

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037582**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.04.16

(51) Int. Cl. **C12N 15/39** (2006.01)
A61K 39/285 (2006.01)

(21) Номер заявки
201690444

(22) Дата подачи заявки
2014.08.22

(54) ИММУНООНКОЛИТИЧЕСКИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

(31) **61/868,978**

(32) **2013.08.22**

(33) **US**

(43) **2016.08.31**

(86) **PCT/US2014/052308**

(87) **WO 2015/027163 2015.02.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**ЮНИВЕРСИТИ ОФ ПИТТСБУРГ -
ОФ ДЗЕ КОММОНВЕЛТ СИСТЕМ
ОФ ХАЙЕР ЭДЬЮКЕЙШН (US)**

(72) Изобретатель:

Торн Стефен Говард (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) **AU-A1-2012244210**

EP-A1-2269618

WO-A2-2012142529

WO-A2-2004014314

KIM, J. H., et al., 'Systemic armed oncolytic and immunologic therapy for cancer with JX-594, a targeted poxvirus expressing GM-CSF', Molecular Therapy, 2006, vol. 14, pages 361-370

WANG, L.-C. S., et al., 'Treating tumors with a vaccinia virus expressing IFN γ illustrates the complex relationships between oncolytic ability and immunogenicity', Molecular Therapy, 2012, vol. 20, pages 736-748

LI, J., et al., 'Chemokine expression from oncolytic vaccinia virus enhances vaccine therapies of cancer', Molecular Therapy, 2011, vol. 19, pages 650-657

LAPORTE, A. N., 'Enhancing the oncolytic efficacy of vaccinia virus by mutagenic augmentation of EEV production', MSc Thesis, 2012, University of Ottawa, Ontario, Canada

THORNE, S. H., 'Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus', Immunologic Research, 2011, vol. 50, pages 286-293

(57) Изобретение относится к онколитическим вирусам осповакцины, модифицированным, чтобы стимулировать противоопухолевый иммунитет, и/или уменьшать иммунитет хозяина, и/или ответ антител хозяина против вируса. Оно основано, по меньшей мере частично, на обнаружении того, что онколитический вирус осповакцины, (i) несущий геномную делецию гена, уменьшающего Т-клеточный иммунитет (белка, связывающего интерлейкин-18); (ii) обработанный ферментом сиалидазой, что, как считают, уменьшает активацию TLR2 и таким образом, ответ антител; (iii) несущий ген, усиливающий индукцию цитотоксических Т-лимфоцитов (например, TRIF), и/или (iv) уменьшающий количество в опухоли супрессорных клеток миелоидного происхождения посредством уменьшения количества простагландина E2, уменьшает рост опухоли. Соответственно, настоящее изобретение относится к иммуноонколитическим вирусам осповакцины и к способам их применения в лечении злокачественных опухолей.

B1**037582****037582****B1**

По заявке на настоящий патент испрашивается приоритет временной заявки на патент США номер 61/868978, поданной 22 августа 2013 г., содержание которой полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки.

1. Введение

Настоящее изобретение относится к онколитическим вирусам осповакцины, модифицированным так, чтобы стимулировать противоопухолевый иммунитет и/или уменьшать ответ антител хозяина против вируса.

2. Уровень техники, предшествующий изобретению

Онколитические вирусы (OV) представляют собой вирусы с репликацией, которая естественным образом является избирательной или модифицирована, чтобы являться избирательной для клеток опухолей¹⁻³. Множество различных вирусных остонов проверяли в качестве OV, включая штаммы вируса осповакцины (VV)⁴⁻¹¹. По меньшей мере для трех отдельных онколитических векторов на основе осповакцины завершено тестирование фазы I, включая штамм vvDD^{6,7}. Для W OV, JX-594^{4,12} (Jennerex), недавно показаны очень многообещающие ответы в исследованиях фазы II для печеночноклеточной карциномы (HCC), включая системную доставку к опухолям^{13,14}. Кроме того, многообещающие результаты фазы III опубликованы для вируса герпеса HSV OV (T-Vec, Amgen^{15,16}) при терапии меланомы (16% ответов, по сравнению с 2% в контрольной группе). В связи с этим, начали выявлять истинный потенциал OV для лечения злокачественных опухолей (помимо исходного штамма аденовируса ONYX-015 (H-101)^{17,18}, который остается единственным терапевтическим средством на основе OV на каком-либо рынке¹⁹).

Несмотря на эти многообещающие результаты, полные ответы с использованием OV остаются редкими. Важно отметить, что штаммы OV первого и второго поколения преимущественно разработаны для разрушения клеток опухолей посредством избирательной репликации, напрямую приводящей к лизису клеток. Кроме того, как JX-594, так и T-Vec экспрессируют трансгенный цитокин (GM-CSF), который, как можно ожидать, резко стимулирует лимфоциты хозяина^{12,14,20,21}. Доклинические исследования показали критическую важность иммунного ответа в терапевтической активности онколитического VV, где (i) мыши являются поголовно устойчивыми к повторному заражению, следующему за полным ответом после терапии VV, что указывает на абсолютную необходимость индукции противоопухолевого адаптивного иммунитета²²; (ii) эффекты вакцин VV обеспечивают большее терапевтическое преимущество, чем эквивалентные вакцины DC²³; (iii) инфекция опухоли VV образует характерный цитокиновый профиль ("иммунологическую константу отторжения"²⁴); (iv) терапия VV уменьшает количество иммуносупрессивных клеток в опухоли (MDSC, T-reg и макрофагов M2)²⁵; (v) иммунный ответ, индуцированный терапией VV, способен уничтожить остаточную опухоль и метастазы, значительно позже выведения вируса, обеспечивая длительный иммунологический надзор для предотвращения обострения^{22,25,26}; и (vi) в некоторых исследованиях полагают, что надежная вирусная репликация не является фактически необходимой для терапевтического эффекта^{27,28}. Таким образом, иммунотерапевтические эффекты OV, в частности, VV, являются по меньшей мере такими же важными, как непосредственные онколитические эффекты, и эти векторы, возможно, следует рассматривать в первую очередь в качестве иммунотерапевтических средств.

Примечательно, что современные клинические векторы не разрабатывали в качестве иммунотерапевтических средств (за исключением экспрессии отдельных цитокинов), и эта область остается относительно недостаточно изученной. Поэтому, существует огромный нереализованный потенциал для улучшения онколитических векторов посредством оптимизации их взаимодействий с иммунной системой хозяина и для получения векторов, способных к вакцинации *in situ* против соответствующих антигенов опухоли. Альтернативно, большинством общепринятых способов для терапевтических вакцин против злокачественных опухолей достигали небольшого успеха в клинике, особенно против больших опухолей, несмотря на доказательства успешной иммунизации²⁹⁻³¹. Таким образом, необходимы также новые способы для вакцин, в идеале опосредующие индукцию ответов против соответствующих антигенов в каждой опухоли, преодолевающих супрессию даже внутри больших опухолей и улучшающих хоминг Т-клеток в опухолях-мишенях.

3. Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к "иммуноонколитическим" вирусам осповакцины, модифицированным, чтобы стимулировать противоопухолевый иммунитет и/или уменьшать иммунный ответ и ответ антител хозяина против вируса. Оно основано, по меньшей мере частично, на обнаружении улучшенного ингибирования роста опухоли посредством онколитического вируса осповакцины, который является обработанным средством, уменьшающим уровень гликозилирования, и/или обработанным ферментом сиалидазой (которые считают уменьшающими активацию TLR2 и уменьшающими ответ антител хозяина против вируса); и/или несет модификации или делеции нуклеиновой кислоты вирусного генома, кодирующей продукт, уменьшающий Т-клеточный иммунитет (вирусный белок, связывающий интерлейкин-18); и/или несет нуклеиновую кислоту, кодирующую продукт, который (i) усиливает индукцию цитотоксических Т-лимфоцитов (TRIF) и/или (ii) уменьшает количество в опухоли супрессорных клеток миелоидного происхождения (MDSC) посредством уменьшения количества простагландина E2. Соответствен-

но, настоящее изобретение относится к иммуноонколитическим вирусам осповакцины и к способам их применения в лечении злокачественных опухолей.

4. Краткое описание чертежей

Фиг. 1А-С. (А) Для вируса WR. ΔC12L показана избирательность для опухолей *in vivo* относительно исходного вируса WR. Мышей C57BL/6, несущих опухоли CMT-93, обрабатывали в/в 5e8 БОЕ вирусов, и мышей умерщвляли в предопределенные периоды времени после терапии. Вирусные БОЕ количественно определяли в различных тканях посмертно после гомогенизации. (В) Увеличенные противоопухолевые эффекты WR.ΔC12L. Мышей, несущих подкожные опухоли CMT-93, обрабатывали в/в однократной дозой (1e8 БОЕ) вируса и наблюдали выживаемость (определяемую как время до достижения объема опухоли 1000 мм³, как определено по измерению штангенциркулем). (С) Продукция IFN-γ (как маркер продукции эффекторных Т-клеток) из спленоцитов, выделенных от мышей, предварительно обработанных указанным вирусом, и после подвергания воздействию WR *ex vivo*.

Фиг. 2А-Е. Дегликозилирование оболочки вируса осповакцины. (А) Иммуноблоттинг, показывающий дегликозилирование белка оболочки вируса осповакцины. Очищенные вирусы WR и дегликозилированный WR разрушали и подвергали блоттингу с использованием антитела против B5R. Уменьшение массы белка соответствует дегликозилированию белка B5R. (В) Дегликозилирование оболочки вируса не оказывает эффекта на инфекционность вируса осповакцины. Различные линии клеток опухолей мыши инфицировали ТК или его дегликозилированным вариантом при MOI 1, и экспрессию вирусной люциферазы измеряли через 3 ч после инфекции посредством получения изображений с помощью биолуминесценции. Средние значения +SD из 3 независимых экспериментов наносили на график. (С) Дегликозилирование уменьшает активацию TLR2 *in vitro*. Клетки HEK293, экспрессирующие TLR2 мыши, трансфицировали рNiFty (репортерной плазмидой для передачи сигнала TLR). Через 24 ч после трансфекции, клетки инфицировали при MOI 1 WR или дегликозилированным WR, и активацию TLR2 количественно определяли через 24 ч после инфекции посредством получения изображений с помощью биолуминесценции. Изображены средние +SD из 3 независимых экспериментов (проведенных в четырех повторях). (D) фосфорилирование STAT3 истощено в лимфоцитах селезенки мышей, инфицированных дегликозилированным вирусом осповакцины. Процентное содержание pSTAT1-pSTAT3+ лимфоцитов определяли посредством проточной цитометрии. PBS и PAM(3)CSK(4) использовали в качестве контроля. Значения для индивидуальных мышей и средние +SEM для различных обработок нанесены на график. (Е) Дегликозилирование оболочки вируса осповакцины увеличивает экспрессию вирусных генов в опухолях *in vivo*. Мышей BALB/c, несущих подкожные ксенотрансплантаты клеток Rensa (почечная аденокарцинома мыши), случайным образом распределяли и подвергали инъекции однократной внутривенной дозы 1×10⁸ БОЕ на мышь ТК- или дегликозилированного ТК-. Кинетику экспрессии вирусных генов внутри опухолей мониторировали посредством получения изображений с помощью биолуминесценции для экспрессии вирусной люциферазы. Средние значения для 12-13 животных +SD наносили на график. *, значимое P<0,05 по сравнению с PBS или контролем. #, значимое P<0,05 по сравнению с группой ТК- или WR. φ, значимое P<0,05 по сравнению с группой PAM(3)CSK(4).

Фиг. 3А-Д. Прекращение активации TLR2 посредством дегликозилирования приводит к увеличенным терапевтическим эффектам. (А) Обработка штамма осповакцины WR ферментом сиалидазой (DS) приводит к потере активации пути передачи сигнала TLR2 в модели *in vitro* (активации NF-κB в клетках HEK293, трансфицированных для экспрессии TLR2). (В) Для вируса DS WR показана значительно улучшенная системная доставка в опухоли мышей (подкожные опухоли 4Т1 у мышей BALB/c с вирусом, доставленным в/в, и экспрессией вирусного трансгена люциферазы в опухоли, определенной через 24 ч посредством получения изображений с помощью биолуминесценции (примечание: для не относящихся к опухоли тканей не показано различий в поглощении вируса). (С) Противоопухолевый эффект в такой же модели показал терапевтическое преимущество вируса DS. (D) Потеря активации TLR2 (у трансгенных мышей с нокаутом TLR2) после инфекции осповакциной приводит к значительно сниженной индукции противовирусного нейтрализующего антитела (нейтрализующего антитела, измеренного как способность различных разведений сыворотки мыши, собранной через 14 суток после обработки WR, предотвращать экспрессию вирусного трансгена люциферазы после смешивания с WR.TK-Luc+ и инфекции слоя клеток BSC-1).

Фиг. 4А-С. (А) Схематическая диаграмма, представляющая конструкцию вируса ТК-TRIF и схематическая диаграмма, представляющая конструкцию вируса ТК-DAI. (В) Анализы ELISA использовали для определения концентраций TRIF в клетках, инфицированных ТК- и ТК-TRIF. (С) Вестерн-блоттингом показана экспрессия DAI в контроле ТК-DAI.

Фиг. 5А-С. (А) Экспрессия TRIF с вируса осповакцины усиливает продукцию IFN типа I *in vitro*, даже более экспрессии в штамме B18R-. (В) Экспрессия TRIF увеличивала продукцию CTL *in vivo*. (С) Дополнительно усиленный терапевтический эффект *in vivo* после однократной в/в доставки 1e8 БОЕ вируса мышам BALB/c, несущим подкожные опухоли Rensa.

Фиг. 6А-Д. Онколитический вирус осповакцины, экспрессирующий белок TRIF мыши, увеличивал активацию отвечающих на TLR путей и высвобождение провоспалительных цитокинов и хемокинов. (А-

В) Активация путей NF- κ B (А) и IRF3 (В) после инфекции ТК-TRIF и ТК-DAI. Анализы ELISA использовали для определения концентраций pIKK3 и IRF3 в цитоплазматических и ядерных экстрактах, соответственно, клеток 4T1 или MEF, инфицированных ТК-, ТК-TRIF или ТК-DAI при MOI 1. Анализы проводили через 24 ч после инфекции. Данные получали в четырех повторах из 2 независимых экспериментов и наносили на график как кратность изменения по сравнению с ТК- +SD. Пунктирной линией показан уровень активации ТК-. (С) Высвобождение цитокинов и хемокинов *in vitro* после инфекции ТК-TRIF и ТК-DAI. Концентрации IL-6, IP-10, TNF- α , и IFN- β в супернатанте клеток Rensa, 4T1, MC38 и MEF оценивали посредством анализа Luminex через 24 ч после инфекции ТК-, ТК-TRIF или ТК-DAI (MOI 1). Данные представлены как кратность изменения по сравнению с ТК- +SD (2 независимых эксперимента). Пунктирной линией показаны концентрации ТК-. (D) внутриопухолевая концентрация цитокинов и хемокинов *in vivo*. Мышей BALB/c с прижившимися подкожными ксенотрансплантатами Rensa случайным образом распределяли и подвергали инъекции однократной внутривенной дозы 1×10^8 БОЕ на мышь ТК- или ТК-TRIF. Кратность изменения по сравнению с ТК- для 4-5 мышей +SD нанесено на график. Пунктирной линией указаны концентрации ТК-. *, значимое $P < 0,05$ по сравнению с группой ТК-. #, значимое $P < 0,05$ по сравнению с группой ТК-DAI.

Фиг. 7А-Е. Анализы ELISA использовали для определения концентрации NF- κ B (А), HMGB1 (В) и Hsp-70 (С) в клетках, инфицированных ТК-, ТК-TRIF или ТК-DAI при MOI 1. Анализы проводили через 24 ч после инфекции. Данные получали и наносили на график как кратность изменения по сравнению с ТК- +SD. Пунктирной линией указан уровень активации для ТК-. Анализировали уровень Т-клеток-помощников (D) и регуляторных Т-клеток (Е) в ответ на инфекцию вирусом ТК- или ТК-TRIF.

Фиг. 8А-Д. Репликация и противоопухолевая активность ТК-TRIF и ТК-DAI. (А) Продукция вирусов ТК-TRIF и ТК-DAI в клетках опухолей мыши. Различные линии клеток опухолей инфицировали при MOI 1, и продукцию вируса измеряли посредством анализа бляшек в различные моменты времени. Выход вируса оценивали в четырех повторах для каждой линии клеток, посредством проведения двух независимых экспериментов. Средние +SD нанесены на график. (В) Сравнительная цитотоксичность ТК-TRIF и ТК-DAI. Клетки инфицировали указанными вирусами в дозах в диапазоне от 75 до 0,00025 БОЕ/клетку. Показаны значения EC_{50} (MOI, необходимое, чтобы вызывать 50% уменьшение жизнеспособности культуры клеток) на сутки 4 после инфекции. Четыре различных повтора количественно оценивали для каждой линии клеток, и показано среднее для каждого MOI. (С-Д) Экспрессия вирусных генов и противоопухолевая эффективность *in vivo*. Ксенотрансплантаты Rensa или MC38 имплантировали мышам BALB/c или C57BL/6, соответственно, и мышам инъецировали PBS или 1×10^8 БОЕ ТК-, ТК-TRIF или ТК-DAI через хвостовую вену. Экспрессию вирусной люциферазы в опухолях (С) и объемы опухолей (D) измеряли в указанные моменты времени. $n=12-15$ мышей/группу +SE. *, значимое $P < 0,05$ по сравнению с группой PBS. #, значимое $P < 0,05$ по сравнению с группой ТК-. ϕ , значимое $P < 0,05$ по сравнению с группой ТК-DAI.

Фиг. 9А-Е. (А) Экспрессия вирусных генов ТК-TRIF и ТК-DAI в клетках опухолей мышей. Различные линии клеток опухолей инфицировали при MOI 1, и экспрессию вирусной люциферазы количественно определяли посредством получения изображений с помощью биоломинесценции в различные моменты времени. Экспрессию люциферазы оценивали в четырех повторах для каждой линии клеток, посредством проведения двух независимых экспериментов. Средние +SD нанесены на график. (В) Процентное содержание апоптотических клеток после инфекции ТК-TRIF и ТК-DAI. Панель линий клеток опухолей мышей инфицировали указанными вирусами с использованием MOI 1. Через 48 ч после инфекции, процентное содержание некротических и апоптотических клеток определяли проточной цитометрией посредством окрашивания PI и аннексина V. Проводили два независимых эксперимента, и средние +SD нанесены на график. (С-Д) ТК-TRIF улучшает противоопухолевую эффективность ТК-GMCSF в полуортопической модели на молочной железе. Клетки 4T1 имплантировали в жировой слой молочной железы мышам BALB/c и после приживания опухоли, мышам инъецировали PBS или 1×10^8 БОЕ ТК-, ТК-TRIF, или ТК-GMCSF через хвостовую вену. Экспрессию вирусной люциферазы внутри опухолей (С) и объемы опухолей (D) измеряли в указанные моменты времени. $n=12-14$ мышей/группу +SE. (Е-Е) ТК-TRIF улучшает выживаемость мышей, несущих опухоли. Мышей BALB/c или C57BL/6, несущих ксенотрансплантаты Rensa (Е) или MC38 (F), соответственно, обрабатывали, как на фигуре 3d, и конечную точку определяли при объеме опухоли ≥ 750 мм³. Кривые выживаемости Каплана-Мейера нанесены на график. $n=12-15$ мышей/группу. *, значимое $P < 0,05$ по сравнению с группой PBS или контроля. #, значимое $P < 0,05$ по сравнению с группой ТК-. ϕ , значимое $P < 0,05$ по сравнению с группой ТК-GMCSF. ω , значимое $P < 0,05$ по сравнению с группой ТК-DAI.

Фиг. 10А-Е. (А) Изменчивость массы тела после внутривенного введения дегликозилированного ТК-TRIF. Мышам BALB/c инъецировали внутривенно 1×10^8 БОЕ на мышь ТК-, ТК-TRIF или дегликозилированного ТК-TRIF. Введение фосфатно-солевого буфера (PBS) использовали в контрольной группе. Для подвергнутых инъекции ТК- мышам выявлено уменьшение массы тела более 10% на сутки 6 после инъекции вируса, в то время как для подвергнутых инъекции ТК-TRIF и дегликозилированного ТК-TRIF мышам выявлен профиль массы, сходный с профилем для мышам, подвергнутых инъекции PBS. (В)

Экспрессия вирусных генов *in vivo* после введения дегликозилированного ТК-TRIF. Опухоли Rensa имплантировали мышам BALB/c, и мышам инъецировали PBS или 1×10^8 БОЕ ТК-, ТК-TRIF или дегликозилированного ТК-TRIF через хвостовую вену. Экспрессию вирусной люциферазы внутри опухолей измеряли в указанные моменты времени. $n=12-14$ мышей/группу +SE. (C-D) Выживаемость несущих опухоли мышей, обработанных дегликозилированным ТК-TRIF. (C-D) Ксенотрансплантаты Rensa (C) или MC38 (D) приживались в мышах BALB/C или C57BL/6, соответственно, и их обрабатывали однократной внутривенной дозой 1×10^8 БОЕ указанных вирусов или PBS. Конечную точку определяли при объеме опухоли $>750 \text{ мм}^3$, и кривые выживаемости Каплана-Мейера наносили на график. $n=12-15$ мышей/группу. (E). Дегликозилированный ТК-TRIF улучшал выживаемость по сравнению с группой обработки ТК-GMCSF. Мышей (BALB/c, несущих подкожные опухоли Rensa) обрабатывали посредством инъекции в хвостовую вену PBS или однократной дозы 1×10^8 БОЕ ТК-GMCSF или дегликозилированного ТК-TRIF ($n=10-12$ на группу). Кривые выживаемости Каплана-Мейера получали после установки конечной точки $>750 \text{ мм}^3$ для объема опухоли. *, значимое $P<0,05$ по сравнению с группой PBS. #, значимое $P<0,05$ по сравнению с группой ТК-. ф, значимое $P<0,05$ по сравнению с группой дегликозилированного ТК-. ф, значимое $P<0,05$ по сравнению с группой ТК-TRIF. Ψ, значимое $P<0,05$ по сравнению с группой ТК-GMCSF.

Фиг. 11A-F. Комбинация дегликозилирования оболочки и экспрессии TRIF мыши резко стимулировала противоопухолевые клеточные ответы и обладала сильной противоопухолевой эффективностью. (A-B) Клеточные иммунные ответы на вирус осповакцины и клетки опухолей оценивали посредством анализа IFN- γ ELISpot. На сутки 7 после введения вируса, селезенки собирали от мышей, подвергнутых внутривенной инъекции 1×10^8 БОЕ указанных вирусов или PBS (мыши BALB/c, несущие ксенотрансплантаты Rensa), и оценивали количество CTL, узнающих вирус осповакцины (A) или клетки Rensa (B). Показаны значения для индивидуальных мышей и средние $\pm$ SEM. (C) Титры нейтрализующих антител в сыворотке. Анализ нейтрализации проводили для определения циркулирующих уровней антител против вируса осповакцины для мышей, подвергнутых инъекции 1×10^8 БОЕ ТК-, ТК-TRIF или дегликозилированного ТК-TRIF. Титры Nab определяли по наивысшему разведению сыворотки, приводящего по меньшей мере к 50% ингибированию инфекции. Значения для индивидуальных мышей и средние $\pm$ SEM нанесены на график. (D-E) Противоопухолевая активность *in vivo* в различных моделях. BALB/c, несущих ксенотрансплантаты опухоли Rensa (D), или C57BL/6, несущих ксенотрансплантаты опухоли MC38 (E), обрабатывали однократной внутривенной дозой указанных вирусов (1×10^8 БОЕ/мышь). За ростом опухоли следили посредством измерений штангенциркулем. Показаны средние для 12-15 мышей на группу +SE. (F) Для дегликозилированного ТК-TRIF показана более сильная противоопухолевая активность, чем для ТК-GMCSF. Мышам BALB/c, несущим ксенотрансплантаты Rensa, инъецировали внутривенно дозу 1×10^8 БОЕ/мышь ТК-GMCSF или дегликозилированного ТК-TRIF. Относительный объем опухоли после введения вируса нанесен на график ($n=12-15$ мышей/группу +SE). *, значимое $P<0,05$ по сравнению с группой PBS. #, значимое $P<0,05$ по сравнению с группой ТК-. ф, значимое $P<0,05$ по сравнению с группой дегликозилированного ТК-. ф, значимое $P<0,05$ по сравнению с группой ТК-TRIF.

Фиг. 12A-C. (A) Для штамма осповакцины WR с обработкой DS, делецией C12L и экспрессией mTRIF (названного UPCI-1812) показаны усиленные противоопухолевые эффекты у мышей BALB/c, несущих опухоли 4T1, относительно современных клинических штаммов WR.TK-GM-CSF+ (в качестве модели штамма JX-594). Для вируса UPCI-1812 показана также увеличенная продукция иммунотерапевтических цитокинов в микроокружении опухоли, включая (B) интерферон гамма и (C) интерлейкин-12.

Фиг. 13A-C. (A) Выживаемость различных линий клеток опухолей анализировали после инфекции вирусом ТК-. (B) Экспрессия вирусных генов в опухолях, полученных из мышей BALB/c и C57BL/6 после имплантации конкретных линий клеток опухолей, и объем опухолей, полученных из BALB/c и C57BL/6 после имплантации конкретных линий клеток опухолей и инфекции ТК-. (C) Детекция фосфорилированного Sp6 в миелоидных клетках в опухолях, полученных от мышей BALB/c и C57BL/6 после имплантации конкретных линий клеток опухолей и обработки ТК-.

Фиг. 14A-B. (A) Мышей, не несущих опухолей, или несущих подкожные опухоли, происходящие из клеток LLC или B16 ($50-100 \text{ мм}^3$), обрабатывали однократной внутривенной инъекцией 1×10^7 БОЕ WR.TK-. Мышей ($n=3$ на группу и период времени) умерщвляли в указанные периоды времени, и выделяли селезенки и сыворотку. Спленоциты быстро фиксировали и пермеабелизовали (в соответствии с опубликованным ранее протоколом авторов настоящего изобретения), а затем окрашивали способом phosflow для детекции активации путей передачи сигнала. Это проводили для регуляторных Т-клеток (CD3+CD4+CD8-FoxP3+CD25+) с анализом pSTAT5, pS6 и Ki67; для CD4 Т-клеток (CD3+CD4+CD8-FOXP3-) с анализом pS6, Ki67, CD44 и CD62L; и для CD8 Т-клеток (CD3 + CD4-CD8+FoxP3-) с анализом pS6, Ki67, CD44 и CD62L. (B) Уровни нейтрализующих антител против вируса также проверяли в сыворотке.

Фиг. 15A-B. (A) Концентрация регуляторных Т-клеток и клеток MDSC в различных моделях опухолей на мышах, инфицированных ТК-. (B) Концентрация регуляторных Т-клеток, клеток MDSC и CD8+ Т-клеток в моделях опухолей 4T1 и MC38 на мышах, инфицированных ТК-.

