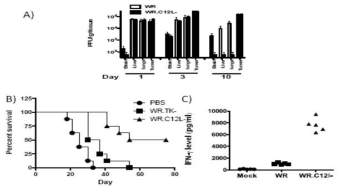
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Radicación	16 59814 0000 0000	2016-03-08 15:53:12	
Trámite	11	PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II	
Evento	378	FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO I	
Actuación	411	PRESENTACION	Folios: 131
Dependencia	2020	DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES	
Pago #1	22720	$ 526000	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL - PCT



1	**Titulo de la Invención**(200 caractares o espacios máximos)			
	TERAPIAS INMUNO-ONCOLÍTICAS			
2	**Datos del Solicitante**			
	Nombre:	UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION	**Dirección Electrónica:**	notificaciones@clarkemodet.com.co
	Dirección:	200 Gardner Steel Conference Center, Thackeray and O´Hara Streets	**Domicilio/País de constitución:**	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - PENNSYLVANIA - PITTSBURG
	Identificación:			

☐ CEDULA DE CIUDADANIA		☐ CEDULA DE EXTRANJERIA	
☒ EMPRESA EXTRANJERA		☐ NIT	
☐ PASAPORTE			
Número:	1049362-		

3	**Solicitantes**		
	Apellidos - Nombres o Razón Social	**Tipo**	**Identificación**
1.	UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION	NN	1049362

4	**Datos del Inventor**			
	Nombre:	Stephen, Howard THORNE	**Dirección Electrónica:**	notificaciones@clarkemodet.com.co
	Dirección:	805 Fairview Road	**Domicilio/País de constitución:**	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA - PENNSYLVANIA - PITTSBURG
	Identificación:			
	☐ CEDULA DE CIUDADANIA	☐ CEDULA DE EXTRANJERIA		
	☐ EMPRESA EXTRANJERA	☐ NIT		
	☐ PASAPORTE	☒ No Aplica		
	Número:	-		

5	**Inventor(es)**	
	Apellidos - Nombres	**Domicilio**
1.	THORNE Stephen, Howard	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

6	**Datos Inventor(es)**			
	País de Residencia	**Departamento/Estado**	**Ciudad**	**Dirección**

1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	PENNSYLVANIA	PITTSBURG	805 Fairview Road

7	Datos del Representante Legal / Apoderado			
	Nombre:	CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO	**Dirección Electrónica:**	notificaciones@clarkemodet.com.co
	Dirección:	CARRERA 11 NO. 86-53, PISO 6	**Domicilio/País de constitución:**	COLOMBIA - BOGOTA D.C. - BOGOTA D.C.
	Identificación: ☒ CEDULA DE CIUDADANIA ☐ CEDULA DE EXTRANJERIA ☐ EMPRESA EXTRANJERA ☐ NIT ☐ PASAPORTE **Número:** 66783790-			

Presentación de Poder	
Año de Radicación	
Número de Radicación	

8	Datos Solicitud: PCT / WO			
	Número Solicitud:	PCT/US2014/052308	**Fecha Solicitud:**	22/08/2014
	Número Publicacion:	WO 2015/027163	**Fecha Publicacion:**	26/02/2015

9	Declaraciones de prioridad	☒ SI ☐ NO

	(33) País de origen	Codigo del país	(31) No. Solicitud	(32) Fecha
1.	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	US	61/868,978	22/08/2013

10	Reivindicaciones			
	Número reivindicaciones:	24	**Pago Reivindicaciones:**	Si

11	Reducción de tasas.

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolucón vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

☐ Micro, pequeñas y medianas empresas

☐ Universidades públicas o privadas

☐ Entidades sin ánimo de lucro

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

12	**Documentos Anexos**

☒ Reivindicaciones

☒ Descripción

☒ Dibujos y/o Figuras

☒ Resumen

☐ Certificado Depósito Material Biológico

☐ Uso de Conocimiento tradicional

☐ Listado de secuencias

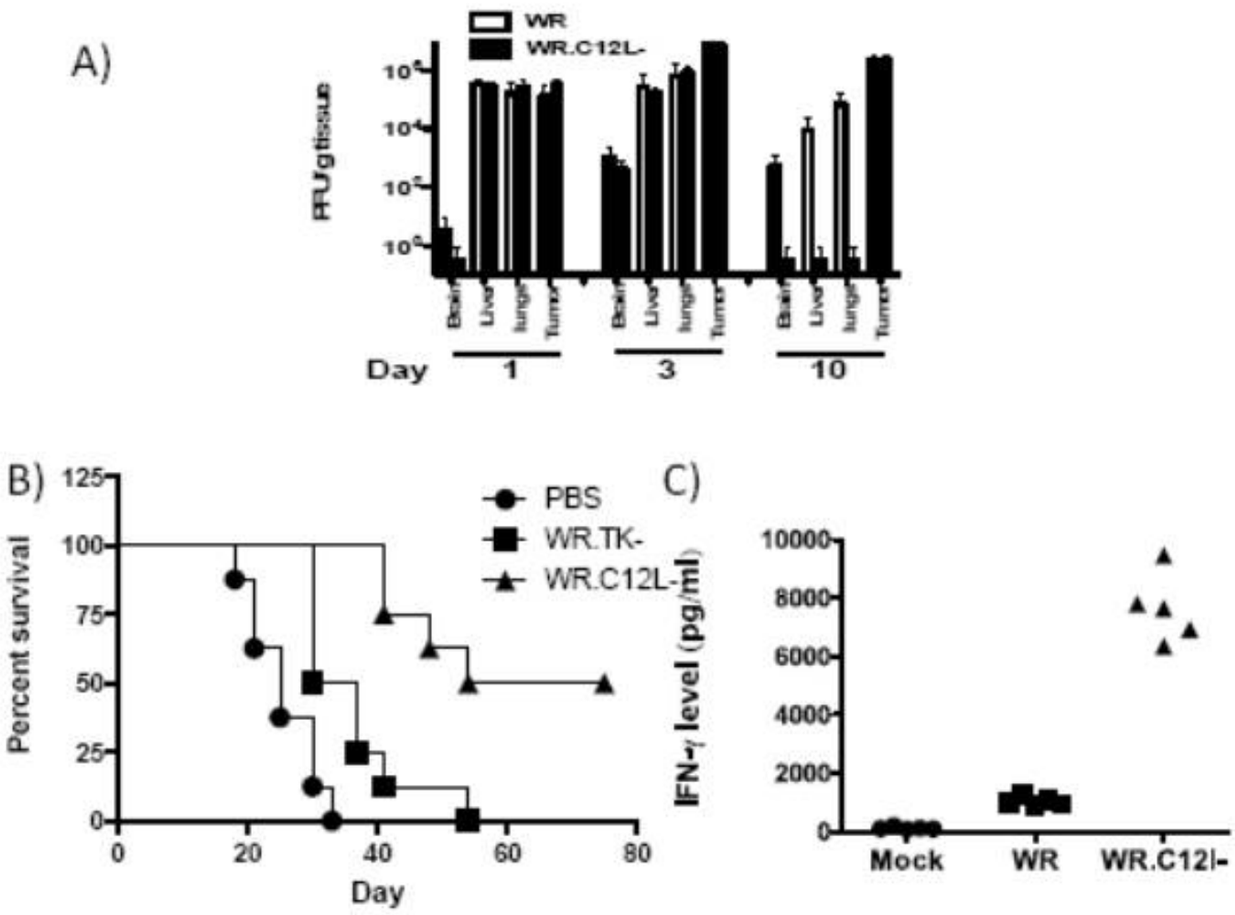
☒ Artes finales 12 x 12 cm

☐ Poderes, si fuere el caso

☐ Copia de la primera solicitud si se reivindica prioridad

☐ Traducción simple de la primera solicitud, si se reivindica prioridad

☒ Otros Anexos


A)
WR
WR.C12L-
PFU/g tissue
Brain
Liver
Lungs
Tumor
Day
1
3
10
B)
Percent survival
PBS
WR.TK-
WR.C12L-
Day
C)
IFN-γ level (pg/ml)
Mock
WR
WR.C12l-

TERAPIAS INMUNO-ONCOLÍTICAS

REFERENCIA CRUZADA DE LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama la prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos de América serie No. 61/868,978, presentada el 22 de Agosto de 2013, la cual se incorpora por referencia aquí en su totalidad.

1. INTRODUCCIÓN

La presente invención se refiere a virus de vaccinia oncolítica los cuales se han modificado para promover una inmunidad en contra del tumor y/o reducir la respuesta de anfitrión de anticuerpo en contra del virus.

2. ANTECEDENTES DE LA INVEDNCIÓN

Los virus oncolíticos (OV) son virus con replicación que es naturalmente o lograda para ser selectiva para las células de tumor[1-3]. Una variedad de diferentes columnas vertebrales se han examinado como virus oncolítico, incluyendo cepas de virus vaccinia (VV)[4-11]. Por lo menos tres vectores de vaccinia oncolítica han completado la prueba de Fase I incluyendo la cepa vvDD[6.7]. La cepa VV OV, JX-594[4,12] (Jennerex), ha demostrado recientemente respuestas alentadoras altas en los

ensayos de Fase II para carcinima heptacelular (HCC), incluyendo la entrega de tumor sistémico[13,14]. Además, los resultados de la Fase III alentadores se han reportado para el virus de herpes HSV OV (T-Vec, Amgen[15,16]) en terapia de melanoma (16% de respuestas, en comparación a 2% en brazo control). Como tal el potencial verdadero de los virus oncolíticos en el tratamiento de cáncer han comenzado a ser revaluados (más allá del original ONYX-015 (H-101) cepa Adenovirus[17,18] que permanece siendo la única terapia de virus oncolítico probada en cualquier mercado[19]).

A pesar de esta promesa, las respuestas completas con virus oncolítico siguen siendo raras. Significativamente, las cepas de virus oncolítico de primera y segunda generación fueron primeramente diseñadas para destruir células de tumor a través de una duplicación selectiva llevando directamente a la lisis de la célula. Adicionalmente, JX-594 y T-Vec ambas expresan un transgen de citoquinas (GM-CSF) el cual puede ser esperado que aumente los linfocitos anfitriones[12,14,20,21]. Los estudios pre-clínicos han demostrado la importancia crítica de la respuesta inmune en la actividad terapéutica de VV oncolítica, con (i) ratones siendo uniformemente resistentes al recambio seguido por una respuesta completa después de la terapia VV, indicando un requerimiento absoluto para la inducción de una inmunidad adaptada en contra del tumor[22]; (ii) los efectos de vacuna de VV demuestran beneficios terapéuticos mayores que las vacunas DC[23];

(iii) la infección VV del tumor produciendo un perfil de citoquina de contraste (la constante inmunológica de rechazo[24]); (iv) terapia VV reduciendo el número de células inmunosupresivas en el tumor (MDCS,T-reg y M2 macrófagos)[25]; (v) la respuesta inmune surgida mediante terapia VV siendo capaz de erradicar el tumor residual y metástasis bien después de que el virus ha sido limpiado, proporcionando una vigilancia inmune a largo plazo para evitar la recaída[22,25,26]; y (vi) en algunos estudios aparece que la aplicación viral robusta no es necesaria realmente para el efecto terapéutico[27,28]. Por tanto, los efectos inmunoterapéuticos de OVs, particularmente VV, son por lo menos tan importantes como los efectos oncolíticos directamente y que estos vectores deben probablemente ser considerados principalmente como inmunoterapias.

Notablemente, los vectores clínicos actuales no fueron diseñados como inmunoterapéuticos (más allá de la expresión de citoquinas singulares) y esta área ha permanecido relativamente no explorada. Como tal hay un potencial enorme no aprovechado para mejorar los vectores oncolíticos a través de optimizar sus interacciones con el sistema inmune anfitrión y para crear vectores capaces de vacunación in situ en contra de antígenos de tumor relevante. Alternativamente, los aproximamientos de vacuna de cáncer terapéutico tradicionales han tenido un éxito limitado en la clínica especialmente en contra de tumores más grandes, a pesar de la evidencia de inmunización exitosa29-31.

Los acercamientos de vacuna novedosos son por tanto necesarios, idealmente la inducción mediata de respuestas en contra de antígenos relevantes en cada tumor, superando la supresión aun dentro de tumores grandes y mejorando la búsqueda de célula-T a los objetivos de tumor.

3. SÍSNTESIS DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a virus de vaccinia "inmuno-oncolíticos" los cuales se han modificado para promover la inmunidad en contra del tumor y/o reducir la respuesta de anticuerpo e inmune de anfitrión en contra del virus. Esto se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de una inhibición mejorada del crecimiento de tumor mediante el virus de vaccinia oncolítica que se ha tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación y/o que se ha tratado con enzima sialidasa (las cuales se cree que reducen la activación TLR2 y para disminuir la respuesta de anticuerpo de anfitrión en contra del virus); y/o lleva modificaciones o supresiones de ácido nucleico genómico viral codificando un producto que reduce la inmunidad de célula-T (interleucina viral-18 proteína aglutinante); y/o lleva ácido nucleico codificando un producto que (i) mejora la inducción T linfocito citotóxica (TRIF) y/o (ii) reduce las células supresoras derivadas de mieloide tumor (MDSCs) mediante el reducir la prostaglandina E2. Por tanto, la

presente invención proporciona virus de vaccinia inmuno-oncolítica y métodos para usarlos en el tratamiento de cánceres.

4. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figuras 1A-C- (A) Virus WR.ΔC12L exhibieron tumor selectivamente en vivo en relación al virus padre WR. Los ratones C57BL/6 llevando los tumores CMT-93 fueron tratados IV con 5e8 PFU de virus, y los ratones se sacrificaron en momentos predeterminados después de la terapia. El PFU viral fue cuantificado en diferentes tejidos post mortem después de la homogenización. (B) efectos en contra del tumor mejorados de WR.ΔC12L. Los ratones llevando tumores subcutáneos CMT-93 fueron tratados IV con una dosis única (1e8 PFU) de virus y siguió la supervivencia (definida como el tiempo a volumen de tumor alcanzando 1000 mm cubico como se determinó mediante medición de calibre). (C) Producción de IFN-γ (como un marcador de producción de célula-T efector) desde esplenocitos recuperados de ratones previamente tratados con el virus indicado y después de exposición ex vivo a WR.

Figuras 2A-E. Deglicosilación de cubierta de virus vaccinia. (A) inmunoblot mostrando deglicosilación de proteína

de cubierta de virus vaccinia. Los virus deglicosilatados WR y WR purificados fueron rotos y secados usando el anticuerpo anti-B5R. (B) La deglicosilación de cubierta de virus no tuvo efecto sobre la inefectividad de virus vaccinia. Diferentes líneas de célula de tumor de ratón fueron infectadas con TK- o su versión deglicosilatada a un MOI de 1, y la expresión de luciferasa viral fue medida tres horas después de la infección mediante formación de imagen de bioluminiscencia. Los valores principales +SD de tres experimentos independientes están dibujados. (C) La deglicosilación reduce la activación TLR2 in vitro. Las células HEK293 expresando TLR2 de ratón fueron transfectadas con pNiFty (plásmido reportero señalando TLR). 24 horas después de la transfección, las células fueron infectadas a un MOI de 1 con WR o WR deglicosilatado y la activación TLR2 fue cuantificada 24 horas después de la infección mediante formación de imagen de bioluminiscencia. Los medios +SD de tres experimentos independientes (llevados a cabo en cuadruplicado) están mostrados. (D) la fosforilación STAT3 es agotada en linfocitos esplénicos de ratones inyectados con vaccinia deglicosilatada. El porcentaje de pSTAT1-pSTAT3+ linfocitos fue determinado mediante citometría de flujo. El PBS y PAM(3)CSK(4) fueron usados como controles. Los valores de ratones individuales y medios ±SEM de diferentes tratamientos están dibujados. € Deglicolisación de cubierta de vaccinia aumenta la expresión de gen viral de tumores en vivo. BALB/c ratones albergando xenoinjertos subcutáneos de células Renca (adenocarcinoma renal

de ratón) fueron inyectados y al azar con una dosis intravenosa única de 1 x 10^8 PFU por ratón de TK- o TK- deglicosilado. La cinética de la expresión de gen viral desde dentro del tumor fue vigilada mediante formación de imagen de bioluminiscencia de la expresión de luciferasa viral. Los valores principales de 12-13 animales +CD están establecidos. *, P<0.05 significante en comparación con PBS o Control, #, significante P<0.05 en comparación con el grupo TK- o WR. ϕ, significante P<0.05 en comparación con el grupo PAM(3)CSK(4).

Figuras 3A-D. La activación de ablación TLR2 a través de la deglicosilación lleva a efectos terapéuticos incrementados. (A) Tratamiento de cepa de vaccinia WR con una enzima sialidasa (DS) resulta en la pérdida de activación de trayectoria de señalamiento TLR2 en un modelo in vitro (activación NF-κB en células HEK293 transfectadas para expresar TLR2). (B) Virus DS WR exhibió una entrega sistémica mejorada significativamente a tumores de ratón (tumores subcutáneos 4T1 en BALB/c ratones con virus entregado IV y expresión de transgen luciferasa viral en el tumor determinado 24 horas después mediante formación de imagen de luminiscencia (tejidos de no tumor N.B. no exhibieron diferencia en toma viral). (C) El efecto en contra del tumor en el mismo modelo demostró ventaja terapéutica de DS el virus. (D) Pérdida de activación TLR2 (en un ratón transgénico noqueado TLR2) después de la infección con vaccinia lleva a una inducción significativamente reducida de

anticuerpo neutralizante antiviral (anticuerpo neutralizante medido como la habilidad de diferentes diluciones de suero de ratón recolectadas 14d después del tratamiento con WR para prevenir la expresión de transgen luciferasa después del mezclado con WR.TK-Luc+ y la infección de la capa de célula BSC-1).

Figuras 4A-C. (A) Diagrama esquemático representando la construcción de virus TK-TRIF y un diagrama esquemático representando la construcción del virus TK-DAI. (B) los ensayos ELISA fueron utilizados para determinar concentraciones de TRIF en células infectadas con TK- y TK-TRIF. (C) Mancha Western mostrando la expresión de DAI desde la referencia TK-DAI.

Figuras 5A-C. (A) La expresión TRIF desde la vaccina mejora la producción IFN tipo I in vitro aún más allá de la cepa B18R. (B) La expresión TRIF aumentó la producción de CTL en vivo. (C) Además el efecto terapéutico mejorado en vivo después de una entrega única IV de 1e8 PFU de virus para BALB/c ratones llevando tumores Renca subcutáneos.

Figuras 6A-D. Virus de vaccinia oncolítica expresando la activación incrementada de proteína TRIF de ratón de trayectorias que responden-TLR y la liberación de citoquinas proinflamatorias y quimoquinas. (A-B) Activación de NF-κB (A) y trayectorias IRF3 (B) después de la infección con ensayos TK-

TRIF y TK-DAI. Los ensayos ELISA fueron utilizados para determinar con las concentraciones de pIKKβ y de IRF3 sobre extracto citoplásmico y nuclear, respectivamente, de 4T1 o células MEF infectadas con TK-, TK-TRIF, o TK-DAI a un MOI de 1. Los análisis se llevaron a cabo 24 horas después de la infección. Los datos fueron obtenidos en cuadruplicado de dos experimentos independientes y están dibujados como cambio doblado contra TK- +SD. La línea punteada indica el nivel de activación TK-. (C) Liberación de citoquinas y quimoquinas in vitro después de la infección con TK-TRIF y TK-DAI. Las concentraciones IL-6, IP-10, TNF-α y IFN-β en el súper nadante de Renca células 4T1, MC38 y MEF fueron evaluadas por el ensayo Luminex 24 horas después de la infección con TK-, TK-TRIF o TK-DAI (MOI de 1). Los datos están mostrados como cambio doblado contra TK- +SD (dos experimentos independientes). La línea punteada indica concentraciones TK-. (D) Concentración intra-tumoral de citoquinas y de quimoquinas. Los ratones BALB/c con xenoinjertos subcutáneos Renca establecidos se pusieron al azar y se inyectaron con una dosis intravenosa única de 1 x 10^8 PFUpor ratón de TK- o de TK-TRIF. Doble cambio contra TK- desde 4-5 ratones +SD que está dibujado. La línea punteada indica concentraciones TK-. *, significante $P<0.05$ comparado con el grupo TK-. #, $P<0.05$ significante comparado con el grupo TK-DAI.

