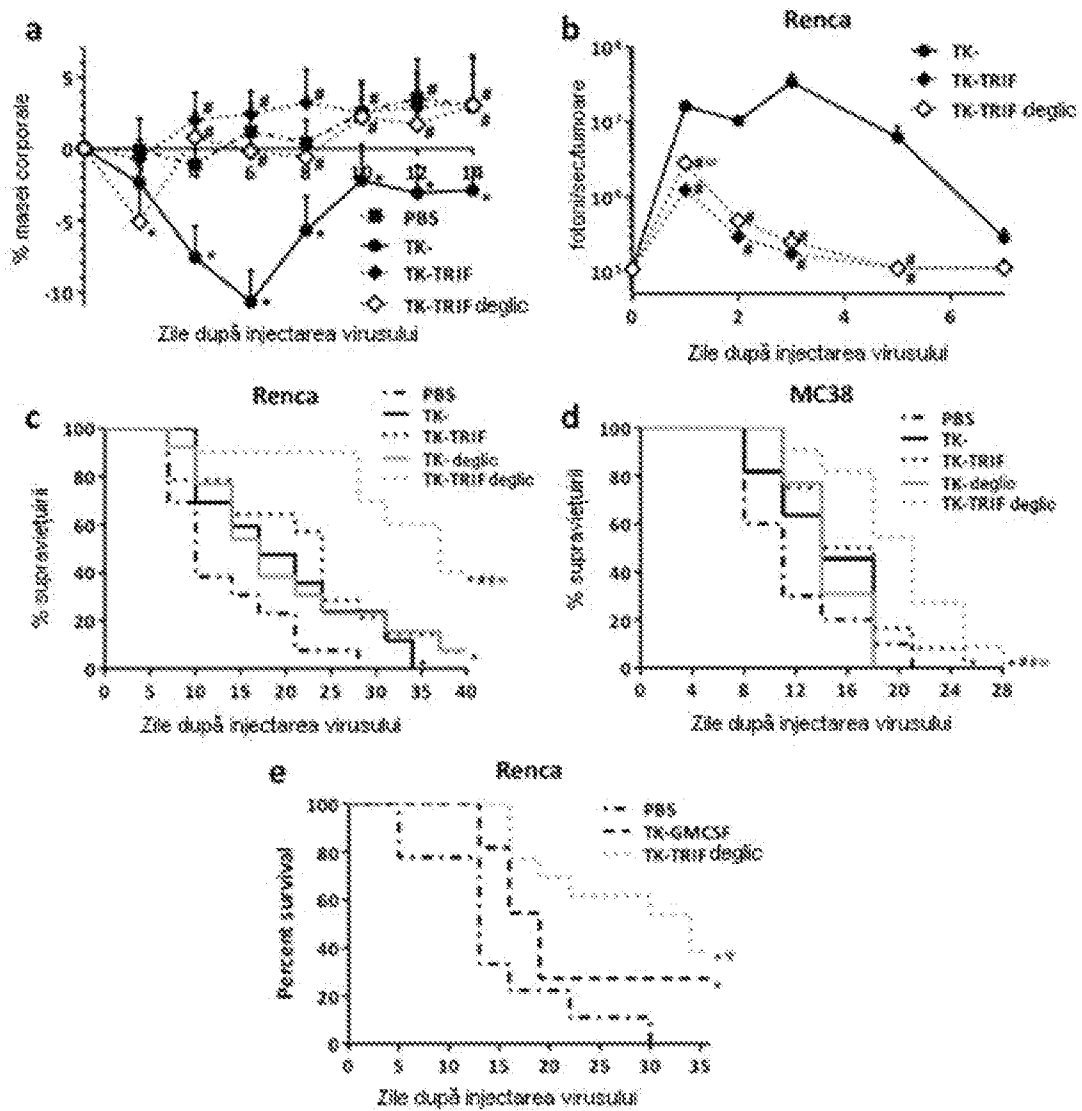


Fig. 10

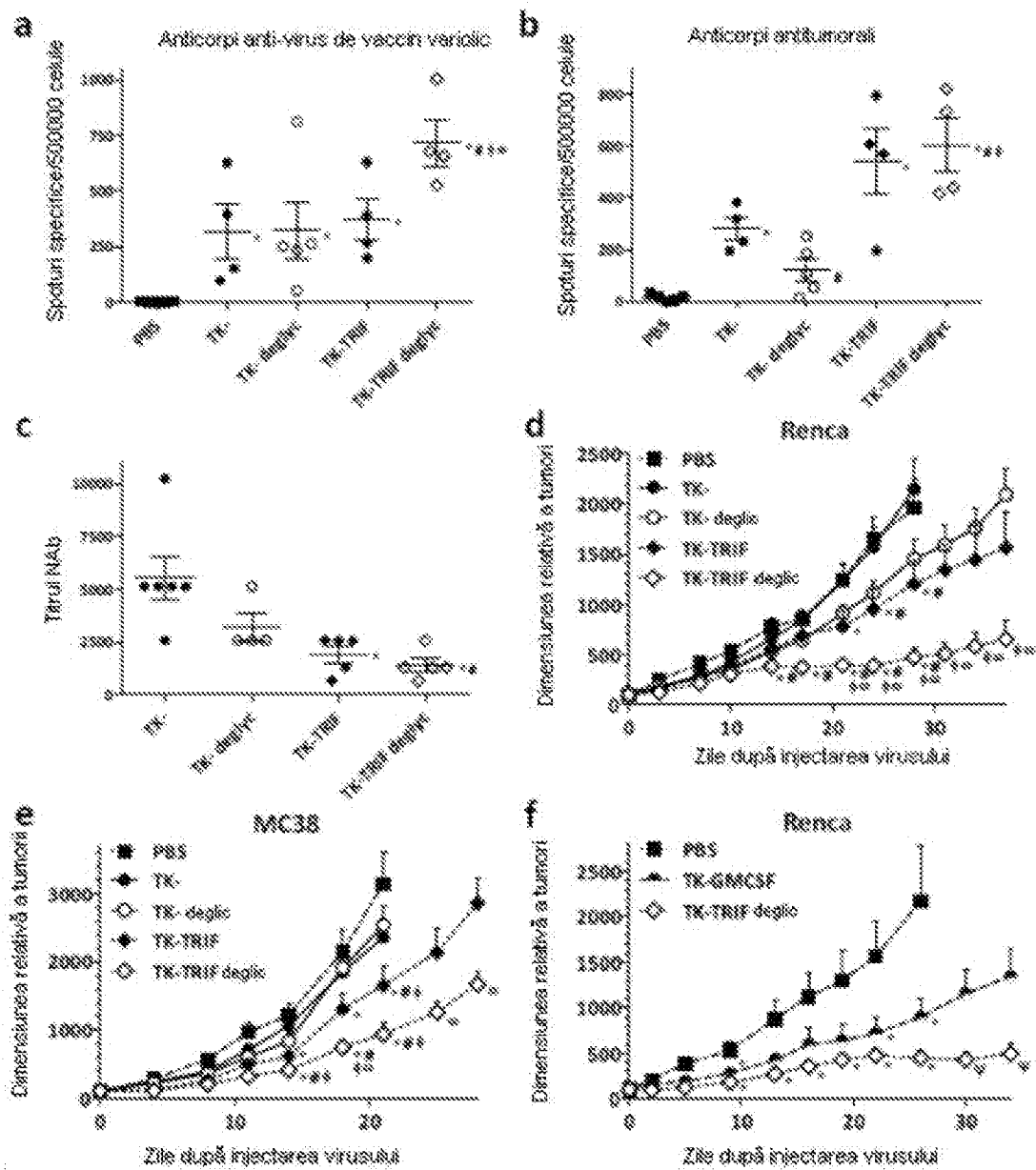


Fig. 11

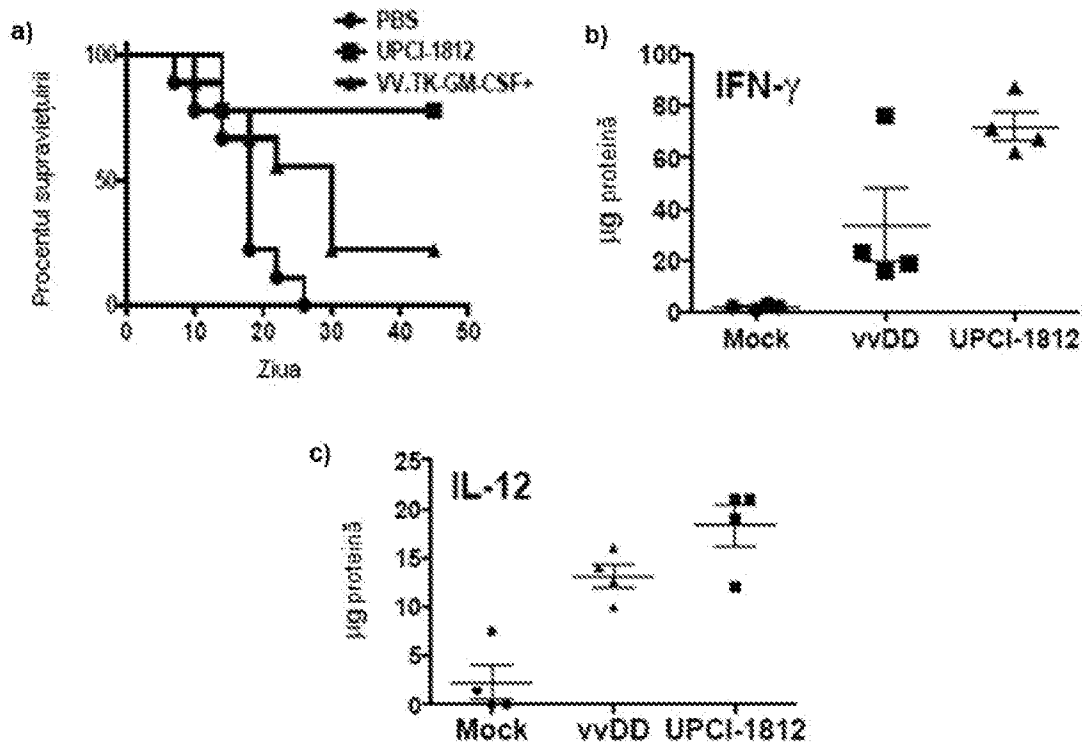


Fig. 12