Фиг. 16А-В. (А) Показаны способы отбора для детекции MDSC (слева), и Т-клеток и Т-reg (справа) для спленоцитов или клеток, выделенных из дезагрегированных опухолей. (В) Уровни MDSC и Т-reg в селезенке показаны для мышей, несущих различные опухоли.

Фиг. 17А-С. (А) Для штамма осповакцины ТК- показана очень слабая способность увеличивать медианную выживаемость (относительно контроля с PBS) в моделях опухолей на мышах, для которых показаны высокие уровни MDSC в исходной точке. Также, терапия вирусом ТК- может уменьшать уровни (В) Т-reg в обработанных опухолях, но не оказывает влияния на уровни MDSC (С).

Фиг. 18. Анализ иммунного ответа у мышей с имплантированными клетками опухолей MC3 8 после обработки иммуногенными штаммами осповакцины, GM-CSF, WR.TK-GM-CSF, WR.B18R-IFN α +, WR.B18R-IFN β + и WR. B18R-IFN γ +, по сравнению с иммунным ответом, вызванным инфекцией ТК-.

Фиг. 19. Анализ иммунного ответа у мышей с имплантированными клетками опухолей 4Т1 после обработки иммуногенными штаммами осповакцины, GM-CSF, WR.TK-GMCSF и WR. B18R-IFN β +, по сравнению с иммунным ответом, вызванным инфекцией ТК-.

Фиг. 20. Экспрессия COX2 и HPGD после экспрессии WR-TK-HPGD или обработки ингибитором Cox 2, цеlexоксиком. Бета-актин детектировали в качестве контроля нанесения. Экспрессию PGE2 определяли в клетках Rensa после инфекции WR-TK-HPGD или WR ТК-, или обработки цеlexоксиком.

Фиг. 21А-D. Экспрессия HPGD с онколитического вируса осповакцины уменьшала количество MDSC в опухоли и сенсibiliзировала остаточные опухоли к терапии вирусами. (А) Эффект экспрессии HPGD на уровни Т-reg и MDSC в опухоли. Мышей, несущих опухоли Rensa, обрабатывали посредством внутриопухолевой инъекции низкой дозы (1×10^7 БОЕ) указанного вируса, и мышей умерщвляли в указанные периоды времени, опухоли выделяли, дезагрегировали и анализировали проточной цитометрией, как ранее. Экспрессия HPGD уменьшает уровни MDSC и Т-reg (* $p < 0,05$ по сравнению с контролем). (В) Усиленная терапевтическая активность WR.TK-HPGD+. Мышей, несущих подкожные опухоли Rensa или MC38, обрабатывали посредством однократной внутриопухолевой инъекции PBS или 1×10^7 БОЕ WR.TK- или WR.TK-HPGD+, и за последующим ростом опухоли следили посредством измерения штангенциркулем ($n=15$ на группу; WR.TK-HPGD+ значимо ($p < 0,05$) задерживал рост опухоли от суток 3 (RENCA) или суток 7 (MC38) по сравнению с WR.TK- и приводил к 3 полным ответам для RENCA и 2 для MC38. Ни для одной мыши из любой другой группы не показан CR). (С) Сравнение роста опухоли и экспрессии вирусных генов для обработки WR.TK-HPGD+. Рост опухоли для индивидуальных мышей с опухолями Rensa и после обработки WR.TK-HPGD+ нанесен на график, по сравнению с контролем с PBS (серый столбец) и разделен на обладающих хорошим (сплошная линия) и наилучшим (пунктирная линия) ответом. Сигнал биолюминесценции (экспрессия вирусных генов) в опухоли на сутки 1 и 5 нормализован по объему опухоли и показан для обладающих как хорошим, так и наилучшим ответом. (D) Экспрессия HPGD не уменьшала экспрессию вирусных генов. Показана экспрессия вирусного гена люциферазы внутри опухоли через 24 ч после обработки WR.TK- или WR.TK-HPGD+.

Фиг. 22. Объем опухоли как функция суток после обработки контролем с PBS (CTL; круги), отрицательным по тимидинкиназе Western Reserve W (WR ТК-; квадраты) или отрицательным по тимидинкиназе (TK) Western Reserve VV, несущим HPGD (WR ТК-HPGD, треугольники) (HPGD представляет собой мышинный эквивалент белка 15-PGDH человека).

Фиг. 23А-D. Процент MDSC в (А) селезенке мышей, инфицированных WR ТК-; (В) селезенке мышей, инфицированных WR ТК- HPGD; (С) опухоли мышей, инфицированных WR ТК-; и (D) опухоли мышей, инфицированных WR ТК- HPGD.

Фиг. 24А-D. Экспрессия HPGD усиливает иммунный ответ и изменяет транспорт иммунных клеток к опухоли. (А) Профили цитокинов и хемокинов в опухоли после различных обработок. Мышей, несущих опухоли RENCA, обрабатывали, как указано, 1×10^7 БОЕ различных вирусных штаммов IT и умерщвляли через 3 суток. Гомогенаты опухолей подвергали анализам Luminex для количественного определения различных цитокинов и хемокинов (* $p < 0,05$). (В) Противоопухолевый ответ CTL увеличивается при экспрессии HPGD. В спленоцитах, собранных от несущих опухоль RENCA мышей через 7 суток после указанных обработок, количественно оценивали противоопухолевый ответ CTL, как определено посредством ELISPOT (* $p < 0,06$). (С) Системные изменения уровней хемокинов после различных обработок. В сыворотке, собранной от несущих опухоль RENCA мышей через 3 суток после указанных обработок, количественно определяли уровни хемокинов посредством ELISA ($p < 0,05$). (D) Активированные иммунные клетки предпочтительно нацелены на опухоли, инфицированные экспрессирующим HPGD вирусом. Мышам с двух сторон имплантировали опухоли RENCA, и когда они достигали 50-100 мм³, им инъецировали 1×10^7 БОЕ WR.TK- в один бок и WR.TK-HPGD+ в противоположный бок, через 24 ч 1×10^7 активированных и меченных Су5.5, клеток NK Т (СИК) доставляли посредством инъекции в хвостовую вену. Через 24 ч для мышей получали изображения посредством биолюминесценции (экспрессия вирусных генов) и флуоресценции (транспорт Т-клеток NK к опухолям) (* $p < 0,05$). Показан репрезентативный пример получения изображения посредством флуоресценции.

Фиг. 25. Экспрессия COX2 в опухолях, инфицированных WR.TK-, по сравнению с необработанными опухолями.

Фиг. 26А-В. (А) Выживаемость различных линий клеток после инфекции ТК-. (В) Продукция вируса и экспрессия генов ТК- в различных линиях клеток опухолей.

На фиг. 27 изображена экспрессия вирусных генов в моделях инфицированных ТК- опухолей MC-38, LLC и AB12 на мышах через 4 суток или 5 суток после инфекции.

Фиг. 28. Рост опухоли как функция суток после обработки PBS или инфекции дегликозилированным WR.TK-TRIF+- (UPCI-1812), Western Reserve ТК-, несущим HPGD (W-HPGD) или UPCI-1812 в комбинации с экспрессией HPGD.

Фиг. 29. Продукция улучшенного EEV (мутация A34R K151E) приводит к уменьшенному уровню нейтрализующих антител против вируса (14 суток после IP доставки WR или EEV).

Фиг. 30. Домены TRIF. В аминокислотной последовательности TRIF человека присутствуют три связывающих TRAF домена и домен RHIM, связывающий RIP1.

5. Подробное описание изобретения

Для ясности описания, а не для ограничения, подробное описание изобретения разделено на следующие подразделы: (i) мутации вирусного остова; (ii) модификация вирусного гликозилирования; (iii) модификация, стимулирующая ответ Т-клеток; (iv) модификация, ингибирующая иммуносупрессию; (v) модификация, улучшающая распространение и активность вируса; (vi) модифицированные вирусы; (vii) способы лечения; и (viii) наборы.

Термин "гомология", в рамках изобретения, относится к степени гомологии между последовательностями нуклеиновой кислоты или аминокислотными последовательностями, как определено с использованием известных в данной области способов, в качестве неограничивающих примеров, программного обеспечения, такого как BLAST или FASTA.

5.1. Мутации вирусного остова

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления изобретения, W содержит одну или несколько мутаций его генома, благоприятствующих репликации вируса в клетках злокачественной опухоли и/или усиливающих индукцию иммунного ответа цитотоксических Т-лимфоцитов (CTL). Мутация может представлять собой вставку, делецию или замену в одной или нескольких нуклеиновых кислотах природного вируса.

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления, мутация приводит к уменьшенной экспрессии функционального связывающего интерлейкин-18 белка ("IL-18BP"). В качестве неограничивающих примеров, (i) мутация может приводить к белку с более слабым связыванием с IL-18, чем природный белок W; (ii) мутация может приводить к экспрессии укороченного белка с уменьшенной или отсутствующей функциональной активностью; или (iii) мутация может делетировать ген IL-18BP. В конкретном неограничивающем примере, мутация может представлять собой делецию C12L (например, см. Symons et al., 2002, J. Gen. Virol. 83:2833-2844). В конкретных вариантах осуществления делеция C12L может представлять собой полную или частичную делецию C12L. В качестве неограничивающего примера, частичная делеция C12L может включать в себя мутацию, приводящую к делеции по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30% или по меньшей мере приблизительно 40% или более из аминокислотной последовательности белка C12L.

В дополнительных неограничивающих вариантах осуществления, вирусный остов может содержать, отдельно или в дополнение к одной или нескольким мутациям (включая делецию) в нуклеиновой кислоте, кодирующей IL-18BP, описанной выше, мутацию в нуклеиновой кислоте, кодирующей B8R (связывающий IFN-гамма белок; например, см. Symons et al., 1995, Cell. 81(4):551-60), B18R (связывающий IFN типа I белок; например, см. Colamonici et al., 1995, J. Biol. Chem. 270(27):15974-8), A35R (ингибитор представления МНС II; например, см. Rehm et al., 2010, Virology. 397 (1) :176-86 и Roper et al., 2006, J. Virol. 80 (1):306-13), B15R (связывающий IL-1 β белок; например, см. Alcamí et al., 1992, Cell. 71(1) :153-67), связывающие хемокины белки (B29R, G3R, H5R), ингибитор STAT1 (H1L); ингибиторы дцРНК или PKR, такие как E3L (например, см. Chang et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. 89 (11) : 4825-9) или K3L (например, см. Davies et al., 1993, J. Virol. 67(3) :1688-92 и Langland et al., 2002, Virology. 299 (1): 133-41); подобные Bcl-2 белки (такие как N1, N2, B14, F1, C6, A46 и K7), или их сочетание.

5.2. Модификация вирусного гликозилирования

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления изобретения, W обрабатывают средством, модифицирующим гликозилирование. Например, в клетку, продуцирующую VV, можно вводить ингибитор гликозилирования и/или культивировать ее в присутствии ингибитора гликозилирования, или W можно обрабатывать средством, уменьшающим или модифицирующим гликозилирование. В конкретных вариантах осуществления W можно подвергать обработке кислотой для уменьшения гликозилирования вируса. В конкретных вариантах осуществления W по настоящему изобретению можно получать в линии клеток, не обладающей функцией гликозилирования, например, из-за мутаций в одном или нескольких ферментах гликозилирования.

В конкретных вариантах осуществления VV, обработанный средством, уменьшающим или удаляющим, или модифицирующим гликозилирование, например, дегликозилированный вирус, может обладать менее приблизительно 90%, менее приблизительно 80%, менее приблизительно 70%, менее приблизительно 60%, менее приблизительно 50%, менее приблизительно 40%, менее приблизительно 30%,

менее приблизительно 20% или менее приблизительно 10% гликозилирования VV, не обработанного средством, модифицирующим гликозилирование.

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления, W по настоящему изобретению можно обрабатывать ферментом сиалидазой, который уменьшает количество остатков или удаляет остатки сиаловой кислоты с поверхности вируса (например, оболочки). В неограничивающих вариантах осуществления, W обрабатывают ферментом сиалидазой перед введением пациенту. В конкретном неограничивающем варианте осуществления, фермент сиалидаза представляет собой фермент сиалидазу A (глико-сиалидаза A, код WS0042) например, в качестве части набора для ферментативного дегликозилирования Glycorgo (код продукта: GK80110, Prozyme). В конкретных вариантах осуществления W можно обрабатывать сиалидазой A в комбинации с N- и O-гликаназами. По изобретению можно использовать также другие ферменты, которые удаляют сиаловую кислоту или отщепляют остатки гликозила от вируса, включая в качестве неограничивающих примеров нейраминидазы, ПНГазы (например, ПНГазу A или ПНГазу F), β 1-4 галактозидазу, β -N-этилацетилглюкозаминидазу, или применение химических обработок, таких как б-элиминация или щелочной гидролиз или гидразинолиз.

Без связи с какой-либо конкретной теорией, полагают, что уменьшение гликозилирования, например, посредством обработки сиалидазой вируса осповакцины, уменьшает активацию TLR2 и таким образом задерживает системную иммунную активацию в течение периода вирусной доставки и/или уменьшает продукцию нейтрализующих антител вируса.

5.3. Модификации, стимулирующие ответ Т-клеток

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления изобретения, W модифицируют для включения одной или нескольких нуклеиновых кислот, кодирующих пептид или белок, стимулирующий ответ Т-клеток. В конкретных вариантах осуществления пептид или белок, стимулирующий ответ Т-клеток, может стимулировать экспрессию одного или нескольких провоспалительных цитокинов. Например, и без ограничения, провоспалительные цитокины могут включать в себя IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , CCL5 и IP-10.

Неограничивающие примеры пептида или белка, стимулирующего ответ Т-клеток, включают в себя адаптер, содержащий Toll/IL-1R домен, индуцирующий IFN- β ("TRIF"), или его функциональный домен.

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления нуклеиновая кислота может кодировать TRIF человека, обладающий аминокислотной последовательностью, как указано в UniProtKB No. Q8IUC6, или аминокислотной последовательностью, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95% или по меньшей мере приблизительно на 98% гомологичной ей, или TRIF мыши, обладающий аминокислотной последовательностью, как указано в UniProtKB No. Q80UF7, или аминокислотной последовательностью, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95% или по меньшей мере приблизительно на 98% гомологичной ей.

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления нуклеиновая кислота может кодировать один или несколько доменов TRIF, как изображено на фиг. 30. В конкретных вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид или белок, стимулирующий ответ Т-клеток, например, TRIF, можно клонировать в локус гена тимидинкиназы (ТК) вируса, как изображено на фиг. 4А. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид или белок, стимулирующий ответ Т-клеток, может быть функционально связана с любым промотором, который может приводить к экспрессии нуклеиновой кислоты. В рамках изобретения, "функционально связанный" означает, что промотор находится в правильном функциональном местоположении и/или ориентации по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты, чтобы контролировать инициацию транскрипции и/или экспрессию этой последовательности. В конкретных вариантах осуществления промотор представляет собой промотор вируса осповакцины и/или промотор синтетического вируса осповакцины. В конкретных вариантах осуществления промотор представляет собой промотор рSE/L синтетического вируса осповакцины. В конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая пептид или белок, стимулирующий ответ Т-клеток, является функционально связанной с вирусным промотором р7.5.

В других неограничивающих вариантах осуществления, нуклеиновая кислота может кодировать гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор ("GM-CSF"), IL-12, IFN- γ или IL-18. В конкретных вариантах осуществления более чем одну такую нуклеиновую кислоту можно включать в VV.

5.4. Модификации, ингибирующие иммуносупрессию

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления изобретения, W модифицируют для включения одной или нескольких нуклеиновых кислот, кодирующих пептид или белок, или рибонуклеиновых кислот или микро-РНК, которые ингибируют или уменьшают иммуносупрессию. Неограничивающие примеры измерений иммуносупрессии включают в себя: уровень супрессорных клеток миелоидного происхождения ("MDSC"); уровень макрофагов M2; и уровень Т-клеток-помощников по отношению к супрессорным регуляторным Т-клеткам. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления, нуклеиновая кислота кодирует пептид или белок, или рибонуклеиновую кислоту или микро-РНК, которые уменьшают активность простагландина E2 ("антагонист PGE2"). В конкретных неограничи-

вающих вариантах осуществления, нуклеиновая кислота кодирует пептид и/или белок, который является антагонистом PGE2 (как этот термин используют в настоящем документе), вызывающим деградацию PGE2. В конкретном неограничивающем примере, белок, вызывающий деградацию PGE2, представляет собой 15-PGDH (человека) или HPGD (мыши). Например, и без ограничения, 15-PGDH может обладать аминокислотной последовательностью, как указано в UniProtKB No. P15428, или аминокислотной последовательностью, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95% или по меньшей мере приблизительно на 98% гомологичной ей, и нуклеиновая кислота, кодирующая 15-PGDH, может обладать последовательностью нуклеиновой кислоты, как указано по номеру доступа в GeneBank U632961, или последовательностью нуклеиновой кислоты по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95% или по меньшей мере приблизительно на 98% гомологичной ей. В следующих неограничивающих вариантах осуществления, нуклеиновую кислоту, кодирующую секретрируемый и солюбилизованный вариант внеклеточного рецептора для PGE2, можно включать в VV, например, нуклеиновую кислоту, кодирующую EP1, EP2, EP3 и/или EP4, где EP3 и 4 обладают более высокой аффинностью. В конкретных вариантах осуществления один или несколько пептидов или белков, ингибирующих или уменьшающих иммуносупрессию, могут приводить к уменьшенной экспрессии одного или нескольких супрессивных хемокинов, таких как, в качестве неограничивающих примеров, CXCL12. В конкретных вариантах осуществления один или несколько пептидов или белков, ингибирующих или уменьшающих иммуносупрессию, могут приводить к увеличенной экспрессии одного или нескольких иммуноактивирующих хемокинов, таких как, в качестве неограничивающих примеров, CXCL9, CXCL10 и CCL5.

В конкретных вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую антагонист PGE2, можно клонировать в локус гена тимидинкиназы (ТК) вируса. Нуклеиновая кислота, кодирующая пептид или белок - антагонист PGE2, может являться функционально связанной с любым промотором, который может приводить к экспрессии нуклеиновой кислоты. В конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая пептид или белок - антагонист PGE2, является функционально связанной с вирусным промотором p7.5. В конкретных вариантах осуществления промотор представляет собой промотор вируса осповакцины и/или промотор синтетического вируса осповакцины. В конкретных вариантах осуществления промотор представляет собой промотор pSE/L синтетического вируса осповакцины. В конкретных вариантах осуществления вирус может включать нуклеиновую кислоту, кодирующую антагонист PGE2, и нуклеиновую кислоту, кодирующую пептид или белок, стимулирующий ответ Т-клеток, которые обе являются функционально связанными с промотором, например, вирусным промотором p7.5 и клонированными в локус гена тимидинкиназы (ТК) вируса.

В следующих неограничивающих вариантах осуществления, иммуноонкологический вирус по изобретению можно вводить вместе со средством, ингибирующим или уменьшающим количество MDSC, включая, в качестве неограничивающих примеров, антитело, нацеленное на поверхностный маркер MDSC, такое как антитело против CD33 или его вариационная область; антитело против CD11b или его вариационная область; ингибитор COX2, например, целекоксиб; сунитиниб и/или полностью трансретиноевая кислота (например, см. Najjar and Finke, 2013, *Frontiers in Oncology*, 3 (49) 1-9).

5.5. Модификации, улучшающие распространение и активность вируса

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления изобретения, VV модифицируют для улучшения распространения и/или активности вируса. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления, W модифицируют для увеличения количества продуцируемой внеклеточной покрытой оболочкой формы вируса, например, посредством введения одной или нескольких из следующих мутаций: A34R Lys151 до Glu; полная или частичная делеция B5R; мутация/делеция A36R и/или мутация/делеция A56R. В конкретных вариантах осуществления VV модифицируют для включения полной или частичной делеции B5R.

6.6. Модифицированные вирусы

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к иммуноонкологическому VV, содержащему одну или несколько, или две или более, или три или более, или четыре или более, из следующих модификаций, как описано в разделах выше:

- (i) мутация вирусного остова;
- (ii) модификация вирусного гликозилирования;
- (iii) модификация, стимулирующая ответ Т-клеток;
- (iv) модификация, ингибирующая иммуносупрессию; и/или
- (v) модификация, улучшающая распространение и активность вируса.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, содержащему модификацию вирусного гликозилирования и одну или несколько из следующих модификаций, как описано в разделах выше:

- (i) мутация вирусного остова;
- (ii) модификация, стимулирующая ответ Т-клеток;
- (iii) модификация, ингибирующая иммуносупрессию; и/или
- (iv) модификация, улучшающая распространение и активность вируса.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования (например, сиалирования), перед введением хозяину и который включает или несет, или содержит одну или несколько из следующих модификаций, как описано в разделах выше:

- (i) мутация вирусного остова;
- (ii) модификация, стимулирующая ответ Т-клеток;
- (iii) модификация, ингибирующая иммуносупрессию; и/или
- (iv) модификация, улучшающая распространение и активность вируса.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обладает уменьшенным гликозилированием (например, сиалированием) относительно немодифицированного вируса и который включает или несет, или содержит одну или несколько из следующих модификаций, как описано в разделах выше:

- (i) мутация вирусного остова;
- (ii) модификация, стимулирующая ответ Т-клеток;
- (iii) модификация, ингибирующая иммуносупрессию; и/или
- (iv) модификация, улучшающая распространение и активность вируса.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования, перед введением хозяину, или который иным образом обладает уменьшенным гликозилированием относительно немодифицированного вируса.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан сиалидазой перед введением хозяину, или который иным образом обладает уменьшенным количеством остатков сиаловой кислоты относительно немодифицированного вируса.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к W который включает или несет, или содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который включает или несет, или содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антагонист PGE2 (например, 15-PGDH или HPGD).

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который содержит одну или несколько модификаций, улучшающих распространение и активность вируса, выбранных из группы из мутации A34R Lys151 до Glu; полной или частичной делеции B5R; мутации/делеции A3 6R, и/или мутации/делеции A56R.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который содержит одну или несколько модификаций вирусного остова, выбранных из группы из мутации, уменьшающей экспрессию функционального IL-18BP (например, делеции C12L), делеции B8R, делеции B18R, делеции A35R, или их сочетание.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования, перед введением хозяину, или который иным образом обладает уменьшенным гликозилированием относительно немодифицированного вируса и дополнительно включает или несет, или содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования (например, сиалирования), перед введением хозяину, или который иным образом обладает уменьшенным гликозилированием (например, уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса и дополнительно включает или несет, или содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антагонист PGE2 (например, 15-PGDH или HPGD).

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования (например, сиалирования), перед введением хозяину, или который иным образом обладает уменьшенным гликозилированием (например, уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса и дополнительно включает или несет, или содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен, и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую антагонист PGE2 (например, 15-PGDH или HPGD).

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования (например, сиалирования), перед введением хозяину, или который иным образом обладает уменьшенным гликозилированием (например, уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса и дополнительно содержит одну или несколько модификаций, улучшающих распространение и активность вируса, выбранных из группы из мутации A34R Lys151 до Glu; полной или частичной делеции B5R; мутации/делеции A36R и/или мутации/делеции A56R. В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к дегликозилированному VV, который содержит полную или частичную делецию B5R.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования (например, сиалирования), перед введе-

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования (например, сиалирования), перед введением хозяину, или который иным образом обладает уменьшенным гликозилированием (например, уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса и дополнительно включает или несет, или содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен, и дополнительно содержит одну или несколько модификаций вирусного остова, выбранных из группы из мутации, уменьшающей экспрессию функционального IL-18BP (например, делеции C12L), делеции B8R, делеции B18R, делеции A35R, или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления вирус содержит делецию C12L.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к ТК-VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования (например, сиалирования), перед введением хозяину, или который иным образом обладает уменьшенным гликозилированием (например, уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса и дополнительно включает или несет, или содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую антагонист PGE2 (например, 15-PGDH или HPGD), и дополнительно содержит одну или несколько модификаций вирусного остова, выбранных из группы из мутации, уменьшающей экспрессию функционального IL-18BP (например, делеции C12L), делеции B8R, делеции B18R, делеции A35R, или их сочетание.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования (например, сиалирования), перед введением хозяину, или который иным образом обладает уменьшенным гликозилированием (например, уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса и дополнительно включает или несет, или содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен, и дополнительно содержит одну или несколько модификаций, улучшающих распространение и активность вируса, выбранных из группы из мутации A34R Lys151 до Glu; полной или частичной делеции B5R; мутации/делеции A36R и/или мутации/делеции A56R.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования (например, сиалирования), перед введением хозяину, или который иным образом обладает уменьшенным гликозилированием (например, уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса, и дополнительно включает или несет, или содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую антагонист PGE2 (например, 15-PGDH или HPGD), и дополнительно содержит одну или несколько модификации, улучшающих распространение и активность вируса, выбранных из группы из мутации A34R Lys151 до Glu; полной или частичной делеции B5R; мутации/делеции A36R и/или мутации/делеции A56R.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования (например, сиалирования), перед введением хозяину, или который иным образом обладает уменьшенным гликозилированием (например,

уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса и дополнительно включает или несет, или содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую антагонист PGE2 (например, 15-PGDH или HPGD), и дополнительно содержит одну или несколько модификаций, улучшающих распространение и активность вируса, выбранных из группы из мутации A34R Lys151 до Glu; полной или частичной делеции B5R; мутации/делеции A3 6R и/или мутации/делеции A56R.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV, который обработан средством, уменьшающим уровень гликозилирования (например, сиалирования), перед введением хозяину, или который иным образом обладает уменьшенным гликозилированием (например, уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса и дополнительно включает или несет, или содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен, и нуклеиновую кислоту, кодирующую антагонист PGE2 (например, 15-PGDH или HPGD), и дополнительно содержит одну или несколько модификаций, улучшающих распространение и активность вируса, выбранных из группы из мутации A34R Lys151 до Glu; полной или частичной делеции B5R; мутации/делеции A3 6R и/или мутации/делеции A56R, и содержит одну или несколько модификаций вирусного остова, выбранных из группы из мутации, уменьшающей экспрессию функционального IL-18BP (например, делеции C12L), делеции B8R, делеции B18R, делеции A35R, или их сочетание. В конкретных вариантах осуществления вирус содержит делецию C12L. В конкретных вариантах осуществления VV может содержать делецию C12L и делецию B5R.

Описанные выше модификации можно получать в VV (вирусе осповакцины), известном в данной области. Неограничивающие примеры включают в себя; штамм Western Reserve, штамм Copenhagen; штамм Wyeth (NYCBOH); штамм Tian Tian; или штамм USSR (и см. ссылки 1 и 2, ниже). Основной штамм VV, модифицированный, как указано в настоящем документе, может сам по себе содержать одну или несколько мутаций относительно исходного штамма, в качестве неограничивающих примеров, одну или несколько из следующего: делеция в ТК (т.е., обозначенная в настоящем документе как "ТК-"); делеция в VGF; делеция SPI-1; и/или делеция SPI-2.