Figuras 7A-E. Los ensayos ELISA fueron utilizados para determinar la concentración de NF-κB (A), HMGB1 (B) y Hsp-70 (C) en células infectadas con TK-, TK-TRIF o TK-DAI a un MOI de 1. Los análisis se llevaron a cabo 24 horas después de la infección. Los datos fueron obtenidos y dibujados como cambio doble contra TK- +SD. La línea punteada indica nivel de activación TK-. El nivel de células-T auxiliares (D) y de células-T reguladoras (E) fue analizado en respuesta a la infección con virus TK- o TK-TRIF.

Figuras 8A-D. La duplicación y actividad en contra del tumor de TK-TRIF y de TK-DAI. (A) Producción viral de TK-TRIF y TK-DAI en células de tumor de ratón. Las líneas de célula de tumor diferentes fueron infectadas con MOI de 1 y la producción de virus fue medida mediante ensayo de placa a diferentes puntos de tiempo. El rendimiento viral fue evaluado por cuadruplicado para cada línea de célula mediante el llevar a cabo dos experimentos independientes. Los medios +SD están trazados. (B) La citotoxicidad comparativa de TK-TRIF y de TK-DAI. Las células fueron infectadas con los virus indicados a dosis variando de desde 75 a 0.00025 PFU/célula. Los valores EC_{50} (MOI requerido para provocar una reducción de 50% en la viabilidad de cultivo de célula) en el día 4 después de que la infección está mostrada. Cuatro duplicados diferentes fueron cuantificados para cada línea de célula y el significado para cada MOI está mostrado. (C-D) La expresión de gen viral y

eficacia anti-tumor en vivo. Los xenoinjertos MC38 o Renca fueron implantados en ratones BALB/c o C57BL/6, respectivamente, y los ratones fueron inyectados con PBS o 1 x 10^8 PFU de TK-, TK-TRIF o TK-DAI a través de la vena de la cola. La expresión de luciferasa viral en los tumores (C) y de volúmenes de tumor (D) en los puntos de tiempo indicados, n=12-15 ratones/grupo +SE. *, P<0.05 significante comparado con el grupo PBS. El #, P<0.05 significante comparado con el grupo TK-. El ϕ, P<0.05 significante comparado con el grupo TK-DAI.

Figuras 9A-F. (A) Expresión de gen viral de TK-TRIF y TK-DAI en células de tumor de ratón. Diferentes líneas de células de tumor de ratón. Diferentes líneas de célula de tumor fueron infectadas con un MOI de 1 y la expresión de luciferasa viral fue cuantificada mediante formación de imagen de bioluminiscencia a diferentes puntos de tiempo. La expresión de luciferasa fue evaluada por cuadruplicado para cada línea de célula, mediante el llevar a cabo dos experimentos independientes. Los medios +SD están trazados. (B) El porcentaje de células apoptóticas después de la infección con TK-TRIF y TK-DAI. Un panel de líneas de célula de tumor de ratón fue infectado con los virus indicados usando un MOI de 1. A 48 horas después de la infección, el porcentaje de células necróticas y apoptóticas fue determinado por citometría de flujo mediante PI y manchado Annexin V. Dos experimentos independientes fueron llevados a cabo y los medios +SD son

trazados. (C-D) el TK-TRIF mejora la eficacia en contra del tumor de TK-GMCSF en un modelo casi-ortotópico mamario. Las células 4T1 fueron implantadas en la almohadilla gorda mamaria de BALB/c ratones y, una vez que el tumor fue establecido, los ratones fueron inyectados con PBS o 1 x 10^8 PFU de TK-, TK-TRIF o TK-GMCSF a través de la vena de la cola. La expresión de luciferasa viral de desde dentro de los tumores (C) y los volúmenes de tumor (D) fueron medidos en los puntos de tiempo indicados. N=12-14 ratones/grupo +SE. (E-F) el TK-TRIF mejora la supervivencia de ratones llevando tumores. Los ratones BALB/c o C57BL/6 albergando los xenoinjertos Renca (E) o MC38 (F) respectivamente, fueron tratados como en la figura 3d y el punto final fue establecido en un volumen de tumor de ≥750 mm cúbicos. Las curvas de supervivencia Kaplan-Meyer están trazadas. n=12-15 ratones/grupo. *, P<0.05 significante comparado con PBS o el Control, #, P<0.05 significante comparado con el grupo TK-. ϕ, P<0.05 significante comparado con el grupo TK-GMCSF. ω, el P<0.05 significante comparado con el grupo TK-DAI.

Figuras 10A-E. (A) La variación de peso de cuerpo después de la administración deglicosilada de TK-TRIF intravenosa. Los ratones BALB/c fueron inyectados intravenosamente con 1 x 10^8 PFU por ratón de TK-, TK-TRIF o TK-TRIF deglisosilado. La administración de solución salina tamponada con fosfato (PBS) fue usada en el grupo de control.

Los ratones inyectados TK- presentaron más de una reducción de 10% en el peso del cuerpo en el día 6 después de la inyección del virus, mientras que los ratones inyectados con TK-TRIF y TK-TRIF deglicolisado presentaron un perfil de peso similar a aquellos inyectados con solución salina tamponada con fosfato. (B) la expresión de gen viral en vivo después de la administración de TK-TRIF deglicosilado. Los tumores Renca fueron implantados en ratones BALB/c, y los ratones fueron inyectados con PBS o 1 x 10^8 PFU de TK-, TK-TRIF o TK-TRIF deglicosilado a través de la vena de la cola. La expresión de luciferasa viral desde dentro de los tumores se midió en los puntos de tiempo indicados. n=12-14 ratones/grupo +SE. (C-D) Supervivencia de ratones llevando tumor tratados con TK-TRIF deglicosilada. (C-D) xenoinjertos Renca (C) o MC38 (D) fueron establecidos en los ratones BALB/c o en los ratones C57BL/6, respectivamente, y se trataron con una dosis intravenosa única de 1 x 10^8 PFU de virus indicados o solución salina tamponada con fosfato. El punto de extremo fue establecido en un volumen de tumor de ≥750 mm cúbicos, y las curvas de supervivencia Kaplan-Meyer están trazadas. n=12-15 ratones/grupo. (E) el TK-TRIF deglicosilado mejoró la supervivencia en comparación con el tratamiento TK-GMCSF. Los ratones (BALB/c albergando tumores Renca subcutáneos) fueron tratados a través de la inyección en la vena de la cola de PBS o una dosis única de 1 x 10^8 PFU de TK-GMCSF o TK-TRIF deglicosilada (n=10-12 por grupo). Las curvas de supervivencia Kaplan-Meyer fueron obtenidas después de

establecer un punto final de ≥750 mm cúbicos para el volumen de tumor. *, P<0.05 significante comparado con el grupo de solución salina tamponada con fosfato. #, P<0.05 significante comparado con el grupo TK-. ϕ, P<0.05 significante comparado con el grupo TK-deglicosilado. ω, P<0.05 significante comparado con el grupo TK-TRIF. Ψ, P<0.05 significante comparado con el grupo TK-GMCSF.

Figuras 11A-F. La combinación de deglicosilación de cubierta y las respuestas celulares anti-tumor incrementadas de expresión TRIF de ratón y exhibieron eficacia anti-tumor potente. (A-B) Respuestas inmune celular al virus vaccinia y células de tumor evaluadas por el ensayo IFN-γ ELISpot. En el día 7 después de la administración del virus, los bazos fueron cosechados de ratones inyectados intravenosamente con 1 x 10^8 PFU de virus indicados o solución salina tamponada con fosfato (ratones BALB/c llevando xenoinjertos Renca) y fueron evaluados por la cantidad de CTLs reconociendo virus vaccinia (A) o células Renca (B). Los valores de ratones individuales y medios ±SEM están mostrados. (C) los títulos de anti-cuerpo neutralizante de suero. Un ensayo neutralizante se llevó a cabo para determinar los niveles de anticuerpo anti-vaccinia circulantes para ratones inyectados con 1 x 10^8 PFU de TK-, TK-TRIF o TK-TRIF deglicosilada. Los títulos Nabs fueron determinados por la dilución más alta de suero que resultó en

por lo menos 50% de inhibición de infección. Los valores de ratones individuales y medios ±SEM están trazados. (D-E) actividad en contra del tumor en vivo en diferentes modelos. Los ratones BALB/c llevando Renca (D) o C57BL/6 llevando xenoinjertos de tumor MC38 (E) fueron tratados con una dosis intravenosa única de virus indicados (1 x 10^8 PFU/ratón). El crecimiento de tumor fue seguido mediante mediciones de calibre. Los medios de 12-15 ratones por grupo +SE están mostrados. (F) el TK-TRIF deglicosilado exhibió una actividad en contra del tumor mayor que el TK-GMCSF. Los ratones BALB/c albergando xenoinjertos Renca fueron inyectados intravenosamente con una dosis de 1 x 10^8 PFU/ratón de TK-GMCSF o de TK-TRIF deglicosilada. El volumen de tumor relativo después de la administración de virus está trazada (n=12-15 ratones/grupo +SE). *, $P<0.05$ significante comparado con el grupo de solución salina tamponada con fosfato. #, $P<0.05$ significante comparado con el grupo TK-. ϕ, $P<0.05$ significante comparado con el grupo TK-deglicosilado. ω, $P<0.05$ significante comparado con el grupo TK-TRIF.

Figuras 12A-C. (A) WR cepa vaccinia con tratamiento DS, supresión C12L y expresión mTRIF (llamada UPCI-1812) exhibió efectos anti-tumor incrementados en ratones BALB/c llevando tumores 4T1 en relación a cepas clínicas actuales WR.TK-GM-CSF+ (como un modelo de la cepa JX-594). El virus UPCI-1812 también exhibieron una producción incrementada de citoquinas

inmunoterapéuticas en microambiente de tumor incluyendo (B) gamma interferón y (C) interkeucin-12.

Figuras 13A-C. (A) Supervivencia de varias líneas de células de tumor fueron analizadas con la infección viral con TK-. (B) Expresión de gen viral en tumores derivados de ratones BALB/c y C57BL/6 implantados con ciertas líneas de célula de tumor, y el volumen de tumor es obtenido de BALB/c y C57BL/6 implantados con ciertas líneas de célula de tumor e infectados con TK-. (C) Detección de Sp6 fosforilatado en células mieloide en tumores derivados de ratones BALB/c y C57BL/6 implantados con ciertas líneas de célula de tumor y tratados con TK-.

Figuras 14A-B. (A) Los ratones no llevando tumor o tumores subcutáneos derivados de LLC o de células B16 (50-100 mm cúbicos) fueron tratados con una inyección intravenosa única de 1 x 10^7 PFU de WR.TK-. Los ratones (n=3 por grupo y tiempo) fueron sacrificados en los tiempos indicados y los bazos y el suero se recuperaron. Los esplenocitos fueron rápidamente fijados y permeabilizados (de acuerdo a nuestro protocolo previamente publicado) y después se mancharon para fosflujo para detectar la activación de trayectorias señaladoras. Esto se llevó a cabo para células-T regulatorias (CD3+CD4+CD8-FoxP3+CD25+), con pSTATS, pS6 y Ki67 analizado; para células-T de CD4 (CD3+CD4+CD8+FOXP3-), con pS6, Ki67, CD44 y CD62L

analizado; y para células-T CD8 (CD3+CD4+CD8+FoxP3-), con pS6, Ki67, CD44 y CD62L analizado. (B) Los niveles de anticuerpo neutralizante anti-viral fueron también examinados en el suero.

Figuras 15A-B. (A) La concentración de células-T regulatorias y de células MDSC en varios modelos de tumor de ratón infectados con TK-. (B) Concentración de células-T regulatorias, de células MDSC y de células-T CD8+ en modelos de tumor de ratón MC38 infectados con TK-.

Figuras 16A-B. (A) Estrategias de compuerta están mostradas para la detección de células MDSC (izquierda) y células-T y t-regs (derecha) para esplenocitos o células recuperadas de tumores desagregados. (B) los niveles de MDSC y T-reg en el bazo están mostrados para ratones llevando diferentes tumores.

Figuras 17A-C. (A) La cepa de vaccinia TK- exhibe una habilidad muy pobre para aumentar la supervivencia media (en relación al control PBS) en modelos de tumor de ratón que exhiben niveles altos de MDSC en la línea de base. También, la terapia viral TK- puede reducir niveles de (B) T-reg en tumores tratados, pero no impactó sobre los niveles (C) MDSC.

Figura 18. El análisis de la respuesta inmune en ratones implantados con células de tumor MC38 con el tratamiento

con las cepas de vaccinia inmunogénica, GM-CSF, WR.TK-GM-CSF, WR.B18R-IFNα+, WR.B18R-IFNβ+ y WR.B18R-IFNγ+ en comparación a la respuesta inmune surgida mediante infección TK-.

Figura 19. Análisis de respuesta inmune en ratones implantados con células de tumor 4T1 con el tratamiento con las cepas de vaccinia inmunogénica, GM-CSF, WR.TK-GM-CSF y WR.B18R-IFNβ+ en comparación a la respuesta inmune suscitada por la infección TK-.

Figura 20. Expresión de COX2 y HPGD con la expresión de WR-TK-HPGD o el tratamiento del inhibidor Cox 2, Celecoxib, el Beta-actin fue detectado como control de carga. La expresión de PGE2 fue determinada en células Renca con la infección con WR-TK-HPGD o WR TK- o el tratamiento de Celecoxib.

Figuras 21A-D. La expresión HPGD de vaccinia oncolítica redujo MDSC en el tumor y sensibiliza tumores resistentes a la terapia viral. (A) Efecto de la expresión HPGD sobre niveles T-reg y MDSC en el tumor. Los ratones llevando tumores Renca fueron tratados con una inyección de dosis baja (1×10^7 PFU) intra-tumoral de virus indicados y los ratones se sacrificaron en los tiempos indicados, los tumores se recuperaron, se disgregaron y analizaron por citometría de flujo como anteriormente. La expresión HPGD reduce los niveles MDSC y de T-reg (* $p<0.05$ en comparación al control). (B) la actividad

terapéutica mejorada de WR.TK-.HPGD+. Los ratones llevando tumores Renca subcutáneo o MC38 fueron tratados con una inyección intra-tumoral única de solución salina tamponada con fosfato o 1 x 10^7 PFU o WR.TK- o WR.TK-HPGD+ y el crecimiento de tumor subsecuente fue seguido mediante medición de calibre (n=15 por grupo; WR.TK-HPGD+ ($P<0.05$ significantemente retrasó el crecimiento de tumor desde el día 3 (Renca) o desde el día 7 (MC38) en comparación a WR-TK- y resultó en tres respuestas completas para Renca y dos para MC38. Ningunos ratones de cualquier otro grupo exhibieron un CR). (C) La comparación de crecimiento de tumor y expresión de gen viral para el tratamiento WR.TK-.HPGD+. El crecimiento de tumor para los ratones individuales con tumores Renca y tratados con WR.TK-HPGD+ están trazados, se compararon al control de solución salina tamponada con fosfato (barra gris y se dividió en respuestas buena (línea sólida) y mejor (línea punteada). La señal de bioluminiscencia (expresión de gen viral) desde el tumor en el día 1 y 5 fue normalizada a volumen de tumor y se mostró para ambos respondedores bueno y mejor. (D) La expresión HPGD no redujo la expresión de gen viral. La expresión de gen de luciferasa viral de desde dentro del tumor a 24 horas después del tratamiento con WR.TK- o WR.TK-HPGD+ está mostrada.

Figura 22. El volumen de tumor como una función de días después del tratamiento con el control de solución salina tamponada con fosfato (CTL; círculo), timidina quinasa negativa

Western reserva VV (WR TK-; cuadrado) o timidina quinasa (TK) reserva Western negativa VV llevando HPGD (WR TK-HPGD, triangulo) (HPGD es un equivalente de ratón de la proteína humana 15-PGDH).

Figuras 23A-D. El porciento de MDSCs en (A) el bazo de ratón infectado con WR TK-; (B) bazo de ratón infectado con WR TK-HPGD; (C) tumor de ratón infectado con WR TK-; y (D) tumor de ratón infectado con WR TK-HPGD.

Figuras 24A-D. Expresión HPGD incrementó la respuesta inmune y altera el tráfico de célula inmune al tumor. (A) Los perfiles de citoquina y de quimoquina en el tumor después de diferentes tratamientos. Los ratones llevando tumores Renca fueron tratados como se indicó con 1 x 10^7 PFU desde diferentes cepas virales IT y se sacrificaron después de 3 días. Los homogeneizados de tumor fueron corridos como ensayos Luminex para cuantificar diferentes citoquinas y quimoquinas (* $P<0.05$). (B) Respuesta anti-tumor CTL se incrementó con la expresión HPGD. Los esplenocitos recolectados de ratones levando tumor Renca 7 días después de los tratamientos indicados fueron cuantificados para respuesta CTL en contra del tumor como se determinó por ELISPOT (* $P<0.06$). (C) Alteraciones sistémicas en niveles de quimioquinas después de diferentes tratamientos. El suero recolectado de ratones llevando tumor Renca 3 días después de los tratamientos indicados fueron cuantificados

respecto de los niveles de quimioquinas mediante ELISA ($P<0.05$). (D) Las células inmunes activadas preferiblemente tumores de objetivo infectados con virus expresando-HPGD. Los ratones fueron implantados con tumores Renca bilaterales y cuando éstos alcanzaron 50-100 mm cúbicos, estos fueron inyectados con 1 x 10^7 PFU de WR.TK- sobre un flanco y WR-TK-HPGD+ sobre el otro flanco después de 24 horas 1 x 10^7 activado y las células NK T (CIK) etiquetadas Cy5.5 fueron entregadas a través de inyección en la vena de la cola. Después de 24 horas los ratones fueron formados en imágenes mediante bioluminiscencia (expresión de gen viral) y fluorescencia (tráfico de célula NK T a tumores) (*$P<0.05$). Un ejemplo representativo de formación de imagen de fluorescencia se muestra.

Figura 25. La expresión COX2 en tumores infectados con WR.TK- comparada a tumores no tratados.

Figuras 26A-B. (A) supervivencia de varias líneas de célula con la infección con TK-. (B) Producción viral y expresión de gen de TK- en varias líneas de células de tumor.

Figura 27 muestra la expresión de gen viral de modelos de tumor de ratón de TK infectado MC38, LLC y AB12 después del día 4 o del día 5 de la infección.

Figura 28. Crecimiento de tumor como una función de días después del tratamiento con solución salina tamponada con fosfato o infección con WR.TK-TRIF deglicosilado+- (UPCI-1812), reserva Western TK- llevando HPGD (VV-HPGD) o UPCI-1812 combinado con la expresión HPGD.

Figura 29. Producción EEV incrementada (mutación A34R K151E) lleva a un anticuerpo neutralizante antiviral reducido (14 días después de la entrega IP de WR o de EEV).

Figura 30. Dominios TRIF. En la secuencia aminoácido TRIF humana hay tres dominios aglutinantes TRAF y el dominio RHIM que aglutina RIP1.

5. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Para claridad de la descripción, y no por vía de limitación, la descripción detallada de la invención está dividida en las siguientes subsecciones:

(i) mutación de columna viral;

(ii) modificación de glicosilación viral;

(iii) modificación que promueve respuestas de célula-T;

(iv) modificación que inhibe inmunosupresión;

(v) modificación que mejora esparcimiento de virus y actividad;

(vi) virus modificados;

(vii) métodos de tratamiento; y

(viii) equipos.

El término "homología" como se usó aquí se refiere al grado de homología entre las secuencias de ácido nucleico y amino ácido como se determinó usando métodos conocidos en el arte, por ejemplo, pero no limitándose al software tal como BLAST o FASTA.

5.1 MUTACIONES DE COLUMNA VIRAL

En ciertas incorporaciones no limitantes de la invención, un VV contiene una o más mutaciones de su genoma que favorece la respuesta del virus en una célula de cáncer y/o la inducción incrementada de la respuesta inmune T-Linfocito citotóxico (CTL). Una mutación puede ser una inserción, supresión, o sustitución de uno o más ácidos nucleicos del virus nativo.