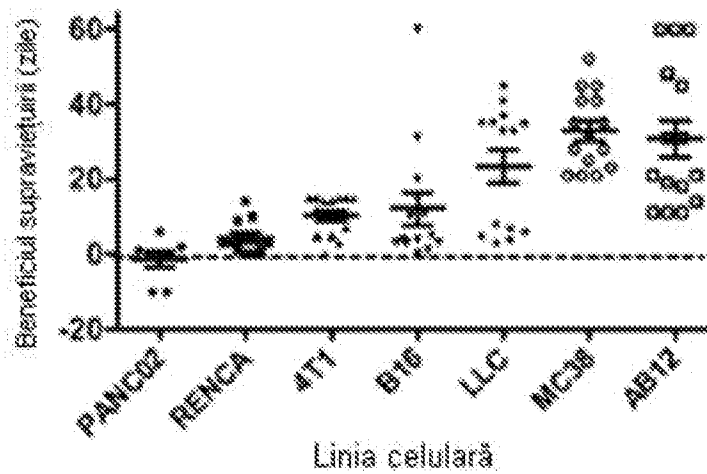


Fig. 13A

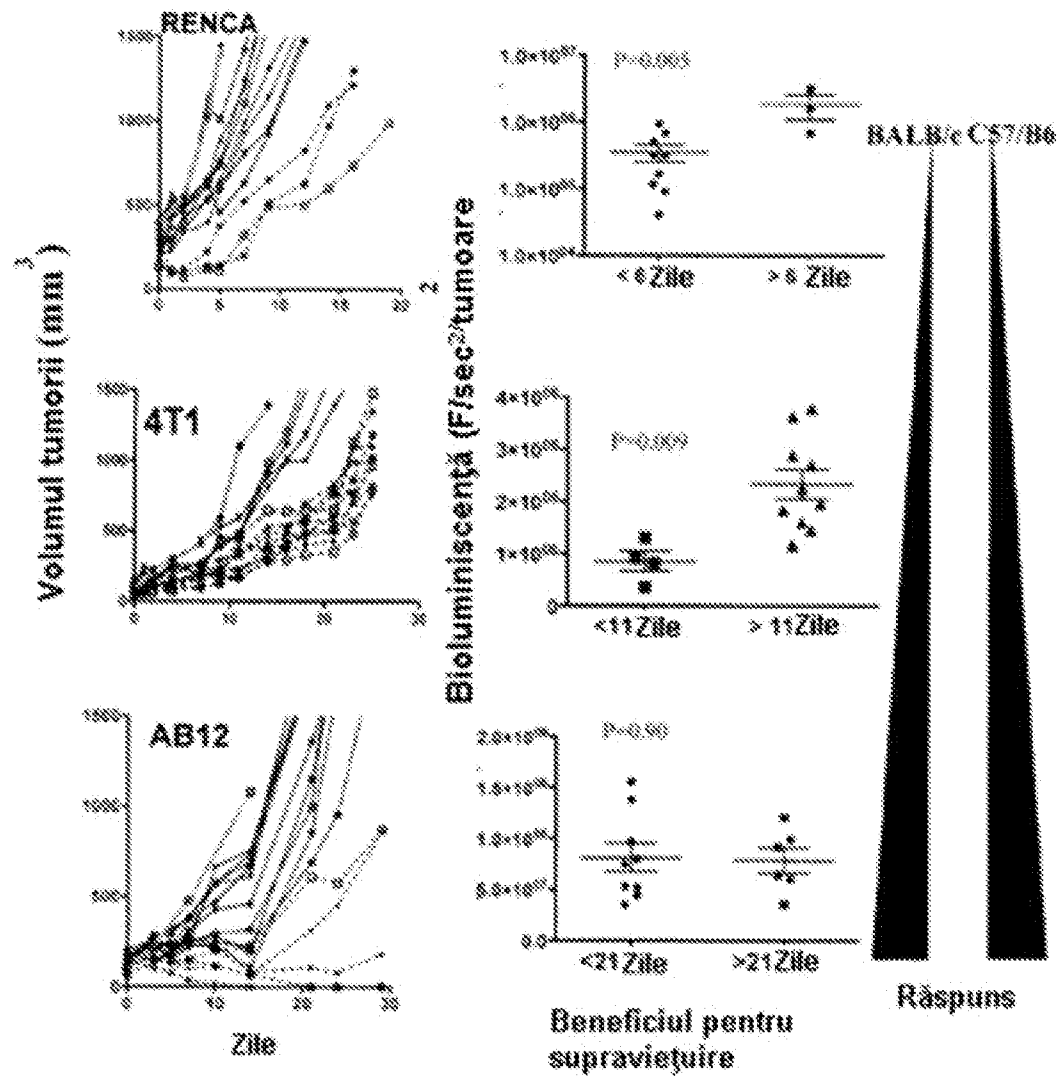


Fig. 13B

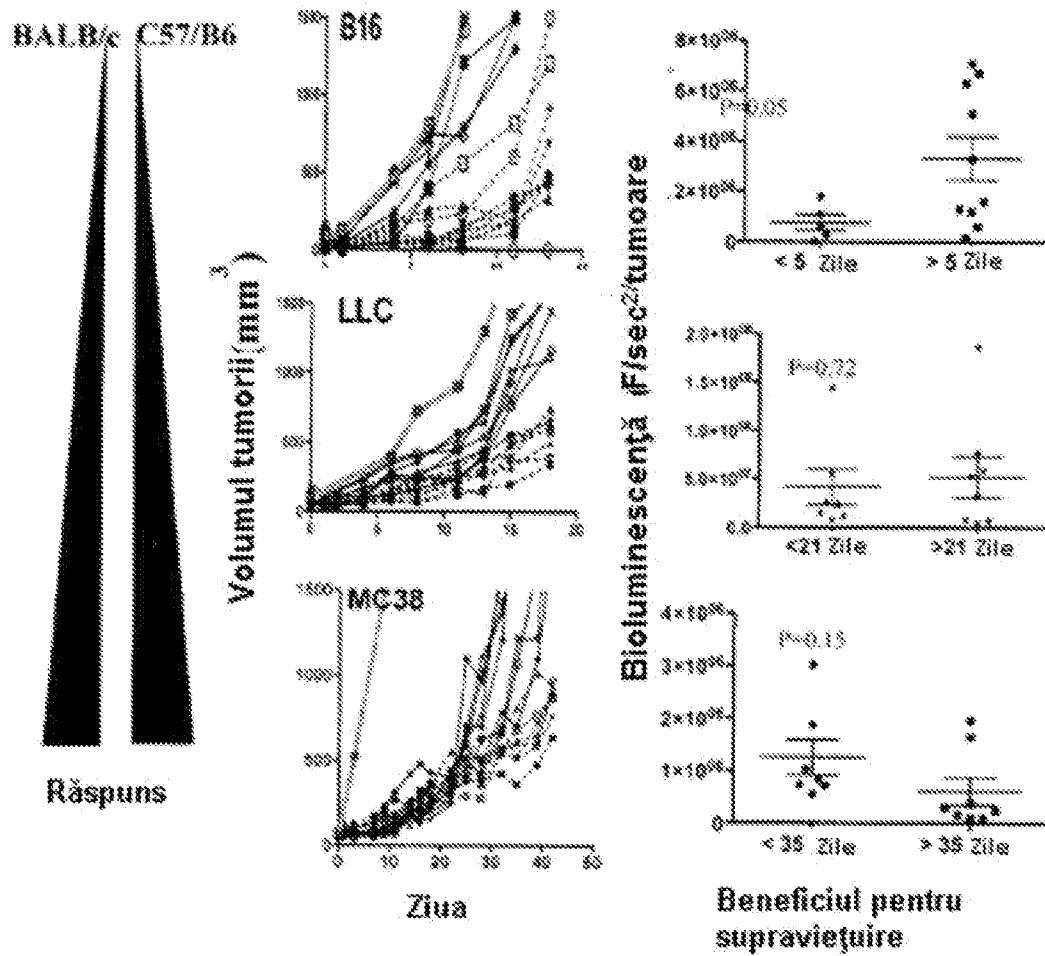


Fig. 13B (continuare)