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV со следующими модификациями:

- (i) оболочка с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса;
- (ii) нуклеиновая кислота, кодирующая TRIF или его функциональный домен; и/или
- (iii) нуклеиновая кислота, кодирующая 15-PGDH или его функциональный домен.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV со следующими модификациями:

- (i) оболочка с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса;
- (ii) нуклеиновая кислота, кодирующая TRIF или его функциональный домен;
- (iii) нуклеиновая кислота, кодирующая 15-PGDH или его функциональный домен; и/или
- (iv) делецию C12L.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV со следующими модификациями:

- (i) оболочка с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса;
- (ii) нуклеиновая кислота, кодирующая TRIF, или его функциональный домен;
- (iii) нуклеиновая кислота, кодирующая 15-PGDH, или его функциональный домен;
- (iv) делеция C12L; и/или
- (v) делеция B5R.

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV со следующими модификациями:

- (i) делеция ТК;
- (ii) оболочка с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса;
- (iii) нуклеиновая кислота, кодирующая TRIF или его функциональный домен; и/или
- (iv) нуклеиновая кислота, кодирующая 15-PGDH или его функциональный домен.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к VV со следующими модификациями:

- (i) делеция ТК;
- (ii) оболочка с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса;
- (iii) нуклеиновая кислота, кодирующая TRIF или его функциональный домен;
- (iv) нуклеиновая кислота, кодирующая 15-PGDH или его функциональный домен; и/или
- (v) делеция C12L.

В неограничивающих вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к W со следующими модификациями:

- (i) делеция ТК;
- (ii) оболочка с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса;
- (iii) нуклеиновая кислота, кодирующая TRIF или его функциональный домен;
- (iv) нуклеиновая кислота, кодирующая 15-PGDH или его функциональный домен;
- (v) делеция C12L; и/или
- (vi) делеция B5R.

5.7. Способы лечения

Настоящее изобретение относится к способу уменьшения роста клеток злокачественной опухоли, включающему в себя введение, в клетки злокачественной опухоли пациента, эффективного количества иммуноонколитического VV, как описано выше. Уменьшение роста клеток злокачественной опухоли может проявляться, например, посредством гибели клеток или замедленной скорости репликации, или уменьшенной скорости роста опухоли, содержащей клетки, или продленной выживаемости пациента, содержащего клетки злокачественной опухоли.

"Пациент" или "пациент", как взаимозаменяемо используют в настоящем документе, относится к человеку или к не относящемуся к человеку пациенту. Неограничивающие примеры не относящихся к человеку пациентов включают в себя нечеловекообразных приматов, собак, кошек, мышей, крыс, морских свинок, кроликов, свиней, домашнюю птицу, лошадей, коров, коз, овец и т.д.

Настоящее изобретение относится к способу уменьшения роста опухоли, включающему в себя введение в опухоль эффективного количества иммуноонколитического VV, как описано выше. Уменьшение роста опухоли может проявляться, например, посредством уменьшенной скорости роста или продленной выживаемости пациента, содержащего опухоль.

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, обладающего злокачественной опухолью, включающему в себя введение пациенту эффективного количества иммуноонколитического VV, как описано выше.

"Эффективное количество" в таком способе включает в себя количество, которое уменьшает скорость роста или распространение злокачественной опухоли, или которое продлевает выживаемость пациента. В конкретных вариантах осуществления эффективное количество может включать в себя количество, которое является достаточным для оказания противоракового эффекта у пациента.

"Противораковый эффект", в рамках изобретения, относится к одному или нескольким из уменьшения агрегации клеточной массы клеток злокачественной опухоли, уменьшения скорости роста клеток злокачественной опухоли, уменьшения пролиферации клеток злокачественной опухоли, уменьшения массы опухоли, уменьшения объема опухоли, уменьшения пролиферации клеток опухоли, уменьшения скорости роста опухоли и/или уменьшения метастазирования опухоли.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу оказания противоракового эффекта у пациента, обладающего злокачественной опухолью, включающему в себя введение пациенту эффективного количества иммуноонколитического VV, как описано выше.

В конкретных неограничивающих вариантах осуществления, количество введенного VV (например, доза) может составлять между приблизительно 10^3 и 10^{11} бляшкообразующих единиц (БОЕ), или приблизительно от 10^5 и 10^{10} БОЕ, или между приблизительно 10^5 и 10^8 БОЕ, или между приблизительно 10^5 и 10^{11} БОЕ, или между приблизительно 10^8 и 10^{11} БОЕ. Также см. Thorne and Kirn, 2009, Nat Rev Cancer 9: 64-71. Следует отметить, что в настоящем документе 10^x альтернативно выражают как $1eX$. В конкретных вариантах осуществления онколитический вирус можно вводить в однократной дозе или можно вводить в множественных дозах. В конкретных вариантах осуществления, где вирус вводят в множественных дозах, дозы можно вводить последовательно, например, с ежесуточными, еженедельными или ежемесячными интервалами, или для удовлетворения конкретной необходимости пациента.

В конкретных вариантах осуществления иммуноонколитический вирус можно вводить в фармацевтической композиции, где вирус присутствует в эффективном количестве и в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. "Фармацевтически приемлемый", в рамках изобретения, включает в себя любой носитель, который не нарушает эффективность биологической активности активных ингредиентов и/или который не является токсичным для пациента, которому его вводят. Неограничивающие примеры подходящих фармацевтических носителей включают в себя растворы фосфатно-солевого буфера, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы средств для смачивания и стерильные растворы. Дополнительные неограничивающие примеры фармацевтически совместимых носителей могут включать в себя гели, материалы биоадсорбируемой матрицы, элементы для имплантации, содержащие онколитический VV, или любые другие подходящие носитель, средства или материал для доставки или диспергирования. Такие носители можно составлять общепринятыми способами и можно вводить пациенту в эффективном количестве.

VV по настоящему изобретению можно получать способами, известными специалисту в данной области. В конкретных вариантах осуществления VV можно размножать в подходящих клетках-хозяевах,

выделять из клеток-хозяев и хранить в условиях, способствующих стабильности и целостности вируса, так что потеря инфекционности с течением времени минимизирована. Например, VV можно сохранять посредством замораживания или высушивания, например, посредством лиофилизации. В конкретных вариантах осуществления перед введением сохраненный W можно возвращать в жидкое состояние (если он был высушен для хранения) и разводить в фармацевтически приемлемом носителе для введения.

Онколитический вирус можно вводить пациенту с использованием общепринятых способов введения. В конкретных неограничивающих вариантах осуществления, онколитический вирус можно вводить системно. Альтернативно или дополнительно, онколитический вирус можно вводить посредством инъекции в участок злокачественной опухоли, например, в участок опухоли. В качестве неограничивающих примеров, способ введения может представлять собой ингаляционное, интраназальное, внутривенное, внутриартериальное, интратекальное, внутриопухолевое, интраперитонеальное, внутримышечное, подкожное, местное, интрадермальное, местно-регионарное, пероральное введение или их сочетания. В конкретных вариантах осуществления, онколитический вирус можно вводить пациенту из источника, имплантированного пациенту. В конкретных вариантах осуществления, введение онколитического вируса можно осуществлять посредством непрерывной инфузии в течение выбранного периода времени. В конкретных вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно вводить непосредственно в участок опухоли, например, посредством прямой внутриопухолевой инъекции.

Злокачественные опухоли, которые можно лечить посредством терапии иммуноонколитическим VV, включают в себя, в качестве неограничивающих примеров аденокарциному, остеосаркому, карциному шейки матки, меланому, печеночноклеточную карциному, рак молочной железы, рак легких, рак предстательной железы, рак яичника, лейкоз, лимфому, карциному почки, рак поджелудочной железы, рак желудка, карциному ободочной кишки, рак двенадцатиперстной кишки, мультиформную глиобластому, астроцитому и саркому.

В конкретных вариантах осуществления лечение с использованием иммуноонколитического VV, как описано выше, можно использовать отдельно или в комбинации с одним или несколькими противораковыми средствами. "Противораковое средство", в рамках изобретения, может представлять собой любую молекулу, соединение, химическое вещество или композицию, которые оказывают противораковый эффект. Противораковые средства включают в себя, в качестве неограничивающих примеров, химиотерапевтические средства, радиотерапевтические средства, цитокины, ингибиторы иммунных контрольных точек, антиангиогенные средства, индуцирующие апоптоз средства, антитела против злокачественных опухолей и/или средства против циклин-зависимых киназ.

В конкретных вариантах осуществления лечение с использованием иммуноонколитического VV можно использовать отдельно или в комбинации с одним или несколькими иммуномодулирующими средствами. Иммуномодулирующее средство может включать в себя любое соединение, молекулу или вещество, способные супрессировать противовирусный иммунитет, ассоциированный с опухолью или злокачественной опухолью. В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство является способным супрессировать врожденный иммунитет и/или адаптивный иммунитет против онколитического вируса.

Неограничивающие примеры иммуномодулирующих средств включают в себя антитело против CD33 или его вариабельную область, антитело против CD11b или его вариабельную область, ингибитор COX2, например, цеlexоксиб, цитокины, такие как IL-12, GM-CSF, IL-2, IFN β и IFN γ , и хемокины, такие как MIP-1, MCP-1 и IL-8. В конкретных вариантах осуществления иммуномодулирующее средство включает в себя ингибиторы иммунных контрольных точек, такие как, в качестве неограничивающих примеров, анти-CTLA4, анти-PD-1, анти-PDL1 и агонисты TLR (например, поли I:C).

"В комбинации с", в рамках изобретения, означает, что иммуноонколитический VV и одно или несколько средств вводят пациенту в качестве части режима или плана лечения. В конкретных вариантах осуществления использование в комбинации не требует того, чтобы иммуноонколитический VV и одно или несколько средств физически объединяли перед введением, или чтобы их вводили в одни и те же временные рамки. В качестве неограничивающего примера, иммуноонколитический VV и одно или несколько средств можно вводить пациенту, подвергаемому лечению, параллельно, или можно вводить одновременно или последовательно в любом порядке или в различные временные точки.

В конкретных вариантах осуществления способ лечения пациента, обладающего злокачественной опухолью, включает в себя введение пациенту эффективного количества иммуноонколитического VV, содержащего: (i) оболочку с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса; (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен; и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-PGDH или его функциональный домен.

В конкретных вариантах осуществления способ лечения пациента, обладающего злокачественной опухолью, включает в себя введение пациенту эффективного количества иммуноонколитического VV, содержащего: (i) оболочку с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса; (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен; (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-PGDH или его функциональный

домен; и (iv) делецию C12L.

В конкретных вариантах осуществления способ лечения пациента, обладающего злокачественной опухолью, включает в себя введение пациенту эффективного количества иммуноонколитического VV, содержащего: (i) оболочку с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса; (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF, или его функциональный домен; (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-PGDH или его функциональный домен; (iv) делецию C12L; и (v) делецию B5R.

В конкретных вариантах осуществления способ лечения пациента, обладающего злокачественной опухолью, включает в себя введение пациенту эффективного количества иммуноонколитического VV, содержащего: (i) делецию ТК; (ii) оболочку с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса; (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен; и (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-PGDH или его функциональный домен.

В конкретных вариантах осуществления способ лечения пациента, обладающего злокачественной опухолью, включает в себя введение пациенту эффективного количества иммуноонколитического VV, содержащего: (i) делецию ТК; (ii) оболочку с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса; (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен; (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-PGDH или его функциональный домен; и (v) делецию C12L.

В конкретных вариантах осуществления способ лечения пациента, обладающего злокачественной опухолью, включает в себя введение пациенту эффективного количества иммуноонколитического VV, содержащего: (i) делецию ТК; (ii) оболочку с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса; (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен; (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-PGDH или его функциональный домен; (v) делецию C12L; и (vi) делецию B5R.

В конкретных вариантах осуществления способы по настоящему изобретению могут дополнительно включать в себя введение пациенту эффективного количества одного или нескольких средств. В качестве неограничивающих примеров, средство может представлять собой противораковое средство и/или иммуномодулирующее средство, как описано выше.

5.8 Наборы.

Настоящее изобретение дополнительно относится к наборам, предоставляющим иммуноонколитический VV, как описано выше. В конкретных вариантах осуществления набор по настоящему изобретению может включать иммуноонколитический VV или фармацевтическую композицию, содержащую иммуноонколитический VV, как описано выше. В конкретных вариантах осуществления набор по настоящему изобретению может дополнительно включать один или несколько компонентов, таких как инструкции для применения, устройства и дополнительные реагенты, и компоненты, такие как пробирки, контейнеры и шприцы для осуществления способов, описанных выше. В конкретных вариантах осуществления набор по настоящему изобретению может дополнительно включать одно или несколько средств, например, противораковых средств и/или иммуномодулирующих средств, которые можно вводить в комбинации с иммуноонколитическим VV.

В конкретных вариантах осуществления набор по настоящему изобретению может включать инструкции для применения, устройство для введения иммуноонколитического VV пациенту, или устройство для введения дополнительного средства или соединения пациенту. В качестве неограничивающих примеров, инструкции могут включать в описание иммуноонколитического VV и, необязательно, других компонентов, включенных в набор, и способов введения, включая способы определения соответствующего состояния пациента, надлежащей величины дозы и надлежащего способа введения для введения иммуноонколитического VV. Инструкции могут также включать руководство для мониторингирования пациента на протяжении времени лечения.

В конкретных вариантах осуществления набор по настоящему изобретению может включать устройство для введения иммуноонколитического VV пациенту. Любое из множества устройств, известных в данной области для введения лекарственных средств и фармацевтических композиций, можно включать в наборы, представленные в настоящем документе. В качестве неограничивающих примеров, такие устройства включают в себя иглу для подкожных инъекций, иглу для внутривенных инъекций, катетер, устройство для безыгольных инъекций, ингалятор и дозатор жидкостей, такой как глазная пипетка. В конкретных вариантах осуществления иммуноонколитический VV, предназначенный для системного введения, например, посредством внутривенной инъекции, можно включать в набор вместе с иглой для подкожных инъекций и шприцем.

В конкретных вариантах осуществления набор по настоящему изобретению включает эффективное количество иммуноонколитического VV, содержащего: (i) оболочку с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса; (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен; и (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-PGDH или его функциональный домен.

В конкретных вариантах осуществления набор по настоящему изобретению включает эффективное количество иммуноонколитического VV, содержащего: (i) оболочку с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса; (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен; (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-PGDH или его функциональный домен; и (iv) делецию C12L.

В конкретных вариантах осуществления набор по настоящему изобретению включает эффективное количество иммуноонколитического VV, содержащего: (i) оболочку с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса; (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен; (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-PGDH или его функциональный домен; (iv) делецию C12L; и (v) делецию B5R.

В конкретных вариантах осуществления набор по настоящему изобретению включает эффективное количество иммуноонколитического VV, содержащего: (i) делецию TK; (ii) оболочку с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса; (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен; и (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-PGDH или его функциональный домен.

В конкретных вариантах осуществления набор по настоящему изобретению включает эффективное количество иммуноонколитического VV, содержащего: (i) делецию TK; (ii) оболочку с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса; (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен; (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-PGDH или его функциональный домен; и (v) делецию C12L.

В конкретных вариантах осуществления набор по настоящему изобретению включает эффективное количество иммуноонколитического VV, содержащего: (i) делецию TK; (ii) оболочку с уменьшенным гликозилированием (например, с уменьшенным сиалированием) относительно немодифицированного вируса; (iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF или его функциональный домен; (iv) нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-PGDH или его функциональный домен; (v) делецию C12L; и (vi) делецию B5R.

Следующие примеры предложены для более полной иллюстрации описания, но их не следует рассматривать как ограничивающие его объем.

6. Пример 1. Эффект мутации остова C12L

Отрицательный по тимидинкиназе ("TK-") вирус осповакцины (VV) Western Reserve модифицировали для делеции C12L. Штамм осповакцины Western Reserve получали из BEI Resources (Manassas, VA), и все использованные или сконструированные рекомбинантные вирусы осповакцины основаны на этом штамме.

Делеционный мутант вируса с отсутствием 40% ORF C12L конструировали с использованием временной доминантной селекции (Falkner & Moss, 1990, J Virol. 64(6): 3108-3111). Клетки инфицировали вирусом осповакцины WR дикого типа и одновременно трансфицировали плазмидой, содержащей области 3' и 5' гена C12L. Позволяли происходить рекомбинации, и селективный маркер использовали для определения событий рекомбинации. Вирусы титровали посредством анализа образования бляшек на клетках BSC-1, выделяли и очищали, как описано ранее, для использования *in vivo* (Sampath, P et al. (2013) Mol. Ther., 21: 620-628).

Мышам C57BL/6, несущим опухоль CMT-93, вводили 5×10^8 бляшкообразующих единиц ("БОЕ") либо немодифицированного вируса WR, либо вируса, несущего делецию C12L (WRΔC12L). Для тестирования специфичности вируса для опухолей, количество вируса в головном мозге, печени, легком и опухоли оценивали через 1, 3 и 10 суток после инфекции. Результаты, на фиг. 1A, показывают, что хотя приблизительно эквивалентные количества вирусов WR и WRΔC12L обнаружены в печени, легком и опухоли через 1 сутки после инфекции, через десять суток очень мало вируса WRΔC12L обнаружено в не относящейся к опухоли ткани относительно количества, обнаруженного в опухоли, где различие в экспрессии в опухоли/вне опухоли намного меньше для немодифицированного вируса WR.

Для оценки эффекта мутации C12L на выживаемость, мышей C57BL/6 (закупленных в The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), несущих подкожные опухоли CMT-93, обрабатывали внутривенно однократной дозой 1×10^8 БОЕ вируса WR или WRΔC12L, а затем мониторировали. В то время как все мыши, которым вводили вирус WR, умерли ранее 60 суток после инфекции, через 70 суток 50% животных с WRΔC12L были еще живыми (Фиг. 1B).

Животных сначала иммунизировали WR или WRΔC12L, и Т-клетки от этих мышей (или контрольных мышей) смешивали с WR, и полученные уровни продукции IFN-γ определяли посредством ELISA. Результаты показаны на фиг. 1C и указывают на то, что делеция C12L приводит к большей продукции CTL или продуцирующих IFN-γ спленоцитов.

7. Пример 2. Эффект обработки дегликозилированием

Для тестирования эффекта модификации гликозилирования белков вирусной поверхности, WR TK-VV, N-связанные и простые O-связанные гликаны, например, сиаловую кислоту, удаляли с вирусной оболочки с использованием сиалидазы А (гликосиалидаза А, код WS0042) или коктейля N- и O-гликаназ и сиалидазы А (набора для ферментативного дегликозилирования GlycoPro, код продукта: GK80110, Pro-

zyme). Неденатурирующий способ дегликозилирования вируса представлял собой отбор (i) 20 мкл исходного препарата вируса; (ii) добавление 17 мкл деионизированной воды; (iii) добавление 10 мкл 5X реакционного буфера; (iv) добавление 1 мкл каждого из N-гликаназы, сиалидазы А и О-гликаназы (или любого фермента, используемого отдельно, с 19 мкл деионизированной воды); и (v) инкубацию при 37°C в течение 16 ч перед использованием. Дегликозилирование вируса подтверждали посредством анализа вестерн-блоттингом (Фиг. 2А).

Эффект дегликозилирования на инфекционность вируса оценивали в различных линиях клеток опухолей мышей, инфицированных ТК- ("WR" или "WR.TK-") или его дегликозилированным вариантом ("TK-deglyc" и "DS WR.TK-") при MOI 1. Линии клеток HeLa (аденокарцинома шейки матки человека), Bsc-1 (клетки нормальной почки зеленой мартышки), 143В (остеосаркома человека), CV-1 (фибробласты почки зеленой мартышки), Rensa (аденокарцинома почки мыши) и 4Т1 (рак молочной железы мыши) получали из Американской коллекции типовых культур (Manassas, VA). Клетки HEK293-mTLR2 приобретали из InvivoGen (San Diego, CA). Линии клеток MC38 (аденокарцинома ободочной кишки мыши) и MEF (эмбриональные фибробласты мыши) были, соответственно, любезно предоставлены Dr. David Bartlett и Dr. Robert Sobol (University of Pittsburgh Cancer Center). Все линии клеток поддерживали в рекомендованных средах для культивирования, содержащих 5-10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиков, при 37°C, 5% CO₂. Инфекционность вируса определяли посредством анализа экспрессии вирусных генов. Экспрессию вирусных генов измеряли через 3 ч после инфекции посредством получения изображений с помощью биолюминесценции экспрессии люциферазы *in vitro*. Для культивируемых клеток, 10 мкл 30 мг/мл D-люциферина (GoldBio, St Louis, MO) добавляли к 1 мл среды для культивирования. Как показано на фиг. 2В, дегликозилирование оболочки вируса не оказывало эффект на инфекционность вируса.

Эффект дегликозилирования на активацию TLR2 оценивали в модельной системе, в которой измеряют активацию NF-κB в клетках HEK293, сконструированных для экспрессии TLR2 (HEK2 93/mTLR2) и трансфицированных pNiFty, репортерной плазмидой для передачи сигнала TLR. pNiFty (репортерную плазмиду для передачи сигнала TLR - люциферазы) получали из InvivoGen и трансфицировали в клетки HEK2 93/mTLR2 с использованием реагента для трансфекции FuGENE HD (Promega, Madison, WI). Клетки HEK2 93/mTLR2 инфицировали при MOI 1 вирусом WR или дегликозилированным WR, и активацию TLR2 количественно определяли через 24 ч после инфекции посредством получения изображений с помощью биолюминесценции. Как показано на фиг. 2С, дегликозилирование вируса приводило к меньшей активации TLR2 *in vitro* по сравнению с вирусом, не являвшимся дегликозилированным. Кроме того, и как можно наблюдать на фиг. 3А, дегликозилированный вирус являлся ассоциированным со значительно меньшей активацией TLR2, чем вирус WR.

Для дегликозилированного вируса показано также большее поглощение опухолями. Для этих экспериментов, ген люциферазы под контролем промотора pSE/L синтетического вируса осповакцины (Chakrabarti et al. (1997). Biotechniques 23: 1094-1097) включали в вирус осповакцины WR.TK- или DS WR.TK- ("WR.TK-Luc+" и "DS WR.TK-Luc+", соответственно), и вводили внутривенно мышам BALB/c (закупленным из The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), несущим подкожную опухоль 4Т1. Экспрессию вирусных генов в опухоли можно затем измерять посредством получения изображений с помощью биолюминесценции для экспрессии люциферазы *in vivo*. Для моделей на животных, дозу 4,5 мг D-люциферина на мышь инъецировали интраперитонеально перед получением изображений. IVIS модели 2000 (PerkinElmer, Waltham, MA) использовали для получения изображений, и изображения анализировали с помощью программного обеспечения LivingImage (PerkinElmer).

На фиг. 3В показано, что через 24 ч после инфекции присутствовала значительно более высокая экспрессия вируса DS WR.TK-Luc+ в опухоли относительно его гликозилированного эквивалента. Этого различия в поглощении не наблюдали в не относящихся к опухоли тканях. На фиг. 3С показано, что инфекция десилированным вирусом приводит к меньшему объему опухоли. Кроме того, мышам BALB/c, несущим подкожные ксенотрансплантаты клеток Rensa (аденокарцинома почки мыши) случайным образом распределяли и инъецировали им однократную внутривенную дозу 1×10^8 БОЕ на мышь вируса ТК- или дегликозилированного ТК-. Кинетику экспрессии вирусных генов внутри опухоли мониторируют посредством получения изображений с помощью биолюминесценции для экспрессии вирусной люциферазы. Как показано на фиг. 2Е, дегликозилирование вирусной оболочки увеличивало экспрессию гена в опухолях *in vivo*.

Эффект дегликозилирования вируса на присутствие pSTAT1-pSTAT3+ лимфоцитов анализировали в мышах C57BL/6, подвергнутых внутривенной инъекции 1×10^7 БОЕ вируса WR или дегликозилированного WR. Селезенки собирали от мышей C57BL/6 через 1 ч после инъекции указанных вирусов и спленоциты выделяли, фиксировали в 1,6% PFA и пермеабелизировали метанолом. Анализы двухцветного внутриклеточного иммуоокрашивания проводили с использованием проточного цитометра LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, California). Спленоциты окрашивали с использованием антител с PacificBlue против pSTAT1 мыши и с AlexaFluor647 против pSTAT3 мыши (BD Biosciences). Процентное содержание pSTAT1-pSTAT3+ лимфоцитов определяли посредством проточной цитометрии, и PBS и

РАМ(3)CSK(4) использовали в качестве контроля. На фиг. 2D показано, что фосфорилирование STAT3 истощено в лимфоцитах селезенки мышей, инъецированных дегликозилированным вирусом осповакцины.

Для определения иммунного ответа против вируса *in vivo*, проводили анализы нейтрализующих антител. Кратко, содержащую антитело сыворотку получали от мышей, обработанных, как указано, на сутки 14 после инъекции вируса, и серийные разведения сыворотки (начиная с 1/20) использовали для нейтрализации 1000 БОЕ ТК- вируса осповакцины. 2×10^4 клеток HeLa высевали на лунку в 96-луночный планшет и инфицировали смесью сыворотка-вирус. На сутки 4 после инфекции, планшеты промывали PBS, и оптическую плотность количественно определяли после окрашивания культур с использованием набора для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток (Promega, Madison, WI). Значения IC_{50} (разведение сыворотки, необходимое для нейтрализации вируса осповакцины, способное индуцировать 50% ингибирование клеток) определяли из кривых зависимости "доза-эффект" посредством стандартной нелинейной регрессии, с использованием адаптивного уравнения Хилла. Как показано на фиг. 3D, количество нейтрализующих антител против вируса больше у мышей C57BL/6 дикого типа, чем у мышей, несущих мутацию нокаута TLR2. Соответственно, более низкая активация TLR2, ассоциированная с дегликозилированным вирусом, может быть ассоциирована с меньшей продукцией антител против вируса и улучшенным противоопухолевым ответом.

8. Пример 3. Эффект экспрессии TRIF

Нуклеиновую кислоту, кодирующую TRIF мыши, вводили в вирус WR.TK- и оценивали его эффект на Т-клетки. TRIF экспрессировался из локуса тимидинкиназы, экспрессируемого с раннего/позднего промотора p7.5 вируса осповакцины ("TK-TRIF" или "WR.TK-TRIF"; фиг. 4A). Получали вирус A WR.TK-, обладающий нуклеиновой кислотой, кодирующей DAI мыши (DLM-1/ZBP1), экспрессируемый с p7.5, и клонированной в locus гена тимидинкиназы вируса ("TK-DAI"; фиг. 4A).