En particular en las incorporaciones no limitantes, la mutación resulta en una expresión de proteína aglutinante interleucin-18 ("IL-18BP") funcional disminuida. Como ejemplos no limitantes, (i) la mutación puede resultar en una proteína con un aglutinamiento más débil a IL-18 que la proteína VV nativa; (ii) la mutación puede resultar en la expresión de una proteína truncada con una actividad funcional ausente o disminuida; o (iii) la mutación puede suprimir el gen IL-18BP. En un ejemplo no limitante específico, la mutación puede ser una supresión C12L (por ejemplo vea Symons y otros, 2002, J. Gen. Virol. 83:2833-2844). En ciertas incorporaciones, la supresión C12L puede ser una supresión completa o parcial de C12L. Por ejemplo, y no por vía de limitación, una supresión parcial de C12L puede incluir una mutación que resulta en la supresión de por lo menos alrededor de 10%, de por lo menos alrededor de 20%, de por lo menos alrededor de 30%, o de por lo menos de alrededor de 40% o más de la secuencia de amino ácido de la proteína C12L.

En incorporaciones no limitantes adicionales, la columna viral puede contener, separadamente o en adición a una o más mutaciones en (incluyendo la supresión) de ácido nucleico codificando IL-18BP descrito arriba como una mutación en ácido nucleico codificando B8R (proteína aglutinante gamma IFN; vea, por ejemplo Symons y otros, 1995, Célula 81(4):551-60), B18R (tipo I proteína aglutinante IFN; por ejemplo vea Colamonici y

otros 1995, J. Biol. Chem. 270(27):15974-8), A35R (inhibidor de la presentación MHC II; por ejemplo vea Rehm y otros, 2010, Virología. 397(1):176-86 y Roper y otros, 2006, Diario de Virología 80(1):306-13), B15R (proteína aglutinante IL-1β; por ejemplo vea Alcami y otros, 1992, Célula 71(1):153-67), proteínas aglutinantes quimioquina (B29R, G3R, H5R), inhibidor STAT1 (H1L); dsRNA o PKR inhibidores tal como E3L (vea por ejemplo Chang y otros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. 89(11):4825-9) o K3L (por ejemplo, vea Davies y otros, 1993, J. Virol. 67(3):1688-92 y Langland y otros, 2002, Virología, 299(1):133-41); Bcl-2 como proteínas (tal como N1, N2, B14, F1, C6, A46 y K7), o combinaciones de las mismas.

5.2 MODIFICCAIONES DE GLICOSILACIÓN VIRAL

En ciertas incorporaciones no limitantes de la invención, un VV es tratado con un agente que modifica la glicosilación. Por ejemplo, una célula que produce el VV puede ser administrada un inhibidor de glicolización y/o cultivarse en la presencia de un inhibidor de glicosilación o un VV puede ser tratado con un agente que reduce o remueve o modifica la glicosilación. En ciertas incorporaciones, un VV puede ser sometido a un tratamiento ácido para reducir la glicosilación del virus. En ciertas incorporaciones, el VV de la presente

invención puede ser producido en una línea de célula que no tiene la función de glicosilación, por ejemplo, debido a mutaciones en una o más de las enzimas de glicosilación.

En ciertas incorporaciones, el VV tratado con un agente que reduce o remueve o modifica la glicosilación, por ejemplo, un virus deglicosilado, puede tener menos de alrededor de 90%, menos de alrededor de 80%, menos de alrededor de 70%, menos de alrededor de 60%, menos de alrededor de 50%, menos de alrededor de 40%, menos de alrededor de 30%, menos de alrededor de 20%, menos de alrededor de 10% de la glicosilación de VV que no se trata con un agente que modifica la glicosilación.

En particular las incorporaciones no limitantes, muestran un VV de la presente invención que puede ser tratado con una enzima sialidasa la cual reduce o remueve los residuos de amino ácido sialico desde la superficie viral (por ejemplo cubierta). En una o más incorporaciones no limitantes, el VV es tratado con una enzima sialidasa antes de la administración a un sujeto. En una incorporación no limitante específica, la enzima sialidasa es la enzima Sialidasa A (Glyko Sialidasa A, Código WS0042) por ejemplo como parte del equipo Deglicosilación Enzimática Glycopro (Código de producto: GK80110, Prozyme). En ciertas incorporaciones, el VV puede ser tratado con Sialidasa A en combinación con N- y O-glicanasas. Otras enzimas que remueven el ácido sialico o que rompen los residuos glicosilo

desde el virus pueden también ser usadas de acuerdo a la invención, incluyendo pero no limitándose a neuraminidasas, PNGases (por ejemplo, PNGase A o PNGaseF), β1-4 galactosidasa, β-N-acetilglucosaminidasa, o el uso de tratamientos químicos tal como b-eliminación o álcali o hidrazonollo.

Sin desear estar unido a ninguna teoría en particular, se cree que la reducción de glicosilación, por ejemplo mediante tratamiento sialidasa del virus de vaccinia, se reduce la activación TLR2 y por tanto se retrasa la activación inmune sistémica durante el período de entrega viral y/o se reduce la producción de anticuerpos neutralizantes antivirales.

5.3 MODIFICACIÓN QUE PROMUEVE RESPUESTA DE CÉLULA-T

En ciertas incorporaciones no limitantes de la invención, un VV es modificado para incluir uno o más ácidos nucleicos codificando un péptido o proteína que promueve la respuesta de célula-T. En ciertas incorporaciones, el péptido o proteína el cual promueve una respuesta de célula-T puede promover la expresión de una o más sito quinas proinflamatorias. Por ejemplo, y no por vía de limitación, las citoquinas

proinflamatorias pueden incluir IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, CCL5 y IP-10.

Los ejemplos no limitantes de un péptido o proteína que promueve una respuesta de célula-T incluyen Toll/IL-1R dominio-conteniendo adaptador induciendo IFN-β ("TRIF") o un dominio funcional del mismo. En ciertas incorporaciones no limitantes, el ácido nucleico puede codificar un TRIF humano teniendo una secuencia de amino ácido como se establece en UniProtKB No. Q8IUC6, o una secuencia de amino ácido de por lo menos de alrededor de 90%, por lo menos de alrededor de 95%, o por lo menos de alrededor de 98% homólogo al mismo, o un TRIF de rata teniendo una secuencia de amino ácido como se establece en UniProtKB o una secuencia de aminoácido por lo menos de alrededor de 90%, por lo menos de alrededor de 95% o por lo menos de alrededor de 98% homóloga al mismo.

En ciertas incorporaciones no limitantes, el ácido nucleico puede codificar uno o más dominios TRIF como se mostró en la figura 30. En ciertas incorporaciones, el ácido nucleico codificando un péptido o proteína que promueve una respuesta célula-T, por ejemplo TRIF, puede ser clonado en el lugar del gen de cinasa timidina (TK) del virus como se muestra en la figura 4A. El ácido nucleico codificando un péptido o proteína que promueve una respuesta de célula-T puede ser enlazado operablemente a cualquier promotor que puede resultar en la

expresión del ácido nucleico. Como se usó aquí, "operablemente enlazado" significa que un promotor está en una ubicación funcional correcta y/o en una orientación en relación a la secuencia de ácido nucleico para controlar la iniciación transcripcional y/o la expresión de esa secuencia. En ciertas incorporaciones, el promotor es un promotor de vaccinia y/o un promotor de vaccinia sintética. En ciertas incorporaciones, el promotor es un promotor de vaccinia sintética pSE/L. En ciertas incorporaciones, el ácido nucleico codificando un péptido o proteína que promueve una respuesta de célula-T está enlazado operablemente al promotor p7.5 viral.

En otras incorporaciones no limitantes el ácido nucleico puede codificar un factor estimulante de colonia de granulocito-macrófago ("GM-CSF"), IL-12, IFN-γ o IL-18. En ciertas incorporaciones más de uno de tal ácido nucleico puede ser incorporado en VV.

5.4 MODIFICACIONES QUE INHIBEN LA INMUNOSUPRESIÓN

En ciertas incorporaciones no limitantes de la invención, un VV es modificado para incluir uno o más ácidos nucleicos codificando un péptido o proteína o un ácido nucleico o micro-RNA que inhibe o reduce la inmunosupresión. Los ejemplos no limitantes de medidas de inmunosupresión incluyen: el nivel de células supresoras derivadas de mieloide ("MDSC"); el nivel

de macrófagos M2; y el nivel de células-T auxiliares en contra de células-T reguladoras supresoras. En particular en incorporaciones no limitantes, el ácido nucleico codifica un péptido o proteína o ácido ribonucleico o micro-RNA que reduce la actividad prostaglandina E2 ("un antagonista PGE2"). En incorporaciones no limitantes específicas, el ácido nucleico codifica un péptido y/o una proteína que es un antagonista PGE2 (como se usa el término aquí) que degrada en el PGE2. En un ejemplo no limitante específico, la proteína que degrada PGE2 es 15-PGDH (humana) o HPGD (ratón). Por ejemplo, y no por vía de limitación, el 15-PGDH puede tener una secuencia de amino ácido como se establece en UniProtKB No. P15428, o una secuencia de amino ácido de por lo menos de alrededor de 90%, de por lo menos de alrededor de 95%, o de por lo menos de alrededor de 98% homóloga al mismo; y un ácido nucléico codificando 15-PGDH puede tener una secuencia de ácido nucleico como se establece en el acceso GenBank No. U63296.1, o una secuencia de ácido nucleico de por lo menos de 90%, de por lo menos de 95%, o de por lo menos de98% homóloga al mismo. En incorporaciones no limitantes adicionales, un ácido nucleico codificando una versión secretada o insolubilizada del receptor extracelular para PGE2 puede ser incluida en el VV, por ejemplo el ácido nucleico codificando EP1, EP2, EP3, y/o EP4, en donde EP3 y EP4 son de una afinidad superior. En ciertas incorporaciones, el uno o más péptidos o proteínas que inhiben o reducen la inmunosupresión pueden resultar en la expresión reducida de uno o más de quimioquinas

supresoras tal como, pero no limitándose a CXCL12. En ciertas incorporaciones, el uno o más péptidos o proteínas que inhiben o reducen la inmunosupresión pueden resultar en la expresión incrementada de uno o más de quimioquinas inmuno activantes tal como, pero no limitándose a CXCL9, CXCL10 y CCL5.

En ciertas incorporaciones, el ácido nucleico codificando un antagonista PGE2 puede ser clonado en el lugar del gen tiamidina cinasa (TK) del virus. El ácido nucleico codificando una proteína o péptido antagonista PGE2 puede ser operablemente enlazado a cualquier promotor que puede resultar en expresión del ácido nucleico. En ciertas incorporaciones, el ácido nucleico codificando una proteína o péptido antagonista PGE2 operablemente enlazado al promotor p7.5 viral. En ciertas incorporaciones, el promotor es un promotor de vaccinia y/o un promotor de vaccinia sintética. En ciertas incorporaciones, el promotor es el promotor de vaccinia sintética pSE/L. En ciertas incorporaciones, el virus puede incluir un ácido nucleico codificando un antagonista PGE2 y un ácido nucleico codificando un péptido o proteína que promueve una respuesta de célula-T que son ambas operablemente enlazadas a un promotor, por ejemplo el promotor p7.5 viral, y clonado en el lugar del gen de timidina cinasa (TK) del virus.

En incorporaciones no limitantes adicionales, un virus inmuno oncolítico de la invención puede ser administrado junto

con un agente que inhibe o reduce MDSC, incluyendo, por ejemplo, pero no por vía de limitación, un anticuerpo que tiene como objetivo un marcador de superficie de MDSC tal como un anticuerpo anti-CD33 o una región variable del mismo; un anticuerpo anti-CD11b o región variable del mismo; un inhibidor COX2, por ejemplo celecoxib; sunitinib y/o todos los ácidos trans retinoicos (por ejemplo, vea Najjar y Finke, 2013, Fronteras en Oncología, 3 (49) 1-9).

5.5 MODIFICACIONES QUE MEJORAN EL ESPARCIMIENTO Y ACTIVIDAD DEL VIRUS

En ciertas incorporaciones no limitantes de la invención, un VV es modificado para mejorar el esparcimiento y/o la actividad del virus. En particular en incorporaciones no limitantes, un VV es modificado para aumentar la cantidad de envoltura extracelular desde el virus que se produce, por ejemplo mediante introducir una o más de las siguientes mutaciones: A34R Lys151 a Glu; supresión completa o parcial de B5R; mutación/supresión de A36R y/o mutación/supresión de A56R. En ciertas incorporaciones, un VV modificado puede incluir una supresión completa o parcial de B5R.

5.6 VIRUS MODIFICADOS

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV inmuno-oncolítico que comprende una o más, o dos o más, o tres o más o cuatro o más, de las siguientes modificaciones, como se describe en las secciones dadas arriba:

(i) una mutación de columna viral:

(ii) una modificación de glicosilación viral;

(iii) una modificación que promueve la respuesta de célula-T;

(iv) una modificación que inhibe la inmunosupresión; y/o

(v) una modificación que mejora la actividad y el esparcimiento de virus.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV que comprende una modificación de glicosilación viral y una o más de las siguientes modificaciones, como se describió en la secuencia dada arriba:

(i) una mutación de columna viral:

(ii) una modificación que promueve una respuesta de célula-T;

(iii) una modificación que inhibe la inmunosupresión; y/o

(iv) una modificación que mejora el esparcimiento y la actividad de virus.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV el cual está tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión y comprende o leva o contiene una o más de las siguientes modificaciones, como se describió en las secciones anteriores:

(i) una mutación de columna viral:

(ii) una modificación que promueve la respuesta de célula-T;

(iii) una modificación que inhibe la inmunosupresión; y/o

(iv) una modificación que mejora el esparcimiento y la actividad de virus.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV que tiene una glicosilación reducida (por ejemplo sialilación) en relación a un virus no modificado y comprende o lleva o contiene una o más de las siguientes modificaciones, como se describió en las secciones anteriores:

(i) una mutación de columna viral:

(ii) una modificación que promueve la respuesta de célula-T;

(iii) una modificación que inhibe la inmunosupresión; y/o

(iv) una modificación que mejora el esparcimiento y la actividad de virus.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV que es tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene una glicosilación reducida en relación al virus no modificado.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV que es tratado con sialidasa antes

de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene residuos de ácido sialico reducidos en relación a un virus no modificado.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV que comprende o lleva o contiene un ácido nucleico codificando TRIF.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV que comprende o lleva o contiene un ácido nucleico codificando un antagonista PGE2 (por ejemplo 15-PGDH o HPGD).

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV que comprende una o más modificaciones que mejoran el esparcimiento y la actividad de virus seleccionados del grupo de A34R Lys151 a la mutación Glu; una supresión completa o parcial de B5R; una mutación/supresión de A36R y/o una mutación/supresión de A56R.

En las incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV que comprende una o más modificaciones de columna de virus seleccionadas del grupo de una mutación que reduce la expresión de IL-18BP funcional (por ejemplo supresión CD12L), supresión B8R, supresión B18R, supresión A35R, o una combinación de las mismas.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV que es tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene una glicosilación reducida en relación al virus no modificado y además comprende o lleva o contiene un ácido nucleico codificando TRIF o un dominio funcional del mismo.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV el cual está tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera ha reducido la glicosilación (por ejemplo sialilación reducida) en relación al virus no modificado y además comprende o lleva o contiene un ácido nucleico codificando un antagonista PGE2 (por ejemplo 15-PGDH o HPGD).

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV el cual está tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera ha reducido la glicosilación (por ejemplo sialilación reducida) en relación a virus no modificado y además comprende o lleva o contiene un ácido nucleico codificando TRIF

o un dominio funcional del mismo y/o un ácido nucleico codificando un antagonista PGE2 (por ejemplo 15-PGDH o HPGD).

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV el cual está tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo, sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera ha reducido la glicosilación (por ejemplo, sialilación reducida) en relación a un virus no modificado y además comprende una o más modificaciones que mejoran el esparcimiento y actividad del virus seleccionado del grupo de un A34R Lys151 a mutación Glu; una supresión completa o parcial de B5R; una supresión/mutación de A36R y/o una mutación/supresión de A56R. En ciertas incorporaciones, la presente invención proporciona un VV deglicosilado que comprende una supresión completa o parcial de B5R.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV el cual está tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera ha reducido la glicosilación (por ejemplo una sialilación reducida) en relación a un virus no modificado y además comprende una o más modificaciones de columna de virus seleccionadas del grupo de una mutación que reduce la expresión de IL-18BP funcional (por ejemplo supresión C12L), supresión

B8R, supresión B18R, supresión A35R, o una combinación de los mismos. En ciertas incorporaciones, la presente invención proporciona un VV deglicosilado que comprende una supresión C12L.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV el cual está tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera ha reducido la glicosilación (por ejemplo sialilación reducida) en relación a virus no modificado y además comprende una o más modificaciones de columna de virus seleccionadas del grupo de una mutación que reduce la expresión de IL-18BP funcional (por ejemplo supresión C12L), supresión B8R, supresión B18R, supresión A35R, o una combinación de los mismos y además comprende una o más modificaciones que mejoran el esparcimiento y la actividad de virus seleccionados del grupo de A34R Lys151 a mutación Glu; una supresión completa o parcial de B5R; una mutación/supresión de A36R y/o una mutación/supresión de A56R. En ciertas incorporaciones, la presente invención proporciona un VV deglicosilado el cual comprende una supresión C12L y una supresión B5R.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV el cual está tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo

sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene una glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado y además comprende o lleva o contiene un ácido nucleico codificando TRIF o un dominio funcional del mismo y además comprende una o más modificaciones de columna de virus seleccionadas del grupo de una mutación que reduce la expresión de IL-18BP funcional (por ejemplo supresión C12L), una supresión B8R, una supresión B18R, una supresión A35R, o una combinación de los mismos. En ciertas incorporaciones, el virus comprende la supresión C12L.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV que esta tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración en anfitrión o que de otra manera tiene una glicosilación reducida (por ejemplo una sialilación reducida) en relación a un virus no modificado y además comprende o lleva o contiene un ácido nucleico codificando un antagonista PGE2 (por ejemplo 15-PGDH o HPGD) y además comprende una o más modificaciones de columna de virus seleccionadas del grupo de mutación que reduce la expresión de IL-18BP funcional (por ejemplo supresión C12L), supresión B8R, supresión B18R, supresión A35R, o una combinación de los mismos.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona el TK- VV el cual está tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene una glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado y además comprende o lleva o contiene un ácido nucleico codificando TRIF o un dominio funcional del mismo y un ácido nucleico codificando un antagonista PGE2 (por ejemplo 15-PGDH o HPGD), y además comprende una o más modificaciones de columna de virus seleccionadas del grupo de mutación que reduce la expresión de IL-18BP funcional (por ejemplo supresión C12L), supresión B8R, supresión B18R, una supresión A35R, o combinaciones de las mismas.

En incorporaciones no limitantes la presente invención proporciona un VV el cual está tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene una glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado y además comprende o lleva o contiene un ácido nucleico codificando TRIF o un dominio funcional del mismo y además comprende una o más modificaciones que mejoran el esparcimiento y actividad del virus seleccionados del grupo de un A34R Lys151 a mutación Glu; una supresión

completa o parcial de B5R; una mutación/supresión de A36R y/o una mutación/supresión de A56R.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV el cual está tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene una glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a virus no modificado y además comprende o lleva o contiene un ácido nucleico codificando un antagonista PGE2 (por ejemplo 15-PGDH o HPGD) y además comprende una o más modificaciones que mejoran el esparcimiento y actividad de virus seleccionada del grupo de un A34R Lys151 a mutación Glu; una supresión completa o parcial de B5R; una mutación/supresión de A36R y/o una mutación/supresión de A56R.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV que está tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene una glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado y además comprende o lleva o contiene un ácido nucleico codificando TRIF o un dominio funcional del mismo y un ácido nucleico codificando un antagonista PGE2 (por ejemplo 15-PGDH o HPGD), y además comprende una o más modificaciones que mejoran el esparcimiento

y actividad de virus seleccionadas del grupo de un A34R Lys151 a mutación Glu; una supresión completa o parcial de B5R; una mutación/supresión de A36R y/o una mutación/supresión de A56R.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV que es tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene una glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a virus no modificado y además comprende o lleva o contiene un ácido nucleico codificando TRIF o un dominio funcional del mismo y un ácido nucleico codificando un antagonista PGE2 (por ejemplo 15-PGDH o HPGD), y además comprende una o más modificaciones que mejoran el esparcimiento y actividad de virus seleccionadas del grupo de un A34R Lys151 a mutación Glu; una supresión completa o parcial de B5R; una mutación/supresión de A36R y/o una mutación/supresión de A56R y que comprende una o más modificaciones de columna de virus seleccionadas del grupo de una mutación que reduce la expresión de IL-18BP funcional (por ejemplo supresión C12L), una supresión B8R, una supresión B18R, una supresión A35R, o una combinación del mismo. En ciertas incorporaciones, el virus comprende la supresión C12L. En ciertas incorporaciones, el VV puede comprender la supresión C12L y la supresión B5R.