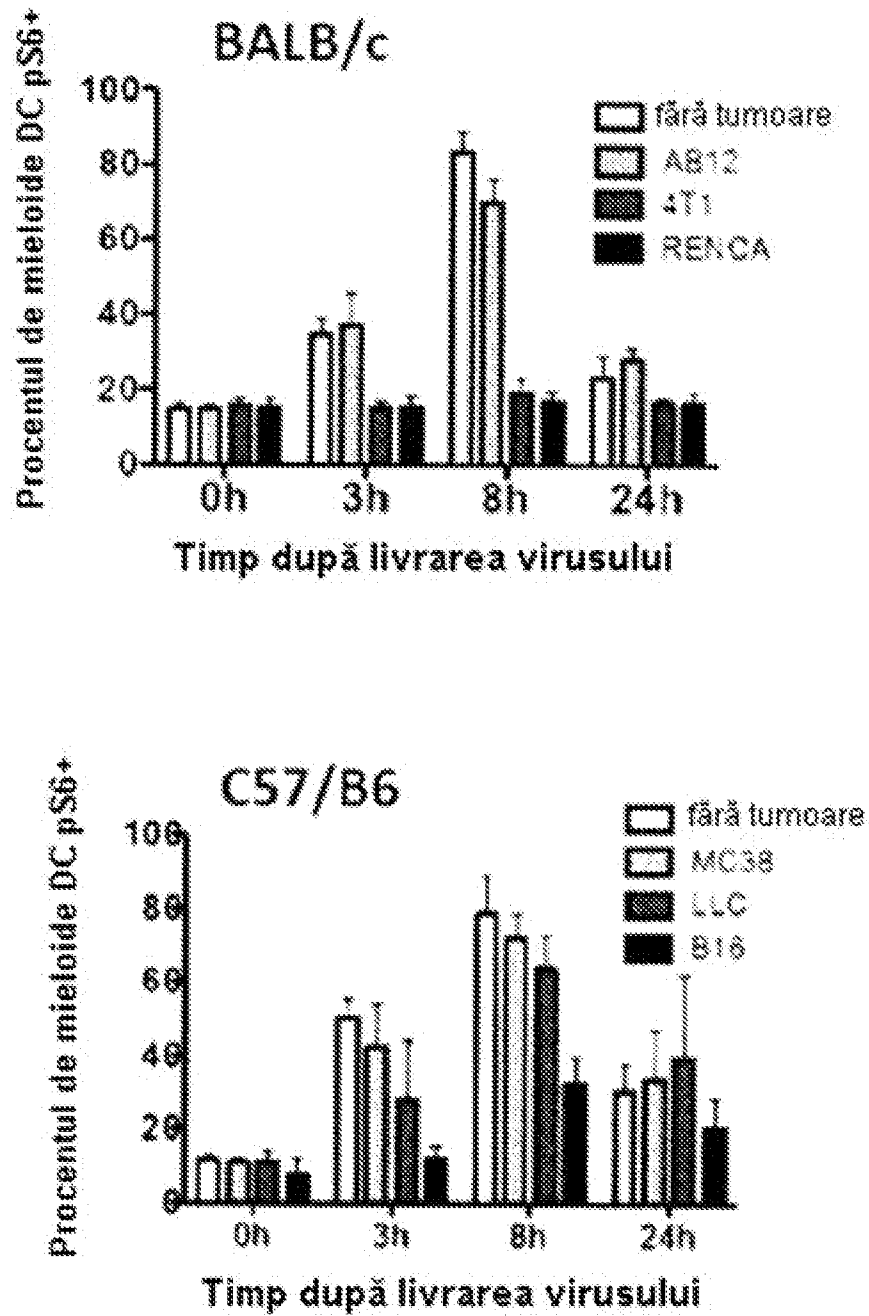


Fig. 13C

Celule T reglatoare

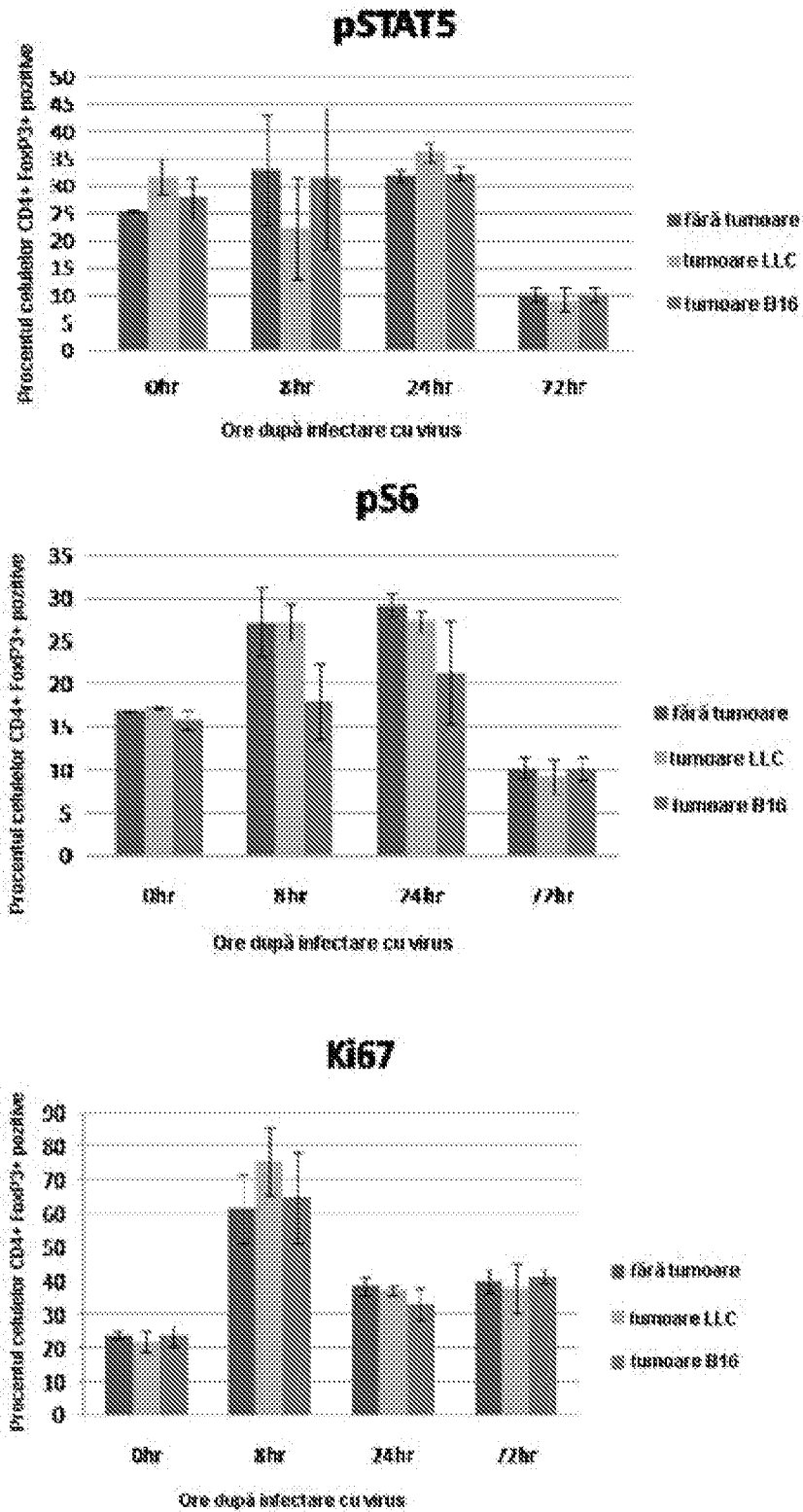


Fig. 14A

Celule T CD4+

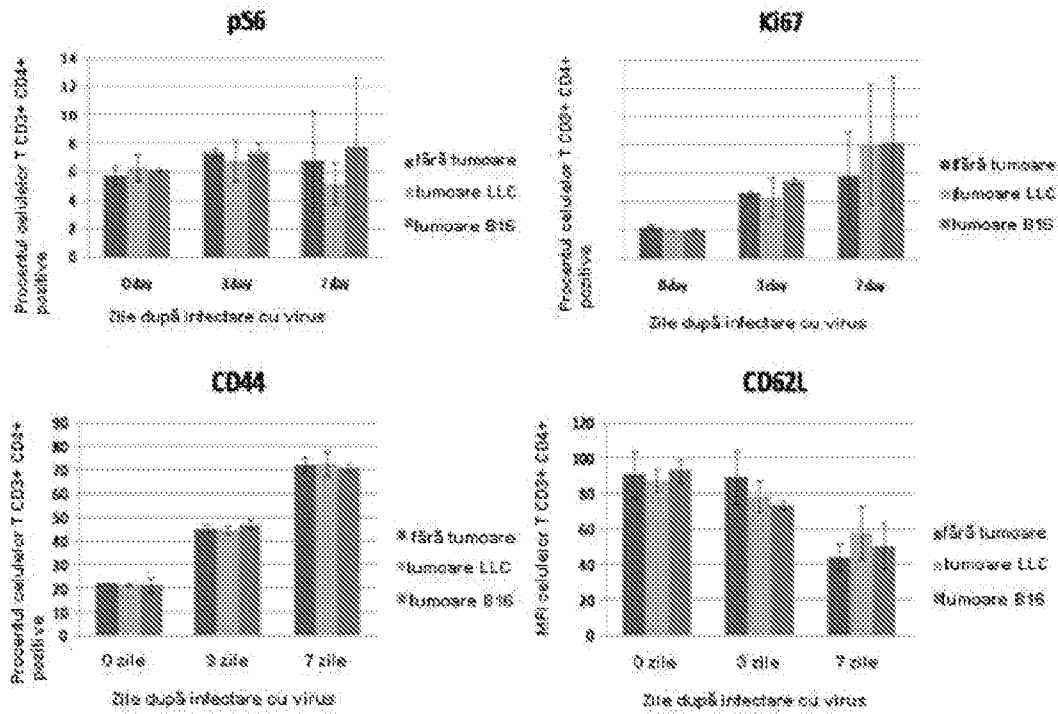


Fig. 14A (continuare)

Celule T CD8+

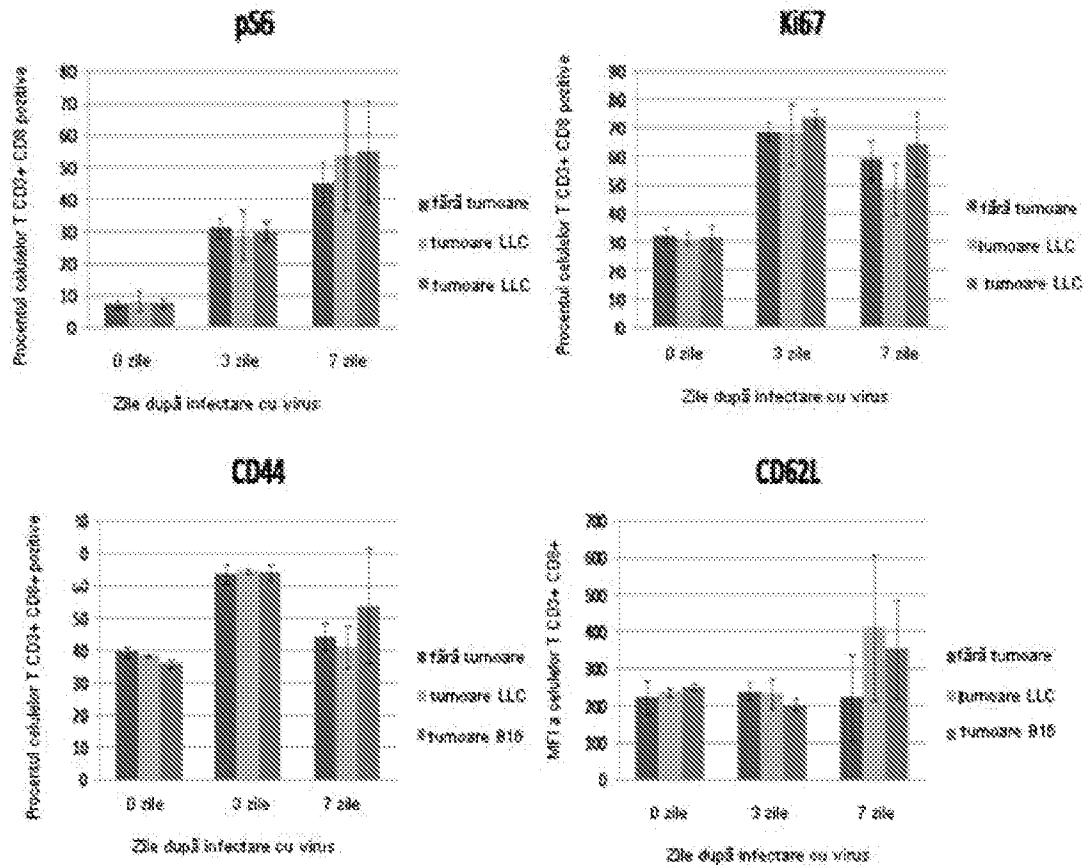


Fig. 14A (continuare)