ELISA проводили для подтверждения экспрессии TRIF из вируса TK-TRIF (Фиг. 4B). Для ELISA, набор для ELISA TRIF мыши использовали для определения концентрации TRIF в супернатанте или экстрактах клеток из клеток, инфицированных при MOI 1 (БОЕ/клетку) TK-TRIF. Как показано на фиг. 4B, вирус TK-TRIF специфически экспрессировал TRIF по сравнению с ТК-. Вестерн-блоттинг использовали для подтверждения экспрессии DAI из вируса TK-DAI (Фиг. 4C). Для анализа вестерн-блоттингом, культуры клеток высевали в 6-луночные планшеты и инфицировали при MOI 5 (БОЕ/клетку) и через 24 ч после инфекции, экстракты белка из цельных клеток инкубировали в буфере для лизиса клеток (Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA) в течение 1 ч при 4°C. Осветленные образцы (15 мкг/дорожку) разделяли посредством SDS-PAGE в 10% геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Белок DAI мыши детектировали посредством иммуноблоттинга мембран с использованием поликлонального первичного антитела против DAI (кролика, Abeam, Cambridge, MA) и поликлонального антитела против антител кролика, конъюгированного с HRP (козы, Thermo Scientific, Waltham, MA). Мышиное моноклональное антитело против Р-актина (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) и конъюгированное с пероксидазой антитело против антител мыши (козы, Thermo Scientific) использовали для иммуноблоттинга β-актина в качестве контроля нанесения. Как показано на фиг. 4C, вирус TK-DAI специфически экспрессировал DAI по сравнению с ТК-.

Как показано на фиг. 5A, экспрессия TRIF приводила к увеличению продукции интерферона типа I лимфоцитами *in vitro*. Экспрессия TRIF увеличивала также продукцию CTL *in vivo*, как показано по анализу ELISpot (Фиг. 5B). Для анализов ELISpot, от мышей получали спленоциты. Спленоциты смешивали с клетками опухолей или спленоцитами, ранее инфицированными УФ-инактивированным вирусом осповакцины в соотношении 5:1. Наивные спленоциты от каждой мыши использовали в качестве контроля. 96-луночные планшеты для фильтрации с мембраной (EMD Millipore, Billerica, MA), покрытые 15 мкг/мл моноклонального антитела против IFN-γ мыши AN18 (Mabtech, Inc., Cincinnati, OH), использовали для анализов. Клетки поддерживали в течение 48 ч при 37°C, и пятна детектировали с использованием 1 мкг/мл биотинилированного антитела против IFN-γ мыши R4-6A2-биотин (Mabtech). Планшеты проявляли с использованием набора ABC и набора субстратов AEC для пероксидазы (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Специфические пятна подсчитывали и анализировали с использованием анализатора и программного обеспечения ImmunoSpot (CTL, Shaker Heights, OH).

Анализ высвобождения цитокинов и хемокинов *in vitro* и *in vivo* через 24 ч после инфекции ТК-, ТК-TRIF или ТК-DAI (MOI 1) проводили посредством анализа Luminex. Для супернатантов культуры клеток, использовали набор с мультиплексной панелью цитокинов мыши (5-плексный) из Milipore (Billerica, MA) и 2-плексного набора для анализа белков мыши из Panomics (Redwood City, CA). Для лизатов опухолей, набор с 20-плексной панелью цитокинов мыши из Invitrogen (Carlsbad, CA) использовали для определения концентраций в опухолях, собранных на сутки 4 после введения вируса осповакцины. Опухоли гомогенизировали с использованием пробирок Lysing Matrix D и устройства FastPrep-24. Как показано на Фиг. 6A и C, концентрации pIKKβ, IL-6, IP-10, TNF-α и IFN-β значительно увеличивались после инфекции ТК-TRIF по сравнению с ТК- в различных линиях клеток опухолей. Кроме того, мышей BALB/c с прижившимися подкожными ксенотрансплантатами Rensa, подвергнутых инъекции однократной внут-

ривенной дозой 1×10^8 БОЕ на мышь ТК- или ТК-TRIF, анализировали для определения внутриопухолевой концентрации цитокинов и хемокинов *in vivo*. Через 4 суток после инъекции, опухоли собирали, и концентрацию различных цитокинов и хемокинов определяли в лизатах опухолей посредством анализов luminex или ELISA. На фиг. 6D показано, что внутриопухолевые концентрации INF- γ , IL-12, IP-10, TNF- α , IL-1 β , GM-CSF и KC значительно увеличивались в ответ на ТК-TRIF по сравнению с ТК-.

Активацию путей NF- κ B и IRF3 анализировали после инфекции ТК-TRIF и ТК-DAI. Анализы ELISA использовали для определения концентраций pIKK β и IRF3 в цитоплазматических и ядерных экстрактах, соответственно, клеток 4T1 или MEF, инфицированных ТК-, ТК-TRIF или ТК-DAI при MOI 1. Как показано на фиг. 6A и B, ТК-TRIF увеличивал активацию путей передачи сигнала NF- κ B и IRF3, как наблюдали по увеличению концентрации pIKK β и IRF3 при экспрессии через 24 ч после инфекции. На фиг. 7A показано, что фосфорилирование NF- κ B увеличивалось после инфекции ТК-TRIF и ТК-DAI. Для HMGB1 и Hsp-70, которые функционируют как регуляторы NF- κ B, также показана измененная экспрессия после инфекции ТК-TRIF (Фиг. 7B и 7C). Присутствие CD4 $^{+}$ Т-клеток-помощников и CD8 $^{+}$ цитотоксических Т-клеток анализировали после инфекции ТК-, ТК-TRIF. Как показано на фиг. 7D и E, количество цитотоксических Т-клеток и Т-клеток-помощников было выше у мышей, инфицированных ТК-TRIF.

Анализ репликации и противоопухолевой активности ТК-TRIF проводили в различных клетках опухолей мышей. Различные линии клеток опухолей инфицировали при MOI 1, и продукцию вируса измеряли посредством анализа бляшек ELISpot, как описано выше, в различные моменты времени. Как показано на фиг. 8A, продукция вируса как ТК-TRIF, так и ТК-DAI, являлась значительно меньшей в устойчивых клетках Rensa по сравнению с ТК-, но продукция вируса как ТК-TRIF, так и ТК-DAI в клетках MC38 и 4T1 находилась на уровнях, сходных с ТК- (также см. фиг. 9A).

Дополнительные анализы вирусной экспрессии в опухолях и объемах опухолей проводили у мышей BALB/c или C57BL/6 с имплантацией ксенотрансплантатов Rensa или MC38, соответственно, и у мышей BALB/c с имплантацией ксенотрансплантатов 4T1. Мышам BALB/c или C57BL/6 инъецировали PBS или 1×10^8 БОЕ ТК-, ТК-TRIF или ТК-DAI через хвостовую вену. Для полуортопической модели 4T1, 2×10^5 клеток 4T1 имплантировали в жировой слой молочной железы самок мышей BALB/C. На фиг. 8C показано, что экспрессия вирусных генов ТК-TRIF и ТК-DAI находилась на более низком уровне в опухолях из ксенотрансплантатов Rensa или MC38, имплантированных мышам BALB/c или C57BL/6, соответственно, по сравнению с экспрессией вирусных генов ТК-. На фиг. 9C показано, что продукция вируса и вирусная экспрессия ТК-DAI и ТК-TRIF являлась уменьшенной в опухолях по сравнению с вирусной экспрессией для вируса ТК- или ТК-, экспрессирующего GM-CSF ("ТК-GMCSF"). Мышей BALB/c с опухолями Rensa, имплантированными подкожно, обрабатывали в/в дозой 1×10^8 БОЕ, как только опухоли достигали 50-100 мм 3 . Используемые вирусы представляли собой WR.TK- и WR.TK-TRIF+ (или контроль с PBS). За последующим ответом опухолей следили посредством измерения штангенциркулем, и уменьшение роста опухоли наблюдали у мышей, инфицированных ТК-TRIF (Фиг. 5C и Фиг. 8D). Сходный ответ наблюдали у мышей с имплантацией опухолей MC38 (Фиг. 8D) и опухолей 4T1 по сравнению с опухолями, инфицированными ТК-GMCSF (Фиг. 9D).

Цитотоксичность модифицированного вируса по сравнению с ТК-определяли посредством проведения анализов цитотоксичности. Анализы цитотоксичности проводили посредством посева 2×10^4 клеток на лунку в 96-луночные планшеты в DMEM с 5% FBS. Клетки инфицировали серийными разведениями, начиная с MOI 75 и, на сутки 4 после инфекции, планшеты промывали PBS, и оптическую плотность количественно определяли после окрашивания культур с использованием набора для нерадиоактивного анализа пролиферации клеток (Promega, Madison, WI). Значения IC $_{50}$ (БОЕ на клетку, необходимое для получения 50% ингибирования) определяли из кривых зависимости "доза-эффект" посредством стандартной нелинейной регрессии, с использованием адаптивного уравнения Хилла. На фиг. 8B показана сравнительная цитотоксичность ТК-TRIF и ТК-DAI в клетках, инфицированных указанными вирусами в дозах в диапазоне от 750 до 0,0025 БОЕ/клетку. Модификация вируса ТК- для экспрессии TRIF или DAI не приводила к изменению цитотоксичности по сравнению с ТК-. Определение количества апоптотических клеток по окрашиванию аннексином V, как показано на фиг. 9B, показало, что инфекция клеток Rensa и 4T1 приводила к увеличению количества апоптотических клеток. Для оценки апоптоза/некроза линий клеток, клетки инфицировали при MOI 1 указанными вирусами и окрашивали с использованием набора для детекции апоптоза с аннексином V-FITC (Abcam, Cambridge, MA) через 48 ч после инфекции. Анализы проводили с использованием проточного цитометра Accuri C6 (BD Biosciences).

Проводили эксперименты для определения того, влияет ли ТК-TRIF на выживаемость мышей с ксенотрансплантатами Rensa или MC38 по сравнению с мышами, обработанными ТК- или PBS. Обеспечивали приживание ксенотрансплантатов Rensa или MC38 у мышей BALB/C или C57BL/6, соответственно, и обрабатывали однократной внутривенной дозой 1×10^8 БОЕ указанных вирусов или PBS. Как показано на фиг. 9E и F, ТК-TRIF значительно улучшал выживаемость по сравнению с обработкой ТК-.

9. Пример 4. Эффект комбинированных экспрессии TRIF и дегликозилирования

ТК- вирус, модифицированный для экспрессии TRIF, как указано выше в 6.3, дегликозилировали ("TK-TRIF deglyc") для анализа эффекта, который такая комбинация может оказывать на противоопухолевые ответы клеток и противоопухолевую эффективность вируса.

Для определения токсичности вируса, экспрессирующего ТК-TRIF, анализировали массу тела мышей BALB/C с инъектированными внутривенно PBS в качестве контроля или 1×10^8 БОЕ на мышь ТК-, ТК-TRIF или дегликозилированного ТК-TRIF. На фиг. 10A показано, что подвергнутые инъекции ТК-мыши обладали более 10% уменьшением массы тела на сутки 6 после инъекции вируса, в то время как мыши, подвергнутые инъекции ТК-TRIF и ТК-TRIF deglyc-, обладали профилем массы, сходным с профилем для мышей, подвергнутых инъекции PBS, что указывает на то, что ТК-TRIF и ТК-TRIF deglyc являются менее токсичными, чем ТК-.

Анализировали экспрессию вирусных генов ТК-TRIF-deglyc *in vivo*, по сравнению с ТК- и ТК-TRIF. Опухоли Rensa имплантировали мышам BALB/c, и мышам инъектировали PBS или 1×10^8 БОЕ ТК-, ТК-TRIF или ТК-TRIF deglyc через хвостовую вену. Экспрессию вирусных генов определяли посредством детекции экспрессии вирусной люциферазы внутри опухолей, измеренной в указанные моменты времени. На фиг. 10B показано, что через 24 ч после инфекции присутствовала менее сильная экспрессия ТК-TRIF и ТК-TRIF deglyc в опухолях по сравнению с ТК-.

Проводили эксперименты для определения того, влияет ли ТК-TRIF или ТК-TRIF deglyc на выживаемость мышей с ксенотрансплантатами Rensa или MC38 по сравнению с мышами, обработанными ТК- или PBS. Обеспечивали приживание ксенотрансплантатов Rensa или MC38 у мышей BALB/C или C57BL/6, соответственно, и обрабатывали их однократной внутривенной дозой 1×10^8 БОЕ указанных вирусов или PBS. Как показано на фиг. 10 C и D, ТК-TRIF и ТК-TRIF deglyc значительно улучшали выживаемость мышей по сравнению с ТК-. А также, ТК-TRIF deglyc улучшал выживаемость мышей с опухолями Rensa по сравнению с обработкой ТК-GMCSF (Фиг. 10E).

Клеточные иммунные ответы на вирус осповакцины и клетки опухолей оценивали посредством анализа IFN- γ ELISpot, как описано выше в разделе 6.3. На сутки 7 после введения вируса, селезенки собирали от мышей, подвергнутых внутривенной инъекции 1×10^8 БОЕ указанных вирусов или PBS (мыши BALB/c, несущие ксенотрансплантаты Rensa) и оценивали количество CTL, узнающих вирус осповакцины или клетки Rensa. На фиг. 11A показано, что дегликозилирование и экспрессия TRIF приводили к значимому увеличению продукции CTL, узнающих вирус осповакцины, *in vivo*, по сравнению с отдельными модификациями, например, ТК-TRIF или ТК-deglyc. В частности, дегликозилированный вирус, экспрессирующий TRIF, приводил к увеличению продукции CTL, большему, чем увеличение продукции CTL, наблюдаемое для индивидуальных модификаций. Кроме того, На фиг. 11B показано, что дегликозилирование и экспрессия TRIF приводили к увеличению количества продукции CTL, узнающих клетки RENCA *in vivo*, по сравнению с отдельными модификациями, например, ТК-TRIF или ТК-deglyc.

Анализ нейтрализации проводили для определения циркулирующих уровней антител против вируса осповакцины у мышей, подвергнутых инъекции 1×10^8 БОЕ ТК-, ТК-TRIF или дегликозилированного ТК-TRIF. Титры Nab определяли по наивысшему разведению сыворотки, приводящему по меньшей мере к 50% ингибированию инфекции. На фиг. 11C показано, что количество нейтрализующих антител выше у мышей C57BL/6 дикого типа, инфицированных ТК-, по сравнению с мышами, инфицированными ТК-TRIF, ТК-deglyc или ТК-TRIF-deglyc. Для мышей, инфицированных ТК-TRIF-deglyc, показано наибольшее уменьшение количества нейтрализующих антител в сыворотке.

Эффект дегликозилированного вируса, экспрессирующего TRIF, на рост опухоли, анализировали у мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантаты опухоли Rensa, или у мышей C57BL/6, несущих ксенотрансплантаты опухоли MC38. Для ксенотрансплантатов опухолей Rensa или MC38, линии клеток опухолей имплантировали подкожно при 5×10^5 клеток на мышь мышам BALB/c или C57BL/6, соответственно. Когда опухоли достигали ~ 50 - 100 мм³, мышей обрабатывали посредством однократной внутривенной дозы указанных вирусов (1×10^8 БОЕ/мышь) в хвостовую вену. Рост опухоли мониторируют посредством измерения штангенциркулем и определяли посредством уравнения $V(\text{mm}^3) = \pi/6 \times W^2 \times L$, где W и L представляют собой ширину и длину опухоли, соответственно. Данные выражали как относительный размер опухоли на начало терапии, который принимали за 100%. Неожиданно, дегликозилированный вирус ТК-TRIF приводил к большему уменьшению размера опухоли у несущих ксенотрансплантаты RENCA и MC38 мышей по сравнению с аддитивным эффектом комбинации индивидуальных модификаций или вируса ТК- (Фиг. 11D и E). Кроме того, для дегликозилированного ТК-TRIF показана улучшенная противоопухолевая активность по сравнению с ТК-GMCSF, как наблюдали по значимому уменьшению размера опухоли у мышей BALB/c, несущих ксенотрансплантаты Rensa (Фиг. 11F) или подкожные опухоли 4T1 у мышей BALB/c (Фиг. 9D). Соответственно, дегликозилированный ТК- вирус осповакцины, экспрессирующий TRIF, обладает значимо улучшенным противоопухолевым ответом и приводит к уменьшению продукции антител против вируса.

10. Пример 5. Эффект комбинированных экспрессии TRIF, десалирования и делеции C12L в UPCI-1812

Вышеописанные модификации, а именно, делецию C12L, десалирование и введение TRIF, включали вместе для получения нового штамма VV UPCI-1812, и эффект этого вируса с тройной модификацией оценивали по его терапевтическим и иммунологическим эффектам. Как показано на фиг. 12A, инфекция UPCI-1812 приводила к значительно лучшей выживаемости, чем WR.TK-, кодирующим GM-CSF. Относительно десалированного вируса с делецией C12L ("vvDD"), UPCI-1812 продуцировал значительно более высокие уровни интерферона гамма (IFN- γ) (Фиг. 12B) и интерлейкина-12 (IL-12) (Фиг. 12C).

11. Пример 6. Эффект нацеливания на PGE2

Для видов терапии онколитическими вирусами наконец начали демонстрировать клиническую эффективность в рандомизированных исследованиях, подчеркивающих реальный потенциал этой платформы. Однако среди современного поколения клинических векторов, те, которые, как обнаружено, являются наиболее успешными, экспрессировали иммуноактивирующий цитокин (GM-CSF), подкрепляя обилие доклинических данных, что указывает на то, что иммунный ответ является ключевым медиатором эффективности вируса. Однако, несмотря на это наблюдение, еще является неясным, как или почему некоторые пациенты отвечают хорошо, а другие кажутся устойчивыми к терапии онколитическими вирусами.

Первоначальные эксперименты проводили для корреляции чувствительности *in vitro* линии клеток опухоли к вирусной инфекции и репликации с ответами *in vivo* такой же линии клеток при использовании для формирования сингенных опухолей у иммунокомпетентных мышей. 14 различных линий клеток опухолей мышей из различных типов опухолей и штаммов мышей анализировали *in vitro* посредством инфекции линий клеток ТК- (Фиг. 26A). Продукцию вируса и экспрессию вирусных генов наблюдали в 14 различных линиях клеток опухолей мышей. Продукцию вируса анализировали посредством посева 2×10^5 клеток в 24-луночные планшеты, с последующей инфекцией при MOI 1 (БОЕ/клетку) указанными вирусами осповакцины. Через четыре ч после инфекции, культуры дважды промывали PBS и инкубировали в свежей свободной от вируса среде. В указанные моменты времени после инфекции, культуры собирали и замораживали-размораживали три раза для получения экстракта клеток (CE). Вирусные титры определяли посредством анализа образования бляшек на клетках BSC-1.

Семь из 14 линий далее тестировали *in vivo* с использованием прямой внутриопухолевой инъекции ТК- (Фиг. 13A и B и Фиг. 26A и B). Прямую внутриопухолевую инъекцию использовали для уменьшения изменчивости, которая может возникать из-за различий в доставке вируса. Как показано на фиг. 13A и B, не наблюдали прямой корреляции между либо репликацией вируса, либо опосредованным вирусом уничтожением клеток, и противоопухолевым эффектом *in vivo*, что указывает на то, что факторы, отличные от непосредственной онколитической активности, опосредуют противоопухолевые эффекты.

Онколитические вирусы осповакцины, экспрессирующие люциферазу, использовали в ходе этих экспериментов, чтобы позволять анализ экспрессии вирусных генов с течением времени в индивидуальных мышках (в качестве суррогата для репликации и персистенции вируса), и позволять сравнения с последующим ответом. Две различных закономерности, по-видимому, выведены из данных. Для более устойчивых моделей опухолей, определенных как те, в которых терапия вирусом увеличивает общую выживаемость менее чем на 2 недели, как наблюдали для Renca, B16, PAN02 и 4T1, прямую корреляцию можно вывести в пределах каждой индивидуальной модели опухоли, так что уровень экспрессии вирусных генов через 24 час соответствовал последующему ответу (Фиг. 13B). Таким образом, даже несмотря на то, что репликация *in vitro* не коррелирует с активностью *in vivo* при сравнении моделей опухолей (предположительно из-за влияния таких факторов, как ECM и не относящиеся к опухоли клетки в опухоли), в пределах любой одной индивидуальной модели опухоли существует корреляция между экспрессией ранних вирусных генов и последующим ответом. Без связи с конкретной теорией, полагают, что репликация вируса и прямая онколитическая активность является ключевым медиатором ограниченного ответа в более устойчивых моделях опухолей. Однако отличную закономерность наблюдали в опухолях, хорошо отвечавших на терапию вирусом, которые включают в себя модели опухолей AB12, LLC, MC38. В этих моделях для опухолей с наилучшим ответом в пределах каждой модели показано быстрое и активное выведение вируса после исходной инфекции и ранней репликации (Фиг. 13B и Фиг. 27). Это активное выведение позволяет предполагать индукцию сильного иммунного ответа для усиления прямых онколитических эффектов вируса в лучше отвечающих моделях опухолей.

Для более тщательной проверки этого наблюдения, первоначально выбраны две модели опухолей с одинаковым генетическим фоном, для которых показаны сравнимые ответы после обработки вирусом *in vivo*, но для одной из которых (LLC) выявлены показатели активной индукции иммунитета (раннее выведение вируса) и ограниченное опосредованное вирусом уничтожение клеток *in vitro* (Фиг. 13B и Фиг. 26A и B). Другая (B16) являлась более чувствительной к уничтожению вирусом *in vitro*, и любой ответ *in vivo*, по-видимому, коррелировал с экспрессией ранних вирусных генов (Фиг. 13B и Фиг. 26A и B). Всестороннюю проверку активации системных иммунных маркеров после вирусной инфекции сравнивали между мышками без опухолей, мышками с опухолями B16 и мышками с опухолями LLC. Они включали в себя маркеры активации врожденной ранней передачи сигналов, такие как pS6, pSTAT1, pSTAT3,

pSTAT5, в различных популяциях клеток (Фиг. 13С и Фиг. 14А), маркеры пролиферации Т-клеток, такие как pS6 и Ki67 (Фиг. 14А), и маркеры активации, такие как CD44 и CD62L (Фиг. 14А), и ответы нейтрализующих антител (Фиг. 14D). Наблюдали незначительные различия в системном иммунном ответе на терапию вирусом между несущими опухоли и не несущими опухоли животными, с одним исключением, представляющим собой фосфорилирование S6 в некоторых миелоидных клетках рано после инфекции (Фиг. 13С). Наблюдали уменьшение уровней pS6 у несущих опухоли животных, но уменьшение иммунной активации являлось наиболее выраженным у несущих опухоль B16 мышей (Фиг. 13С и Фиг. 14А). Это верифицировали в других моделях опухолей, снова подтверждая, что уровни pS6 являлись уменьшенными в более устойчивых моделях опухолей (включая 4T1 и RENCA), указывая на дефект ответа дендритных клеток (DC), который может опосредовать устойчивость у этих мышей (Фиг. 13С).

Поскольку наблюдали небольшие различия в системном иммунном ответе, исследовали эффекты более локализованной иммунной супрессии внутри опухоли. Различные иммунные клетки ассоциированы с супрессорным фенотипом, включая супрессорные клетки миелоидного происхождения (MDSC) и регуляторные Т-клетки (T-reg) (и M2 mac). Анализировали уровень этих различных типов клеток как в селезенке, так и в опухоли, для всех моделей опухолей по сравнению с необработанными животными. Для оценки иммунных популяций в опухолях, собирали опухоли от мышей, обработанных, как указано, и механически дезагрегировали и расщепляли смесью трех ферментов (коллагеназы типа IV, ДНКазы типа IV и гиалуронидазы типа V (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)). Анализы четырехцветного иммуноокрашивания клеточной поверхности проводили с использованием проточного цитометра Gallios (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). Дезагрегированные клетки опухолей окрашивали с использованием антител против CD3 мыши с PE-Cy7 (BD Biosciences, San Jose, CA), антител против CD4 мыши с FITC, антител против CD8 мыши с PerCP-Cy5.5 и антител против CD25 мыши с PE (eBioscience, San Diego, CA).

Уровень MDSC, обнаруженный в опухоли для различных моделей опухолей, тесно коррелировал с устойчивостью или чувствительностью этой модели к терапии вирусом (Фиг. 15А и В, и Фиг. 16). Например, Renca, обладающие устойчивостью к терапии вирусом, приводили к опухолям с высокими уровнями MDSC. На фиг. 17А показано количество MDSC в необработанных опухолях как функция увеличенной выживаемости после внутривенной обработки 1e8 BOE WR.TK- для ряда модельных систем различных опухолей. Для штаммов осповакцины показана очень слабая способность к увеличению выживаемости в моделях опухолей на мышах, обладающих высокими уровнями MDSC в исходной точке. Клетки каждой из перечисленных линий клеток для моделей опухолей (Фиг. 17А) имплантировали сингенным иммунокомпетентным мышам. Затем мышей либо умерщвляли для определения среднего исходного уровня MDSC в полученных опухолях для каждой модели, либо мышей обрабатывали WR.TK- (или PBS для контроля)(1e8 БОЕ, введенных внутрь опухоли) и увеличение ожидаемой продолжительности жизни (для 50% выживаемости) определяли после обработки (в сутках). На график нанесены "относительные количества MDSC в опухолях в исходной точке" против "медианного увеличения выживаемости после обработки WR.TK- (относительно необработанного контроля)". Большее количество MDSC в исходной точке коррелировало с уменьшенной эффективностью терапии.

Исследовали дальнейшие изменения, происходящие в опухоли после терапии вирусом, и наблюдали, что для множества моделей опухолей, таких как 4T1, RENCA и MC38, добавление терапии вирусом осповакцины приводило к потере T-reg, но что уровни MDSC оставались незатронутыми и продолжали увеличиваться с течением времени, как они увеличивались в контрольных группах (Фиг. 15А и В, и Фиг. 16А и В). Терапия вирусом уменьшала уровни T-reg в обработанных опухолях, но не оказывала влияния на уровни MDSC. В модели опухоли Renca (имплантированной подкожно мышам BALB/c), относительные количества T-reg или MDSC в опухоли/мг опухоли определяли в различные периоды времени до или после обработки WR.TK- (1e8 БОЕ, введенные внутрь опухоли) (Фиг. 17В и С). Таким образом, кажется, что неспособность онколитического вируса осповакцины к нацеливанию на MDSC уменьшала его терапевтическую активность в некоторых опухолях, где уровни MDSC являются высокими. Обнаружено также, что в опухолях с низкими исходными уровнями MDSC (MC38), терапия вирусом увеличивает уровень CD8+ Т-клеток в опухоли, в то время как для более устойчивых моделей опухолей (4T1) не показано никакого увеличения (Фиг. 15В).