Las modificaciones arriba descritas pueden ser producidas en un VV (virus de vaccinia) que es conocido en el

arte. Los ejemplos no limitantes incluyen el: cepa reserva Western, cepa Copenhagen; cepa Wyeth (NYCBOH); la cepa Tian Tian; la cepa USSR (y vea las referencias 1 y 2 abajo). La cepa VV de base modificada como se establece aquí puede en sí misma comprender una o más mutaciones en relación a su cepa padre, por ejemplo, pero no limitándose a una o más de las siguientes: supresión en TK- (por ejemplo denotada aquí como "TK-"); supresión en VGF; SPI-1; supresión: y/o supresión SPI-2.

En ciertas incorporaciones no limitantes la presente invención proporciona un virus de vaccinia con las siguientes modificaciones:

(i) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(ii) un ácido nucleico codificando TRIF o un dominio funcional del mismo; y/o

(iii) un ácido nucleico codificando 15-PGDH o un dominio funcional del mismo.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un virus de vaccinia con las siguientes modificaciones:

(i) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(ii) un ácido nucleico codificando TRIF o un dominio funcional del mismo;

(iii) un ácido nucleico codificando 15-PGDH o un dominio funcional del mismo; y/o

(iv) una supresión C12L.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV con las siguientes modificaciones:

(i) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(ii) un ácido nucleico codificando TRIF o un dominio funcional del mismo;

(iii) un ácido nucleico codificando 15-PGDH o un dominio funcional del mismo;

(iv) una supresión C12L; y/o

(v) una supresión B5R.

En ciertas incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un virus de vaccinia con las siguientes modificaciones:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con una glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(iii) un ácido nucleico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; y/o

(iv) un ácido nucleico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un virus de vaccinia con las siguientes modificaciones:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(iii) un ácido nucleico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo;

(iv) un ácido nucleico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo; y/o

(v) una supresión C12L.

En incorporaciones no limitantes, la presente invención proporciona un VV con las siguientes modificaciones:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(iii) un ácido nucleico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo;

(iv) un ácido nucleico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo;

(v) una supresión C12L; y/o

(vi) una supresión B5R.

5.7 MÉTODOS DE TRATAMIENTO

La presente invención proporciona un método para reducir el crecimiento de una célula de cáncer que comprende administrar, a la célula de cáncer de un sujeto, una cantidad efectiva de un virus de vacciniea inmuno oncolítico, como se describió arriba. Reducir el crecimiento de una célula de cáncer puede ser manifestado, por ejemplo, mediante muerte de la célula o una tasa de replicación más lenta o una tasa de crecimiento reducida de un tumor que comprende la célula o una supervivencia prolongada de un sujeto conteniendo la célula de cáncer.

Un "sujeto" o "paciente" como se usó intercambiablemente aquí se refiere a un humano o a un sujeto no humano. Los ejemplos no limitantes de sujetos no humanos incluyen primates no humanos, perros, gatos, ratones, ratas, cochinillas de guinea, ratones, cerdos, aves, caballos, vacas, cabras, ovejas, etc.

La presente invención proporciona un método para reducir el crecimiento de un tumor que comprende administrar, al tumor, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia inmunooncolítico, como se describió arriba. Reduciendo el crecimiento de un tumor puede ser manifestado por ejemplo mediante una tasa de crecimiento reducida o una supervivencia prolongada de un sujeto que tiene el tumor.

La presente invención proporciona un método para tratar a un sujeto que tiene cáncer comprendiendo administrar, al sujeto, una cantidad efectiva de un virus de vacciniea inmuno oncolítico como se describió arriba.

Una "cantidad efectiva" en tal método incluye una cantidad que reduce la tasa de crecimiento o de esparcimiento del cáncer o que prolonga la supervivencia del sujeto. En ciertas incorporaciones, una cantidad efectiva puede incluir una cantidad que es suficiente para producir un efecto anti-cáncer en un sujeto.

Un efecto "anti-cáncer" como se usó aquí, se refiere a uno o más de una reducción en masa de células de cáncer agregadas, una reducción en una tasa de crecimiento de célula de cáncer, en una reducción en la proliferación de células de cáncer, en una reducción de la masa de tumor, en una reducción en el volumen de tumor, en una reducción en proliferación de

célula de tumor, en una reducción en la tasa de crecimiento de tumor y/o en una reducción en la metástasis de tumor.

En ciertas incorporaciones, la presente invención proporciona un método para producir un efecto anti-cáncer en un sujeto que tiene cáncer comprendiendo administrar al sujeto, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia inmunooncolítico como se describió arriba.

En incorporaciones no limitantes, la cantidad de virus de vaccinia administrada (por ejemplo dosis) puede ser de entre alrededor de 10^3 y de 10^{11} unidades formadoras de placa (PFU) o de entre alrededor de 10^5 y 10^{10} unidades formadoras de placa o de entre alrededor de 10^5 y 10^8 unidades formadoras de placa, o de entre alrededor de 10^5 10^{11} unidades formadoras de placa o de entre alrededor de 10^8 y 10^{11} unidades formadoras de placa. También véase Thorne y Kim, 2009, Cáncer Revisión Nacional 9:64-71. Note que aquí 10^X es expresado alternativamente como 1eX. En ciertas incorporaciones, el virus oncolítico puede ser administrado en una dosis única o puede ser administrado en múltiples dosis. En ciertas incorporaciones en donde el virus es administrado en dosis múltiples, las dosis pueden ser administradas secuencialmente, por ejemplo, diariamente, semanalmente o a intervalos mensuales o en respuesta a una necesidad específica del sujeto.

En ciertas incorporaciones, el virus inmunooncolítico puede ser administrado en una composición farmacéutica, en donde el virus está presente en una cantidad efectiva y combinado con un portador farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" como se usó aquí, incluye cualquier portador el cual no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos y/o que no es tóxico al paciente al que se administra. Los ejemplos no limitantes de los portadores farmacéuticos adecuados incluyen soluciones salinas tamponeadas con fosfato, agua, emulsiones, tal como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes y soluciones estériles. Los ejemplos no limitantes adicionales de portadores farmacéuticamente compatibles pueden incluir geles, materiales de matriz bioadsorbibles, elementos de implantación que contienen el virus de vaccinia oncolítico o cualquier otro vehículo adecuado, medios de entrega o surtido o material. Tales portadores pueden ser formulados por métodos convencionales y pueden ser administrados a un sujeto en una cantidad efectiva.

El virus de vaccinia de la presente invención puede ser producido por métodos conocidos por un experto en el arte. En ciertas incorporaciones, el virus de vaccinia puede ser propagado en células anfitrionas adecuadas, aislado de las células anfitrionas y almacenado en condiciones que promueven la estabilidad y la integridad del virus, de manera que la pérdida

de inefectividad con el tiempo es minimizada. Por ejemplo, el virus de vaccinia puede ser almacenado mediante congelado o secado, tal como mediante liofilización. En ciertas incorporaciones, antes de la administración, el virus de vaccinia almacenado puede ser reconstituido (por ejemplo si se seca para el almacenamiento) y diluido en un portador farmacéuticamente aceptable para la administración.

El virus oncolítico puede ser administrado al sujeto usando métodos de administración estándar. En ciertas incorporaciones no limitantes, el virus oncolítico puede ser administrado sistémicamente. Alternativamente o adicionalmente, el virus oncolítico puede ser administrado por inyección en el sitio de cáncer, por ejemplo, en el sitio del tumor. Por ejemplo, y no por vía de limitación, la ruta de administración puede ser mediante inhalación, intranasal, intravenosa, intraarterial, intratecal, intratumoral, intraperitonial, intramuscular, subcutánea, tópica, intradérmica, regional local, administración oral, o combinaciones de las mismas. En ciertas incorporaciones, el virus oncolítico puede ser administrado al paciente desde una fuente implantada en el paciente. En ciertas incorporaciones, la administración del virus oncolítico puede ocurrir mediante infusión continua sobre un período de tiempo seleccionado. En ciertas incorporaciones, las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas directamente a un sitio

de tumor, por ejemplo, a través de inyección intratumoral directa.

Los cánceres que pueden ser tratados mediante terapia de virus de vaccinia inmunooncolítica incluyen pero no se limitan a adenocarcinoma, ostisarcoma, carcinoma cérvico, melanoma, carcinoma heptacelular, cáncer de seno, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer ovario, leucemia, linfoma, carcinoma renal, cáncer pancreático, cáncer gástrico, carcinoma de colon, cáncer duodenal, glioblastoma multiforme, astrocitoma y sarcoma.

En ciertas incorporaciones, el tratamiento usando el virus de vaccinia inmunooncolítico, como se describió arriba puede ser usado solo o en combinación con uno o más agentes anticáncer. Un "agente anticáncer" como se usó aquí, pude ser cualquier molécula, compuesto, químico o composición que tiene un efecto anti-cáncer. Los agentes anti-cáncer incluyen pero no se limitan a agentes quimioterapéuticos, agentes radioterapéuticos, citoquinas, inhibidores de punto de verificación inmune, agentes angiogénicos, agentes que inducen la apoptosis, anticuerpos en contra del cáncer y/o agentes de quinasa anti-ciclina dependientes.

En ciertas incorporaciones, el tratamiento usando un virus de vaccinia inmunooncolítica puede usarse solo o en

combinación con uno o más agentes inmunomodulatorios. Un agente inmunomodulatorio puede incluir cualquier compuesto, molécula o sustancia capaz de suprimir la inmunidad anti-viral asociada con Un tumor o cáncer. En ciertas incorporaciones, el agente inmunomodulatorio es capaz de suprimir la inmunidad innata y/o la inmunidad innata y/o la inmunidad adaptiva al virus oncolítico. Los ejemplos no limitantes de los agentes inmunomodulatorios incluyen un anticuerpo anti-CD33 a una región variable del mismo, un anticuerpo anti-CD11b o una región variable del mismo, un inhibidor COX2, por ejemplo celecoxib, citoquinas tal como IL-12, GM-CSF, IL-2, IFNβ y IFNγ, y quimioquinas tal como MIP-1, MCP-1, e IL-8. En ciertas incorporaciones, el agente inmunomodulatorio incluye inhibidores de punto de verificación inmune tal como pero no limitándose a agonistas anti-CTLA4, anti-PD-1, anti-PDL1 y TLR (por ejemplo, Poly I:C).

La frase "en combinación con" como se usó aquí significa que el virus de vaccinia inmunooncolítico y el uno o más agentes son administrados a un sujeto como parte de un tratamiento o plan. En ciertas incorporaciones, siendo usadas en combinación no requieren que el virus de vaccinia inmunooncolítico y el uno o más agentes sean físicamente combinados antes de la administración o que estos sean administrados sobre el mismo cuadro de tiempo. Por ejemplo, y no por vía de limitación, el virus de vaccinia inmunooncolítico

y el uno o más agentes pueden ser administrados concurrentemente con el sujeto que está siendo tratado, o pueden ser administrados concurrentemente con el sujeto que está siendo tratado, o pueden ser administrados al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden o en puntos diferentes en el tiempo.

En ciertas incorporaciones, un método para tratar un sujeto teniendo cáncer incluye administrar, al sujeto, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia aminooncolítico que comprende: (i) una envoltura con glicosión reducida (por ejemplo, sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; (ii) un ácido nucleico codificando TRIF , o un dominio funcional del mismo; y (iii) un ácido nucleico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo.

En ciertas incorporaciones, un método para el tratamiento de un sujeto teniendo un cáncer incluye administrar, al sujeto, una cantidad efectiva de un virus de vacciniea inmunooncolítico que comprende: (i) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; (ii) un ácido nucleico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; (iii) un ácido nucleico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo; y (iv) una supresión de C12L.

En ciertas incorporaciones, un método para tratar al sujeto teniendo un cáncer incluye administrar, al sujeto, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia inmunooncolítico que comprende: (i) una envoltura con una glicosilación reducida (por ejemplo una sialilación reducida en relación al virus no modificado; (ii) un ácido nucleico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; (iii) un ácido nucleico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo; (iv) una supresión de C12L; y (v) una supresión b5R.

En ciertas incorporaciones, un método para tratar un sujeto teniendo un cáncer incluye administrar, al sujeto, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia inmunooncolítico que comprende: (i) una supresión TK; (ii) una envoltura con una glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; (iii) un ácido nucleico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; y (iv) un ácido nucleico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo.

En ciertas incorporaciones, un método para tratar a un sujeto teniendo un cáncer incluye administrar, al sujeto, una cantidad efectiva de virus de vaccinia inmunooncolítico que comprende: (i) una supresión TK; (ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo una sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; (iii) un ácido nucleico

codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; (iv) un ácido nucleico codificando 15-PGDH o un dominio funcional del mismo; y (iv) una supresión C12L.

En ciertas incorporaciones, un método de tratamiento de un sujeto teniendo un cáncer incluye administrar, al sujeto, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia inmunooncolítico que comprende: (i) una supresión TK; (ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo una sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; (iii) un ácido nucleico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; (iv) un ácido nucleico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo; (iv) una supresión C12L; y (vi) una supresión B5R.

En ciertas incorporaciones, los métodos de la presente invención pueden además incluir el administrar al sujeto una cantidad efectiva de uno o más agentes. Por ejemplo, y no por vía de limitación, el agente puede ser un agente en contra del cáncer y/o un agente inmunomodulatorio como se describió arriba.

5.8 EQUIPOS

La presente invención además proporciona equipos que dan un virus de vaccinia inmunooncolítico como se describió arriba. En ciertas incorporaciones, un equipo de la presente invención puede incluir un virus de vaccinia inmunooncolítico o

una composición farmacéutica comprendiendo un virus de vaccinia inmunooncolítico como se describió arriba. En ciertas incorporaciones, un equipo de la presente invención puede además incluir uno o más componentes tal como las instrucciones de uso, dispositivos y reagentes adicionales, y componentes, tales como tubos, recipientes y jeringas para llevar a cabo los métodos descritos anteriormente. En ciertas incorporaciones, un equipo de la presente invención puede además incluir uno o más agentes, por ejemplo, agentes en contra del cáncer y/o agentes inmunomodulatorios que pueden ser administrados en combinación con un virus de vaccinia inmunooncolítico.

En ciertas incorporaciones, un equipo de la presente invención puede incluir instrucciones para usar, un dispositivo para administrar el virus de vaccinia inmunooncolítico a un sujeto o un dispositivo para administrar un agente adicional o un compuesto a un sujeto. Por ejemplo, y no por vía de limitación, las instrucciones pueden incluir una descripción del virus de vaccinia inmunooncolítico y, opcionalmente, otros componentes incluidos en el equipo, y métodos para la administración, incluyen métodos para determinar el estado adecuado del sujeto, la cantidad de dosis adecuada y el método de administración adecuado para administrar el virus de vaccinia inmunooncolítico. Las instrucciones pueden también incluir guías para vigilar al sujeto por la duración del tiempo del tratamiento.

En ciertas incorporaciones, un equipo de la presente invención puede incluir un dispositivo para administrar el virus de vaccinia inmunooncolítico a un sujeto. Cualquiera de una variedad de dispositivos conocidos en el arte para administrar medicamentos y composiciones farmacéuticas pueden ser incluidos en los equipos proporcionados ahí. Por ejemplo, y no por vía de limitación, tales dispositivos incluyen, una aguja hipodérmica, una aguja intravenosa, un catéter, un dispositivo de inyección de menos aguja, un inhalador y un surtidor de líquido, tal como un gotero de ojos. En ciertas incorporaciones, un virus de vaccinia inmunooncolítico que va ser entregado sistémicamente, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, puede ser incluido en un equipo con una jeringa y aguja hipodérmica.

En ciertas incorporaciones, un equipo de la presente invención incluye una cantidad efectiva de un virus de vaccinia inmunooncolítico que comprende: (i) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo una sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; (ii) un ácido nucleico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; y (iii) un ácido nucleico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo.

En ciertas incorporaciones, un equipo de la presente invención incluye una cantidad efectiva de un virus de vaccinia

inmunooncolítico que comprende: (i) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo una sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; (ii) un ácido nucleico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; (iii) un ácido nucleico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo; y (iv) una supresión C12L.

En ciertas incorporaciones, un equipo de la presente invención incluye una cantidad efectiva de un virus de vaccinia inmunooncolítico que comprende: (i) una envoltura con una glicosilación reducida (por ejemplo una sialilación reducida) en relación al virus no modificado; (ii) un ácido nucleico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; (iii) un ácido nucleico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo, (iv) una supresión C12L; y (v) una supresión B5R.

En ciertas incorporaciones, un equipo de la presente invención incluye una cantidad efectiva de un virus de vaccinia inmunooncolítica que comprende: (i) una supresión TK; (ii) una envoltura con una glicosilación reducida (por ejemplo una sialilación reducida) en relación a un virus no codificado; (iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; y (iv) un ácido nucléico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo.

En ciertas incorporaciones, un equipo de la presente invención incluye una cantidad efectiva de un virus de vaccinia inmunooncolítico que comprende: (i) una supresión TK; (ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; (iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; (iv) un ácido nucléico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo; y (v) una supresión C12L.

En ciertas incorporaciones, un equipo de la presente invención incluye una cantidad efectiva de un virus de vaccinia inmunooncolítico que comprende: (i) una supresión TK; (ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; (iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; (iv) un ácido nucléico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo; (v) una supresión C12L; y (v) una supresión B5R.

Los siguientes ejemplos son ofrecidos para ilustrar más completamente la descripción, pero no deben considerarse como limitantes del alcance de la misma.

6. EJEMPLO 1: <u>EFECTO DE MUTACION DE COLUMNA C12L</u>

El virus de vaccinia (VV) negativo quinasa timidina de Reserva Western ("TK-") fue modificado para suprimir C12L. La cepa de vaccinia de Reserva Western fue obtenida de VEI Resources (de Manassas, Virginia) y todos los virus de vaccinia recombinantes usados o construidos estuvieron basados sobre esta cepa.

Un mutante de supresión de virus careciendo de 40% de C12L ORF fue construido usando una selección dominante transiente Falkner & Moss, 1990, Diario de Virología 64(6) 3108-3111). Las células fueron infectadas con un WR de vaccinia tipo silvestre y simultáneamente se transfectaron con un plásmido conteniendo las regiones 3′ y 5′ del gen C12L. La recombinación se dejó que ocurriera y un marcador seleccionable se usó para determinar los eventos de recombinación. Los virus fueron titulados mediante ensayo de placa sobre células BSC-1, fabricados y purificados como se describió previamente en uso en vivo (Sampath, P y otros (2013) Mol. Ther., 21: 620-628).

Los ratones C57BL/6 llevando un tumor CMT-93 fueron administrados con unidades formadoras de placa de 5 x 10^8 (“PFU”) de virus WR no modificado o virus llevando la supresión C12L (WRΔC12L). Para probar lo específico del tumor del virus, la cantidad de virus en cerebro, hígado, pulmón y tumor fue evaluada a 1, 3 y 10 días después de la infección. Los resultados, en la figura 1A muestran que aun cuando aproximadamente en cantidades equivalentes de virus WR y

WRΔC12L se encontraron en el hígado, pulmón y tumor un día después de la infección, mediante diez días muy poco virus WRΔC12L se encontraron en un tejido sin tumor en relación a la cantidad encontrada en el tumor, con el diferencial en la expresión de tumor/no tumor siendo mucho menor para el virus WR no modificado.

Para evaluar el efecto de la mutación C12L en la supervivencia, los ratones C57BL/6 (comprados de The Jackson Laboratory (de Bar Harbor, ME) llevando tumores CMT-93 subcutáneos fueron tratados intravenosamente con una dosis única de 1 x 10^8 de unidades formadoras de placa de WR o de virus WRΔC12L, y después se vigilaron. Aun cuando todos los ratones recibiendo el virus WR habían muerto antes de 60 días posteriores a la infección, después de 70 días 50% de los animales WRΔC12L aún estaban vivos (Figura 1B).

Los animales fueron primero inmunizados con el virus WR o el virus WRΔC12L y las células-T de estos ratones (o ratones de control) fueron mezcladas con el virus WR y los niveles de producción IFN-γ fueron determinados mediante ELISA. Los resultados están mostrados en la figura 1C e indican que la supresión C12L resultó en una producción mayor de CTL o de IFN-γ produciendo esplenocitos.