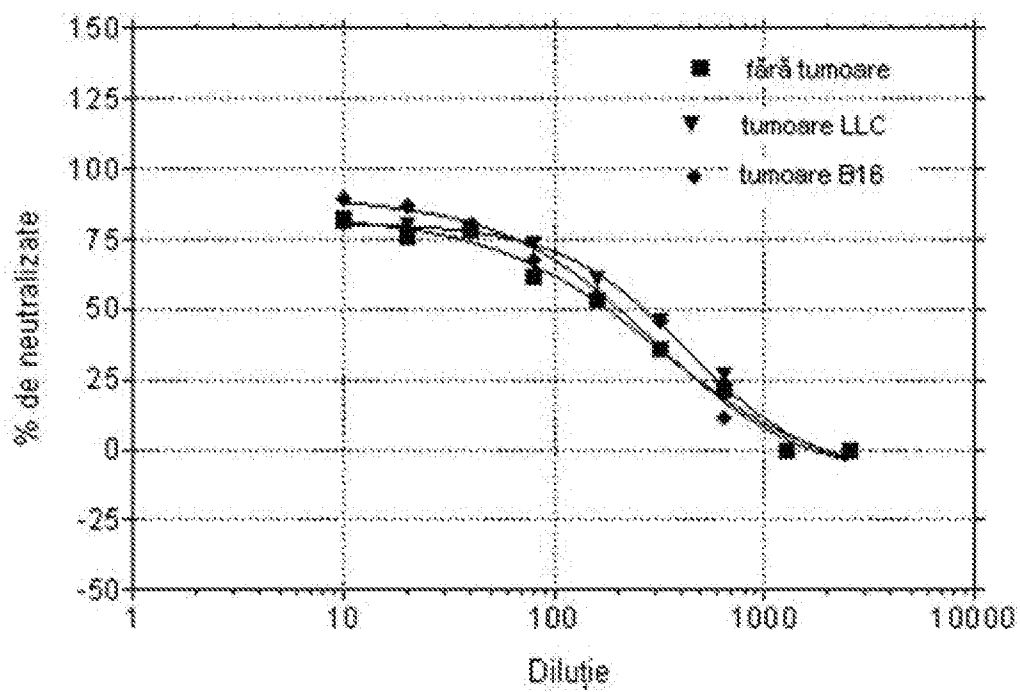


Fig. 14B

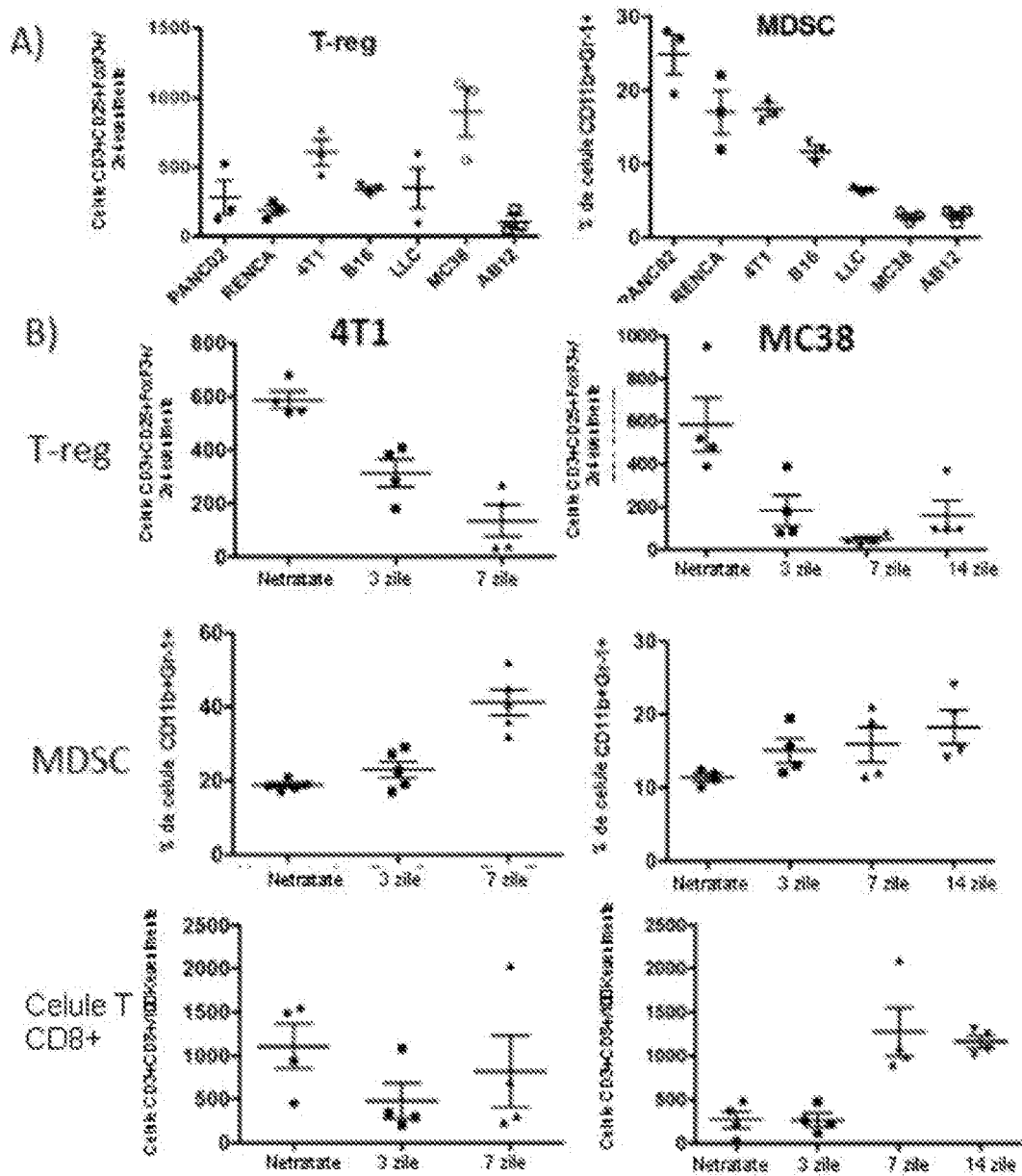


Fig. 15

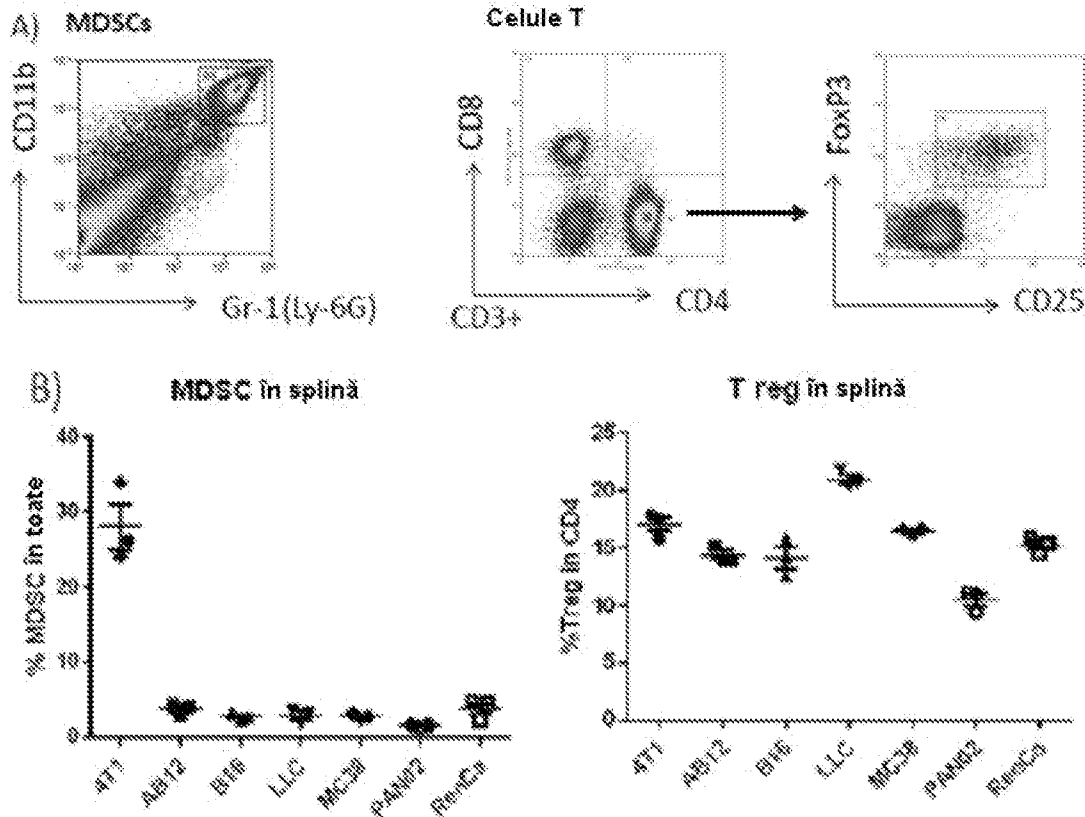


Fig. 16

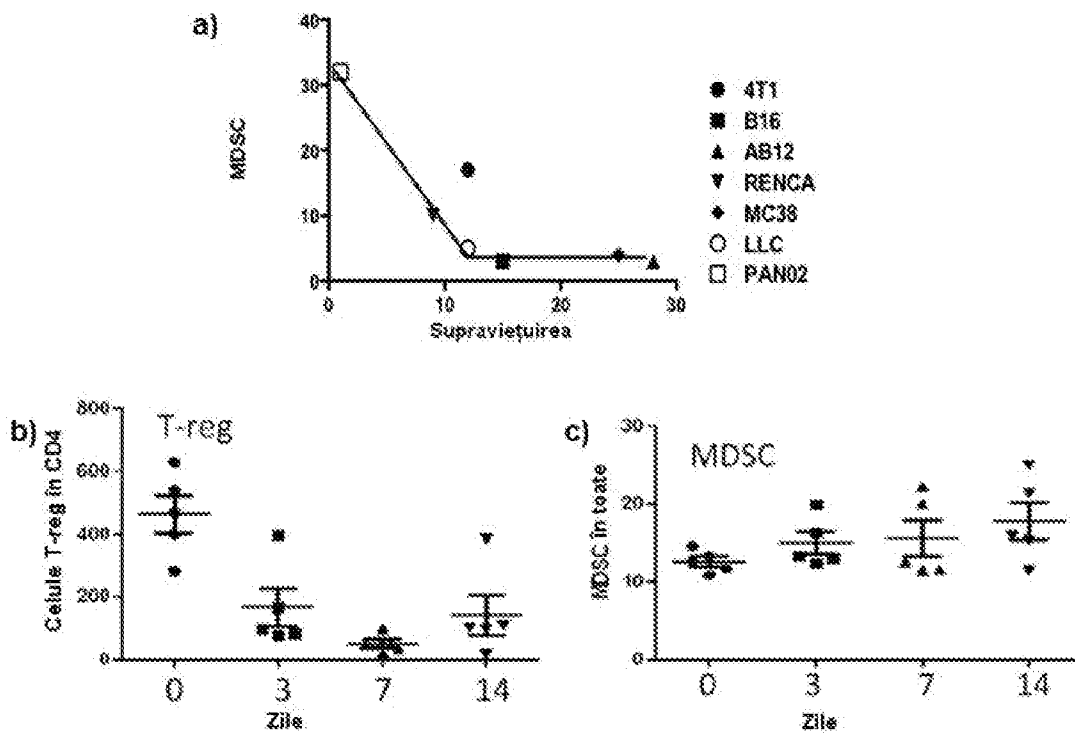


Fig. 17

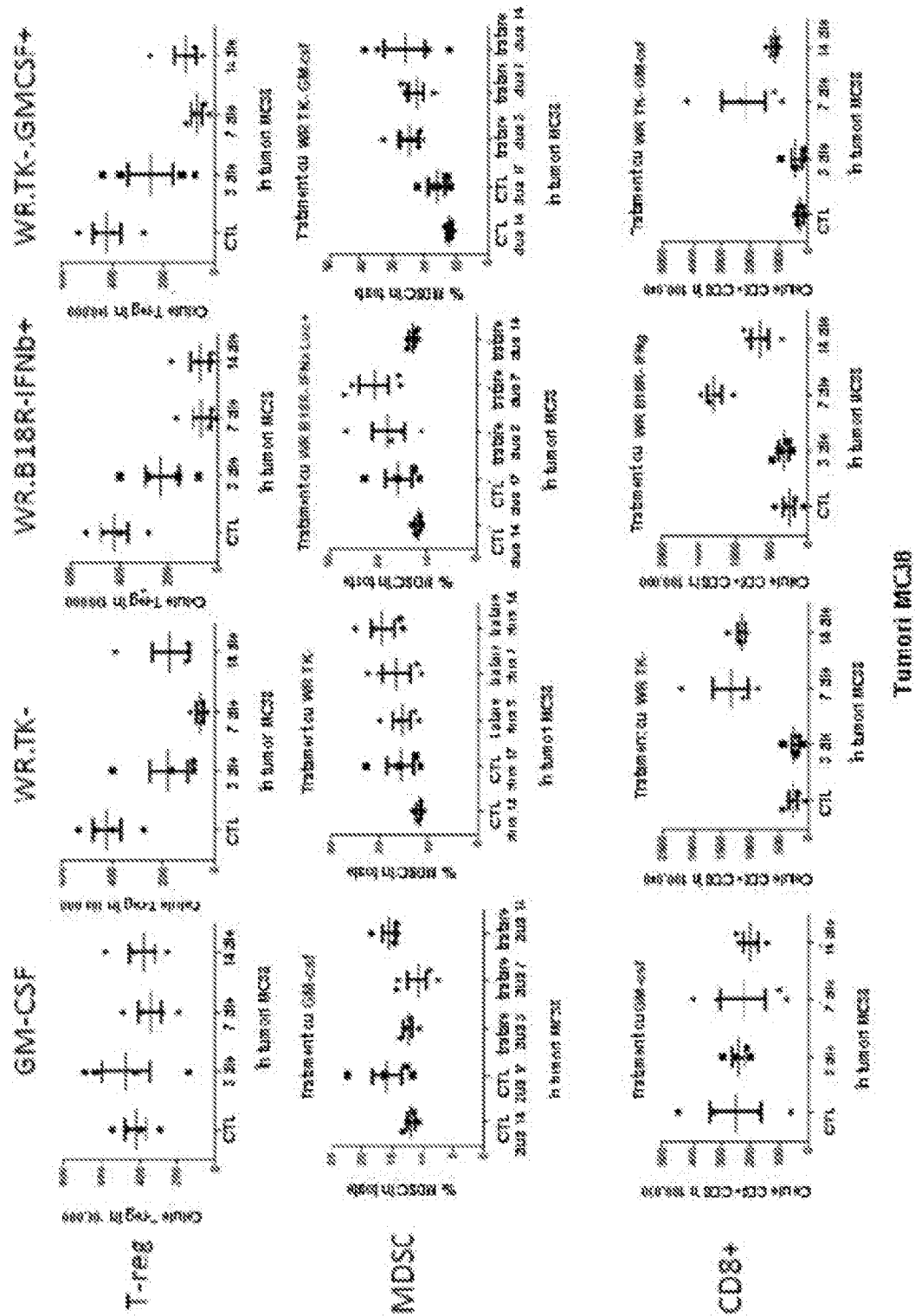