Проводили анализ иммуногенного штамма осповакцины GM-CSF, экспрессирующего цитокин колониестимулирующий фактор (CSF). Ранее показано, что GM-CSF приводит к более значительным клиническими ответами, а также ассоциирован с пролиферацией MDSC. На Фиг. X 18 и 19 показано, что, несмотря на то, что более иммуногенные штаммы осповакцины (WR.TK-GMCSF и WR.B18R-IFN β +) дополнительно улучшали некоторые аспекты иммунного ответа в чувствительных моделях опухолей, такие как дополнительное уменьшение уровней T-reg и увеличение уровней CD8+ Т-клеток, таких преимуществ не наблюдали в устойчивых в ином отношении моделях опухолей. Без связи с конкретной теорией, полагают, что основное отличие между чувствительными и устойчивыми опухолями относится к неспособности вируса индуцировать сильный иммунотерапевтический эффект в опухолях с высокими уровнями опосредованной MDSC иммуносупрессии в микроокружении опухоли.

В недавних сообщениях идентифицировали опосредованную COX2 продукцию простагландина PGE2 в качестве ключевой детерминанты инфильтрации MDSC и поддержания фенотипа MDSC. Два

способа использовали для нацеливания на этот путь. Одним способом являлось применение ингибитора COX2. Вторым способом являлась экспрессия осуществляющего деградацию простагландина фермента HPGD непосредственно с вирусных векторов. Нуклеиновую кислоту, кодирующую гидроксипростагландиндегидрогеназу 15 (HPGD), фермент мыши, осуществляющий деградацию PGE2, вводили в WR.TK- посредством вставки в локус тимидинкиназы посредством гомологичной рекомбинации и под контроль вирусного промотора p7.5 ("TK-HPGD" или "WR.TK-HPGD"). Как показано на фиг. 20, HPGD специфически экспрессировался с TK-HPGD и значительно уменьшал уровни PGE2 в клетках Renca, инфицированных TK-HPGD. Как показано на фиг. 25, полагают, что инфекция WR.TK- может изменять экспрессию COX2 в опухолях местно в участке инфекции, без продукции значительных уровней экспрессии COX2 в опухоли в целом, или вирус может избирательно реплицироваться в областях с низкими уровнями COX2. В исходных экспериментах *in vitro* и *in vivo* определили, что даже при токсичных уровнях, ингибиторы COX2 являлись неспособными к уменьшению уровней PGE2 до в какой-то степени близких к уровню, достигаемому при экспрессии HPGD (Фиг. 20).

Онколитические вирусы осповакцины, экспрессирующие HPGD, тестировали затем в нескольких моделях опухолей на мышах. Наблюдала, что количество клеток MDSC в опухоли быстро и значительно уменьшалось в селезенке и опухолях после обработки только WR.TK-HPGD (Фиг. 21 и Фиг. 23A-D). Обнаружено также, что включение HPGD уменьшало количество MDSC в опухоли и селезенке относительно немодифицированного вируса WR.TK-. Это являлось специфическим для опухолей, без наблюдаемой системной токсичности (Фиг. 21A). Интересно, что TK-HPGD индуцировал также более быстрое и сильное уменьшение количества T-reg в опухоли. Как показано на фиг. 21B и C, и фиг. 22, инфекция WR.TK-HPGD коррелировала с усиленным терапевтическим эффектом в нескольких моделях опухолей на мышах *in vivo* и приводила к меньшим объемам опухолей. Следует отметить, что для модели опухоли, которая ранее являлась наиболее устойчивой к терапии вирусом, RENCA, с показанным "только онколитическим" фенотипом и высокими исходными уровнями MDSC, неожиданно показали наибольшее увеличение терапевтического преимущества после экспрессии HPGD (Фиг. 21B).

Закономерности экспрессии вирусных генов сравнивали также для WR.TK- и WR.TK-HPGD в опухоли RENCA. Наблюдала, что в то время как для WR.TK- наблюдали "только онколитический" фенотип (более высокая экспрессия гена на сутки 1 коррелировала с наибольшим терапевтическим преимуществом), для WR.TK-HPGD+ показан "онколитический и иммунотерапевтический" фенотип, где для лучше всего отвечающих опухолей показано активное и быстрое выведение вируса к суткам 5 (Фиг. 21D). Без связи с конкретной теорией, полагают, что экспрессия HPGD является способной возвращать иммунотерапевтическую активность вектора в этих более устойчивых моделях, и таким образом, может сенсibilизировать в ином случае устойчивые опухоли к терапии онколитическими вирусами. Это происходило несмотря на общую потерю онколитического потенциала экспрессии HPGD.

Проводили анализ механизмов, опосредующих терапевтические преимущества, наблюдаемые для WR.TK-HPGD+. Через 3 суток после обработки, во время, к которому уровни MDSC и T-reg уже были существенно уменьшенными в окружении опухоли, отмечено, что только умеренные изменения происходили в уровнях цитокинов и хемокинов в опухоли (Фиг. 24A). Однако, уровень хемокинов в сыворотке заметно изменялся (Фиг. 24B). В частности, хемокины, ассоциированные с привлечением активированных Т-клеток, включая CCL5, подвергались повышающей регуляции, в то время как уровень CXCL12 (sdf-1, ассоциированный с иммуносупрессивным фенотипом и неблагоприятным прогнозом) был существенно снижен (Фиг. 24A и B). Это изменение системного эффекта хемокинов может являться ответственным за опосредование изменений в репертуаре иммунных клеток в опухоли. Это дополнительно исследовали с использованием анализа билатеральной опухоли, где в одну опухоль инъецировали WR.TK-, и в опухоль с противоположного бока инъецировали WR.TK-HPGD. Наблюдала значительно больший транспорт активированных Т-клеток к экспрессирующей HPGD опухоли (Фиг. 24D). Кроме того, в более поздние моменты времени наблюдали, что экспрессия WR.TK-HPGD приводила к существенно увеличенным уровням нацеленных на опухоль CTL в селезенке. Эти данные указывают на то, что экспрессия HPGD действует не только для ограничения супрессивного окружения в опухоли, но также усиливает привлечение Т-клеток, что приводит к более активному противоопухолевому адаптивному иммунному ответу. Кроме того, включение HPGD в UPCI-1812 приводило к вирусу, который ингибировал рост опухоли значительно более, чем UPCI-1812 ("комбинированный"; фиг. 28). Как показано на фиг. 28, комбинированный вирус приводил к большему уменьшению роста опухоли, чем аддитивный эффект вируса UPCI-1812 и вируса W-HPGD. Опосредованное вирусом нацеливание на PGE2 являлось способным к преодолению локализованной иммуносупрессии, приводя к кардинальным изменениям в микроокружении опухолей и приводя к сенсibilизации ранее устойчивых опухолей к терапии вирусом.

13. Пример 7. Модификация, увеличивающая активность и распространение

На фиг. 29 показан уровень нейтрализующих антител против вируса осповакцины, присутствующих в сыворотке мышей, вакцинированных (1e4 БОЕ) либо WR, либо WR с улучшающей EEV точечной мутацией в вирусном гене A34R (Lys151 до Glu). Мутантный штамм A34R вызывает продукцию меньшего количества нейтрализующих антител против вируса осповакцины по сравнению с WR-.

14. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. Kirn, D.H. & Thorne, S.H. Targeted and armed oncolytic poxviruses: a novel multi-mechanistic therapeutic class for cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 64-71 (2009).
3. Kirn, D., Martuza, R.L. & Zwiebel, J. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nat Med* 7, 781-7 (2001).
4. Kim, J.H., Oh, J.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, 361-70 (2006).
5. 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, e353 (2007).
6. 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, 3350-3358 (2007).
7. 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, 8751-7 (2001).
8. 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, 9991-8 (2005).
9. 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, 1744-50

(1999).

10. 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, 10038-46 (2007).

11. Yu, Y.A., Shabahang, S., Timiryasova, T.M., Zhang, Q., Beltz, R., Gentshev, 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, 313-20 (2004).

12. 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, 533-42 (2008).

13. 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, 99-102 (2011).

14. Schmidt, C. Amgen spikes interest in live virus vaccines for hard-to-treat cancers. *Nature biotechnology* 29, 295-6 (2011).

15. Coffin, R. Clinical Updates with oncolytic HSV. in 7th International Oncolytic Virus Meeting (Quebec City, 2013).

16. 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, 5763-71 (2009).

17. Bischoff, J.R., Kirn, D.H., Williams, A., Heise, C., Horn, S., Muna, M., Ng, L., Nye, J.A., Sampson-Johannes, A., Fattaey, A. & McCormick, F. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science* 274, 373-6 (1996).

18. 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 adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with recurrent head and neck cancer. *Nature Medicine* 6, 879-885 (2000).

19. Garber, K. China approves world's first oncolytic virus therapy for cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 98, 298-300 (2006).

20. Liu, T.C., Hwang, T., Park, B.H., Bell, J. & Kirn, D.H. The targeted oncolytic poxvirus JX-594 demonstrates antitumoral, antivascular, and anti-HBV activities in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Ther* 16, 1637-42 (2008).

21. 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, 185ra63 (2013).

22. 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, 9837-45 (2010).

23. 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, 508-15 (2004).

24. 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., Stroncek, 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, 301 (2009).

25. 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, 1698-705 (2010).

26. Thorne, S.H. Enhancing biological therapy through conditional regulation of protein stability. *Expert reviews in molecular medicine* 12, e2 (2010).

27. 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 IFNbeta Illustrates the Complex Relationships Between Oncolytic Ability and Immunogenicity. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* (2011).

28. 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, 4374-81 (2009).

29. Banchereau, J. & Palucka, A.K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* 5, 296-306 (2005).

30. Nestle, F.O., Tonel, G. & Farkas, A. Cancer vaccines: the next generation of tools to monitor the anticancer immune response. *PLoS Med* 2, e339 (2005).

31. Rosenberg, S.A., Yang, J.C. & Restifo, N.P. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10, 909-15 (2004).

32. Banaszynski, L.A., Sellmyer, M.A., Contag, C.H., Wandless, T.J. & Thorne, S.H. Chemical control of protein

stability and function in living mice. *Nat Med* (2008).

33. Rommelfanger, D.M., Wongthida, P., Diaz, R.M., Kaluza, K.M., Thompson, J.M., Kottke, T.J. & Vile, R.G. Systemic Combination Virotherapy for Melanoma with Tumor Antigen-Expressing Vesicular Stomatitis Virus and Adoptive T-Cell Transfer. *Cancer Research* (2012).

34. Thorne, S.H. Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus. *Immunologic research* 50, 286-93 (2011).

35. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. & Sakaguchi, S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *The Journal of experimental medicine* 201, 723-35 (2005).

36. Enzler, T., Gillessen, S., Manis, J.P., Ferguson, D., Fleming, J., Alt, F.W., Mihm, M. & Dranoff, G. Deficiencies of GM-CSF and interferon gamma link inflammation and cancer. *The Journal of experimental medicine* 197, 1213-9 (2003).

37. Jinushi, M., Nakazaki, Y., Dougan, M., Carrasco, D.R., Mihm, M. & Dranoff, G. MFG-E8-mediated uptake of apoptotic cells by APCs links the pro- and antiinflammatory activities of GM-CSF. *The Journal of clinical investigation* 117, 1902-13 (2007).

38. Lemoine, F.M., Cherai, M., Giverne, C., Dimitri, D., Rosenzweig, M., Trebeden-Negre, H., Chaput, N., Barrou, B., Thioun, N., Gattegnio, B., Selles, F., Six, A., Azar, N., Lotz, J.P., Buzyn, A., Sibony, M., Delcourt, A., Boyer, O., Herson, S., Klatzmann, D. & Lacave, R. Massive expansion of regulatory T-cells following interleukin 2 treatment during a phase I-II dendritic cell-based immunotherapy of metastatic renal cancer. *International journal of oncology* 35, 569-81 (2009).

39. Wei, S., Kryczek, I., Edwards, R.P., Zou, L., Szeliga, W., Banerjee, M., Cost, M., Cheng, P., Chang, A., Redman, B., Herberman, R.B. & Zou, W. Interleukin-2 administration alters the CD4+FOXP3+ T-cell pool and tumor trafficking in patients with ovarian carcinoma. *Cancer Research* 67, 7487-94 (2007).

40. Filipazzi, P., Valenti, R., Huber, V., Pilla, L., Canese, P., Iero, M., Castelli, C., Mariani, L., Parmiani, G. &

Rivoltini, L. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 2546-53 (2007).

41. Smith, G.L., Symons, J.A., Khanna, A., Vanderplasschen, A. & Alcamí, A. Vaccinia virus immune evasion. *Immunol Rev* 159, 137-54 (1997).

42. Smith, G.L., Symons, J.A. & Alcamí, A. Immune modulation by proteins secreted from cells infected by vaccinia virus. *Arch Virol Suppl* 15, 111-29 (1999).

43. Symons, J.A., Alcamí, A. & Smith, G.L. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* 81, 551-60 (1995).

44. Iwasaki, A., Stiernholm, B.J., Chan, A.K., Berinstein, N.L. & Barber, B.H. Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines. *Journal of Immunology* 158, 4591-601 (1997).

45. Gulley, J.L., Arlen, P.M., Tsang, K.Y., Yokokawa, J., Palena, C., Poole, D.J., Remondo, C., Cereda, V., Jones, J.L., Pazdur, M.P., Higgins, J.P., Hodge, J.W., Steinberg, S.M., Kotz, H., Dahut, W.L. & Schlom, J. Pilot study of vaccination with recombinant CEA-MUC-1-TRICOM poxviral-based vaccines in patients with metastatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 14, 3060-9 (2008).

46. Takeshita, F., Tanaka, T., Matsuda, T., Tozuka, M., Kobiyama, K., Saha, S., Matsui, K., Ishii, K.J., Coban, C., Akira, S., Ishii, N., Suzuki, K., Klinman, D.M., Okuda, K. & Sasaki, S. Toll-like receptor adaptor molecules enhance DNA-raised adaptive immune responses against influenza and tumors through activation of innate immunity. *Journal of virology* 80, 6218-24 (2006).

47. Sasaki, S., Amara, R.R., Yeow, W.S., Pitha, P.M. & Robinson, H.L. Regulation of DNA-raised immune responses by cotransfected interferon regulatory factors. *Journal of virology* 76, 6652-9 (2002).

48. O'Gorman, W.E., Sampath, P., Simonds, E.F., Sikorski, R., O'Malley, M., Krutzik, P.O., Chen, H., Panchanathan, V., Chaudhri, G., Karupiah, G., Lewis, D.B., Thorne, S.H. & Nolan, G.P. Alternate mechanisms of initial pattern recognition drive differential immune responses to related poxviruses. *Cell host & microbe* 8, 174-85 (2010).
49. Zhu, J., Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. Innate immunity against vaccinia virus is mediated by TLR2 and requires TLR-independent production of IFN-beta. *Blood* 109, 619-25 (2007).
50. Samuelsson, C., Hausmann, J., Lauterbach, H., Schmidt, M., Akira, S., Wagner, H., Chaplin, P., Suter, M., O'Keefe, M. & Hochrein, H. Survival of lethal poxvirus infection in mice depends on TLR9, and therapeutic vaccination provides protection. *J Clin Invest* 118, 1776-84 (2008).
51. Hennessy, E.J., Parker, A.E. & O'Neill, L.A. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nature reviews. Drug discovery* 9, 293-307 (2010).
52. O'Neill, L.A., Bryant, C.E. & Doyle, S.L. Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacological reviews* 61, 177-97 (2009).
53. Fukata, M. & Abreu, M.T. Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. *Oncogene* 27, 234-43 (2008).
54. Chen, R., Alvero, A.B., Silasi, D.A., Steffensen, K.D. & Mor, G. Cancers take their Toll--the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells. *Oncogene* 27, 225-33 (2008).
55. Sautes-Fridman, C., Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Fisson, S., Fridman, W.H., Cremer, I. & Dieu-Nosjean, M.C. Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer metastasis reviews* 30, 13-25 (2011).
56. Rakoff-Nahoum, S. & Medzhitov, R. Toll-like receptors and cancer. *Nature reviews. Cancer* 9, 57-63 (2009).
57. Umemura, N., Zhu, J., Mburu, Y.K., Forero, A., Hsieh, P.N., Muthuswamy, R., Kalinski, P., Ferris, R.L. & Sarkar, S.N. Defective NF-kappaB signaling in metastatic head and neck cancer

cells leads to enhanced apoptosis by double-stranded RNA. *Cancer Research* 72, 45-55 (2012).

58. Cheng, Y.S. & Xu, F. Anticancer function of polyinosinic-polycytidylic acid. *Cancer biology & therapy* 10, 1219-23 (2011).

59. Longhi, M.P., Trunpfheller, C., Idoyaga, J., Caskey, M., Matos, I., Kluger, C., Salazar, A.M., Colonna, M. & Steinman, R.M. Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4⁺ Th1 immunity with poly IC as adjuvant. *The Journal of experimental medicine* 206, 1589-602 (2009).

60. Trunpfheller, C., Caskey, M., Nchinda, G., Longhi, M.P., Mizenina, O., Huang, Y., Schlesinger, S.J., Colonna, M. & Steinman, R.M. The microbial mimic poly IC induces durable and protective CD4⁺ T cell immunity together with a dendritic cell targeted vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2574-9 (2008).

61. Kalinski, P., Hilkens, C.M., Wierenga, E.A. & Kapsenberg, M.L. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20, 561-7 (1999).

62. Mailliard, R.B., Wankowicz-Kalinska, A., Cai, Q., Wesa, A., Hilkens, C.M., Kapsenberg, M.L., Kirkwood, J.M., Storkus, W.J. & Kalinski, P. alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res* 64, 5934-7 (2004).

63. Wesa, A., Kalinski, P., Kirkwood, J.M., Tatsumi, T. & Storkus, W.J. Polarized type-1 dendritic cells (DC1) producing high levels of IL-12 family members rescue patient TH1-type antimelanoma CD4⁺ T cell responses in vitro. *J Immunother* 30, 75-82 (2007).

64. Kalinski, P. & Okada, H. Polarized dendritic cells as cancer vaccines: directing effector-type T cells to tumors. *Seminars in immunology* 22, 173-82 (2010).

65. Okada, H., Kalinski, P., Ueda, R., Hoji, A., Kohanbash, G., Donegan, T.E., Mintz, A.H., Engh, J.A., Bartlett, D.L.,

Brown, C.K., Zeh, H., Holtzman, M.P., Reinhart, T.A., Whiteside, T.L., Butterfield, L.H., Hamilton, R.L., Potter, D.M., Pollack, I.F., Salazar, A.M. & Lieberman, F.S. Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with {alpha}-type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29, 330-6 (2011).

66. Hokey, D.A., Larregina, A.T., Erdos, G., Watkins, S.C. & Falco, L.D., Jr. Tumor cell loaded type-1 polarized dendritic cells induce Th1-mediated tumor immunity. *Cancer Research* 65, 10059-67 (2005).

67. Buller, R.M. & Palumbo, G.J. Poxvirus pathogenesis. *Microbiol Rev* 55, 80-122 (1991).

68. Moss, B. Poxviridae: The viruses and their replication. in *Field's Virology* (eds. D.M., K., Fields, B.N. & Howley, P.M.) Ch.84 (Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001).

69. Putz, M.M., Midgley, C.M., Law, M. & Smith, G.L. Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nat Med* 12, 1310-5 (2006).

70. Symons, J.A., Adams, E., Tscharke, D.C., Reading, P.C., Waldmann, H. & Smith, G.L. The vaccinia virus C12L protein inhibits mouse IL-18 and promotes virus virulence in the murine intranasal model. *J Gen Virol* 83, 2833-44 (2002).

71. Reading, P.C. & Smith, G.L. Vaccinia virus interleukin-18-binding protein promotes virulence by reducing gamma interferon production and natural killer and T-cell activity. *J Virol* 77, 9960-8 (2003).

72. Zhu, J., Smith, K., Hsieh, P.N., Mburu, Y.K., Chattopadhyay, S., Sen, G.C. & Sarkar, S.N. High-throughput screening for TLR3-IFN regulatory factor 3 signaling pathway modulators identifies several antipsychotic drugs as TLR inhibitors. *Journal of Immunology* 184, 5768-76 (2010).

73. Okamura, H., Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M.,

Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K. & et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378, 88-91 (1995).

74. Wong, J.L., Mailliard, R.B., Moschos, S.J., Edington, H., Lotze, M.T., Kirkwood, J.M. & Kalinski, P. Helper Activity of Natural Killer Cells During the Dendritic Cell-mediated Induction of Melanoma-specific Cytotoxic T Cells. *Journal of immunotherapy* 34, 270-8 (2011).

75. Falivene, J., Del Medico Zajac, M.P., Pascutti, M.F., Rodriguez, A.M., Maeto, C., Perdiguero, B., Gomez, C.E., Esteban, M., Calamante, G. & Gherardi, M.M. Improving the MVA vaccine potential by deleting the viral gene coding for the IL-18 binding protein. *PLoS One* 7, e32220 (2012).

76. Kirn, D.H., Wang, Y., Liang, W., Contag, C.H. & Thorne, S.H. Enhancing poxvirus oncolytic effects through increased spread and immune evasion. *Cancer Res* 68, 2071-5 (2008).

77. Puhlmann, M., Brown, C.K., Gnant, M., Huang, J., Libutti, S.K., Alexander, H.R. & Bartlett, D.L. Vaccinia as a vector for tumor-directed gene therapy: biodistribution of a thymidine kinase-deleted mutant. *Cancer Gene Ther* 7, 66-73 (2000).

78. Alvarez-Breckenridge, C.A., Yu, J., Price, R., Wojton, J., Pradarelli, J., Mao, H., Wei, M., Wang, Y., He, S., Hardcastle, J., Fernandez, S.A., Kaur, B., Lawler, S.E., Vivier, E., Mandelboim, O., Moretta, A., Caligiuri, M.A. & Chiocca, E.A. NK cells impede glioblastoma virotherapy through NKp30 and NKp46 natural cytotoxicity receptors. *Nature Medicine* 18, 1827-34 (2012).

79. Errington, F., Jones, J., Merrick, A., Bateman, A., Harrington, K., Gough, M., O'Donnell, D., Selby, P., Vile, R. & Melcher, A. Fusogenic membrane glycoprotein-mediated tumour cell fusion activates human dendritic cells for enhanced IL-12 production and T-cell priming. *Gene Ther* 13, 138-49 (2006).

80. Prestwich, R.J., Errington, F., Ilett, E.J., Morgan, R.S., Scott, K.J., Kottke, T., Thompson, J., Morrison, E.E., Harrington, K.J., Pandha, H.S., Selby, P.J., Vile, R.G. &

Melcher, A.A. Tumor infection by oncolytic reovirus primes adaptive antitumor immunity. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 7358-66 (2008).

81. Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D.P., Langlais, C., Hupe, M., Cain, K., MacFarlane, M., Hacker, G. & Leverkus, M. cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Molecular cell* 43, 449-63 (2011).

82. Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K. & Akira, S. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *Journal of Immunology* 171, 4304-10 (2003).

83. Jiang, Z., Mak, T.W., Sen, G. & Li, X. Toll-like receptor 3-mediated activation of NF-kappaB and IRF3 diverges at Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter inducing IFN-beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3533-8 (2004).

84. Bahar, M.W., Kenyon, J.C., Putz, M.M., Abrescia, N.G., Pease, J.E., Wise, E.L., Stuart, D.I., Smith, G.L. & Grimes, J.M. Structure and function of A41, a vaccinia virus chemokine binding protein. *PLoS Pathog* 4, e5 (2008).

85. Smith, G.L. & Moss, B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene* 25, 21-8 (1983).

86. Jones, S.A., Scheller, J. & Rose-John, S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *The Journal of clinical investigation* 121, 3375-83 (2011).

87. Chang, C.L., Ma, B., Pang, X., Wu, T.C. & Hung, C.F. Treatment with cyclooxygenase-2 inhibitors enables repeated administration of vaccinia virus for control of ovarian cancer. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene*

Therapy 17, 1365-72 (2009).

88. Bernard, M.P., Bancos, S., Chapman, T.J., Ryan, E.P., Treanor, J.J., Rose, R.C., Topham, D.J. & Phipps, R.P. Chronic inhibition of cyclooxygenase-2 attenuates antibody responses against vaccinia infection. *Vaccine* 28, 1363-72 (2010).

89. Kalinski, P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *Journal of Immunology* 188, 21-8 (2012).

90. Vella, L.A., Yu, M., Fuhrmann, S.R., El-Amine, M., Epperson, D.E. & Finn, O.J. Healthy individuals have T-cell and antibody responses to the tumor antigen cyclin B1 that when elicited in mice protect from cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 14010-5 (2009).

91. Weiss, V.L., Lee, T.H., Song, H., Kouo, T.S., Black, C.M., Sgouros, G., Jaffee, E.M. & Armstrong, T.D. Trafficking of high avidity HER-2/neu-specific T cells into HER-2/neu-expressing tumors after depletion of effector/memory-like regulatory T cells. *PLoS One* 7, e31962 (2012).

92. Ercolini, A.M., Ladle, B.H., Manning, E.A., Pfannenstiel, L.W., Armstrong, T.D., Machiels, J.P., Bieler, J.G., Emens, L.A., Reilly, R.T. & Jaffee, E.M. Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *The Journal of experimental medicine* 201, 1591-602 (2005).

93. Pulido, J., Kottke, T., Thompson, J., Galivo, F., Wongthida, P., Diaz, R.M., Rommelfanger, D., Ilett, E., Pease, L., Pandha, H., Harrington, K., Selby, P., Melcher, A. & Vile, R. Using virally expressed melanoma cDNA libraries to identify tumor-associated antigens that cure melanoma. *Nature biotechnology* 30, 337-43 (2012).

94. Pol, J.G., Acuna, S., Stephenson, K., Tang, N., Kazdhan, N., Bramson, J.L., McCart, J.A., Stojdl, D., Bell, J., Wan, Y. & Lichty, B. Preclinical Evaluation of an Oncolytic Maraba Virus Vaccine in a Simian Model. in 7th International Oncolytic Viruses Meeting (Quebec City, 2013).

95. Belyakov, I.M. & Ahlers, J.D. What role does the route

of immunization play in the generation of protective immunity against mucosal pathogens? *Journal of Immunology* 183, 6883-92 (2009).

96. Guy, C.T., Webster, M.A., Schaller, M., Parsons, T.J., Cardiff, R.D. & Muller, W.J. Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10578-82 (1992).

97. Tsukamoto, A.S., Grosschedl, R., Guzman, R.C., Parslow, T. & Varmus, H.E. Expression of the int-1 gene in transgenic mice is associated with mammary gland hyperplasia and adenocarcinomas in male and female mice. *Cell* 55, 619-25 (1988).

98. Kelly, K.J., Brader, P., Woo, Y., Li, S., Chen, N., Yu, Y.A., Szalay, A.A. & Fong, Y. Real-time intraoperative detection of melanoma lymph node metastases using recombinant vaccinia virus GLV-1h68 in an immunocompetent animal model. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 124, 911-8 (2009).

99. Eisenberg, D.P., Adusumilli, P.S., Hendershott, K.J., Chung, S., Yu, Z., Chan, M.K., Hezel, M., Wong, R.J. & Fong, Y. Real-time intraoperative detection of breast cancer axillary lymph node metastases using a green fluorescent protein-expressing herpes virus. *Annals of surgery* 243, 824-30; discussion 830-2 (2006).