7. EJEMPLO 2. <u>EFECTO DE TRATAMIENTO DE DEGLICOSILACIÓN</u>

Para probar el efecto de la modificación de la glicosilación de las proteínas de superficie viral, fueron removidos WR TK- Virus de viccinia, glicans N-enlazado y O-enlazado simple, por ejemplo ácido siálico, de dicha envoltura viral usando Sialidasa A (Glyko Sialidasa A, Código WS0042) o un coctail de N- y O-glicanasas y Sialidasa A (equipo de Deglicosilación Enzimática Glycopro, Código de Producto: GK80110, Prozyme). El protocolo de no-desnaturalización para la deglicosilación de un virus fue para tomar (i) 20 µl de un caldo de virus; (ii) agregar 17 µl de agua deionizada; (iii) agregar 10 µl de un amortiguador de reacción 5X; (iv) agregar 1 µl cada uno de N-Glicanasa, Sialidasa A y O-Glicanasa (o cualquier enzima sola usada con 19 µl de agua deionizada); y (v) incubar a 37°C por 16 horas antes del uso. La deglicosilación del virus fue confirmada por análisis de mancha Western (figura 2A).

El efecto de la deglicosilación sobre la inefectividad del virus fue evaluada en diferentes líneas de célula de tumor de ratón infectadas con TK- ("WR" o WR.TK-) o su versión deglicosilada ("TK- deglic, ""WR deglic" y "DS WR.TK-") a un MOI de 1. El HeLa (adenocarcinoma de cérvix humana), Bsc-1 (células de riñón normal de mono verde), 14eD (osteosarcoma humano), CV-1 (fibroblastos de mono verde), Renca (adenocarcinoma renal de ratón) y 4T1 (cáncer de pecho de ratón) las líneas de célula fueron obtenidas de una colección

de cultivo tipo Americano (Manassas, Virginia). Las células HEK293-mTLR2 fueron compradas de InvivoGen (de San Diego, California). Las líneas de células MC38 (adenocarcinoma de colon de ratón) y MEFs (fibroblastos embriónicos de ratón) fueron, respectivamente, una clase de regalo del Dr. David Bartlett y el Dr. Robert Sobol (Universidad del Centro de Cáncer de Pittsburgh). Todas las líneas de célula fueron mantenidas en el medio de cultivo recomendado conteniendo 5-10% de suero bovino fetal y antibióticos a 37°C, 5% de CO_2. La inefectividad viral fue determinada mediante el analizar una expresión de gen viral. La expresión de gen viral fue medida tres horas después de la infección mediante formación de imagen de bioluminiscencia de la expresión luciferasa in viro Para las células cultivadas, 10 µ de 30 mg/ml de D-luciferin (GoldBio, de St. Louis, Missouri) fueron agregados a 1 ml de medio de cultivo. Como se observó en la figura 2BV, la deglicosilación de la envoltura de virus no tuvo un efecto sobre la inefectividad del virus.

El efecto de deglicosilación sobre la activación TLR2 se evaluó en un sistema modelo el cual inhibe la activación NF-κB en células HEK293 diseñadas para expresar TLR2 (HEK293/mTLR2) y transfectadas con pNIFty, un plásmido reportero de TLR-señalamiento. El pNiFty (el plásmido-luciferasa reportero de señalamiento-TLR) fue obtenido de InvivoGen y se transfectó en células HEK293/mTLR2 usando el reactivo de transfección FuGENE

HD (Promega, de Madison, Wisconsin). Las células HEK293/mTLR2 fueron infectadas a un MOI de 1 con virus WR o WR deglicosilado y la activación TLR2 fue cuantificada 24 horas después de la infección mediante formación de imagen de bioluminiscencia. Como se muestra en la figura 2C, la deglicosilación del virus resultó en menos activación de TLR2 in vitro en comparación al virus que no fue deglicosilado. Además, como se puede ver en la figura 3A, el virus deglicosilado fue asociado con esencialmente menos activación de TLR2 que el virus WR.

El virus deglicosilado también exhibió mayor toma por los tumores. Para estos experimentos, el gen de luciferasa bajo el control del promotor de vaccinia sintética pE/L (Chakrabarti y otros (1997). Biotécnicas 23: 1094-1097) fue incorporado en el virus de vaccinia WR.TK- o DS WR.TK- ("WR.TK-Luc+" y "DS WR.TK-Luc+", respectivamente), y se introdujo intravenosamente en los ratones BALB/c (comprados a The Jackson Laboratory (de Bar Harbor, ME)) llevando el tumor subcutáneo 4T1. La expresión de gel viral en el tumor puede ser medida por formación de imagen de bioluminiscencia de la expresión de luciferasa en vivo. Para los modelos de animales, una dosis de 4.5 mg de D-luciferin se inyectó intraperitonealmente por ratón antes de la formación de imagen. Un modelo IVIS 2000 (PerkinElmer, Waltham, Maryland) fue usado para la formación de imagen y las imágenes fueron analizadas con el software LivingImage (PerkinElmer).

La figura 3B muestra que 24 horas después de la infección, hubo una expresión significativamente mayor de DS WR.TK-Luc+ virus en el tumor en relación a su contraparte glicosilada. Esta diferencia en la toma no fue observada en los tejidos sin tumor. La figura 3C muestra que la infección de virus deglicosilado resultó en un volumen de tumor más pequeño. En adición, los ratones BALB/c albergando xenoinjertos subcutáneos de células Renca (adenocarcinoma renal de ratón) fueron puestos al azar y se inyectaron con una dosis intravenosa única de $1x10^8$ de unidades formadoras de placa de virus de TK- o TK- deglicosilado. La cinética de la expresión de gen viral desde dentro del tumor fue vigilada por formación de imagen de bioluminiscencia de expresión luciferasa viral. Como se mostró en la figura 2E, la deglicosilación dela envoltura viral incrementó la expresión de gen en tumores en vivo.

El efecto de la deglisilación del virus en la presencia de linfocitos pSTAT1-pSTAT3+ fue analizada en ratones C57BL/6 inyectados intravenosamente con $1x10^7$ unidades formadoras de placa de WR o WR deglicosilado. Los bazos fueron cosechados de ratones C57BL/6 1 hora después de la inyección de los virus indicados y los esplenocitos fueron aislados, fijados en 1.6% de PFA y se permeabilizaron con metanol. Los análisis de inmunomanchado intracelular de 2-colores fueron llevados a cabo usando un Citómetro de Flujo LSRFortessa (BD Biosciences, de

San José, California). Los esplenocitos fueron manchados usando anticuerpos PacificBlue anti-ratón pSTAT1 y AlexaFluor647 antiratón pSTAT3 (BD Biosciences). El porcentaje de linfocitos pSTAT1-pSTAT3+ fue determinado mediante citometría de flujo, y los PBS y PAM(3)CSK(4) fueron usados como controles. La figura 2D muestra que la fosforilación STAT3 fue agotada en los linfocitos esplénicos de ratones inyectados con virus de vaccinia deglicosilada.

Para determinar la respuesta inmune en contra del virus en vivo, los ensayos de anticuerpo neutralizante fueron llevados a cabo. En breve, el suero conteniendo anticuerpo fue obtenido de ratones tratados como se indicó en el día 14 después de la inyección de virus y las diluciones en serie del suero (empezando a 1/20) fueron usadas para neutralizar 1000 unidades formadoras de placa de virus de vaccinia-TK. Las células $2x10^4$ HeLa fueron cubiertas por pozo en 96 pozos y se infectaron con una mezcla de suero-virus. En el cuarto día después de la infección, las placas fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfato y la absorbencia fue cuantificada después de manchar los cultivos usando un equipo de ensayo de proliferación de célula no radioactiva (Promega, de Madison, Wisconsin). Los valores IC_{50} (dilución del suero requerido para neutralizar el virus vaccinia capaz de inducir 50% de la inhibición de célula) fueron estimados de curva de respuesta de dosis por una regresión no lineal estándar, usando una ecuación

Hill adaptada. Como se mostró en la figura 3D, la cantidad de anticuerpo neutralizante en contra del virus es mayor en los ratones C57BL/6 tipo silvestre que en los ratones llevando una mutación de knockout TLR2. Por tanto, la activación TLR2 más baja asociada con el virus deglicosilado fue asociada con menos producción de anticuerpo anti-virus y una respuesta anti-tumor mejorada.

8. EJEMPLO 3. <u>EFECTO DE EXPRESIÓN TRIF</u>

El ratón codificando ácido nucléico TRIF fue introducido en el virus WR.TK- y su efecto sobre las células T fue evaluado. El TRIF fue expresado desde dentro del lugar de tiamidina quinasa, expresado desde el promotor p7.5 vaccinia temprana/tardía viral ("TK-TRIF" o "WR.TK-.TRIF"; figura 4A). Fue generado un virus WR.TK- teniendo un ratón codificando ácido nucléico DAI (DLM-1/ZBP1) expresado desde el p7.5 y clonado en el lugar del gen de timidina quinasa viral ("TK-DAI"; figura 4A).

Se llevó a cabo el procedimiento ELISA para confirmar la expresión de TRIF desde el virus TK-TRIF (figura 4B). Para ELISA, fue empleado un equipo de ratón TRIF ELISA para determinar la concentración de TRIF en supernadante o extracto de células de células infectadas con un MOI de 1 (unidad formadora de placa/célula) con TK-TRIF. Como se mostró en la figura 4B, el virus TK-TRIF específicamente expresó TRIF en

comparación a TK-. La mancha Western fue usada para confirmar la expresión de DAI desde el virus TK-DAI (figura 4C). Para el análisis de mancha Western, los cultivos de célula fueron sembrados en seis-placas de pozo y se infectaron a un MOI de 5 (unidades formadoras de placa/célula) y, 24 horas después de la infección, los extractos de proteína de célula completa fuero incubados en amortiguador de lisis de célula (Cell Signaling TEchnology Inc, de Danvers, Massachusetts) por una 1 hora a 4°C. Las muestras clarificadas (15 µg/línea) fueron separadas mediante 10% de gel SDS-PAGE transferidas a una membrana de nitrocelulosa. La proteína DAI de ratón fue detectada mediante membranas de inmunomanchado usando un anticuerpo primario anti-DAI policlonal (Rabbit, Abcam, de Cambridge, Massachusetts) y un anti-conejo policlonal conjugado con HRP (Cabra, Thermo Scioentific, Waltham, Massachusetts). Un anticuerpo anti-ß actin monoclonal de ratón (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, California) y un anticuerpo anti-ratón conjugado-peroxidasa (Cabra, Thermo Scientific) fueron usados para el inmunomanchado de ß-actin como un control de carga. Como se mostró en la figura 4C, el virus TK-DAI específicamente expresó DAI comparado a TK-.

Como se mostró en la figura 5A, la expresión de TRIF resultó en un aumento en la producción de interferón tipo I mediante linfocitos in vitro. La expresión de TRIF también aumentó la producción CTL en vivo, como se mostró por el ensayo ELISpot

(figura 5B). Para los ensayos ELISpot, los esplenocitos fueron preparados de ratones. Los esplenocitos fueron mezclados con células de tumor o esplenocitos previamente infectados con un virus de vaccinia UV-inactivado a una proporción de 5:1. Los esplenocitos inocentes de cada ratón fueron usados como un control. Las placas de filtro de membrana de 96 pozos (EMD Millipore, de Billerica, Massachussets) recubiertas con 15 µg/ml de anticuerpo IFN-γ anti-ratón monoclonal AN18 (Mabtech, Inc., de Cincinnati, Ohio) fueron usadas para los ensayos. Las células fueron mantenidas por 48 horas a 37°C y las manchas fueron detectadas usando 1 µg/ml de biotin R4-6A2 anticuerpo IFN-γ antiratón biotinalado (Mabtech). Las placas fueron develadas usando un equipo ABC y un equipo de sustrato AEC para la peroxidasa (Vector Laboratories, Inc., de Burlingame, California) Las manchas específicas fueron contadas y analizadas usando un analizador de inmunomancha y el software (CTL, Shaker Heights, Ohio).

El análisis de la liberación de citoquinas y quimioquinas in vitro y en vivo después de 24 horas después de la infección de TK-, TK-TRIF o TK-DAI (MOI de 1) fue llevado a cabo mediante ensayo Luminex. Para los supernadantes de cultivo de célula, fueron usados un equipo de Miliplex Ratón Citoquina Panel (5-plex) de Milipore (Billerica, Massachusetts) y un equipo de ensayo de Ratón 2-plex de Panomics (Redwood City, California). Para los lisados de tumor, un equipo de panel de 20-plex de

ratón de citoquina de Invitrogen (Carlsbad, California) se usó para determinar las concentraciones en tumores concentrados a 4 días después de la administración del virus de vaccinia. Los tumores fueron homogeneizados usando los tubos de Lysing Matrix D y el instrumento FastPrep-24. Como se mostró en las figuras 6A y C, las concentraciones de pIKKß. OÑ6. O¨1'. TNF-α e IFN-ß incrementaron significativamente con la infección con TK-TRIF en comparación a TK- en diferentes líneas de célula de tumor en comparación a TK-. En adición, los ratones BALB/c con xenoinjertos subcutáneos Renca establecidos se inyectaron con una dosis intravenosa única de $1x10^8$ unidades formadoras de placa por ratón de TK o de TK-TRIF fueron analizados para determinar la concentración intratumoral en vivo de citoquinas y quimioquinas. Después de 4 días de la inyección, los tumores fueron cosechados y la concentración de citoquinas varias y de quimioquinas fue determinada en los lisados de tumor mediante los ensayos luminex o ELISA. La figura 6D muestra que las concentraciones intratumorales de INF-γ, IL-12, IP-10, TNF-α, IL-1ß, GM-CSF y KC incrementaron significativamente en respuesta a TK-TRIF en comparación a TK-.

La activación de las trayectorias NF-κB e IRF3 fueron analizadas después de la infección con T-TRIF y TK-DAI. Los ensayos ELISA fueron utilizados para determinar las concentraciones de pIKKß y de IRF3 en extractos citoplásmico y nuclear, respectivamente, de células 4TI o MEF infectadas con

TK-, TK-TRIF o TK-DAI a un MOI de 1. Como se mostró en la figura 6A y B, TK-TRIF incrementó la activación de las trayectorias de señalamiento NF-κB e IRF3 como se observó por un aumento en la concentración de la expresión pIKKß y de IRF3 después de 24 horas posteriores a la infección. La figura 7A muestra la fosforilación de NF-κB incrementada después de la infección de TK-TRIF y de TK-DAI. Los HMGB1 y Hsp-70, los cuales funcionan como reguladores de NF-κB, también exhibieron la expresión alterada seguido de la infección de TK-TRIF (figuras 7B y 7C). La presencia de células CD4+ T auxiliar y de células CD8+ T citotóxicas fueron analizadas después de la infección con TK-, TK-TRIF. Como se mostró en la figura 7D y E, el número de células T-citotóxicas y de las células T-auxiliares fue mayor en los ratones infectados con TK-TRIF.

El análisis de la respuesta y actividad antitumor de TK-TRIF fue llevada a cabo en diferentes células de tumor de ratón. Las líneas de célula de tumor varias fueron infectadas con un MOI de 1 y la producción de virus fue medida mediante ensayo de placa ELISpot, como se describió previamente, a diferentes puntos de tiempo. Como se mostró en la figura 8A, la producción viral de ambos TK-TRIF y TK-DAI fue significativamente menor en las células Renca resistentes en comparación a TK-, pero la producción viral de TK-TIRF y de TK-DAI en las células MC38 y 4T1 fueron a niveles similares a TK- (véase también la figura 9A).

El análisis adicional de la expresión viral en tumores y volúmenes de tumor fue llevada a cabo en ratones BALB/c o C57BL/6 implantados con xenoinjertos MC38 o Renca, respectivamente, y los ratones BALB/c implantados con xenoinjertos 4T1. Los ratones BALB/c o C57BL/6 fueron inyectados con solución salina taponada con fosfato o $1x10^8$ unidades formadoras de placa de TK-, TK-TRIF o TK-DAI a través de la vena de la cola. Para el modelo casi-ortotópico 4T1, las células $2x10^5$ 4T1 fueron implantadas en la almohadilla grasa de la glándula mamaria de los ratones hembra BALB/c. La figura 8C mostró que la expresión de gen viral de TK-TRIF y TK-DAI estuvo a un nivel inferior en tumores de xenoinjertos Renca o MC38 implantados en ratones BALB/c o C57BL/6, respectivamente, comparado a la expresión de gel viral de TK-, la figura 9C muestra que la producción viral y la expresión viral de TK-DAI y de TK-TRIF fue reducida en tumores en comparación a la expresión viral de los virus TK- o TK- expresando GM-CSF ("TK-GMCSF"). Los ratones BALB/c con tumores Renca implantados subcutáneamente fueron tratados con una dosis IV de $1x10^8$ unidades formadoras de placa una vez que los tumores alcanzaron 50-100 mm^3. Los virus usados fueron WR.TK- y WR.TK-TRIF+ (o control de solución salina tamponada con fosfato). La respuesta del tumor subsecuente fue seguida la medición de calibre, y una reducción en crecimiento de tumor fue observada en ratones infectados con TK-TRIF (figura 5C y figura 8D). Una respuesta

similar fue observada en los ratones implantados con tumores MC48 (figura 8D) y tumores 4T1 comparado a tumores infectados con TK-GMCSF (figura 9D).

La citotoxicidad del virus modificado en comparación al TK-fue determinada mediante el llevar a cabo ensayos de citotoxicidad. Los ensayos de citotoxicidad fueron llevados a cabo mediante el sembrado de $2x10^4$ células por pozo en placas de 96 pozos en SMEM con 5% de FBS. Las células fueron infectadas con diluciones en serie empezando a un MOI de 75 y, en el día 4 después de la infección, las placas fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfato y la absorbencia fue cuantificada después de manchar cultivos usando un equipo de ensayo de proliferación de células no radioactiva (de Promega, Madison, Wisconsin). Los valores IC_{50} (unidad formadora de placa por célula requirió producir 50% de inhibición) fueron estimados de las curvas de respuesta a dosis mediante regresión no lineal estándar, usando la ecuación Hill adaptada. La figura 8B muestra la citotoxicidad comparativa de TK-TRIF y de TK-DAI en células infectadas con los virus indicados a dosis variando de 75 a 0.00025 unidades formadoras de placa/célula. La modificación del virus TK- para expresar TRIF o DAI no resultó en un cambio en la citotoxicidad en comparación a TK-. La determinación del número de células apoptóticas mediante manchado Annexin V, como se muestra en la figura 9B, indica que la infección de células Renca y 4T1 resultó en un aumento en

células apoptóticas. La evaluación de apoptosis/necrosis de las líneas de célula, las células fueron infectadas con un MOI de 1 con los virus indicados y se mancharon usando un Equipo de Detección de Apoptosis Annexin V-FITC (Abcam, Cambridge, Massachusetts) 48 horas después de la infección. Los análisis fueron llevados a cabo usando un Citómetro de Flujo Accuri C6 (BD Biosciences).

Os experimentos se llevaron a cabo para determinar si el TK-TRIF afecta la supervivencia de ratones con xenoinjertos MC38 o Renca en comparación a ratones tratados con TK- o solución salina tamponada con fosfato. Os xenoinjertos Renca o MC38 fueron establecidos en ratones BALB/C o C57BL/6, respectivamente, y se trataron con una dosis intravenosa única de $1x10^8$ unidades formadoras de placa de virus indicados o solución salina tamponada con fosfato. Como se muestra en la figura 9E y en la figura 9F, el TK-TRIF significativamente mejoró la supervivencia en comparación al tratamiento con TK-.

9. EJEMPLO 4. <u>EFECTO DE EXPRESIÓN TRIF Y DEGLICOSILACION COMBINADA</u>.

El virus TK- modificado para expresar TRIF, como se discutió arriba en 6.3, fue deglicosilado ("TK-TRIF deglic") para analizar el efecto tal como una combinación tendría sobre las

respuestas celulares anti-tumores y la eficacia anti-tumor del virus.