Fig. 18

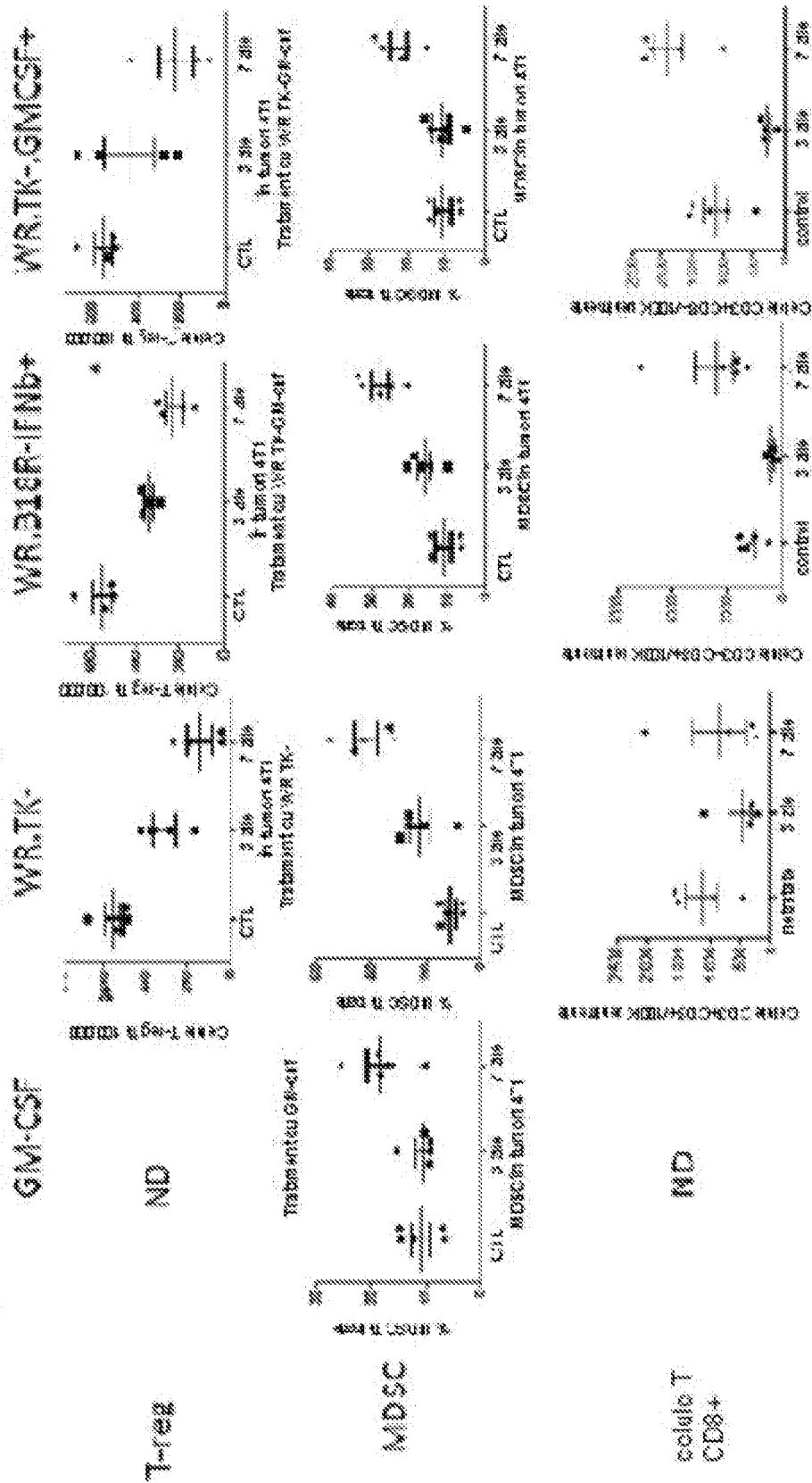


Fig. 19

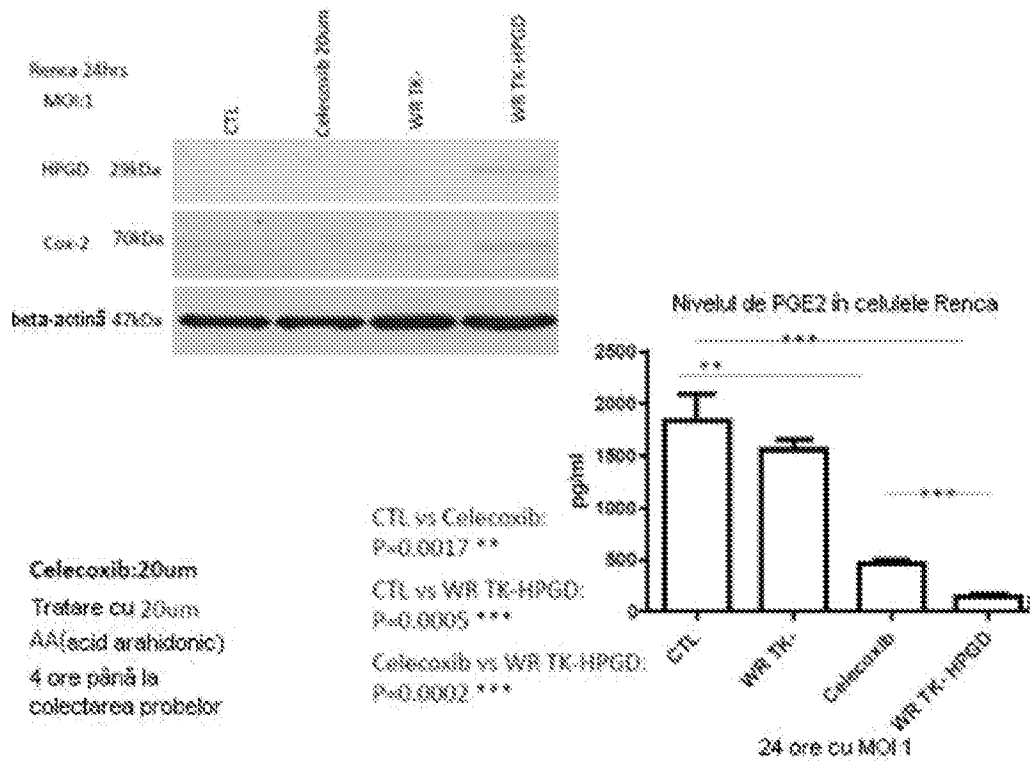


Fig. 20

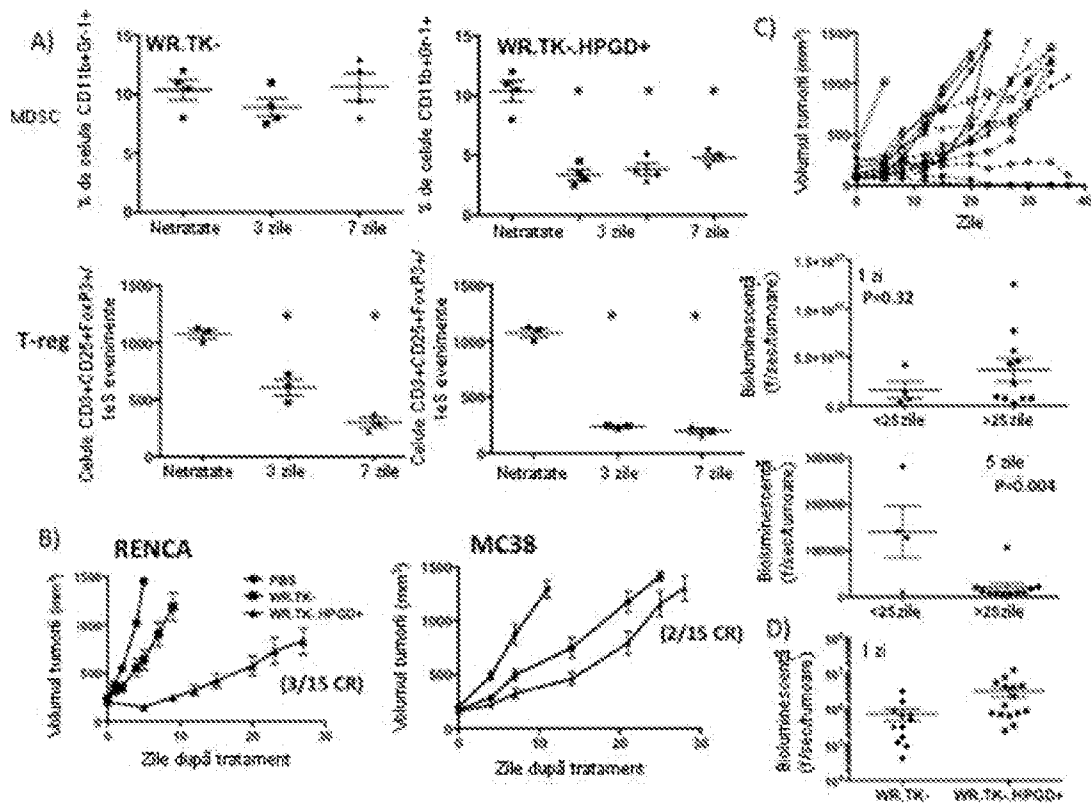


Fig. 21

**Expresia HPGD amplifică activitatea
terapeutică a virusului vaccinului variolic**