100. Brader, P., Kelly, K., Gang, S., Shah, J.P., Wong, R.J., Hricak, H., Blasberg, R.G., Fong, Y. & Gil, Z. Imaging of lymph node micrometastases using an oncolytic herpes virus and [F]FEAU PET. *PLoS One* 4, e4789 (2009).

101. Kim, P.S., Armstrong, T.D., Song, H., Wolpoe, M.E., Weiss, V., Manning, E.A., Huang, L.Q., Murata, S., Sgouros, G., Emens, L.A., Reilly, R.T. & Jaffee, E.M. Antibody association with HER-2/neu-targeted vaccine enhances CD8 T cell responses in mice through Fc-mediated activation of DCs. *The Journal of clinical investigation* 118, 1700-11 (2008).

102. Le, D.T., Ladle, B.H., Lee, T., Weiss, V., Yao, X., Leubner, A., Armstrong, T.D. & Jaffee, E.M. CD8(+) Foxp3(+)

tumor infiltrating lymphocytes accumulate in the context of an effective anti-tumor response. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 129, 636-47 (2011).

103. Chen, H., Sampath, P., Hou, W. & Thorne, S.H. Regulating cytokine function enhances safety and activity of genetic cancer therapies. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 21, 167-74 (2013).

104. Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature reviews. Immunology* 9, 353-63 (2009).

105. Workenhe, S.T., Pol, J.G., Lichty, B.D., Cummings, D.T. & Mossman, K.L. Mitoxantrone synergizes with oncolytic herpes simplex virus to regress established breast tumors in part by increasing recruitment of CD8+ T cells. in 7th International Oncolytic Viruses Meeting (Quebec City, 2013).

106. Fujita, M., Kohanbash, G., Fellows-Mayle, W., Hamilton, R.L., Komohara, Y., Decker, S.A., Ohlfest, J.R. & Okada, H. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Research* 71, 2664-74 (2011).

107. Godin-Ethier, J., Hanafi, L.A., Piccirillo, C.A. & Lapointe, R. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 6985-91 (2011).

108. Terajima, M. & Leporati, A.M. Role of Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Antiviral Activity of Interferon-gamma Against Vaccinia Virus. *Viral immunology* 18, 722-9 (2005).

109. Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoue, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.H., Trajanoski, Z., Fridman, W.H. & Pages, F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313, 1960-4 (2006).

110. Parato, K.A., Breitbach, C.J., Le Boeuf, F., Wang, J., Storbeck, C., Ilkow, C., Diallo, J.S., Falls, T., Burns, J.,

Garcia, V., Kanji, F., Evgin, L., Hu, K., Paradis, F., Knowles, S., Hwang, T.H., Vanderhyden, B.C., Auer, R., Kirn, D.H. & Bell, J.C. The oncolytic poxvirus JX-594 selectively replicates in and destroys cancer cells driven by genetic pathways commonly activated in cancers. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 20, 749-58 (2012).

111. Visus, C., Wang, Y., Lozano-Leon, A., Ferris, R.L., Silver, S., Szczepanski, M.J., Brand, R.E., Ferrone, C.R., Whiteside, T.L., Ferrone, S., DeLeo, A.B. & Wang, X. Targeting ALDH(bright) human carcinoma-initiating cells with ALDH1A1-specific CD8(+) T cells. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 6174-84 (2011).

112. Silva, I.A., Bai, S., McLean, K., Yang, K., Griffith, K., Thomas, D., Ginestier, C., Johnston, C., Kueck, A., Reynolds, R.K., Wicha, M.S. & Buckanovich, R.J. Aldehyde dehydrogenase in combination with CD133 defines angiogenic ovarian cancer stem cells that portend poor patient survival. *Cancer Research* 71, 3991-4001 (2011).

113. Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Wicinski, J., Cervera, N., Finetti, P., Hur, M.H., Diebel, M.E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Viens, P., Xerri, L., Bertucci, F., Stassi, G., Dontu, G., Birnbaum, D. & Wicha, M.S. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Research* 69, 1302-13 (2009).

114. Ning, N., Pan, Q., Zheng, F., Teitz-Tennenbaum, S., Egenti, M., Yet, J., Li, M., Ginestier, C., Wicha, M.S., Moyer, J.S., Prince, M.E., Xu, Y., Zhang, X.L., Huang, S., Chang, A.E. & Li, Q. Cancer stem cell vaccination confers significant antitumor immunity. *Cancer Research* 72, 1853-64 (2012).

115. Cho, R.W., Wang, X., Diehn, M., Shedden, K., Chen, G.Y., Sherlock, G., Gurney, A., Lewicki, J. & Clarke, M.F. Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors. *Stem Cells* 26, 364-71 (2008).

116. Ginestier, C., Liu, S., Diebel, M.E., Korkaya, H., Luo, M., Brown, M., Wicinski, J., Cabaud, O., Charafe-Jauffret, E., Birnbaum, D., Guan, J.L., Dontu, G. & Wicha, M.S. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. *The Journal of clinical investigation* 120, 485-97 (2010).

В настоящем описании процитированы различные публикации, полное содержание которых, таким образом, включено в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Онколитический вирус осповакцины, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую 15-гидроксипростагландин дегидрогеназу (15-PGDH) или ее функциональный домен, причем онколитический вирус осповакцины является отрицательным по тимидинкиназе.

2. Онколитический вирус осповакцины по п.1, дополнительно включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую адаптер, содержащий Toll/IL-1R домен, индуцирующий белок интерферона бета (TRIF) или его функциональный домен.

3. Онколитический вирус осповакцины по п.1 или 2, дополнительно включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) или его функциональный домен.

4. Онколитический вирус осповакцины по любому из пп.1-3, причем онколитический вирус осповакцины включает делецию гена тимидинкиназы.

5. Онколитический вирус осповакцины по любому из пп.1-4, дополнительно включающий модификацию, которая увеличивает количество продуцируемой внеклеточной покрытой оболочкой формы вируса.

6. Онколитический вирус осповакцины по п.5, причем модификация, улучшающая распространение и активность вируса, выбрана из группы, состоящей из следующего: замена Lys151 на Glu в A34R, полная или частичная делеция B5R, мутация или делеция A36R, мутация или делеция A56R и любая из их комбинаций.

7. Онколитический вирус осповакцины по п.6, причем мутация A36R представляет собой аминокислотную замену в белке A36R, делеция A36R является полной или частичной делецией белка A36R, мутация A56R представляет собой аминокислотную замену в белке A56R и/или делеция A56R является полной или частичной делецией в белке A56R.

8. Онколитический вирус осповакцины по любому из пп.1-7, дополнительно включающий вирусную оболочку с уменьшенным гликозилированием относительно в остальном идентичного немодифицированного вируса.

9. Онколитический вирус осповакцины по любому из пп.1-8, дополнительно включающий мутацию вирусного остова, выбранную из группы, состоящей из следующего: полная или частичная делеция C12L, делеция или мутация B8R, делеция или мутация B18R, делеция или мутация A35R, мутация B15R и любая их комбинация.

10. Онколитический вирус осповакцины по п.9, причем мутация вирусного остова включает полную или частичную делецию C12L.

11. Онколитический вирус осповакцины по п.9 или 10, причем мутация вирусного остова включает делецию или мутацию B8R, делецию или мутацию B18R, делецию или мутацию A35R или их комбинацию.

12. Онколитический вирус осповакцины по любому из пп.1-11, дополнительно содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-12 или его функциональный домен, нуклеиновую кислоту, кодирующую IL-18 или его функциональный домен, и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую IFN- γ или его функциональный домен.

13. Онколитический вирус осповакцины по любому из пп.3-12, в котором нуклеиновая кислота, кодирующая TRIF или его функциональный домен, или нуклеиновая кислота, кодирующая GM-CSF или его функциональный домен, клонирована в локус гена тимидин киназы.

14. Онколитический вирус осповакцины по любому из пп.1-13, причем нуклеиновая кислота, кодирующая 15-PGDH или его функциональный домен, клонирована в локус гена тимидин киназы.

15. Онколитический вирус осповакцины по любому из пп.12-14, причем нуклеиновая кислота, кодирующая IL-12 или его функциональный домен, нуклеиновая кислота, кодирующая IL-18 или его функциональный домен или нуклеиновая кислота, кодирующая IFN- γ или его функциональный домен, клонирована в локус гена тимидин киназы.

16. Онколитический вирус осповакцины по любому из пп.1-15, причем онколитический вирус осповакцины включает штамм Western Reserve.

17. Способ уменьшения роста клеток злокачественной опухоли, включающий введение в клетку злокачественной опухоли эффективного количества онколитического вируса осповакцины по любому из пп.1-16.

18. Способ уменьшения роста клеток опухоли, включающий введение в опухоль эффективного количества онколитического вируса осповакцины по любому из пп.1-16.

19. Способ лечения пациента, имеющего злокачественную опухоль, включающий введение пациенту эффективного количества онколитического вируса осповакцины по любому из пп.1-16.

20. Способ оказания противоракового эффекта у пациента, включающий введение пациенту эффективного количества онколитического вируса осповакцины по любому из пп.1-16.

21. Способ по любому из пп.17-20, дополнительно включающий введение одного или более средств, выбранных из группы, состоящей из противоракового средства, иммуномодулирующего средст-

ва, средства, ингибирующего или уменьшающего уровень супрессорных клеток миелоидного происхождения, и любой их комбинации.

22. Способ по п.21, в котором иммуномодулирующее средство включает средство, подавляющее противовирусный иммунитет.

23. Способ по п.21, в котором иммуномодулирующее средство включает ингибитор иммунных контрольных точек.

24. Способ по п.23, в котором ингибитор иммунных контрольных точек включает анти-CTLA4 антитело, анти-PD1 антитело, анти-PDL1 антитело, агонист TLR или их комбинацию.

25. Способ по п.21, в котором иммуномодулирующее средство и средство, ингибирующее или уменьшающее уровень супрессорных клеток миелоидного происхождения, независимо выбраны из группы, состоящей из: анти-CD33 антитела или его функциональной области, анти-CD11b антитела или его функциональной области, цитокина, хемокина, ингибитора COX2 и их комбинаций.

26. Способ по п.25, в котором ингибитор COX2 включает целекоксиб.

27. Способ по любому из пп.21-26, в котором противораковое средство включает химиотерапевтическое средство, радиотерапевтическое средство, антиангиогенное средство, индуцирующее апоптоз средство, антитело против злокачественных опухолей, средство против циклинзависимых киназ или их комбинацию.

28. Применение онколитического вируса осповакцины по любому из пп.1-16 по меньшей мере для одной цели из числа: лечения пациента, имеющего рак, уменьшения роста раковых клеток, уменьшения роста опухоли и получения противоракового эффекта.

29. Применение по п.28, в котором онколитический вирус осповакцины используют в комбинации с одним или более средствами, выбранными из группы, состоящей из: противоракового средства, иммуномодулирующего средства, средства, ингибирующего или уменьшающего уровень супрессорных клеток миелоидного происхождения и их комбинаций.

30. Применение по п.29, в котором иммуномодулирующее средство включает средство, подавляющее противовирусный иммунитет.

31. Применение по п.29, в котором иммуномодулирующее средство включает ингибитор иммунных контрольных точек.

32. Применение по п.31, в котором ингибитор иммунных контрольных точек включает анти-CTLA4 антитело, анти-PD1 антитело, анти-PDL1 антитело, агонист TLR, или их комбинацию.

33. Применение по п.29, в котором иммуномодулирующее средство и средство, ингибирующее или уменьшающее уровень супрессорных клеток миелоидного происхождения, независимо выбраны из группы, состоящей из: анти-CD33 антитела или его функциональной области, анти-CD11b антитела или его функциональной области, цитокина, хемокина, ингибитора COX2 и их комбинаций.

34. Применение по п.33, в котором ингибитор COX2 включает целекоксиб.

35. Применение по любому из пп.29-34, в котором противораковое средство включает химиотерапевтическое средство, радиотерапевтическое средство, антиангиогенное средство, индуцирующее апоптоз средство, антитело против злокачественных опухолей, средство против циклин-зависимых киназ или их комбинацию.

36. Композиция, содержащая онколитический вирус осповакцины по любому из пп.1-16, для применения в по меньшей мере одной цели из числа: лечения пациента, имеющего рак, уменьшения роста раковых клеток, уменьшения роста опухоли и получения противоракового эффекта.

37. Композиция по п.36, дополнительно содержащая дополнительное средство, для применения в по меньшей мере одной цели из числа: лечения пациента, имеющего рак, уменьшения роста раковых клеток, уменьшения роста опухоли и получения противоракового эффекта.

38. Композиция по п.36 или 37, в которой дополнительное средство включает противораковое средство, иммуномодулирующее средство, средство, ингибирующее или уменьшающее уровень супрессорных клеток миелоидного происхождения, или их комбинацию.

39. Композиция по п.38, в которой иммуномодулирующее средство включает средство, подавляющее противовирусный иммунитет.

40. Композиция по п.38, в которой иммуномодулирующее средство включает ингибитор иммунных контрольных точек.

41. Композиция по п.40, в которой ингибитор иммунных контрольных точек включает анти-CTLA4 антитело, анти-PD1 антитело, анти-PDL1 антитело, агонист TLR или их комбинацию.

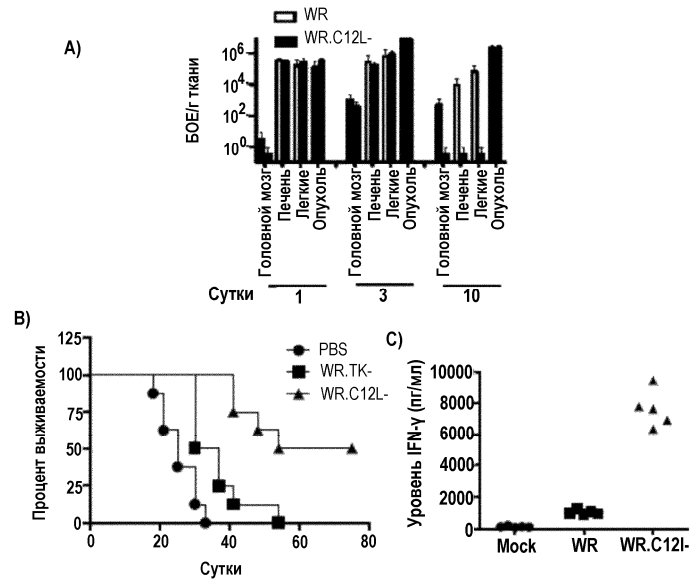
42. Композиция по п.38, в которой иммуномодулирующее средство и средство, ингибирующее или уменьшающее уровень супрессорных клеток миелоидного происхождения, независимо выбраны из группы, состоящей из анти-CD33 антитела или его функциональной области, анти-CD11b антитела или его функциональной области, цитокина, хемокина, ингибитора COX2 и их комбинаций.

43. Композиция по п.42, в которой ингибитор COX2 включает целекоксиб.

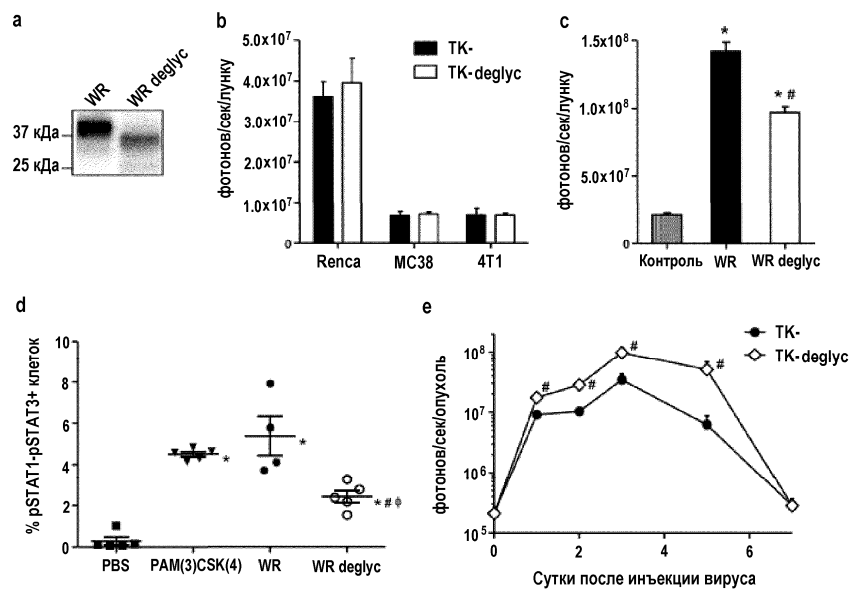
44. Композиция по любому из пп.38-43, в которой противораковое средство включает химиотерапевтическое средство, радиотерапевтическое средство, антиангиогенное средство, индуцирующее апоптоз средство, антитело против злокачественных опухолей, средство против циклин-зависимых киназ или их

комбинацию.

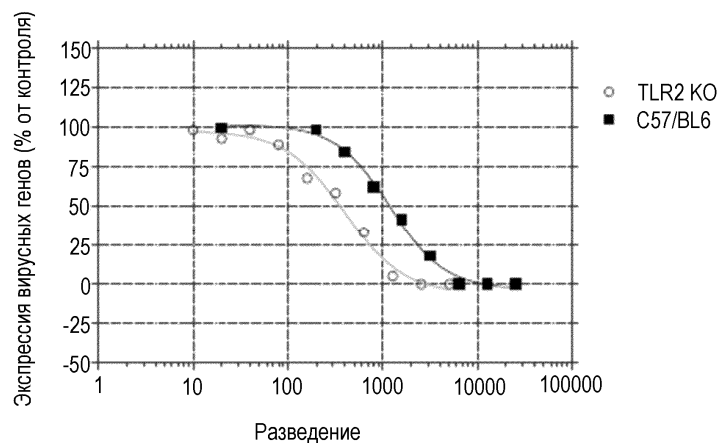
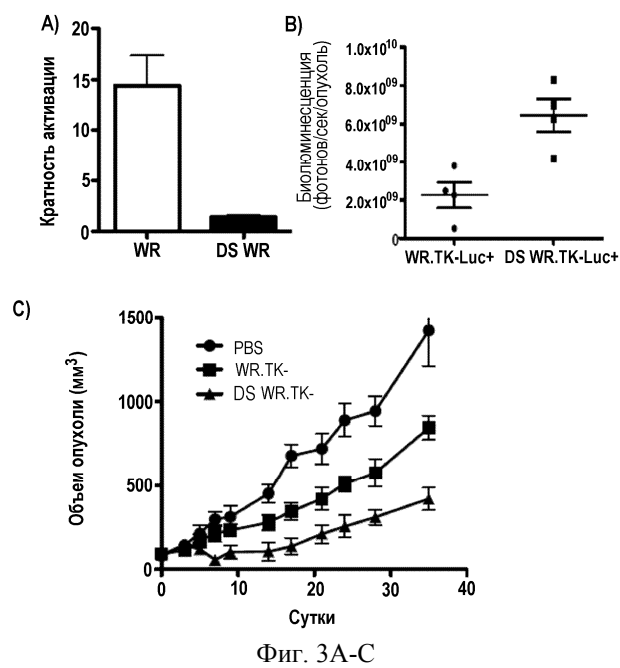
45. Композиция по любому из пп.36-44, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.



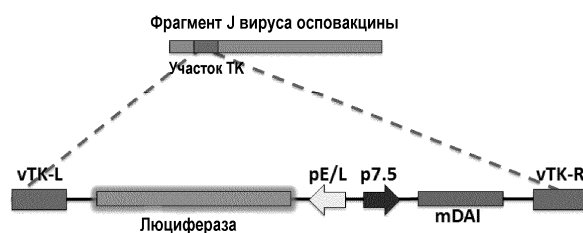
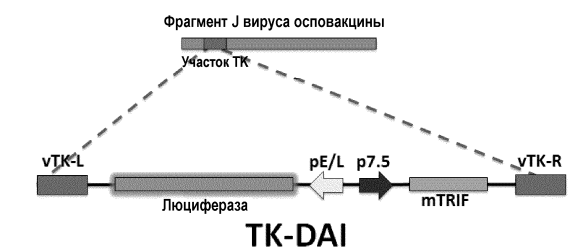
Фиг. 1А-С



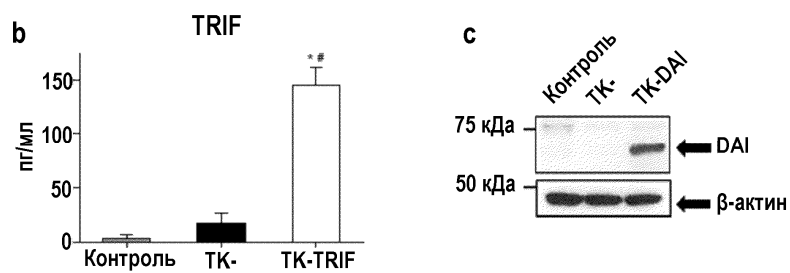
Фиг. 2А-Е



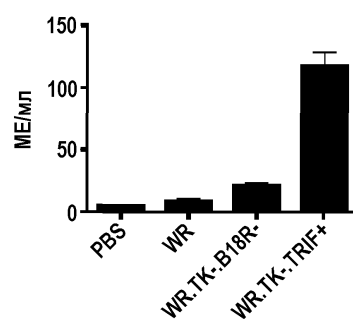
TK-TRIF



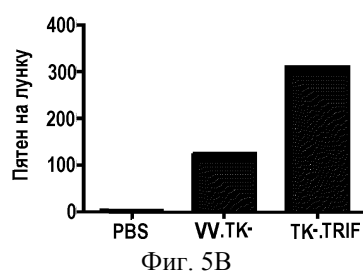
Фиг. 4A



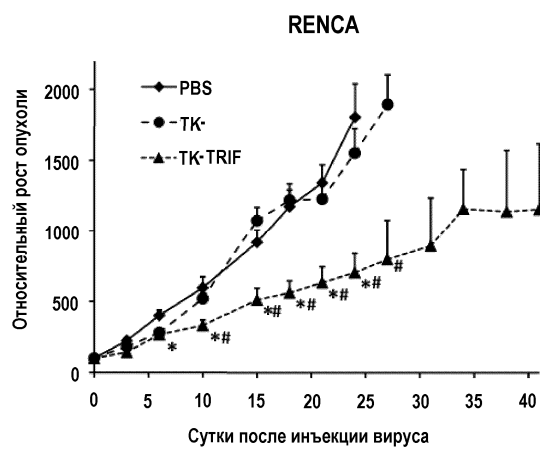
Фиг. 4В-С



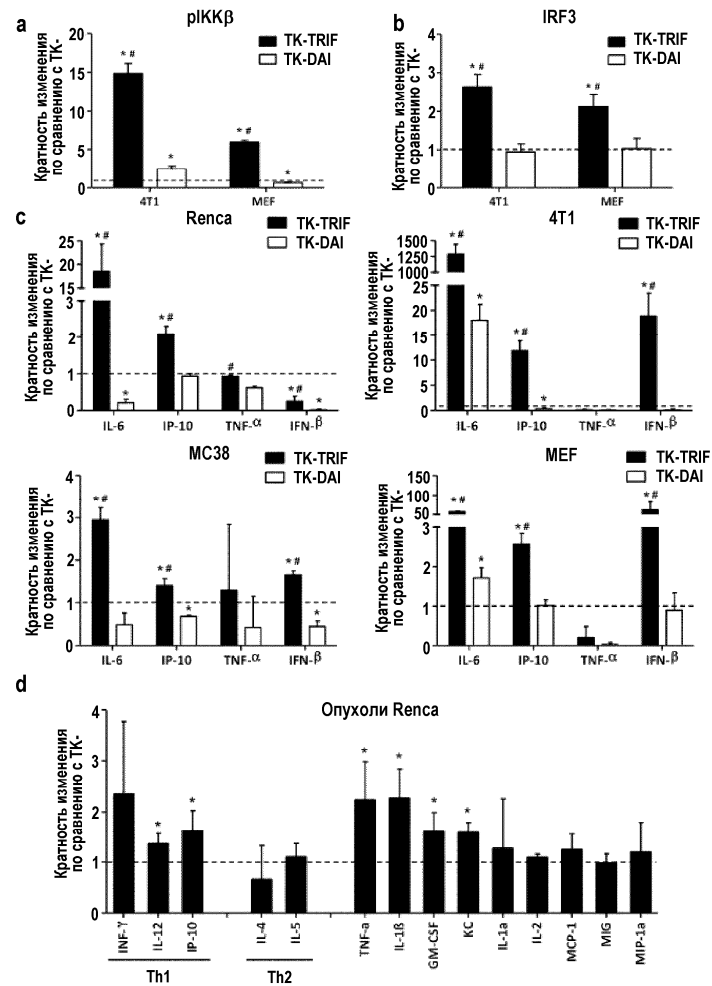
Фиг. 5А



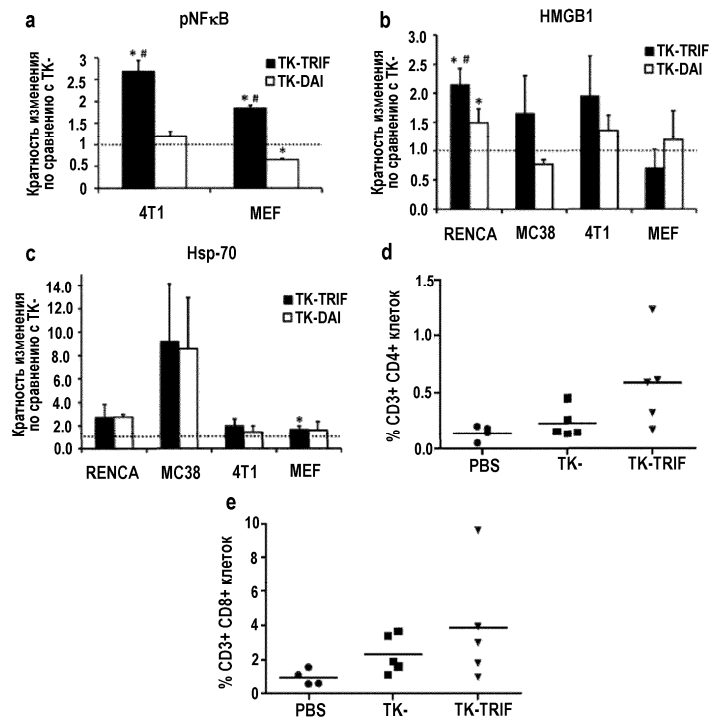
Фиг. 5В



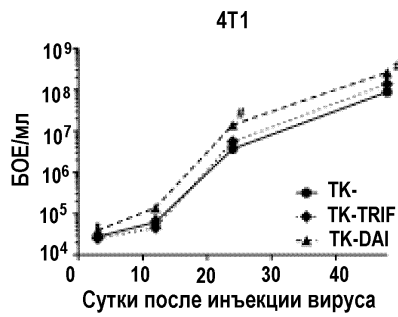
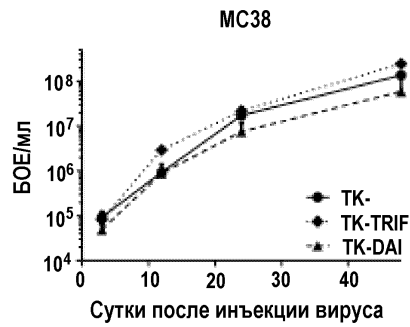
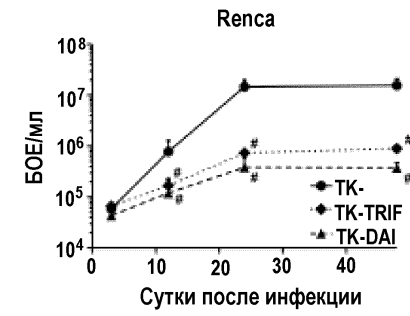
Фиг. 5С