Para determinar la toxicidad del virus expresando TI-TRIF, el peso del cuerpo de los ratones BALB/C inyectados intravenosamente con solución salina tamponada con fosfato como un control o $1x10^8$ unidades formadoras de placa por ratón de TK-, TK-TRIF, o TK-TRIF deglicosilado fueron analizadas. Las figura 10A muestra que los ratones inyectados con TK fueron presentados con una reducción de más de 10% del peso del cuerpo al día 6 después de la inyección, mientras que los ratones inyectados con TK-TRIF y TK-TRIF deglic presentaron un perfil de peso similar que aquellos inyectados con solución de agua salina tamponada con fosfato, indicando que los TK-TRIF y TK-TRIF deglic son menos tóxicos que TK-.

La expresión de gen viral TK-TRIF-deglic en vivo, en comparación a TK- y TK-TRIF, fue analizada. Los tumores Renca fueron implantados en los ratones BALB/c y los ratones fueron inyectados con solución salía tamponada con fosfato o $1x10^8$ unidades formadoras de placa de TK-, TK-TRIF, o TK-TRIF deglic a través de la vena de la cola. La expresión de gen viral fue determinada mediante el detectar la expresión de luciferasa viral desde dentro de los tumores y medida como se indicó en los puntos de tiempo indicados. La figura 10B muestra que 24

horas después de la infección, hubo menos expresión de TK-TRIF y de TK-TRIF deglic en los tumores en comparación a TK-.

Los experimentos se llevaron a cabo para determinar si TK-TRIF o TK-TRIF deglic afectaron la supervivencia de los ratones con xenoinjertos Renca o MC38 en comparación a ratones tratados con TK- o solución salina tamponada con fosfato. Los xenoinjertos Renca o MC38 fueron establecidos en ratones BALB/C o C57BL/6, respectivamente, y se trataron con una dosis intravenosa única de $1x10^8$ de unidades formadoras de placa de los virus inyectados o de solución salina tamponada con fosfato. Como se mostró en la figura 10C y en la figura 10D, los TK-TRIF y TK-TRIF deglic significativamente mejoraron la supervivencia de los ratones en comparación al tratamiento con TK-. También, TK-TRIF deglic mejoró la supervivencia de ratones con los tumores de Renca en comparación con el tratamiento TK-GMCSF (figura 10E).

Las respuestas inmune celular al virus Vaccinia y a las células de tumor fueron evaluadas mediante ensayo IFN-γ ELISpot, como se describió arriba en la sección 6.3. En el día 7 después de la administración de virus, los bazos fueron cosechados de ratones inyectados intravenosamente con $1x10^8$ de unidades formadoras de placa de los virus indicados o solución salina tamponada con fosfato (ratones BALB/c llevando xenoinjertos Renca y se evaluaron respecto de la cantidad de CTLs

reconociendo el virus de Vaccinia o las células Renca. La figura 11A muestra que la deglicosilación y la expresión de TRIF resultó en un aumento significante en la producción de CTL reconociendo el virus de Vaccinia en vivo, en comparación a la modificación sola, por ejemplo TK-TRIF o TK-deglic. En particular, el virus deglicosilado expresando TRIF resultó en un aumento en la producción de CTL que es mayor que los aumentos en la producción de CTL observados por las modificaciones individuales. Adicionalmente, la figura 11B mostró que la deglicosilación y la expresión de TRIF resultó en un aumento en la cantidad de producción de CTLs reconociendo las células RENCA in vivo, en comparación a las modificaciones solas, por ejemplo TK-TRIF o TK-deglic.

Un ensayo neutralizante fue llevado a cabo para determinar los niveles de anticuerpo de anti-vaccinia circulante para ratones inyectados con $1x10^8$ unidades formadoras de placa de TK-, TK-TRIF o TK-TRIF deglicosilado. Los títulos Nabs fueron determinados mediante la dilución más alta de suero que resultó en por lo menos 50% de inhibición de la infección. La figura 11C mostró que la cantidad de anticuerpo neutralizante es mayor en los ratones C57BL/6 de tipo silvestre infectados con TK- en comparación a ratones infectados con TK-TRIF, TK-deglic o TK-TRIF- deglic. Los ratones infectados con TK-TRIF deglic mostraron la reducción mayor en la cantidad de anticuerpo neutralizante en el suero.

El efecto de TRIF expresando virus de glicosilado sobre el crecimiento de tumor fue analizado en ratones BALB/c llevando Renca o ratones C57BL/6 llevando xenoinjertos de tumor MC38. Para los xenoinjertos de tumor MC38 o Renca, las líneas de célula de tumor fueron implantadas subcutáname3nte a $5x10^5$ células por ratón en ratones BALB/c o C57BL/6, respectivamente. Cuando el tumor alcanzó ~50-100 mm^3, los ratones fueron tratados con una dosis intravenosa única de los virus indicados ($1x10^8$ unidades formadoras de placa/ratón) en la vena de la cola. El crecimiento de tumor fue vigilado mediante medición de calibre y fue definido por la ecuación $V(mm^3)=\pi/6 \times W \times L$, en donde W y L son el ancho y la longitud del tumor, respectivamente. Los datos fueron expresados como tamaño de tumor relativo al comienzo de la terapia, la cual se estableció como 100%. Sorprendentemente, el virus TK-TRIF deglicosilado resultó en una reducción mayor en el tamaño de tumor de ratones llevando xenoinjerto MC38 y RENCA en comparación al efecto aditivo de las modificaciones individuales combinadas o del virus TK (figuras 11D y E). Además, el TK-TRIF deglicosilado exhibió una actividad anti-tumor mejorada en comparación a TK-GMCSF, como se observó mediante una reducción significante en el tamaño de tumor en los ratones BALB/c albergando xenoinjertos Renca (figura 11F) o tumores subcutáneos 4T1 en ratones BALB/c (figura 9D). Por tanto, el virus de vaccinia TK- deglicosilado expresando TRIF exhibe una respuesta anti-

tumor significativamente mejorada y resulta en una reducción en la producción de anticuerpo anti-virus.

10. EJEMPLO5. <u>EFECTO DE EXPRESION TRIF COMBINADA, DESILILACION Y SUPRESION C12L EN UPCI-1812.</u>

En las modificaciones anteriores, a saber supresión C12L, la de-sialilación, y la introducción de TRIF fueron incorporados juntos para crear una nueva cepa de virus de vaccinia UPCI-1812, y el efecto de este virus triplemente modificado fue evaluado por su efecto terapéutico e inmunológico. Como se mostró en la figura 12A, la infección UPCI-1812 resultó en una supervivencia significativamente mejor que WR.TK- codificando GM-CSF. En relación al virus de-sialilatado con la supresión C12L ("vvDD"), UPCI-1812 produjo niveles significativamente superiores de gama interferón (IFN-γ) (figura 12B) e interlucin-12 (IL-12) (figura 12C).

11. EJEMPLO 6. <u>EFECTO DE FOCALIZACON PGE1</u>

Las terapias virales oncolíticas han finalmente comenzado a demostrar eficacia clínica en estudios al azar resaltando el potencial real de la plataforma. Sin embargo entre la generación actual de vectores clínicos, aquellos que se encontraron como más exitosos han expresado una citoquina activante inmune (GM-CSF), reforzando una plétora de datos pre-

clínicos indicando que la respuesta inmune es un mediador clave en la efectividad viral. Sin embargo, a pesar de esta observación aún no está claro cómo o porqué algunos pacientes responden bien y otros aparecen resistentes a la viroterapia oncolítica.

Los experimentos iniciales fueron llevados a cabo para correlacionar la sensibilidad in vitro de una célula de tumor a la infección viral y la replicación con respuestas en vivo de la misma línea de célula cuando se usó para formar tumores singenéicos en ratones inmunocompetentes. 14 líneas de célula de ratón de tumor de diferentes tipos de tumor y cepas de ratón fueron analizados in vitro mediante el infectar las líneas de células con TK- (figura 26A). La producción viral y la expresión de gel viral fue observada en las 14 líneas de célula de ratón de tumor diferentes. La producción viral fue analizada mediante el sembrado de $2x10^5$ células en placas de 24 pozos seguido por la infección a un MOI de 1 (unidad formadora de placa/célula) con los virus de vaccinia indicados. Cuatro horas después de la infección, los cultivos fueron lavados dos veces con solución salina tamponada con fosfato y se incubaron en un medio libre de virus fresco. En los puntos de tiempo indicados después de la infección, los cultivos fueron cosechados y congelados-descongelados tres veces para obtener el extracto de célula (CE). Los títulos virales fueron determinados mediante ensayo de placa en células BSC-1.

Siete de las 14 líneas fueron además probadas en vivo usando la inyección intratumoral directa de TK- (figura 13A y figura 13B y figuras 26A y B). La inyección intratumoral directa fue usada para reducir la variabilidad que puede ocurrir debido a diferencias en la entrega viral. Como se mostró en la figura 13A y en la figura 13B ninguna correlación directa fue observada entre ya sea la replicación viral o la destrucción de célula mediada-viral y el efecto anti-tumor en vivo, indicando factores distintos a los efectos anti-tumor mediados con actividad oncolítica directa.

La vaccinia oncolítica expresando luciferasa fue usada durante estos experimentos para permitir el análisis de la expresión de gen viral con el tiempo en ratones invididuales (como un subrogado para la replicación viral y la persistencia viral) y se permitió la comparación a respuesta subsecuente. Dos patrones distintos parecieron surgir de los datos. Para los modelos de tumor más resistentes, definidos como terapia viral aumentando la supervivencia general por menos de 2 semanas, como se ve con el Renca, B16, PAN02 y 4T1, una correlación directa puede deducirse dentro de cada modelo de tumor individual, de manera que el nivel de la expresión de gen viral de 24h correspondió a la respuesta subsecuente (figura 13B). Por tanto, aún a través de la replicación in vitro no correlaciona con la actividad en vivo cuando se comparan

modelos de tumor (presumiblemente debido a la influencia de factores tal como ECM y células de no-tumor en el tumor), dentro de uno cualquiera del modelo de tumor individual hay una correlación entre la expresión de gen viral temprana y la respuesta subsecuente. Sin estar unido a una teoría particular, parece que la replicación viral y la actividad oncolítica directa es el mediador clave de la respuesta limitada a los modelos de tumor más resistentes. Sin embargo, un patrón diferente es observado en tumores que respondieron bien a la terapia viral, los cuales incluyen los modelos de tumor AB12, LLC, MC38. En estos modelos, los mejores respondedores dentro de cada modelo demostraron un despeje rápido y robusto del virus después de la infección inicial y la replicación temprana (figura 13B y figura 27). Este despeje robusto sugiere la inducción de una fuete respuesta inmune a mejorar los efectos oncolíticos directos virales en los modelos de tumor que responden mejor.

A fin de examinar esta observación en mayor detalle, dos modelos de tumor en el mismo antecedente genético, fueron escogidos inicialmente por exhibir respuestas comparables después del tratamiento viral en vivo, pero solo uno de los cuales (LLC) exhibió indicaciones de una inducción inmune robusta (despeje viral temprano) y una destrucción de célula mediada-viral limitada in vitro (figura 13B y figura 26A y figura 26B). El otro (B16) fue más sensible a la destrucción

viral in vitro, y cualquier respuesta en vivo apareció como se correlaciona con la expresión de gen viral temprana (figura 13B y figura 26A y figura 26B). Un examen comprensivo de la activación de los marcadores inmunes sistémicos después de la infección viral fueron comparados entre ratones sin tumores, ratones con tumores B16 y ratones con tumores LLC. Estos incluyeron marcadores de activación de señalamiento innato tempranos tal como pS6, pSTATl, pSTAT3, pSTAT5 en diferentes poblaciones de célula (figura 13C y figura 14A), los marcadores de proliferación de célula-T tal como pS6 y Ki67 (figura 14A) y los marcadores de activación tal como CD44 y CD62L (figura 14A) y respuestas anticuerpo neutralizantes (figura 14D). Las diferencias menores fueron vistas en la respuesta inmune sistémica a la terapia viral entre los animales llevando tumor y los animales no llevando tumor, con una excepción siendo la fosforilación de pS6 en algunas células mieloide tempranamente después de la inye3cción (figura 13C). Los niveles de pS6 fueron observados como que se redujeron en los animales llevando tumor, pero la reducción en la activación inmune fue más pronunciada en los ratones llevando tumor B16 (figura 13C y figura 14A). Esto fue verificado en otros modelos de tumor, de nuevo confirmando que los niveles de pS6 fueron reducidos en los modelos de tumor más resistentes (incluyendo 4T1 y RENCA), indicando un defecto en la respuesta de célula dendrítica (DC) la cual puede medir la resistencia en estos ratones (figura 13C).

Como hay muy pocas diferencias observadas en la respuesta inmune sistémica, los efectos de más supresión inmune localizada dentro del tumor fueron examinadas. Las diferentes células inmune están asociadas con fenotipo supresivo, incluyendo células supresoras derivadas de mieloide (MDSC) y células-T regulatorias (T-regs) (y M2 macs). El nivel de estos tipos de célula diferentes en ambos el bazo y el tumor de todos los modelos de tumor en comparación a los animales no tratados fue analizado. Para la evaluación de poblaciones inmunes en tumores, los tumores fueron cosechados de ratones tratados como se indicó y se disgregaron mecánicamente y se digirieron con una mezcla de enzima triple (Colagenasa tpo IV, Dnase tipo IV, y Hialuronidasa tipo V (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri)). Los análisis de inmunomanchado de superficie de célula de cuatro-colores se llevaron a cabo usando un Citómetro de Flujo Gallios (Beckman Coulter, Inc., Brea, California). Las células de tumor-disgregadas fueron manchadas usando PE-Cy7 anti-ratón CD3 (BD biosciences, San José, California), FITC anti-ratón CD4, PerCP-Cy5.5 anti-ratón CD8, y PE anti-ratón CD 25 (eBioscience, San Diego, California).

El nivel de MDSCs encontrado en el tumor para diferentes modelos de tumor se correlacionó cercanamente con la resistencia o sensibilidad de ese modelo a la terapia viral (figura 15A y B y figura 16). Por ejemplo, Renca, el cual

exhibe resistencia a la terapia viral, resultó en tumores con niveles MDSC altos. La figura 17A muestra el número de MSSC en tumores no tratados como una función de supervivencia incrementada después del tratamiento intravenoso con 1e8 de unidad formadora de placa de Wr.TK- por un número de varios sistemas de modelo de tumor. Las cepas de vaccinia exhiben una habilidad muy pobre para aumentar la supervivencia en modelos de tumor de ratón que exhiben niveles altos de MSSC en la línea de base. Las células de cada una de las líneas de célula de modelo de tumor listadas (figura 17A) fueron implantadas en ratones inmunocompetentes cinegénicos. Los ratones fueron entonces ya sea sacrificados a fin de determinar el nivel de línea de base promedio de MSSC de los tumores resultantes para cada modelo o los ratones fueron tratados con WR.TK- (o control de solución salina tamponada con fosfato) (1e8 unidades formadoras de placa dadas intratumoralmente) y el aumento en la expectación de vida (por 50% de supervivencia) determinado después del tratamiento (en días) la gráfica traza “números MDSC relativos en tumores en la línea de base” en contra de “aumento medio en supervivencia después de tratamiento Wr.TK- (relativo a control no tratado)”. Más MDSC en la línea de base se correlacionó con una efectividad reducida de terapia.

Los cambios adicionales que ocurrieron en el tumor después de la terapia viral fueron examinados y se observó que para múltiples modelos de tumor, tal como 4T1, RENCA y MC28, la

adición de terapia de vaccinia resultó en una pérdida de T-reg, pero los niveles MDSC no fueron afectados y continuó el aumento con el tiempo, como lo hizo en los grupos de control (figuras 15A y figuras 16A y B). La terapia viral redujo los niveles de T-reg en tumores tratados pero no tuvo impacto sobre los niveles MDSC. En modelo de tumor RENCA (implantado subcutáneamente en ratones BALB/c) los números relativos de T-regs o MDSC en el tumor/mg de tumor fueron determinados a diferentes momentos antes o después del tratamiento Wr.TK- (1e8 unidad formadora de placa dada intratumoralmente) figuras 17B y C). Aparece por tanto que la inhabilidad de la vaccinia oncolítica para focalizar MDSC redujo su actividad terapéutica en algunos tumores en donde los niveles de MDSC son altos. En los tumores con niveles de antecedentes bajos de MDSC (MC38), la terapia viral también se encontró que mejora el nivel de células-T CD8+ en el tumor, mientras que los modelos de tumor más resistentes (4T1) no exhibieron ningún aumento (figura 15B).

El análisis de la cepa de vaccinia inmunogénica GM-CSF, la cual expresa el factor estimulante de colonia citoquina (CSF) se llevó a cabo. El GM-CSF había previamente mostrado resultar en respuestas químicas dramáticas y también se había asociado con la proliferación MDSC. Las figuras 18 y 19 muestran que aun cuando más cepas de vaccinia inmunogénica (WR.TK-GMCSF y WR.B18R-IFNP+) mejoraron adicionalmente algunos aspectos de la

respuesta inmune a los modelos de tumor sensibles, tal como el reducir además T-reg y aumentar los niveles de CD8+ T-célula, tal ventaja no se ve en los modelos de tumor de otra manera resistentes. Sin desear estar unido a una teoría particular, parece que la diferencia principal entre los tumores sensibles y resistentes se relaciona a la incapacidad del virus a inducir un efecto inmunoterapéutico robusto en tumores con altos niveles de supresión inmune mediada MDSC dentro del microambiente de tumor.

Los reportes recientes han identificado la producción mediada COX2 de la prostaglandina PGE2 como una clave determinante de infiltración MDSC y el mantenimiento de fenotipo MDSC. Dos acercamientos se usaron para focalizar esta trayectoria. Un acercamiento fue a través de la aplicación de un inhibidor COX2. El segundo acercamiento fue la expresión de HPGD enzima degradación-prostaglandina directamente desde los virales. Un ácido nucléico codificando la hidroxiprostaglandina dehidrogenasa 15 (HPGD(, una enzima de ratón que degrada PGE2, fue introducida en WR.TK- mediante inserción en el lugar de quinasa timidina mediante recombinación homóloga, y bajo control del promotor p7.5 viral ("TK-HPGD" o "WR.TK-.HPGD"). Como se mostró en la figura 20, el HPGD fue expresado específicamente desde TK-HPGD y redujo significativamente los niveles PGE2 en células Renca infectadas con TK-HPGD. Como se mostró en la figura 25, parece que la infección con WR.TK-

puede ocurrir después de la expresión COX2 en los tumores localmente en el sitio de infección, sin producir niveles significantes de expresión COX2 en general en el tumor, o el virus puede selectivamente replicar en regiones con niveles de COX2 bajos. Los experimentos iniciales in vitro y en vivo determinaron que aún a niveles tóxicos, los inhibidores COX2 fueron incapaces de reducir los niveles PGE2 a cualquiera cerca del nivel logrado con la expresión HPGD (figura 20).

La vaccinia oncolítica expresando HPGD fue entonces probado en varios niveles de tumor de ratón. Se vio que el número de células MDSC en el tumor fueron reducidas rápidamente y significativamente en el bazo y los tumores después del tratamiento con WR-TK-HPGD solamente (figura 21 y figura 23A-D).La inclusión de HPGD también se encontró que redujo MDSC en el tumor y el bazo en relación al virus WR.TK- no modificado. Esto fue específico para tumores, sin toxicidad sistémica vista (figura 21A). Interesantemente, el TK-HPGD también indujo una reducción más rápida y robusto números T-reg en el tumor. Como se mostró en la figura 21B y en la figura 21C y en la figura 22, la infección con WR-TK-HPGD se correlacionó con un efecto terapéutico mejorado en varios modelos de tumor de ratón en vivo y resultó en volúmenes de tumor más bajos. De nota, el modelo de tumor que fue previamente más resistente a terapia viral, RENCA, el cual exhibió un fenotipo “solo oncolítico” y niveles de línea de base alta de MDSC, sorprendentemente

exhibió el aumento más rápido en beneficio terapéutico después de la supresión de la expresión HPGD (figura 21B).

Los patrones de expresión de gen viral también fueron comparados respecto de WR.TK-y WR.TK-HPGD en el tumor RENCA. Se vio que mientras que para WR.TK- fue visto un fenotipo "solo oncolítico" (expresión de gen más alto en 1 día se correlacionó con el beneficio terapéutico mayor) WR.TK-HPGD+ exhibió el fenotipo "oncolítico e inmunoterapéutico" con los mejores respondedores exhibiendo un despeje robusto y rápido del virus por el día 5 (figura 21D). Sin estar unido a una teoría particular, parece que la expresión HPGD es capaz de regresar la actividad inmunoterapéutica del vector en estos modelos más resistentes, y de esta manera sensibilizar los tumores de otra manera resistentes a la terapia viral oncolítica. Esto fue a pesar de que no hubo una pérdida general en potencial oncolítico de la expresión HPGD.