Renca

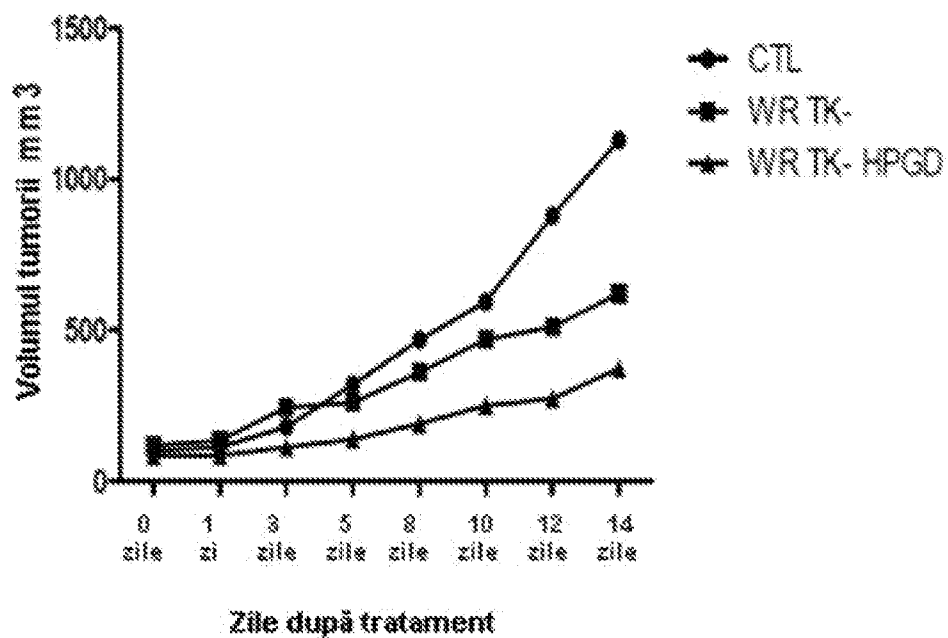


Fig. 22

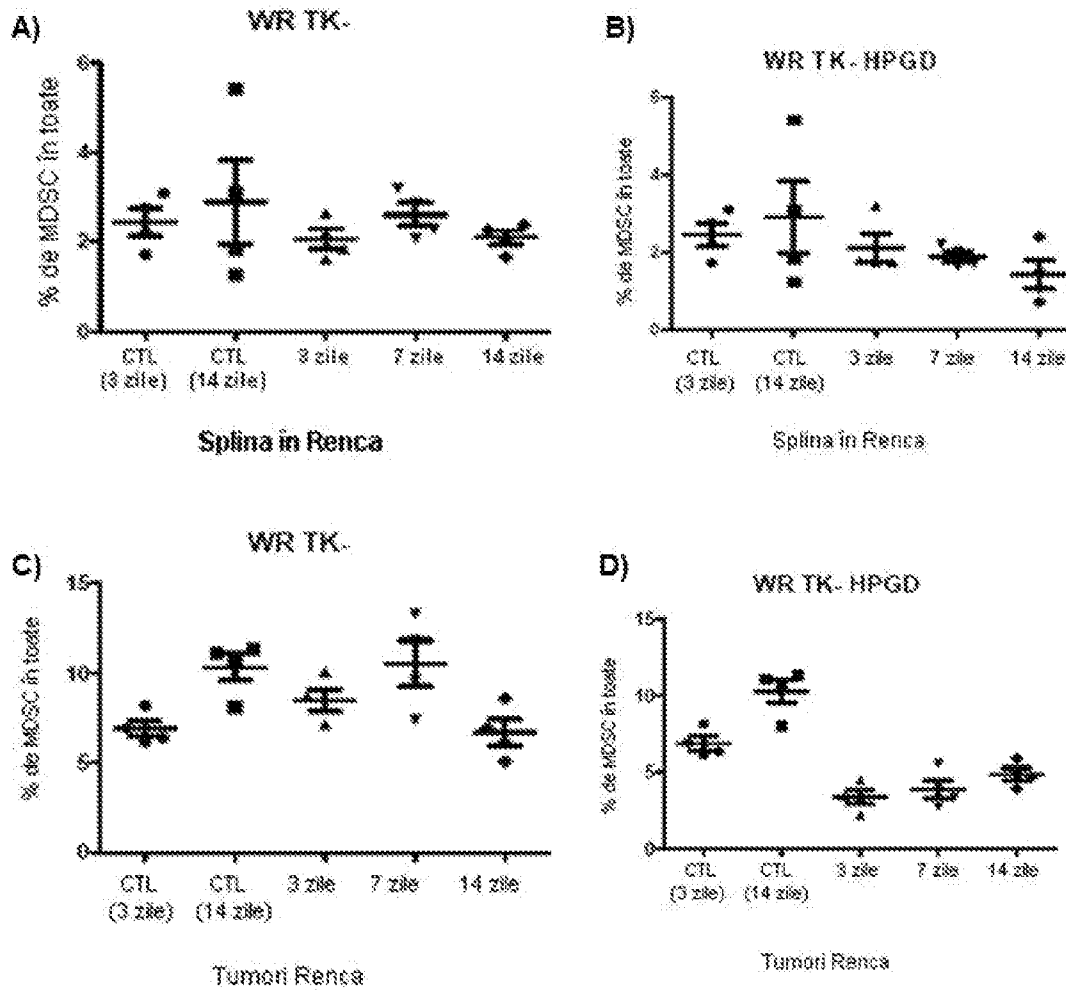


Fig. 23

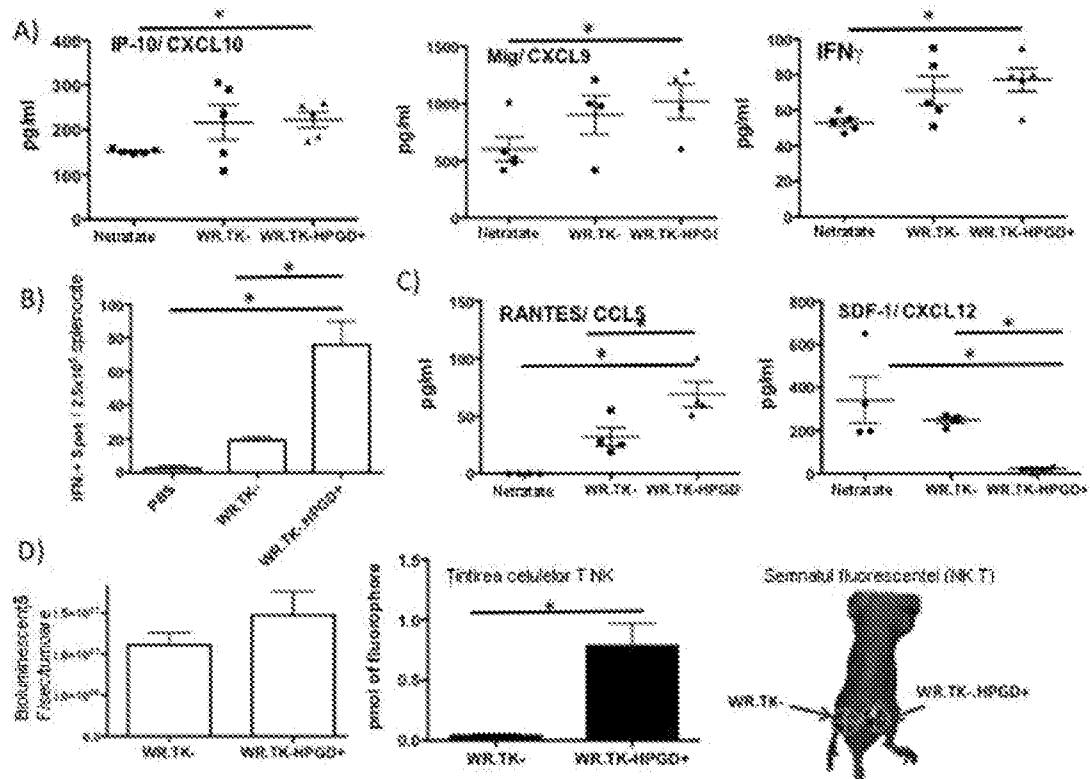


Fig. 24

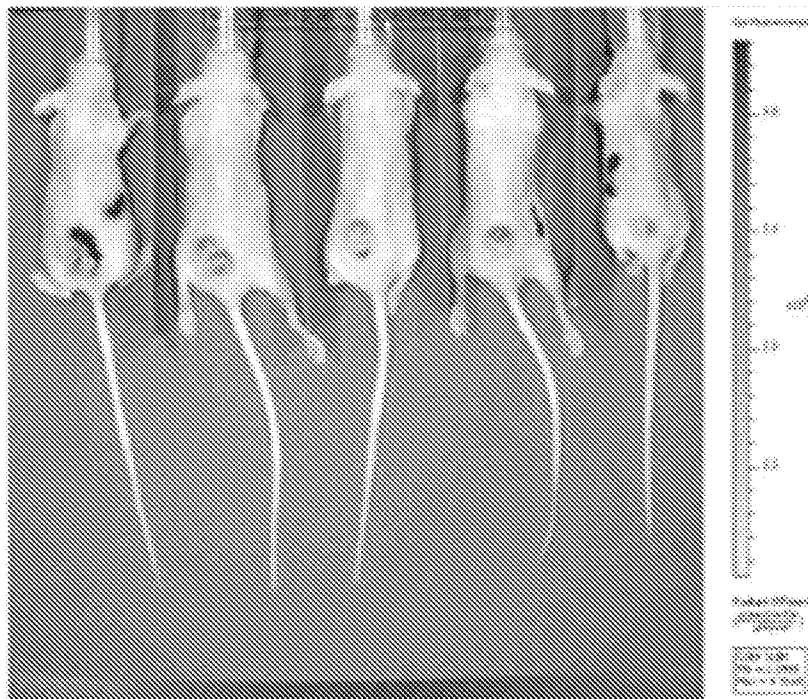
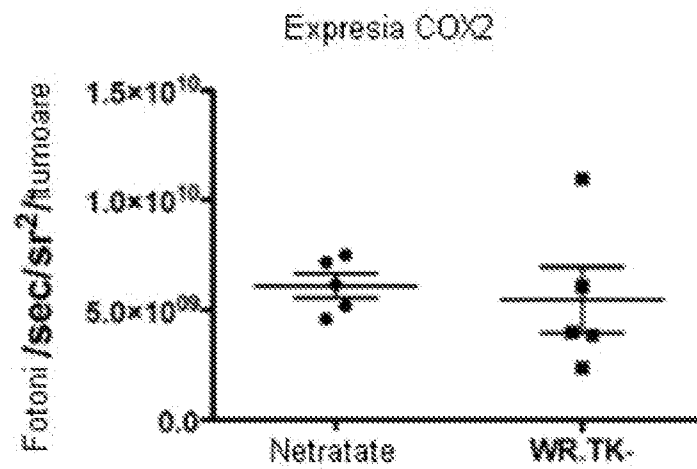