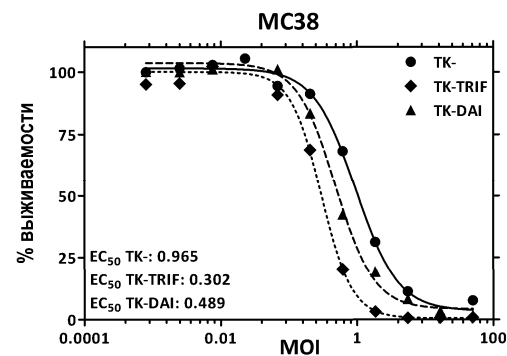
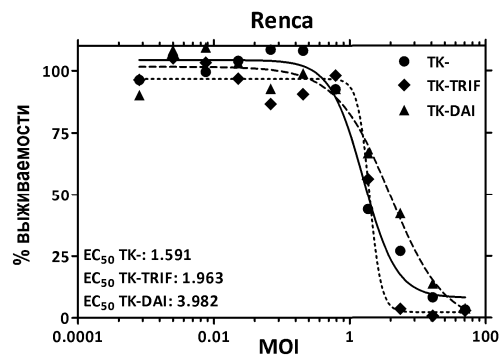
Фиг. 6A-D

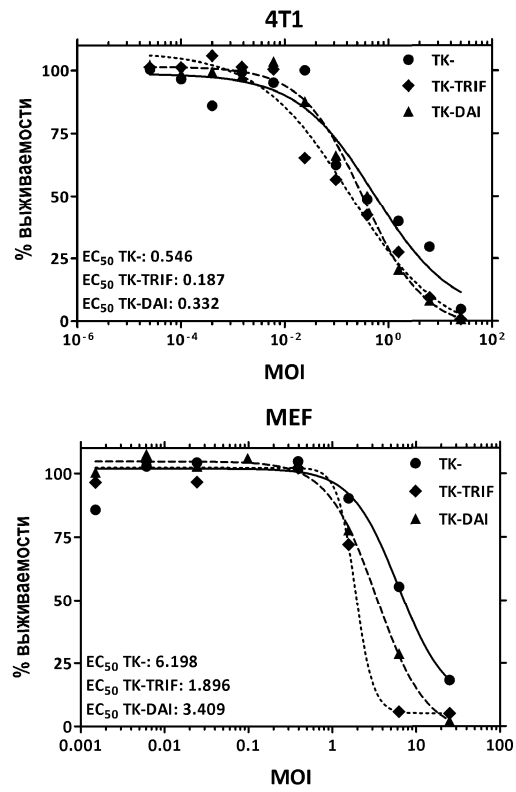


Фиг. 7A-E

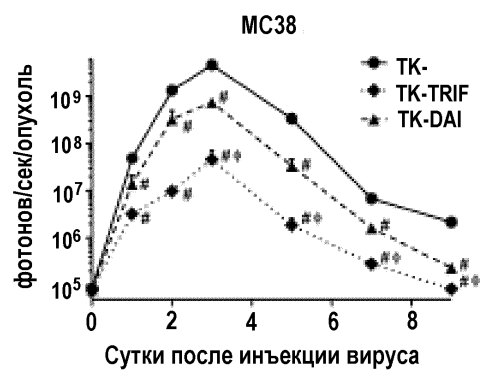
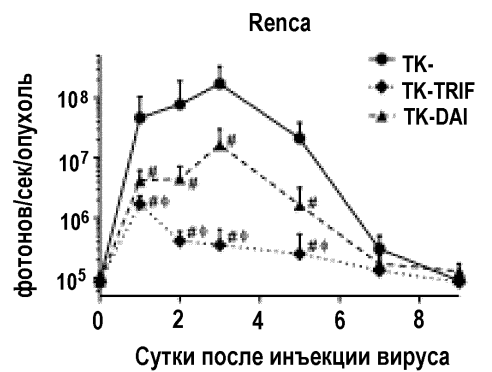


Фиг. 8А

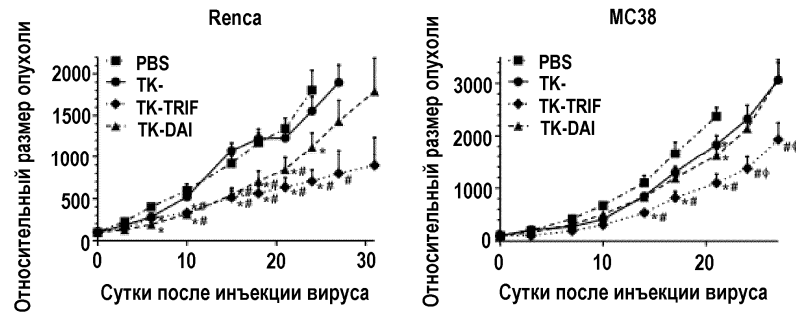




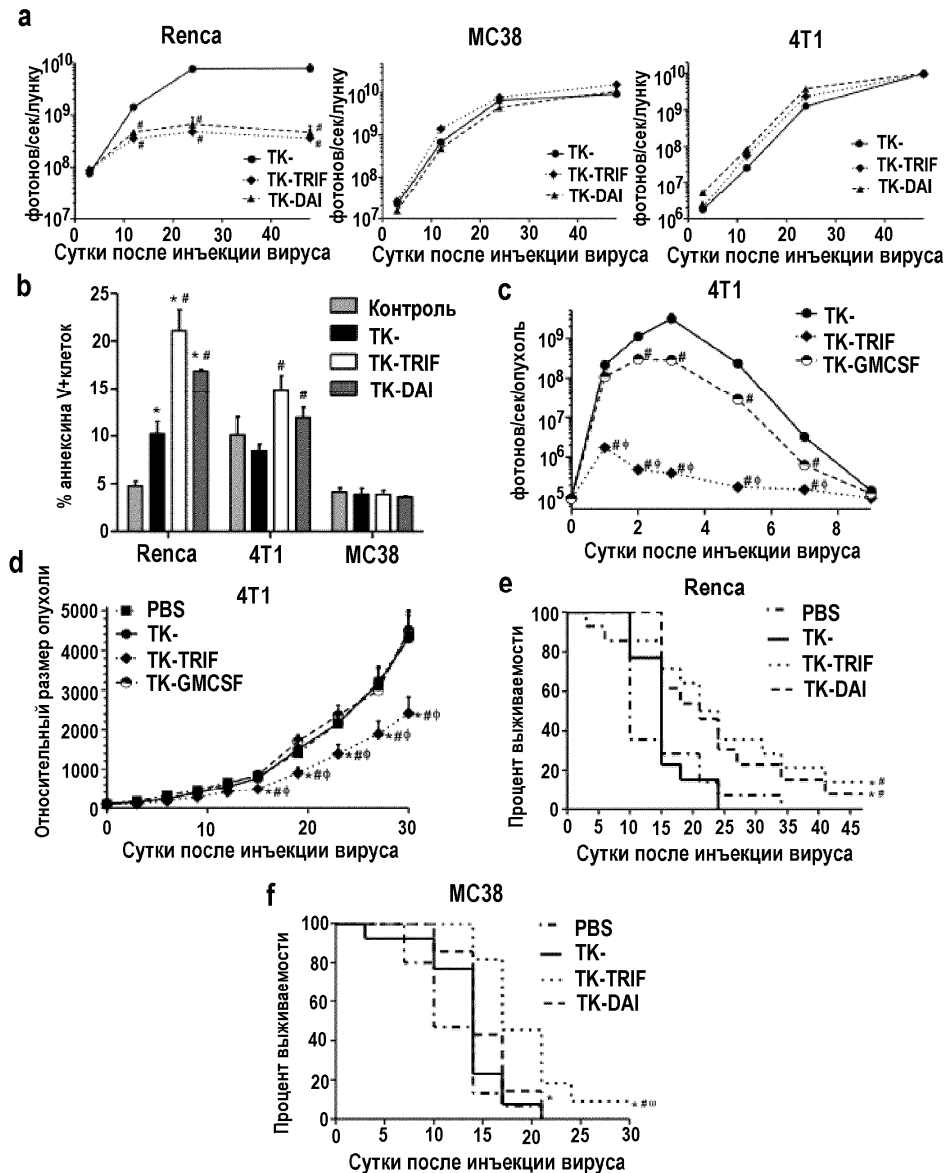
Фиг. 8В



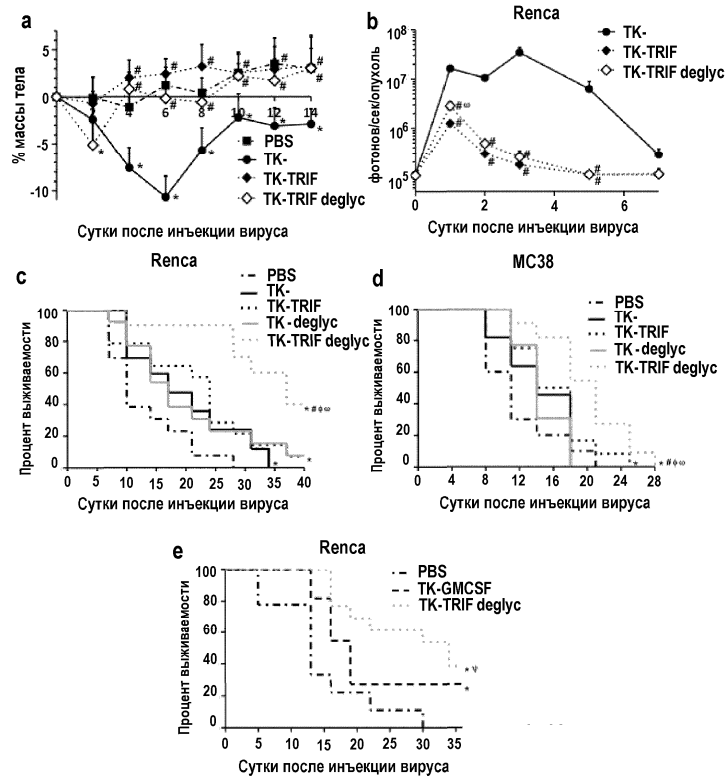
Фиг. 8С



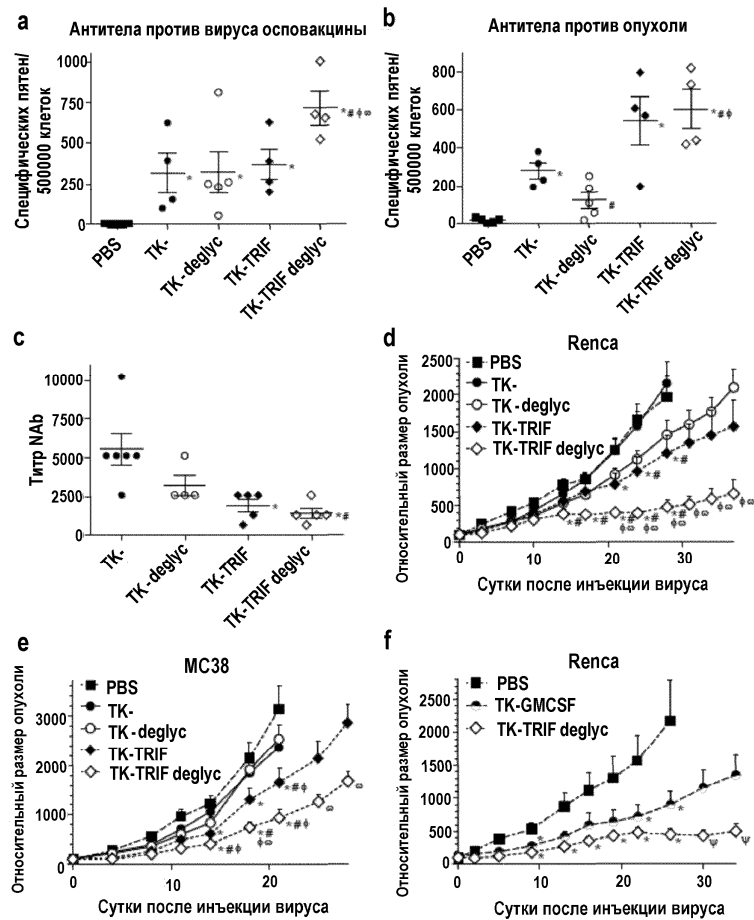
Фиг. 8D



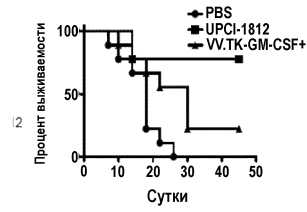
Фиг. 9A-F



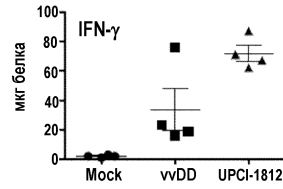
Фиг. 10A-E



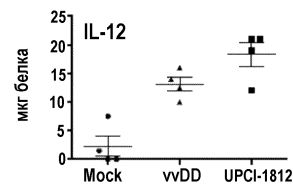
Фиг. 11A-F



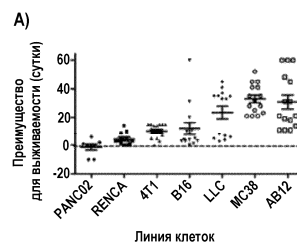
Фиг. 12А



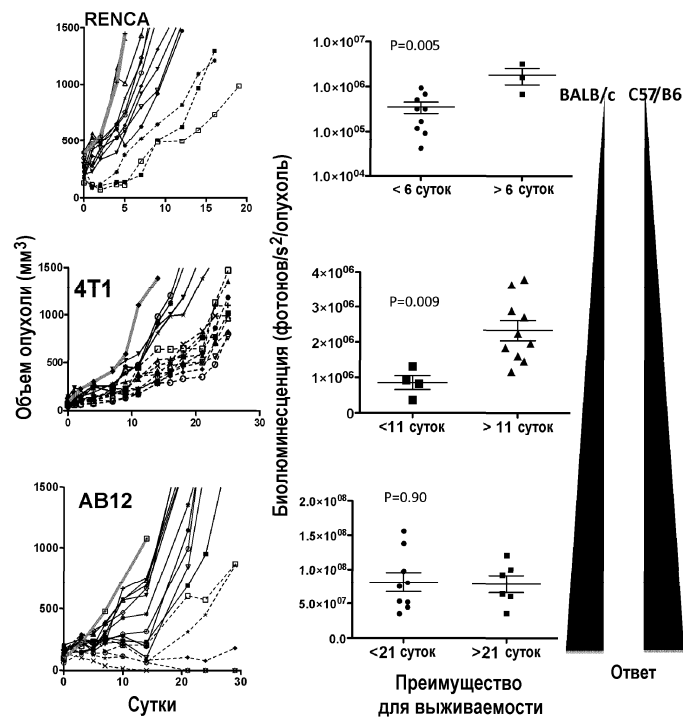
Фиг. 12В

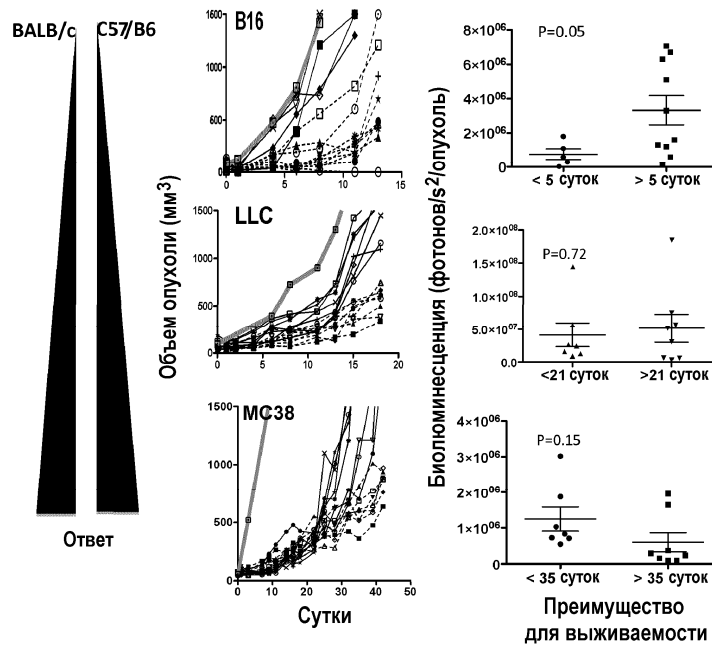


Фиг. 12С

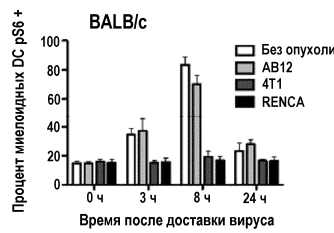


Фиг. 13А



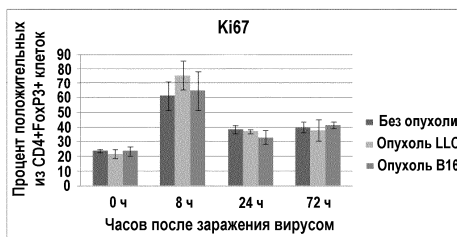
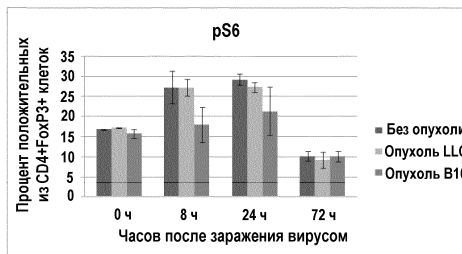
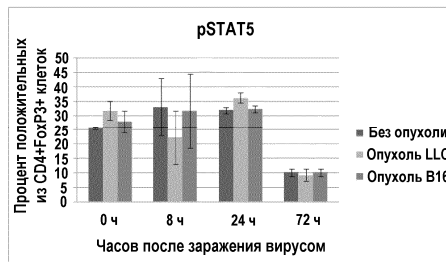