El análisis de los mecanismos mediando las ventajas terapéuticas vistas con WR.TK-HPGD+se llevó a cabo. En el día 3 después del tratamiento, mediante cuyo tiempo los niveles de MDSC y T-regs ya habían sido dramáticamente reducidos dentro del ambiente de tumor, se notó que solo cambios modestos ocurrieron en los niveles de citoquinas y quimioquinas en el tumor (figura 24A). Sin embargo, el nivel de quimioquinas en el suero cambió marcadamente (figura 24B). En particular, las

quimioquinas asociadas con la atracción de células-t activadas, incluyendo CCL5 fueron no reguladas, mientras que CXXL12 (sdf-1, asociado con un fenotipo inmunosupresor y prognosis pobre) se había reducido dramáticamente (figuras 24A y B). Este cambio en el efecto de quimioquina sistémico puede ser responsable para la mediación de los cambios en el repertorio de célula inmune en el tumor. Esto fue además examinado usando un ensayo de tumor bilateral, en donde un tumor fue inyectado con WR.TK- y el tumor sobre el flanco opuesto fue inyectado con WR.TK-HPGD. Se vio que las células-TK activadas traficaron significativamente más a el tumor expresando HPGD (figura 24D). Además, en los puntos de tiempo últimos se vio que la expresión WR.TK-HPGD resultó en niveles dramáticamente incrementados de CTL enfocando-tumor en el bazo. Estos datos indican que la expresión de PPGD está actuando para no solo limitar el ambiente supresor dentro del tumor, sino también mejorando la atracción de células-T llevando a una respuesta inmune adaptiva anti-tumor más robusta. Además, la incorporación de PHGD en UPCI-1812 resultó en un virus el cual inhibió el crecimiento de tumor significativamente más que UPCI-1812 (“combinado”; figura 28). Como se mostró en la figura 18, el virus combinado resultó en una reducción mayor en el crecimiento de tumor que el efecto aditivo del virus UPCI-1812 y el virus VV-HPGD. El enfocado mediado-viral de PGE2 fue capaz de superar la supresión inmune localizada llevando a cambios profundos en el

microambiente de tumor y resultando en la sensibilización de tumores resistentes previamente a la terapia viral.

13. EJEMPLO 7. MODIFICACION QUE INCREMENTA LA ACTIVIDAD Y EL ESPARCIMIENTO.

La figura 29 muestra el nivel de anticuerpo neutralizante anti-vaccinia presente en el suero de ratones vacunados con (1e4 unidades formadoras de placa) de ya sea WR o WR con una mutación de punto de mejoramiento EEV en el gen viral A34R (Lys151 a Glu). La cepa mutante A34R produce menos anticuerpo neutralizante anti-vaccinia en comparación a WR-.

14. REFERENCIAS

1. Guo, Z.S., Thorne, S.H. & Bartlett, D.L. Viroterapia Oncolítica: Objetivos moleculares en replicación selective de tumor y entrega mediada de célula portadora de virus oncolítico. Biochim Biophys Acta (2008).

2. Kirn, D.H. & Thorne, S.H. Virus de viruela oncolíticos armados y enfocados: una clase terapéutica multi-mecanística novedosa para cáncer. Nat Rev Cancer 9, 64-71 (2009).

3. Kirn, D., Martuza, R.L. & Zwiebel, J. Viroterapia selective-replicación para cáncer: principios biológicos, manejo de riesgo y direcciones futuras. 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. Terapia oncolítica e inmunológica armada sistémica para cáncer con JX-54, un virus de viruela enfocado expresando GM-CSF. Mol Ther 14, 361-70 (2006).

5. Kirn, D.H., Wang, Y., Le Boeuf, F., Bell, J. & Thorne, S.H. Enfoque de interferon-beta para producir un virus de vaccinia oncolítico multi-mecanístico específico. 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. Selección de cepa racional y diseño crea un espectro amplio, de virus de viruela oncolítico sistemáticamente efectivo, 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. Terapia de cáncer sistémico con virus de vaccinia selective-tumor careciendo de

imidina quinasa y genes de factor de crecimiento de vaccinia. 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. El tumor incrementado selectivamente de una vaccinia oncolítica careciendo de rango de anfitrión y genes anti-apoptosis SPI-1 y 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. Entrega de gen específica de tumor usando virus de vaccinia recombinante y en un modelo de conejo de metástasis de hígado. 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. Erradicación de tumors de seno humano sólidos en ratones desnudos con un virus de vaccinia oncolíitica emitiendo luz inyectado intravenosamente. Cancer Res 67, 10038-46 (2007).

11. Yu, Y.A., Shabahang, S., Timiryasova, T.M., Zhang, Q., Beltz, R., Gentschev, I. , Goebel, W. & Szalay, A.A. Visualización de tumors y metástasis en animales vivos con bacterias y virus de vaccinia codificando proteína emisora de luz. 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. Uso de virus de viruela oncolítico enfocado, JX-594, en pacientes con cáncer de hígado metástico o primario refractario: una fase I ensayo. 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. Entrega intravenosa de virus de viruela oncolítico enfocado-cáncer multi mecanístico en humanos. Naturaleza. 477, 99-102 (2011).

14. Schmidt, C. Amgen da interés en vacunas de virus vivo para cánceres difíciles de tratar. Biotecnología de Naturaleza 29, 295-6 (2011).

15. Coffin, R. Actualizaciones Clínicas con HSV oncolístico en la Séptima Conferencia de Virus Oncolítico Internacional (Ciudad de Quebec, 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. Ensayo Clínico de fase II de un virus de herpes oncolítico segunda generación codificando-factor estimulante-colonia macrófago-granulocito en pacientes con melanoma metástico no seleccionable. 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. Un mutante adenovirus que replica selectivamente en células de tumor humano p53-deficiente. Ciencia 274, 373-6 (1996).

18. Khuri, F., Nemunaitis, J., Ganly, I., Gore, M., MacDougal, M., Tannock, I., Kaye, S., Hong, W. & Kirn, D. Un ensayo controlado de Onyx-015, un adenovirus suprimido-gen E1B, en combinación con quimioterapia en pacientes con cáncer de cuello y cabeza recurrente. Naturaleza Medicina 6, 879-885 (2000).

19. Garber, K. China aprueba la primera terapia de virus oncolítica del mundo para tratamiento de cáncer. Diario del Instituto Nacional de Cáncer Inst 98, 298-300 (2006).

20. Liu, T.C., Hwang, T., Park, B.H., Bell, J. & Kirn, D.H. El virus de viruela oncolítico enfocado JX-594 demuestra actividades antitumoral, antivascular y anti-HBV en pacientes con carcinoma hepatocelular. 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. Vaccinia oncolítica e inmunoterapéutica induce lisis de célula de cáncer dependiente-complemento mediada-anticuerpo en humanos. Medicina traslacional Ciencia 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. Definición de una terapia de célula inmune mejorada en ratones que pueden enfocar células de linfoma del tipo vástago. Investigación de Cáncer 70, 9837-45 (2010).

23. Yang, Y., Huang, C.T., Huang, X. & Pardoll, D.M. Señales receptoras de tipo persistente se requieren para invertir intolerancia CD8 mediada-célula T regulatoria. Inmunología Naturaleza 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. Tratamiento sistémico de xenoinjertos con virus de vaccinia GLV-1h68 revela faceta inmunológica de terapia oncolítica. BMC genómicos 10, 301 (2009).

25. Thorne, S.H., Liang, W., Sampath, P., Schmidt, T., Sikorski, R., Beilhack, A. & Contag, C.H. Supresión inmune localizada enfocada dentro de ciclos de repetición a través de tumor de terapia de combinación de virus oncolítico-célula inmune. Terapia Molecular: el diario de la Sociedad Americana de Terapia de Gen 18, 1698-705 (2010).

26. Thorne, S.H. Terapia biológica de mejoramiento a través de regulación condicional de estabilidad de proteína. Revisiones Expertas en medicina molecular 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. Tratando tumors con Virus de Vaccinia Expresando IFNbeta Illustra las relaciones complejas entre la habilidad oncolítica y la inmunogenicidad. Terapia Molecular : el diario de la Sociedad Americana de Terapia de Gen (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.

Actividad Antitumor mediada-inmune de reovirus es requerida para terapia y es independiente de replicación y oncolisis viral directa. Clin Cancer Res 15, 4374-81 (2009).

29. Banchereau, J. & Palucka, A.K. Células dendríticas como vacunas terapéuticas en contra del cáncer. Nat Rev Immunol 5, 296-306 (2005).

30. Nestle, F.O., Tonel, G. & Farkas, A. Vacunas de Cáncer : la siguiente generación de herramientas para vigilar la respuesta inmune anticancer. PLoS Med 2, e339 (2005).

31. Rosenberg, S.A., Yang, J.C. & Restifo, N.P. Inmunoterapia de Cáncer: moviéndose más allá de vacunas actuales. Nat Med 10, 909-15 (2004).

32. Banaszynski, L.A., Sellmyer, M.A., Contag, C.H., Wandless, T.J. & Thorne, S.H. Control Químico de estabilidad de proteína y function en ratones vivos. Nat Med (2008).

33. Rommelfanger, D.M., Wongthida, P., Diaz, R.M., Kaluza, K.M., Thompson, J.M., Kottke, T.J. & Vile, R.G. Combinación sistémica de viroterapia para melanoma con virus de Estomatitis vesicular expresando antígeno al tumor y transferencia de T-célula adoptive. Investigación de Cáncer (2012).

34. Thorne, S.H. Potencial inmunoterapéutico de virus de vacuna oncolítica. Investigación Inmunológica 50, 286-93 (2011).

35. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. & Sakaguchi, S. Mantenimiento homeostático de naturaleza Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) células reguladoras T mediante interleukin (IL)-2 e induccion de enfermedad autoimmune mediante neutralización IL-2. El Diario de la Medicina Experimental 201, 723-35 (2005).

36. Enzler, T., Gillessen, S., Manis, J.P., Ferguson, D., Fleming, J., Alt, F.W., Mihm, M. & Dranoff, G. Deficiencias de GM-CSF y la inflamación de enlace gama de interferon y cáncer. El diario de Medicina Experimental 197, 1213-9 (2003).

37. Jinushi, M., Nakazaki, Y., Dougan, M., Carrasco, D.R., Mihm, M. & Dranoff, G. Toma mediada de MFG-E8 de células apoptóticas mediante enlaces APCs las actividades pro y antiinflamatorias de GM-CSF. El Diario de Investigación Clínica 117, 1902-13 (2007).

38. Lemoine, F.M., Cherai, M., Giverne, C, Dimitri, D., Rosenzwajg, 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. Expansión masiva de células-T regulatorias seguido por el tratamiento de interleukin 2

durante una inmunoterapia a base de célula dendrítica fase I-II de cáncer renal metástico. Diario Internacional de Oncología 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. La administración de interleukin-2 altera el conjunto de CD4+FOXP3+ célula-T y el tráfico de tumor en pacientes con carcinoma de ovario. Investigación de Cáncer 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. Identificación de un Nuevo subconjunto de células supresoras de mieloide en sangre periférica de pacientes de melanoma con modulación mediante una vacuna antitumor a base de factor y estimulación-colonia macrófago-granulocito. Diario de Oncología Clínica : diario oficial de la Sociedad Americana de Oncología Clínica 25, 2546-53 (2007).

41. Smith, G.L., Symons, J.A., Khanna, A., Vanderplasschen, A. & Alcami, A. Evasión inmune de virus de vaccinia. Immunol Rev 159, 137-54 (1997).

42. Smith, G.L., Symons, J.A. & Alcami, A. Modulación inmune mediante proteínas secretadas de células infectadas por virus de vaccinia. Arch Virol Suppl 15, 111-29 (1999).

43. Symons, J.A., Alcami, A. & Smith, G.L. Virus de vaccinia codifica un tipo soluble de receptor de interferon tipo I de estructura novedosa y especificación de especies amplias. Célula 81, 551-60 (1995).

44. Iwasaki, A., Stiernholm, B.J., Chan, A.K., Berinstein, N.L. & Barber, B.H. Respuestas CTL mejoradas medidas mediante inmunogenes AND plásmido codificando moléculas coestimulatorias y citocinas. Diario de Inmunología 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. Estudio piloto de vacunación con vacunas a base de CEA-MUC-1-TRICOM recombinante viruela viral en pacientes con carcinoma metástico. 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. Las moléculas de adaptador receptor de tipo Toll

mejora las respuestas inmunes adaptivas ADN elevadas en contra de la influenza y tumores a través de la activación de inmunidad innata. Diario de Virología 80, 6218-24 (2006).

47. Sasaki, S., Amara, R.R., Yeow, W.S., Pitha, P.M. & Robinson, H.L. Regulación de respuestas inmunes de AND-elevada mediante factores regulatorios de interferón cotransfectado. Diario de Virología 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. Mecanismos alternos de respuestas inmunes diferencial de impulsion de reconocimiento de patrón inicial con virus de viruela Relacionados. Anfitrión de Célula y microbio 8, 174-85 (2010).

49. Zhu, J., Martinez, J., Huang, X. & Yang, Y. Inmunidad innata en contra de virus de vaccinia es mediada mediante TLR2 y requiere la producción independiente de TLR de beta-IFNi. Sangre 109, 619-25 (2007).

50. Samuelsson, C, Hausmann, J., Lauterbach, H., Schmidt, M., Akira, S., Wagner, H., Chaplin, P., Suter, M., O'Keeffe, M. & Hochrein, H. Supervivencia de infección de virus de viruela

letal en ratones depende de TLR9, y vacunación terapéutica proporciona protección. J Clin Invest 118, 1776-84 (2008).

51. Hennessy, E.J., Parker, A.E. & O'Neill, L.A. Enfoque de receptores tipo Toll: terapéuticas emergentes? Revisiones de naturaleza. Descubrimiento de Droga 9, 293-307 (2010).

52. O'Neill, L.A., Bryant, C.E. & Doyle, S.L. Enfoque terapéutico de receptores tipo Toll para infecciones y enfermedades inflamatorias y cáncer. Revisiones farmacológicas 61, 177-97 (2009).

53. Fukata, M. & Abreu, M.T. Rol de receptores tipo Toll en enfermedades gastrointestinales. Oncogen 27, 234-43 (2008).

54. Chen, R., Alvero, A.B., Silasi, D.A., Steffensen, K.D. & Mor, G. Cánceres toman la function-Toll y regulación de receptores de tipo Toll en células de cáncer. Oncogen 27, 225-33 (2008).

55. Sautes-Fridman, C, Cherfils-Vicini, J., Damotte, D., Fisson, S., Fridman, W.H., Cremer, I. & Dieu-Nosjean, M.C. Microambiente de tumor es multifacetado. Metástasis de cáncer revisiones 30, 13-25 (2011).

56. Rakoff-Nahoum, S. & Medzhitov, R. Receptores tipo Toll y cáncer. Revisiones de naturaleza. 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. Señalamiento NF-kappaB defectuoso en células de cáncer de cuello y cabeza metástico lleva a apoptosis incrementada mediante ARN de doble cepa. Investigación de cáncer 72, 45-55 (2012).

58. Cheng, Y.S. & Xu, F. Función den contra del cáncer de ácido poliinosinico-policitidílico. Biología y terapia de cáncer 10, 1219-23 (2011).

59. Longhi, M.P., Trumpfheller, C, Idoyaga, J., Caskey, M., Matos, I., Kluger, C, Salazar, A.M., Colonna, M. & Steinman, R.M. Células dendríticas requieren una respuesta de interferón tipo I sistémico para madurar e inducen una inmunidad CD4+ Thl con poli IC como auxiliar. El diario de medicina experimental 206, 1589-602 (2009).

60. Trumpfheller, C, Caskey, M., Nchinda, G., Longhi, M.P., Mizenina, O., Huang, Y., Schlesinger, S.J., Colonna, M. & Steinman, R.M. El poli IC mímico microbial induce inmunidad de CD4+ T célula protectora y duradera junto con una vacuna enfocada de célula dendrítica. Procedimientos de la Academia

Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América 105, 2574-9 (2008).

61. Kalinski, P., Hilkens, CM., Wierenga, E.A. & Kapsenberg, M.L. Células dendríticas polarizadas tipo 1 y tipo 2 mediante imprimación de célula-T: el concepto de tercera señal. Inmunología hoy 20, 561-7 (1999).

62. Mailliard, R.B., Wankowicz-Kalinska, A., Cai, Q., Wesa, A., Hilkens, CM., Kapsenberg, M.L., Kirkwood, J.M., Storkus, W.J. & Kalinski, P. Células dendríticas polarizadas alpha-tipo-1: una herramienta de inmunización novedosa con actividad induciendo-CTL optimizada. Investigación de Cáncer 64, 5934-7 (2004).

63. Wesa, A., Kalinski, P., Kirkwood, J.M., Tatsumi, T. & Storkus, W.J. Células dendríticas tipo-1 polarizadas (DO) produciendo niveles altos de miembros de familia de rescate de antimelanoma tipo TH1 respuestas de célula CD4+ T in vitro. J Immunother 30, 75-82 (2007).

64. Kalinski, P. & Okada, H. Células dendríticas polarizadas como vacunas de cáncer: células de efector-tipo T dirigidas a tumores. Seminarios en inmunología 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. Inducción de respuestas de CD8+ célula-T en contra de péptidos antigen asociados-glioma novedosos y actividad clínica mediante vacunaciones con células dendríticas polarizadas {alfa]-tipo 1 y ácido poliinosínico-policitidílico estabilizado con lisina y carboximetil celulosa en pacientes con glioma maligno recurrente. Diario de Oncología Clínica: Diario Oficial de la Sociedad Americana de Oncología Clínica 29, 330-6 (2011).

66. Hokey, D.A., Larregina, A.T., Erdos, G., Watkins, S.C. & Falo, L.D., Jr. Células dendríticas polarizadas tipo 1 cargadas con células de tumor inducen inmunidad de tumor mediada- Thl. Investigación de Cáncer 65, 10059-67 (2005).

67. Buller, R.M. & Palumbo, G.J. Patogénesis de virus de viruela. Microbiol Rev 55, 80-122 (1991).

68. Moss, B. Viruela: El virus y su replicación, en Virología de campo (eds. D.M., K., Fields, B.N. & Howley, P.M.) Ch.84 (Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001).

69. Putz, M.M., Midgley, CM., Law, M. & Smith, G.L. Cuantificación de respuestas anticuerpo en contra de antígenos múltiples de dos formas infecciosas de virus de vaccinia

proporciona una marca para vacunación de viruela. Medicina Nat. Nat Med 12, 1310-5 (2006).

70. Symons, J.A., Adams, E., Tscharke, D.C., Reading, P.C., Waldmann, H. & Smith, G.L. La proteína C12L de virus de vaccinia inhibe el IL-18 de ratón y promueve virulencia de virus en el modelo intranasal de rata. J Gen Virol 83, 2833-44 (2002).

71. Reading, P.C. & Smith, G.L. La proteína 18 del aglutinante-interleucin de virus de vaccinia promueve virulencia mediante el reducir la producción de interferon-gamma y la destrucción natural y actividad de célula-T. 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. Análisis de producción alta para moduladores de trayectoria de señalamiento de factor 3 regulatorio TLR3-IFN identifica varias drogas antipsicóticas como inhibidores TLR. Diario de Inmunología 184, 5768-76 (2010).

73. Okamura, FL, Tsutsi, FL, Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K. & otros. Clonado de nueva citosina que induce producción IFN-gamma mediante células T. Naturaleza 378, 88-91 (1995).

74. Wong, J.L., Mailliard, R.B., Moschos, S.J., Edington, FL, Lotze, M.T.,Kirkwood, J.M. & Kalinski, P. Actividad de ayuda de Células Destructoras Naturales durante la inducción mediada-célula dendrítica de células T citotóxicas especificación melanoma. Diario de Inmunoterapia 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. Mejoramiento de potencial de vacuna MVA mediante el suprimir la codificación de gen viral para la proteína de aglutinamiento IL-18. PLoS One 7, e32220 (2012).