Fig. 25

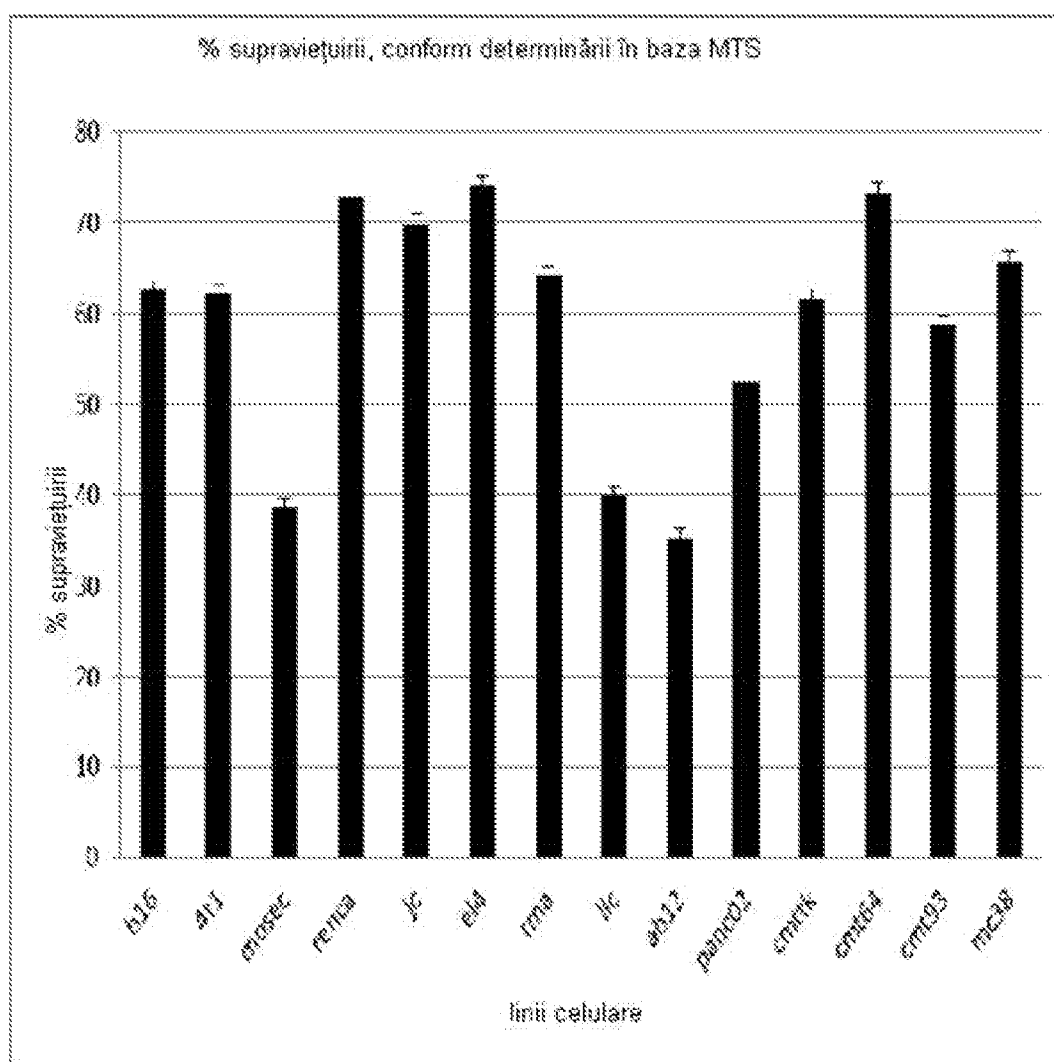


Fig. 26A

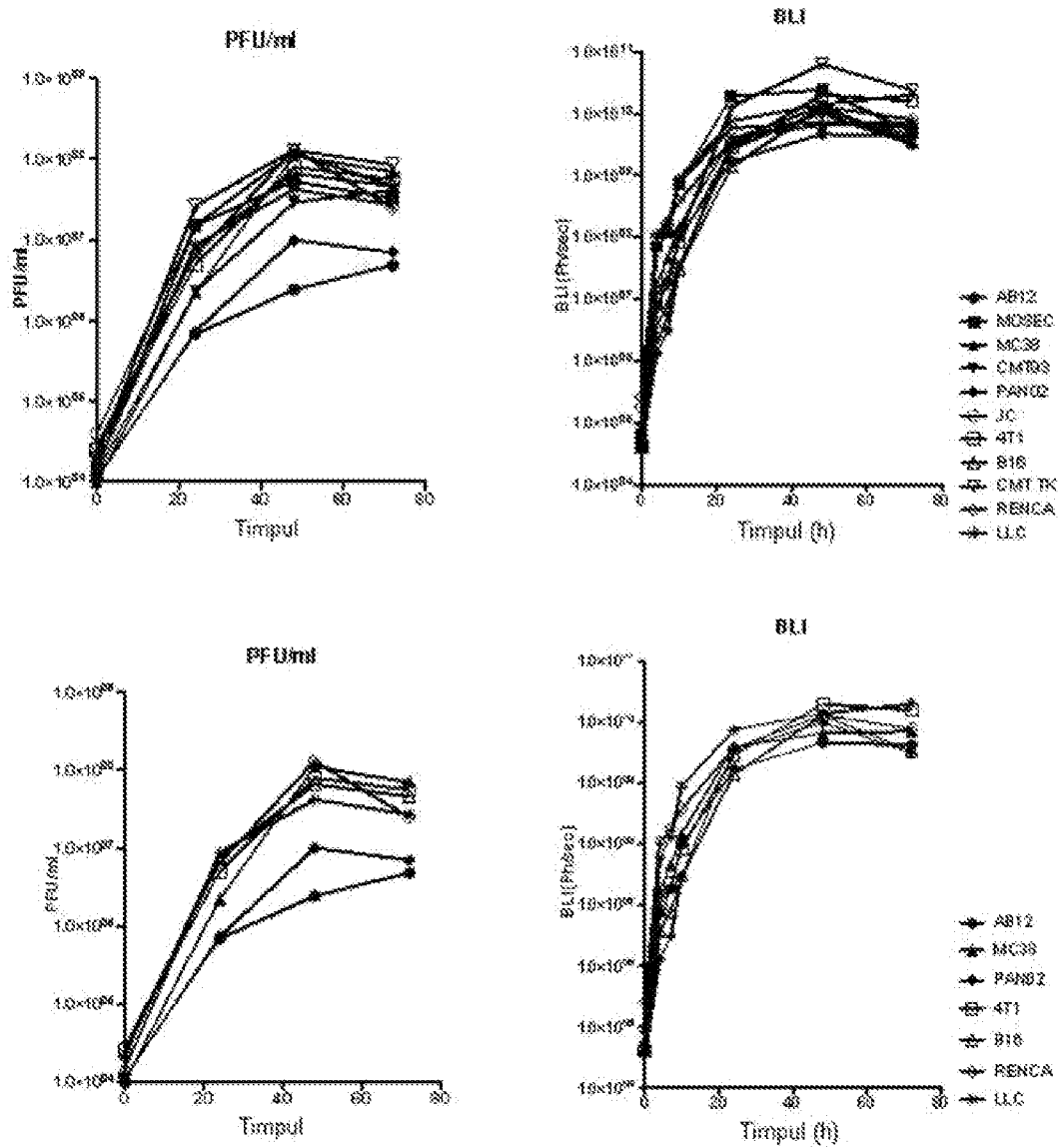


Fig. 26B

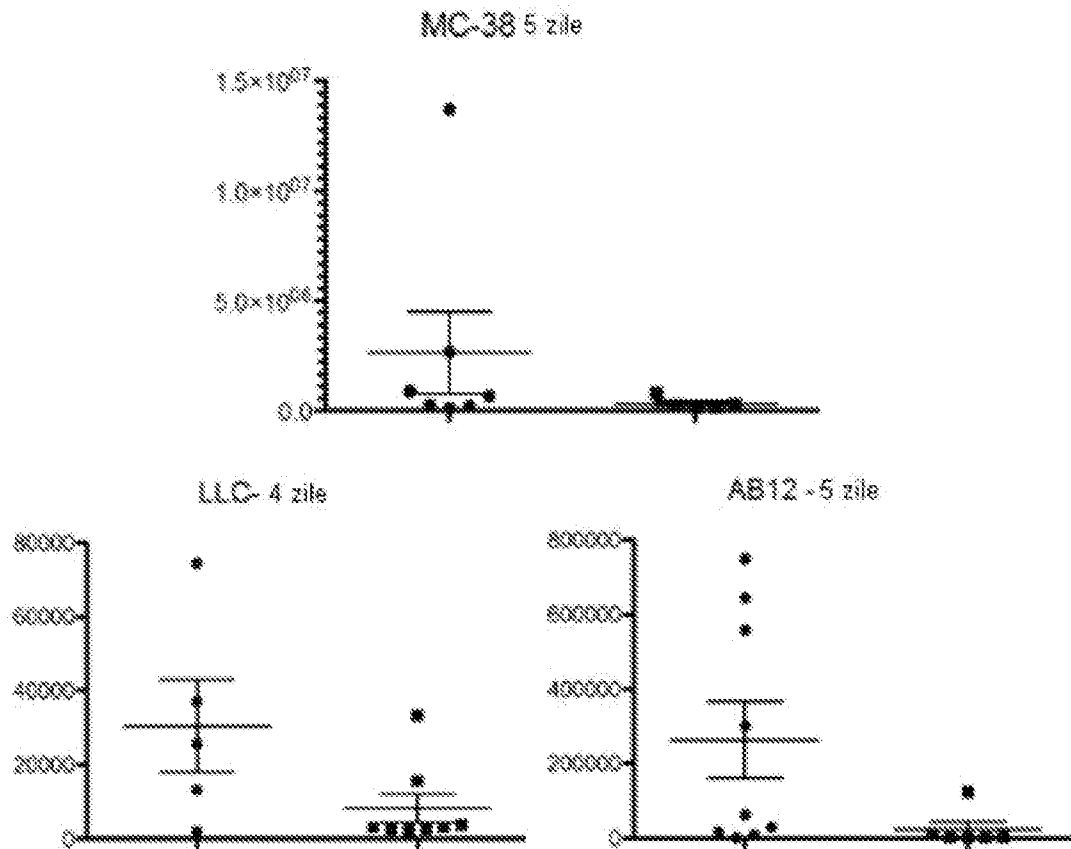


Fig. 27

Adiția expresiei HPGD la virusul inventatorilor
UPCI-1812 suplimentar amplifică activitatea terapeutică

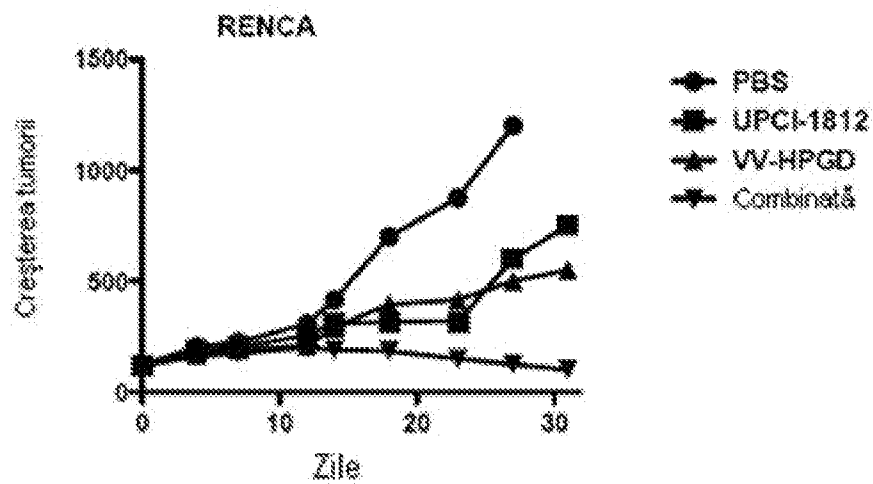


Fig. 28

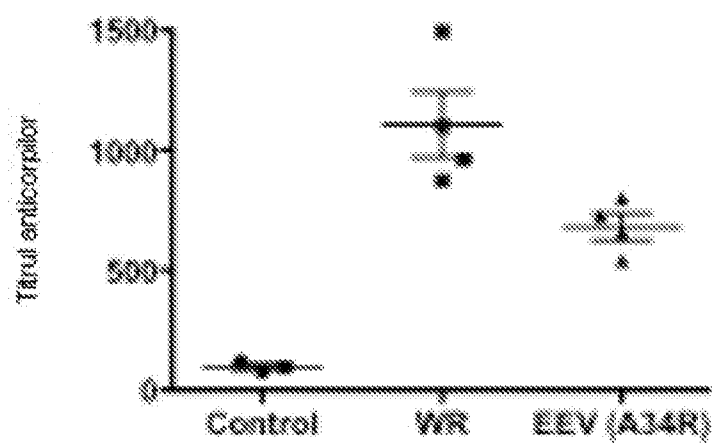


Fig. 29

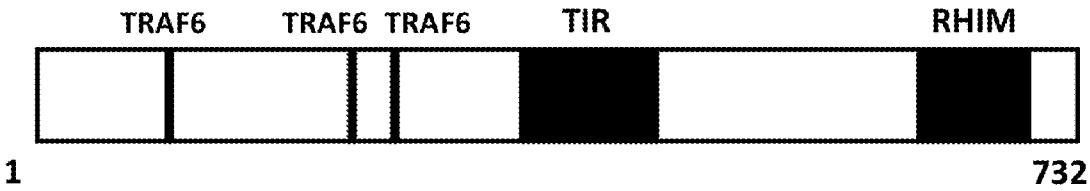


Fig. 30

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2016 0027 (32) Data de prioritate recunoscută: 2013.08.22
 (22) Data depozit: 2014.08.22 Raport de documentare internațională: ☒ da
 (71) Solicitant: **UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION, US**
 (54) Titlul: **Virusuri oncolitice de vaccin variolic și terapii imunooncolitice**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *C12N 15/39* (2006.01)
A61K 39/285 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): **Int.Cl:** *C12N 15/39* (2006.01)

A61K 39/285 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

virus oncolytic, vaccin variolic, TRIF, Toll/IL-1R

"Worldwide" (Espacenet): Int.Cl: *C12N 15/39* (2006.01)

A61K 39/285 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

oncolytic virus, variolovaccine, TRIF, Toll/IL-1R

EA, CIS (Eapatis): Int.Cl: *C12N 15/39* (2006.01)

A61K 39/285 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

онколитический вирус, осповакцина, TRIF, Toll/IL-1R

SU (nonpublic): Int.Cl: *C12N 15/39* (2006.01)

A61K 39/285 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

онколитический вирус, осповакцина, TRIF, Toll/IL-1R

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D, C	Guo Z.S., Thorne S.H., Bartlett D.L. Oncolytic virotherapy: Molecular targets in tumor-selective replication and carrier cell-mediated delivery of oncolytic viruses. Biochim. Biophys. Acta, 2008	1-24
A, D	Kim J.H., Oh L.Y., Park B.H., Lee D.E., Kim J.S., Park H.E., Roh M.S., Je J.E., Yoon J.H., Thorne S.H., Kirn D.,	1-24

	Hwang T.H. Systemic Armed Oncolytic and Immunologic Therapy for Cancer with JX-594, a Targeted Poxvirus Expressing GM-CSF. Mol. Ther. 14, 2006, p. 361-370	
A, D	Schmidt C. Amgen spikes interest in live virus vaccines for hard-to-treat cancers. Nature biotechnology 29, 2011, p. 295-296	1-24
A, D	Coffin R. Clinical Updates with oncolytic HSV. In 7th International Oncolytic Virus meeting , Quebec City, 2013	1-24