Фиг. 13B

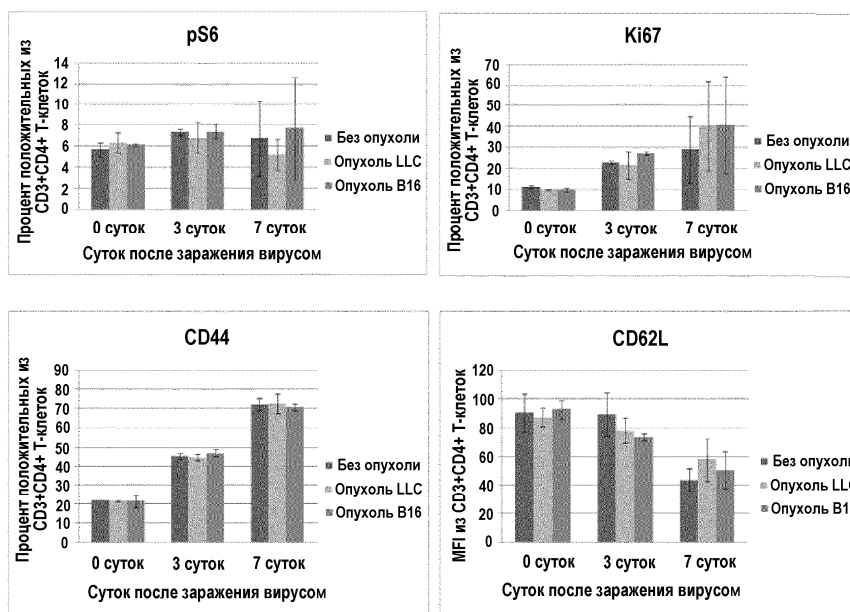


Фиг. 13C

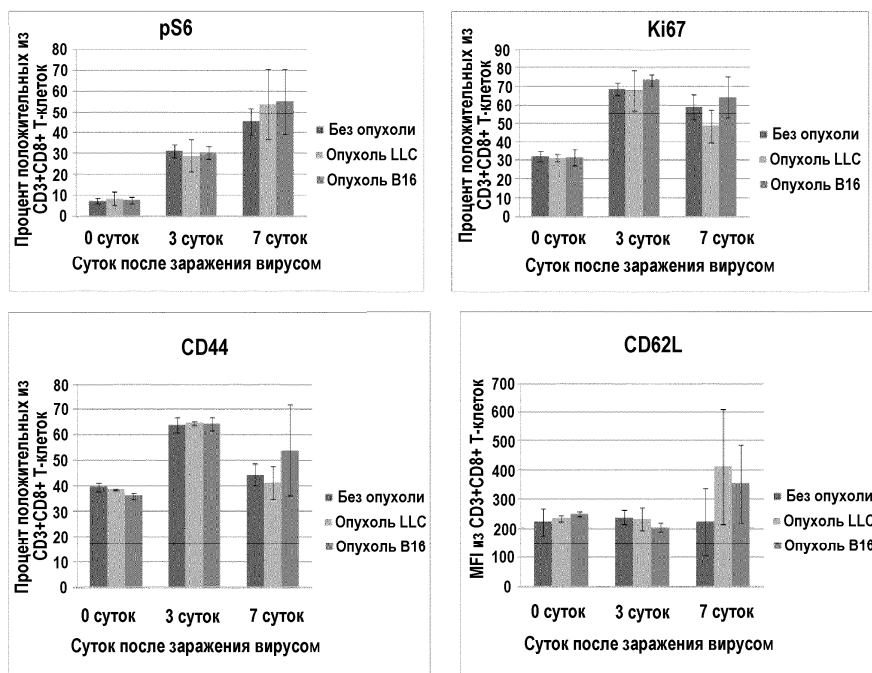
РЕГУЛЯТОРНЫЕ Т-КЛЕТКИ



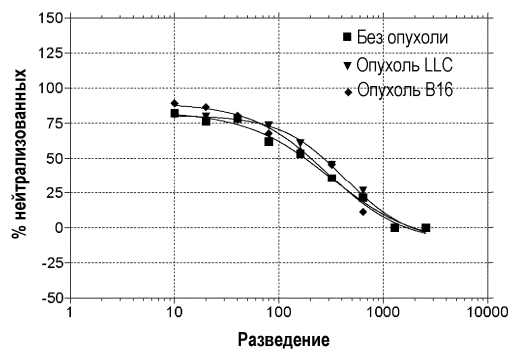
CD4+ Т-КЛЕТКИ



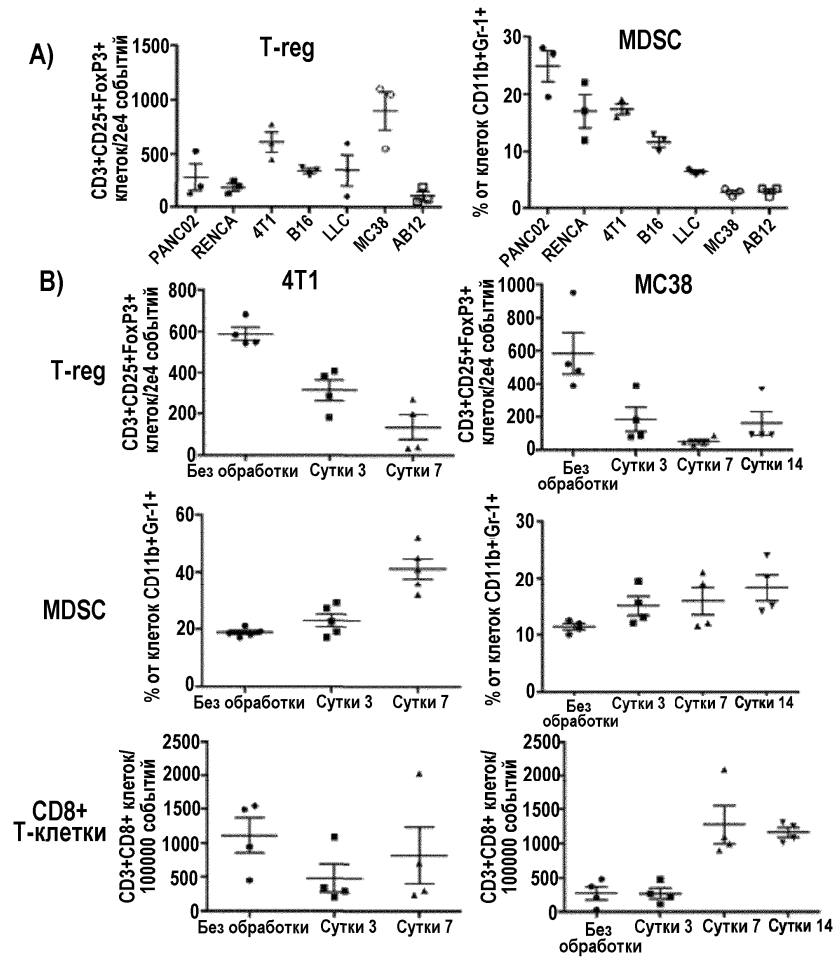
CD8+ Т-КЛЕТКИ



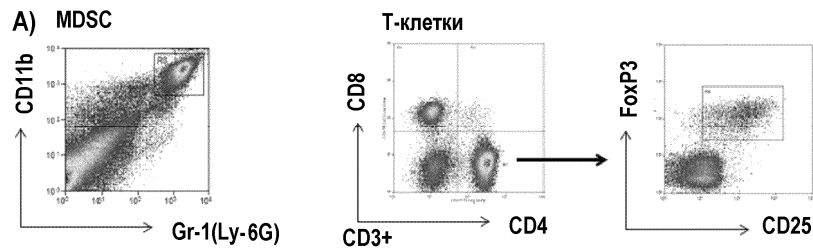
Фиг. 14А



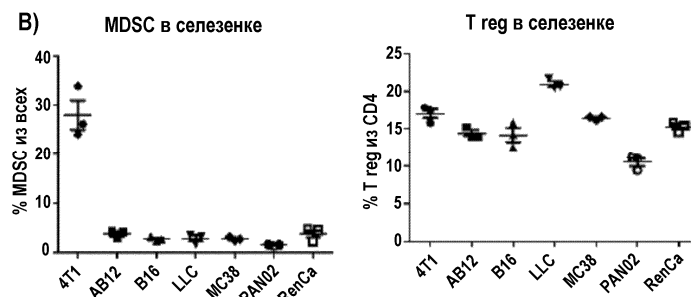
Фиг. 14В



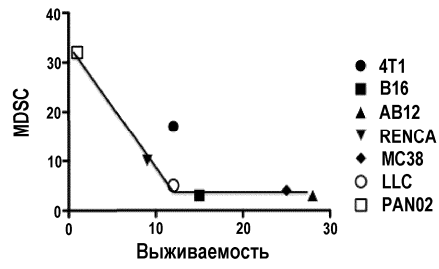
Фиг. 15А-В



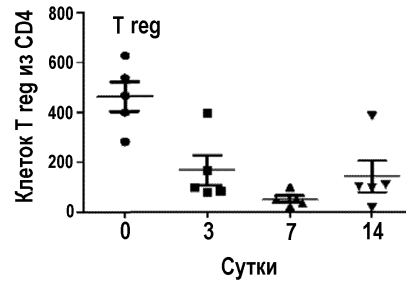
Фиг. 16А



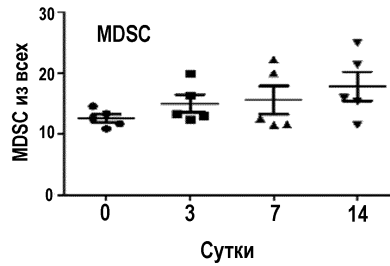
Фиг. 16В



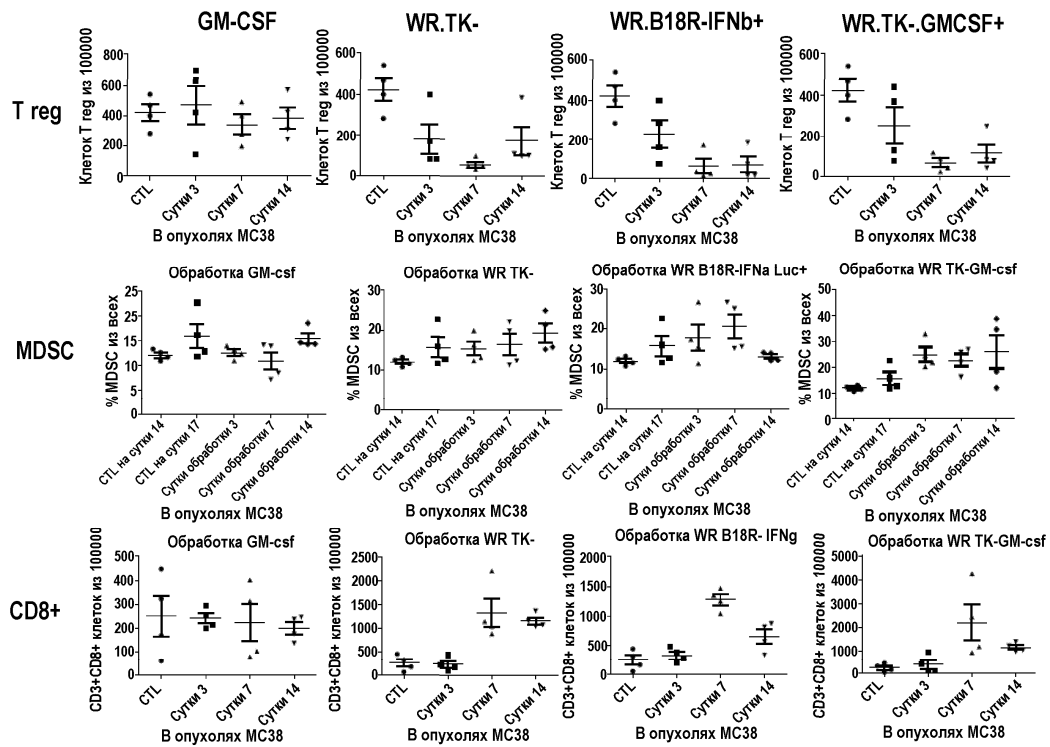
Фиг. 17А



Фиг. 17В

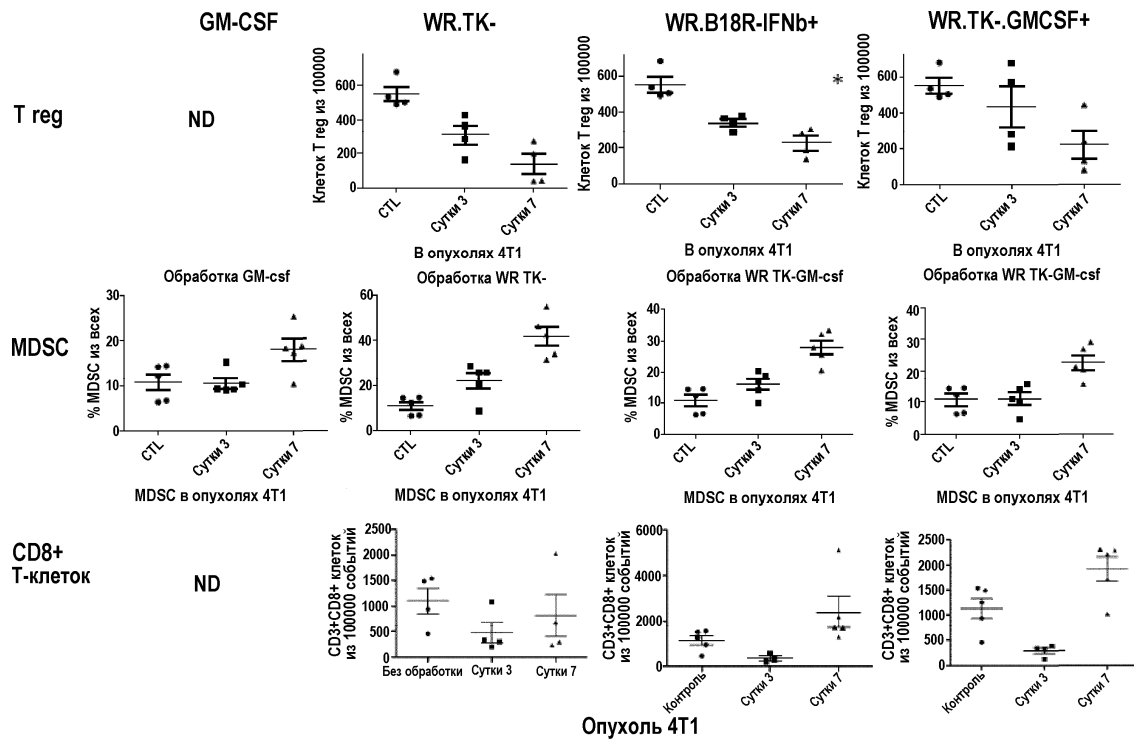


Фиг. 17С

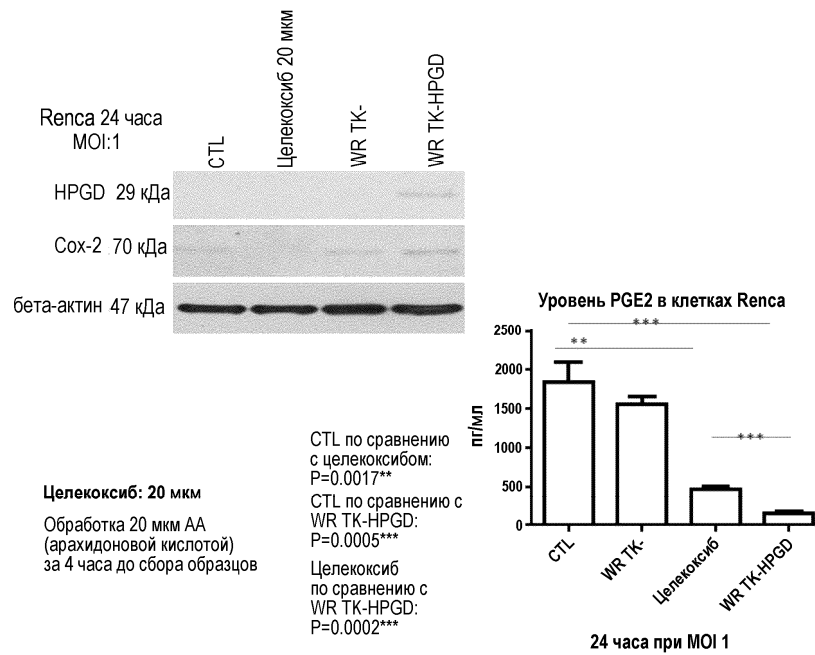


Опухоли MC38

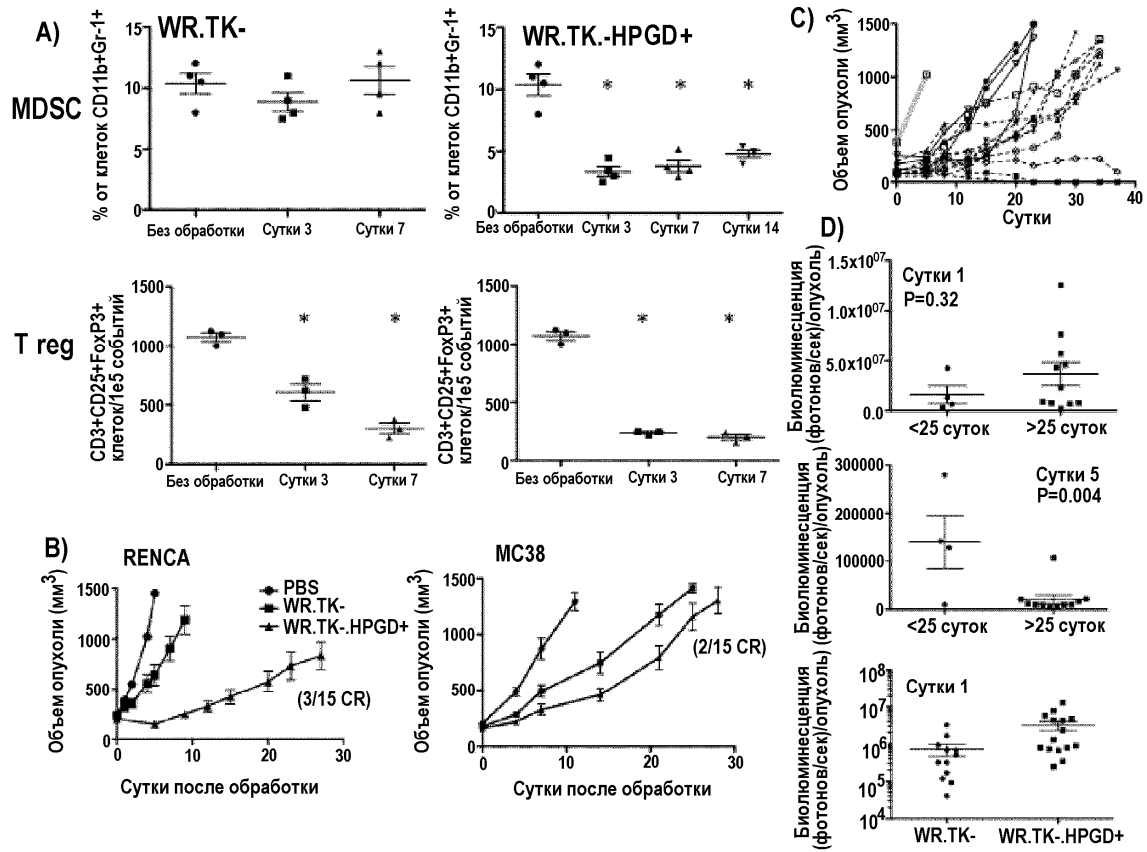
Фиг. 18



Фиг. 19

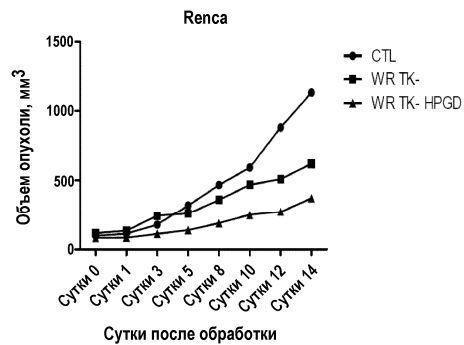


Фиг. 20

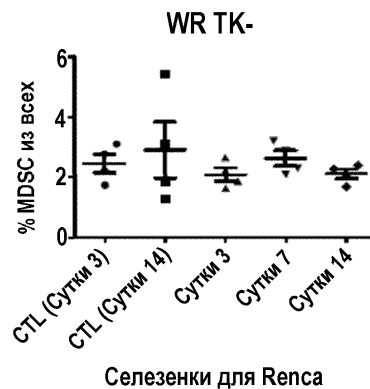


Фиг. 21A-D

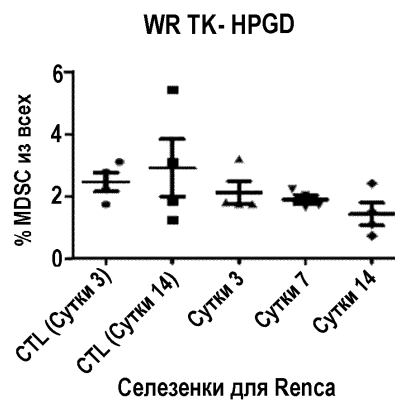
Экспрессия HPGD увеличивает терапевтическую активность вируса осповакцины



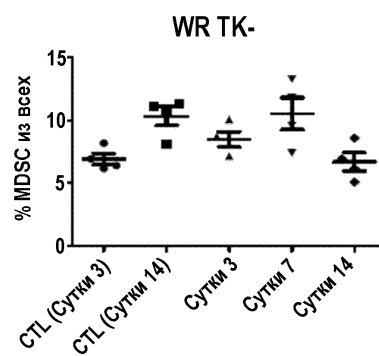
Фиг. 22



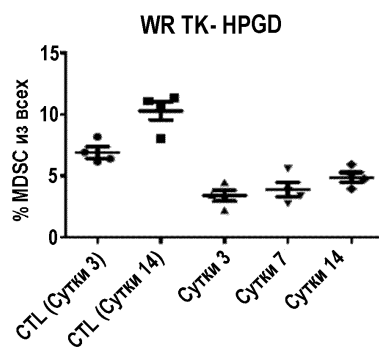
Фиг. 23A



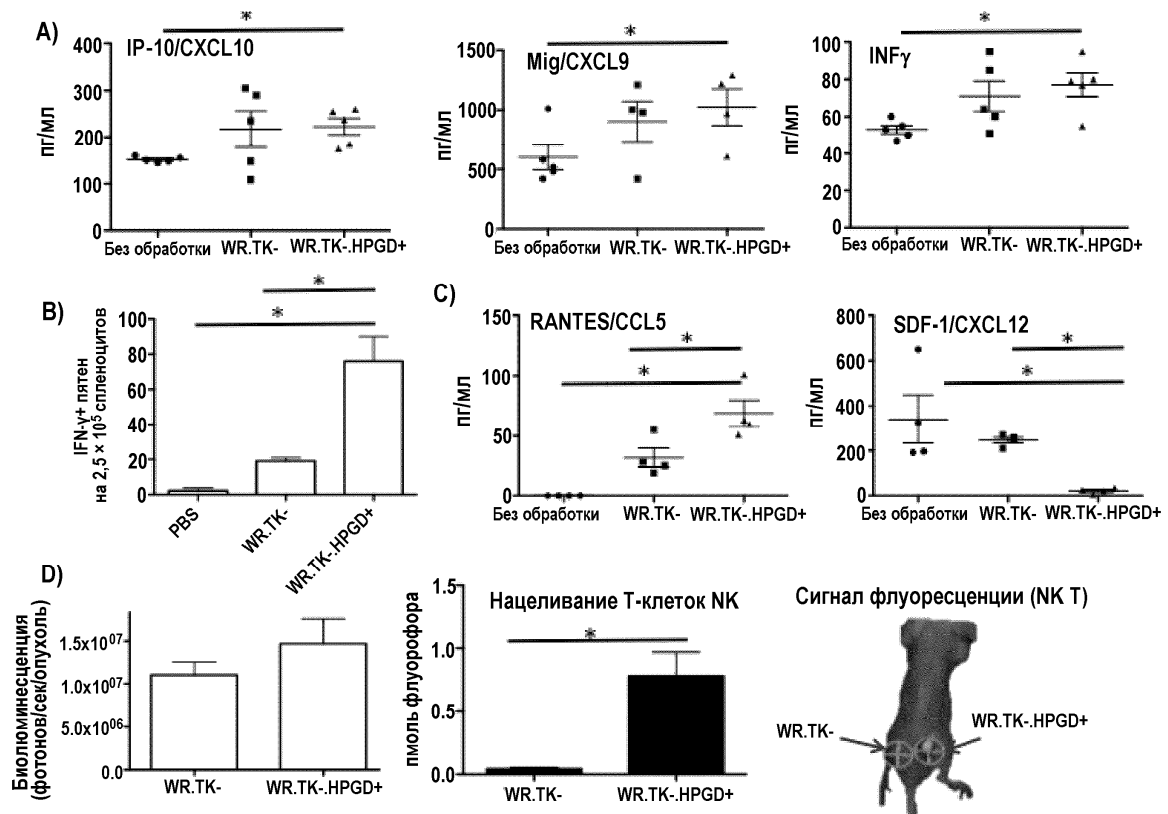
Фиг. 23В



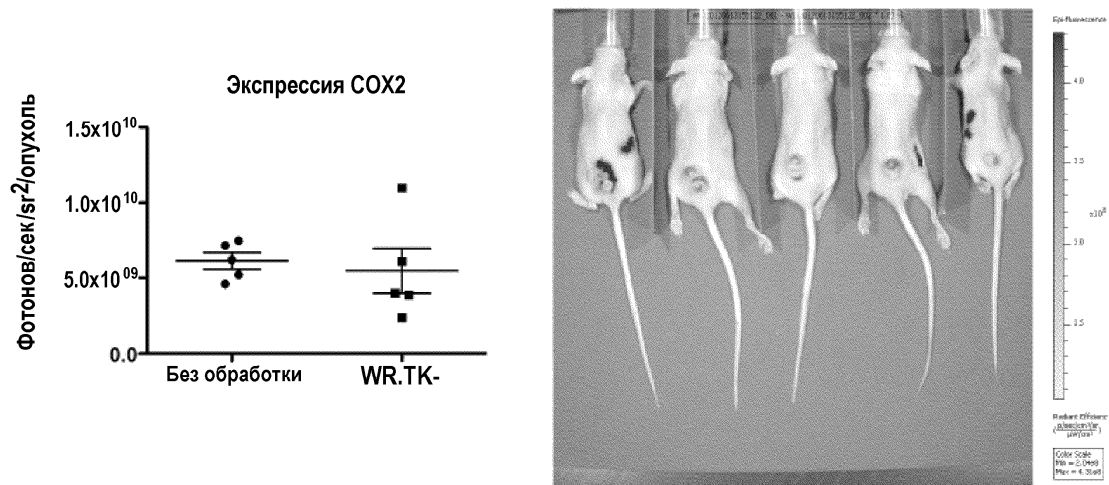
Фиг. 23С



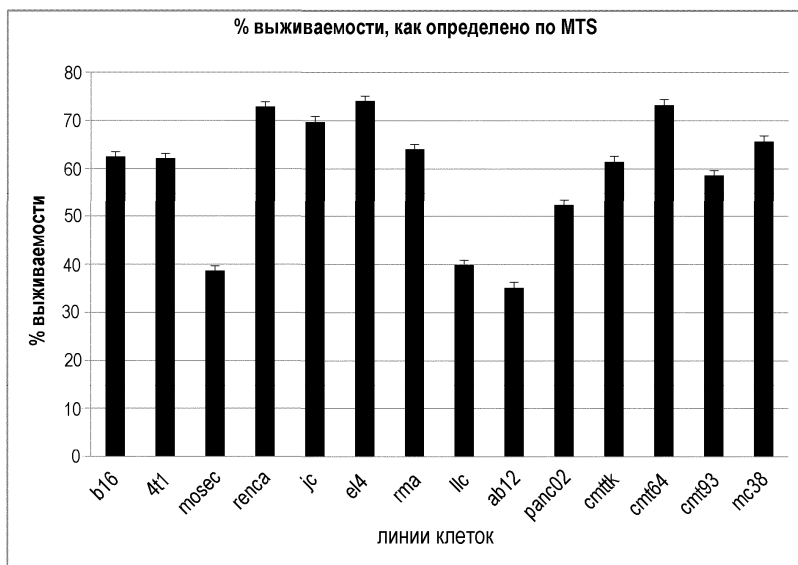
Фиг. 23D



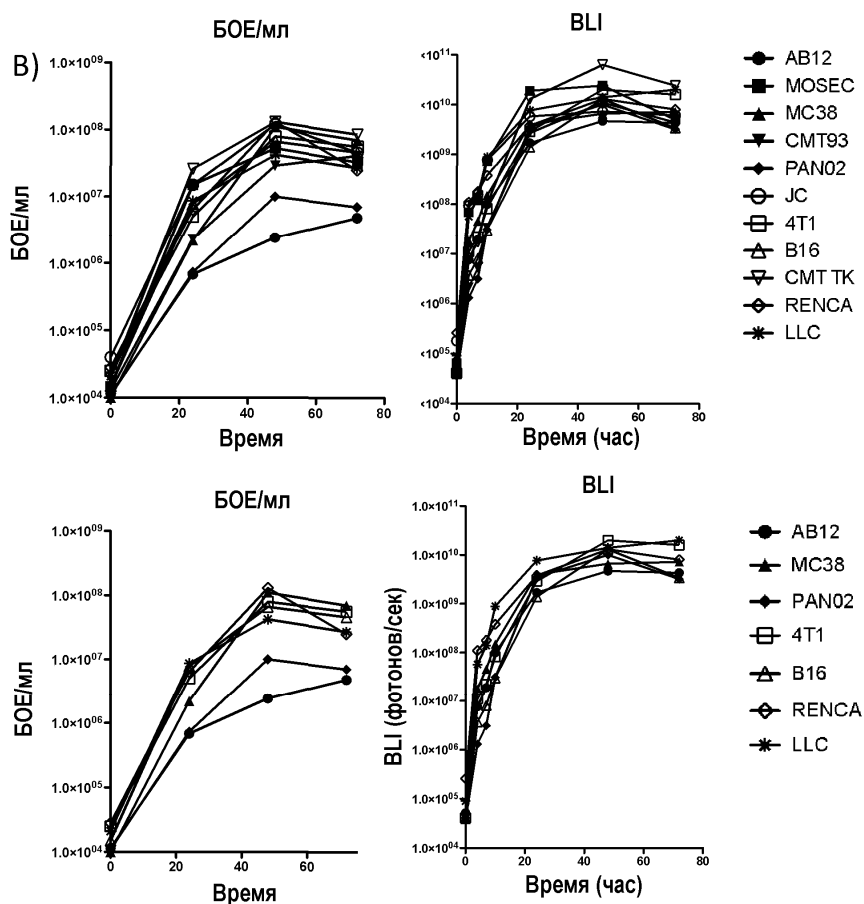
Фиг. 24А-D



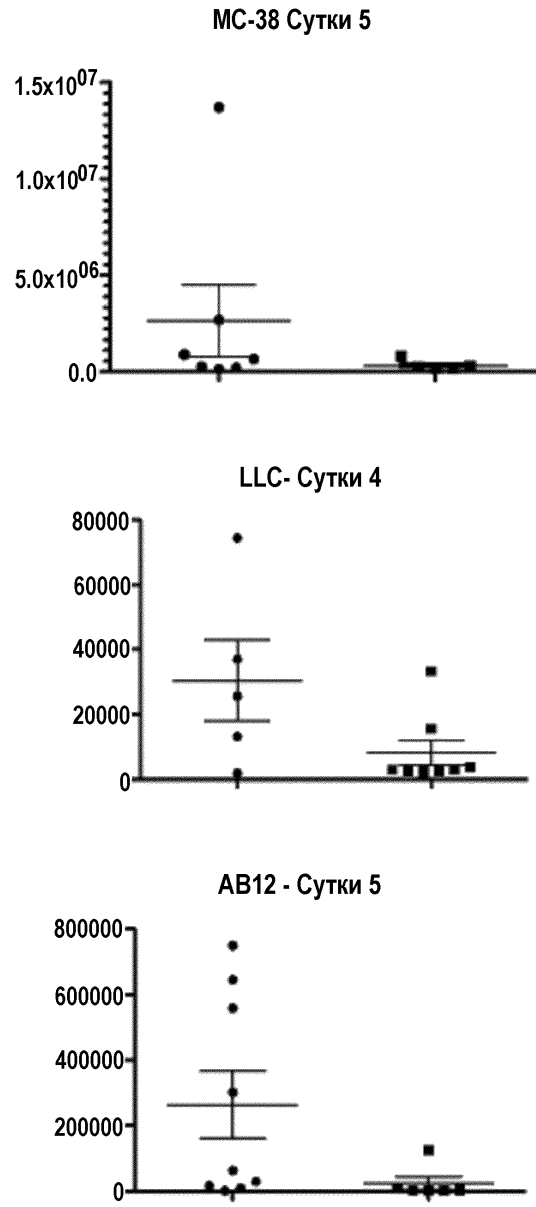
Фиг. 25



ФИГ. 26А

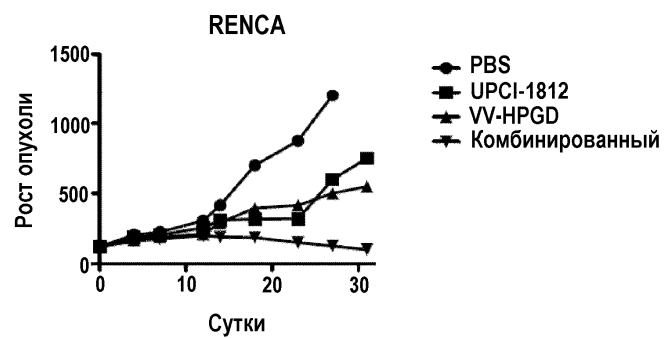


ФИГ. 26В

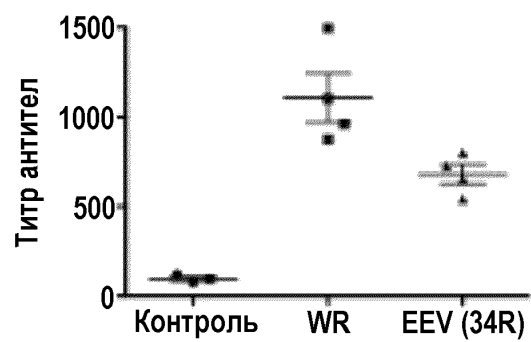


Фиг. 27

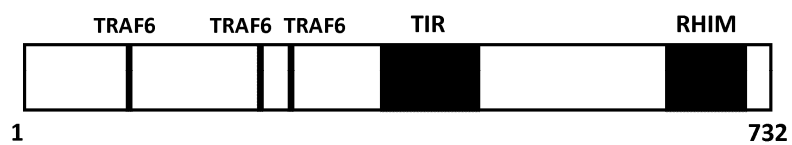
Добавление экспрессии HPGD к вирусу авторов настоящего изобретения UPCI-1812 дополнительно улучшает терапевтическую активность



Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2