A, D	Bischoff J.R., Kirn D.H., Williams A., Heise C., Horn S., Muna M., Ng L., Nye J.A., Sampson-Johannes A., Fattacy A., McCormick F. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor sells. Science 274, 1996, p. 373-376	1-24
X	AU 2012/244210 A1 2012.12.15	1, 5-6, 8-12, 14-24
X	EP 2269618 A1 2011.01.05	1, 5-6, 8-12, 14-24
A	WO 2012142529 A2 2012.10.18	24
A	WO 2004014314 A2 2004.02.19	24
A	Wang L.C.S., et al. Treating tumors with a vaccinia virus expressing IFN β illustrates the complex relationship between oncolytic ability and immunogenicity. Molecular Therapy, 2012, vol. 20, p. 736-748	24
A	Li J., et al. Chemokine expression from oncolytic vaccinia virus enhances vaccine therapies of cancer. Molecular Therapy, 2011, vol. 19, p. 650-657	24
A	Laporte A.N. Enhancing the oncolytic efficacy of vaccinia virus by mutagenic augmentation of EEV production. MSc Thesis, 2012, University of Ottawa, Ontario, Canada	24
A	Thorne S.H. Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus. Immunologic Research, 2011, vol. 50, p. 286-293	24
A, D	Mccart J.A., et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. Cancer research 2001. 12.15, vol. 61, no 24, p. 8751-8757	1
X	Weintraub S., et al. Biogenesis of vaccinia. Effects of inhibitors of glycosylation on virus-mediated activities. Virology , 1977.05.01, vol. 78, no 1, p. 315-322	3
X	Hirvinen Mari, et al. DAI-Armed double deleted oncolytic vaccinia virus displays enhanced anti-tumor activity by eliciting a more robust anti-tumor immune response. Molecular Therapy, 2013.06.01, vol. 21, no suppl., p. s193-	1, 15

	s194	
Y	mpment of recombinant vesicular stomatitis virus for use as kine, vol. 56, no 1, 2011, p. 84	1, 15
Y	2011.09.29	1, 15
X, P	anipulating TLR Pthways Activated By Oncolytic Vaccinia Immune Response Against Tumors. Molecular Therapy, vol. 05, p. s12-s13	1, 6, 8
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
document care definește stadiul anterior ral	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidența principiul sau teoria pe care se bazează invenția	
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată	
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet	
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție	
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete	
P - document publicat inainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri	
Data finalizării documentării	2018.09.20	
Examinator	GROSU Petru	