76. Kirn, D.H., Wang, Y., Liang, W., Contag, C.H. & Thorne, S.H. Mejoramiento de efectos oncolíticos de virus de viruela a través de esparcimiento incrementado y evasión inmune. 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 como un vector para terapia de gen dirigida a tumor; biodistribución de mutante suprimido-cinasa timidina. Terapia de Gen de Cáncer 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. Células NK impiden glioblastoma viroterapia a través de receptores de citotoxicidad natural NKp30 y NKp46. Medicina de Naturaleza 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. La fusión de célula de tumor mediada-glicoproteína de membrana fusogénica active las células dendríticas humanas para la producción IL-12 mejorada y la imprimación de célula T. 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. Infección de tumor mediante reovirus oncolítico imprima inmunidad antitumor adaptiva. Investigación Clínica de Cáncer: un diario oficial de la Sociedad Americana de investigación de Cáncer 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. Formación de Ripoptosoma de bloque cIAPs, un complejo de muerte de célula intracelular conteniendo

RIPl/caspasa-8 complejo diferencialmente regulado mediante isoformas cFLIP. Célula Molecular 43, 449-63 (2011).

82. Sato, S., Sugiyama, M., Yamamoto, M., Watanabe, Y., Kawai, T., Takeda, K. & Akira, S. El dominio receptor Toll/IL-1 contiene adaptador induciendo IFN-beta (TRIF) asocial con el factor 6 asociado-receptor TNF y cinasa aglutinante-TANK 1, y active dos factores de transcripción distintos, NF-kappa B e IFN-factor-3 regulatorio, en el señalamiento receptor tipo Toll. Diario de Inmunología 171, 4304-10 (2003).

83. Jiang, Z., Mak, T.W., Sen, G. & Li, X. Activación mediada-3 receptor tipo Toll de NF-kappaB ed IRF3 diverge en el adaptador conteniendo-dominio receptor Toll-IL-1 induciendo IFN-beta. Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América 101, 3533-8 (2004).

84. Bahar, M.W., Kenyon, J.C., Putz, M.M., Abrescia, N.G., Pease, J.E., Wise, EX., Stuart, D.I., Smith, G.L. & Grimes, J.M. Estructura y function de A41, una proteína aglutinante de quimioquina de virus de vaccinia. PLoS Pathog 4, e5 (2008).

85. Smith, G.L. & Moss, B. Vectores de Virus de viruela infecciosa tienen capacidad para por lo menos 25,000 pares de base AND ajeno. Gen 25, 21-8 (1983).

86. Jones, S.A., Scheller, J. & Rose-John, S. Estrategias terapéuticas para el bloqueo clinic de señalamiento IL-6/gpl30. El Diario de Investigación clínica 121, 3375-83 (2011).

87. Chang, C.L., Ma, B., Pang, X., Wu, T.C. & Hung, C.F. Tratamiento con inhibidores ciclooxigenasa-2 permite administración repetida de virus de vaccinia para control de cáncer de ovario. Terapia Molecular: El diario de la Sociedad Americana de Terapia de Gen 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. Inhibición crónica de ciclooxigenasa-2 atenúa respuesta anticuerpo en contra de infección de vaccinia. Vacuna 28, 1363-72 (2010).

89. Kalinski, P. Regulación de respuestas inmunes por prostaglandina E2. Diario de Inmunología 188, 21-8 (2012).

90. Vella, L.A., Yu, M., Fuhrmann, S.R., El-Amine, M., Epperson, D.E. & Finn, O.J. Individuos saludables tienen célula-T y respuestas anticuerpo a ciclin B1 antigen tumor que cuando elicita en ratón protege contra el cáncer. Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América 106, 14010-5 (2009).

91. Weiss, V.L., Lee, T.H., Song, H., Kouo, T.S., Black, CM., Sgouros, G., Jaffee, E.M. & Armstrong, T.D. Tráfico de avidez alta de células T específicas HER-2/neu en tumores expresando HER-2/neu después de la supresión efector/células T reguladoras de tipo de memoria. 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. Reclutamiento de estanques latentes de células de CD8(+) T de alta avidez para respuesta inmune en contra de tumor. El diario de medicina experimental 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. Usando Bibliotecas cADN de melanoma expresado viralmente que usa para identificar antígenos asociados con tumor que curan melanoma. Biotecnología Naturaleza 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. Evaluación preclínica de una vaccinia virus Maraba Oncolótica en modelo simio en la 7a. Conferencia de virus oncolíticos internacional (Ciudad de Quebec, 2013).

95. Belyakov, I.M. & Ahlers, J.D. Qué papel hace la ruta de inmunización en la generación de inmunidad protectora en contra de patógenos mucosales? Diario de Inmunología 183, 6883-92 (2009).

96. Guy, C.T., Webster, M.A., Schaller, M., Parsons, T.J., Cardiff, R.D. & Muller, W.J. Expresión de protooncogen neu en el epitelio mamario de ratones transgénicos induce enfermedad metastática. Procedimientos de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América 89, 10578-82 (1992).

97. Tsukamoto, A.S., Grosschedl, R., Guzman, R.C., Parslow, T. & Varmus, H.E. Expresión de gen int-1 en ratones transgénicos está asociada con hiperplasia de glándula mamaria y adenocarinomas en ratones macho y hembra. Célula 55, 619-25 (1988).

98. Kelly, K.J., Brader, P., Woo, Y., Li, S., Chen, N., Yu, Y.A., Szalay, A.A. & Fong, Y. Detección intraoperative de tiempo real de metástasis de nodo del melanoma linfo usando virus de vaccinia recombinante GLV-1h68 en un modelo de animal de inmunocompetente. Diario Internacional de 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.

Detección intraoperative de tiempo real de metástasis de nodo de linfa auxiliar y de cáncer de seno usando un virus de herpes que expresa-proteína fluorescente verde. Anales de Cirugía 243, 824-30; discusión 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. Formación de imagen de micromestástasis de nodo de linfa usando virus de herpes oncolítico y [FJFEAU 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. Asociación anticuerpo con vacuna HER-2/neu-de objetivo mejora respuestas de célula CD8 T en ratones a través de activación mediada Fc de DCs. El Diario de Investigación clínica 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. Tumor CD8(+) Foxp3(+) infiltrando linfocitos acumula en el contexto de una respuesta antitumor efectiva. Diario Internacional de Cáncer. Diario Internacional de Cáncer 129, 636-47 (2011).

103. Chen, H., Sampath, P., Hou, W. & Thorne, S.H. La function de citosina reguladora mejora seguridad y actividad de terapias

de cáncer genético. Terapia molecular: el diario de la Sociedad Americana de Terapia de Gen 21, 167-74 (2013).

104. Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Muerte de Célula inmunogénica y tolerogénica. Revisiones de Naturaleza. Inmunología 9, 353-63 (2009).

105. Workenhe, S.T., Pol, J.G., Lichty, B.D., Cummings, D.T. & Mossman, K.L. Mitoxantrona sinergiza con virus simple de herpes oncolítico para regresar tumors de seno establecidos en parte mediante el incrementar reclutamiento de células CD8+ T, en Séptima Conferencia de Virus Oncolítico Internacional (Ciudad de Quebec, 2013).

106. Fujita, M., Kohanbash, G., Fellows-Mayle, W., Hamilton, R.L., Komohara, Y., Decker, S.A., Ohlfest, J.R. & Okada, H. El bloqueo COX-2 suprime bliomagenesis mediante inhibir las células supresoras derivadas de mieloide. Investigación de Cáncer 71, 2664-74 (2011).

107. Godin-Ethier, J., Hanafi, L.A., Piccirillo, C.A. & Lapointe, R. Indoleamine Expresión de indoleamina 2,3-dioxigenasa en cánceres humanos : perspectivas clínica e inmunológica. Investigación de Cáncer Clínico : un diario oficial de la Asociación Americana para Investigación de Cáncer 17, 6985-91 (2011).

108. Terajima, M. & Leporati, A.M. Rol de indoleamina 2,3-Dioxigenasa en la actividad antiviral de Interferón-gamma en contra de virus de vaccinia. Inmunología Viral 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. Tipo, densidad y ubicación de células inmune dentro de tumores colorectales humanos predice resultado clinic. Ciencia 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. El virus de viruela oncolítico JX-594 selectivamente replica y destruye células de cáncer impulsadas por trayectorias genéticas comúnmente activadas en cánceres. Terapia Molecular : el diario de la Sociedad Americana de Terapia de Gen 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. Enfocando células de

iniciación de carcinoma humano ALDH(brillante) con células ALDH1 Al-células T CD8(+) específicas. Investigación de cáncer clínico: un diario oficial de la Asociación Americana para la Investigación de Cáncer 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. Aldehído dehidrogenasa en combinación con CD 133 define células de vástago de cáncer de ovario angiogénico que llevan pobre supervivencia de paciente. Investigación de Cáncer 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. Líneas de célula de cáncer de seno contienen células de vástago de cáncer funcional con capacidad metástica y una firma molecular distinta. Investigación de Cáncer 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. La vacunación de célula de vástago de cáncer confiere significante inmunidad antitumor. Investigación de Cáncer 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. Aislamiento y caracterización molecular de células de vástago de cáncer en tumores de seno de ratón MMTV-Wnt-1. Células de Vástago 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. Bloqueado CXCR1 selectivamente enfoca células de vástago de cáncer de seno humano in vitro y en xenoinjertos. El Diario de la Investigación Clínica 120, 485-97 (2010).

Varias publicaciones son citadas aquí, cuyos contenidos son por tanto incorporados por referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Un virus de vaccinia oncolítica que comprende dos o más de las siguientes modificaciones

(i) una mutación de columna viral;

(ii) una modificación de glicosilación viral;

(iii) una modificación que promueve la respuesta de célula T;

(iv) una modificación de inhibe la inmunosupresión; y/o

(v) una modificación que mejora la actividad y esparcimiento de virus.

2. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende una modificación de glicosilación viral y una o más de las siguientes modificaciones:

(i) una mutación de columna viral;

(ii) una modificación que promueve la respuesta de célula T;

(iii) una modificación que inhibe la inmunosupresión; y/o

(iv) una modificación que mejora el esparcimiento y actividad de virus.

3. Un virus de vaccinia oncolítico que es tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación antes (por ejemplo sialilación) de la administración a un anfitrión o que

de otra manera tiene glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado.

4. Un virus de vaccinia oncolítico el cual es tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a virus no modificado y comprende una o más de las siguientes modificaciones:

(i) una mutación de columna viral;

(ii) una modificación que promueve la respuesta de célula T;

(iii) una modificación que inhibe la inmunosupresión; y/o

(iv) una modificación que mejora el esparcimiento y actividad de virus.

5. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2 o 4, caracterizado porque la mutación de columna viral es una supresión o una supresión funcional de proteína aglutinante-interleucina 18.

6. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2 o 4, caracterizado porque la

mutación de columna viral es una supresión B8R, una supresión B18R, una supresión A35R o una combinación de los mismos.

7. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2, 4, 5, o 6, caracterizado porque la modificación que promueve la respuesta de célula T es la incorporación de un ácido nucléico codificando un adaptador conteniendo-dominio Toll/IL-IR induciendo interferón beta (TRIF) proteína o un dominio funcional de la misma.

8. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2, 4, 5, o 6, caracterizado porque la modificación que promueve la respuesta de célula T es la incorporación de un ácido nucléico codificando un factor estimulando colonia de macrófago granulocito.

9. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8 caracterizado porque la modificación que inhibe la inmunosupresión es la incorporación de un ácido nucléico codificando una prostaglandina E2 antagonista.

10. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en la cláusula 9, caracterizado porque la prostaglandina E2 antagonista es 15-PGDH.

11. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, caracterizado porque la modificación que mejora es esparcimiento y actividad viral es una modificación que aumenta la cantidad de envoltura extracelular desde el virus producido.

12. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en la cláusula 11, caracterizado porque la modificación es una o más de las siguientes mutaciones: A34R Lysl51 a Glu; supresión completa o parcial de B5R; mutación/supresión de A36R y/o mutación/supresión de A56R.

13. Un virus de vaccinia oncolítico el cual es tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a virus no modificado, comprendiendo, un ácido nucléico codificando TRIF o un dominio funcional del mismo y/o un ácido nucléico codificando un antagonista PGE2 antagonista.

14. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; y/o

(iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo;

15. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; y/o

(iii) un ácido nucléico codificando 15-PGDH, o un domino funcional del mismo;

16. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende:

(i) una supresión TK,

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; y/o

(iv) un ácido nucléico codificando 25-PGDH, o un dominio funcional del mismo.

17. Un virus de vaccinia oncolítica que comprende:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo;

(iv) un ácido nucléico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo; y/o

(v) una suppression C12L.

18. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo;

(iv) un ácido nucléico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo;

(v) una suppression C12L; y/o

(vi) una suppression B5R.

19. Un método para reducir el crecimiento de célula de cáncer que comprende administrar a la célula de cáncer, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia oncolítico de cualquiera de las cláusulas 1-18.

20. Un método para reducir el crecimiento de un tumor que comprende administrar al tumor, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia oncolítico de cualquiera de las cláusulas 1-18.

21. Un método para tratar a un sujeto teniendo cáncer que comprende administrar al sujeto, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia oncolítico de cualquiera de las cláusulas 1-18.

22. Un método para producir un efecto anti-cáncer en un sujeto que comprende administrar, al sujeto, una cantidad efectiva del virus de vaccinia oncolítico de una cualquiera de las cláusulas 1-18.

23. El método tal y como se reivindica en las cláusulas 19, 20, 21 o 22 que además comprende administrar uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste de un agente anti cáncer, un agente inmunomodulatorio, y una combinación de los mismos.

24. Un virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-18 anteriores, para usarse en el tratamiento de cáncer en un sujeto.

RESUMEN

La presente invención se refiere a virus de vaccinia oncolítico los cuales se han modificado para promover la inmunidad anti-tumor y/o reducir la inmunidad de anfitrión y/o la respuesta anticuerpo en contra del virus. Esto se basa, por lo menos en parte, sobre el descubrimiento de que el virus de vaccinia oncolítico (i) llevando una supresión de genoma de un gen que reduce la inmunidad de célula T (proteína aglutinante interleucin-18); (ii) tratado con enzima sialidasa que se cree que reduce la activación TLR2 y por tanto la respuesta anticuerpo; (iii) llevando un gen que mejora la inducción de linfocito T citotóxico (por ejemplo TRIF) y/o (iv) reduce las células supresoras derivadas de mieloide mediante reducir prostaglandina E2 reduce el crecimiento de tumor. Por tanto la presente invención proporciona virus de vaccinia inmunooncolíticos y métodos de usarlos en el tratamiento de cánceres.

REIVINDICACIONES

1. Un virus de vaccinia oncolítica que comprende dos o más de las siguientes modificaciones

(i) una mutación de columna viral;

(ii) una modificación de glicosilación viral;

(iii) una modificación que promueve la respuesta de célula T;

(iv) una modificación de inhibe la inmunosupresión; y/o

(v) una modificación que mejora la actividad y esparcimiento de virus.

2. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende una modificación de glicosilación viral y una o más de las siguientes modificaciones:

(i) una mutación de columna viral;

(ii) una modificación que promueve la respuesta de célula T;

(iii) una modificación que inhibe la inmunosupresión; y/o

(iv) una modificación que mejora el esparcimiento y actividad de virus.

3. Un virus de vaccinia oncolítico que es tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación antes (por ejemplo sialilación) de la administración a un anfitrión o que

de otra manera tiene glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado.

4. Un virus de vaccinia oncolítico el cual es tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a virus no modificado y comprende una o más de las siguientes modificaciones:

(i) una mutación de columna viral;

(ii) una modificación que promueve la respuesta de célula T;

(iii) una modificación que inhibe la inmunosupresión; y/o

(iv) una modificación que mejora el esparcimiento y actividad de virus.

5. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2 o 4, caracterizado porque la mutación de columna viral es una supresión o una supresión funcional de proteína aglutinante-interleucina 18.

6. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2 o 4, caracterizado porque la

mutación de columna viral es una supresión B8R, una supresión B18R, una supresión A35R o una combinación de los mismos.

7. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2, 4, 5, o 6, caracterizado porque la modificación que promueve la respuesta de célula T es la incorporación de un ácido nucléico codificando un adaptador conteniendo-dominio Toll/IL-IR induciendo interferón beta (TRIF) proteína o un dominio funcional de la misma.

8. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2, 4, 5, o 6, caracterizado porque la modificación que promueve la respuesta de célula T es la incorporación de un ácido nucléico codificando un factor estimulando colonia de macrófago granulocito.

9. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8 caracterizado porque la modificación que inhibe la inmunosupresión es la incorporación de un ácido nucléico codificando una prostaglandina E2 antagonista.

10. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en la cláusula 9, caracterizado porque la prostaglandina E2 antagonista es 15-PGDH.

11. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, caracterizado porque la modificación que mejora es esparcimiento y actividad viral es una modificación que aumenta la cantidad de envoltura extracelular desde el virus producido.

12. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en la cláusula 11, caracterizado porque la modificación es una o más de las siguientes mutaciones: A34R Lysl51 a Glu; supresión completa o parcial de B5R; mutación/supresión de A36R y/o mutación/supresión de A56R.

13. Un virus de vaccinia oncolítico el cual es tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a virus no modificado, comprendiendo, un ácido nucléico codificando TRIF o un dominio funcional del mismo y/o un ácido nucléico codificando un antagonista PGE2 antagonista.

14. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; y/o

(iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo;

15. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; y/o

(iii) un ácido nucléico codificando 15-PGDH, o un domino funcional del mismo;

16. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende:

(i) una supresión TK,

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; y/o

(iv) un ácido nucléico codificando 25-PGDH, o un dominio funcional del mismo.

17. Un virus de vaccinia oncolítica que comprende:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo;

(iv) un ácido nucléico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo; y/o

(v) una suppression C12L.

18. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo;

(iv) un ácido nucléico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo;

(v) una suppression C12L; y/o

(vi) una suppression B5R.

19. Un método para reducir el crecimiento de célula de cáncer que comprende administrar a la célula de cáncer, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia oncolítico de cualquiera de las cláusulas 1-18.

20. Un método para reducir el crecimiento de un tumor que comprende administrar al tumor, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia oncolítico de cualquiera de las cláusulas 1-18.

21. Un método para tratar a un sujeto teniendo cáncer que comprende administrar al sujeto, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia oncolítico de cualquiera de las cláusulas 1-18.

22. Un método para producir un efecto anti-cáncer en un sujeto que comprende administrar, al sujeto, una cantidad efectiva del virus de vaccinia oncolítico de una cualquiera de las cláusulas 1-18.

23. El método tal y como se reivindica en las cláusulas 19, 20, 21 o 22 que además comprende administrar uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste de un agente anti cáncer, un agente inmunomodulatorio, y una combinación de los mismos.

24. Un virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-18 anteriores, para usarse en el tratamiento de cáncer en un sujeto.

ADVANCE E-MAIL

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

KOLE, Lisa, B.
Baker Botts L.L.P.
30 Rockefeller Plaza
New York, NY 10112-4498
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
22 February 2016 (22.02.2016)

Applicant's or agent's file reference
072396.0570

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2014/052308

International filing date *(day/month/year)*
22 August 2014 (22.08.2014)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION
200 Gardner Steel Conference Center
Pittsburgh, PA 15260
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION
200 Gardner Steel Conference Center
Thackeray and O'Hara Streets
Pittsburgh, Pennsylvania 15260
United States of America

State of Nationality: US
State of Residence: US
Telephone No.:
Facsimile No.:
E-mail address:
☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 65

Authorized officer
Blanc Mathieu
e-mail pt02.pct@wipo.int
Telephone No. +41 22 338 74 02

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
26 February 2015 (26.02.2015)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2015/027163 A1

(51) International Patent Classification:
C12N 15/39 (2006.01) *A61K 39/285* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2014/052308

(22) International Filing Date:
22 August 2014 (22.08.2014)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/868,978 22 August 2013 (22.08.2013) US

(71) Applicant: **UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION** [US/US]; 200 Gardner Steel Conference Center, Pittsburgh, PA 15260 (US).

(72) Inventor: **THORNE, Stephen, Howard**; 805 Fairview Road, Pittsburgh, PA 15238 (US).

(74) Agents: **KOLE, Lisa, B.** et al.; Baker Botts L.L.P., 30 Rockefeller Plaza, New York, NY 10112-4498 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

(54) **Title**: IMMUNO-ONCOLYTIC THERAPIES

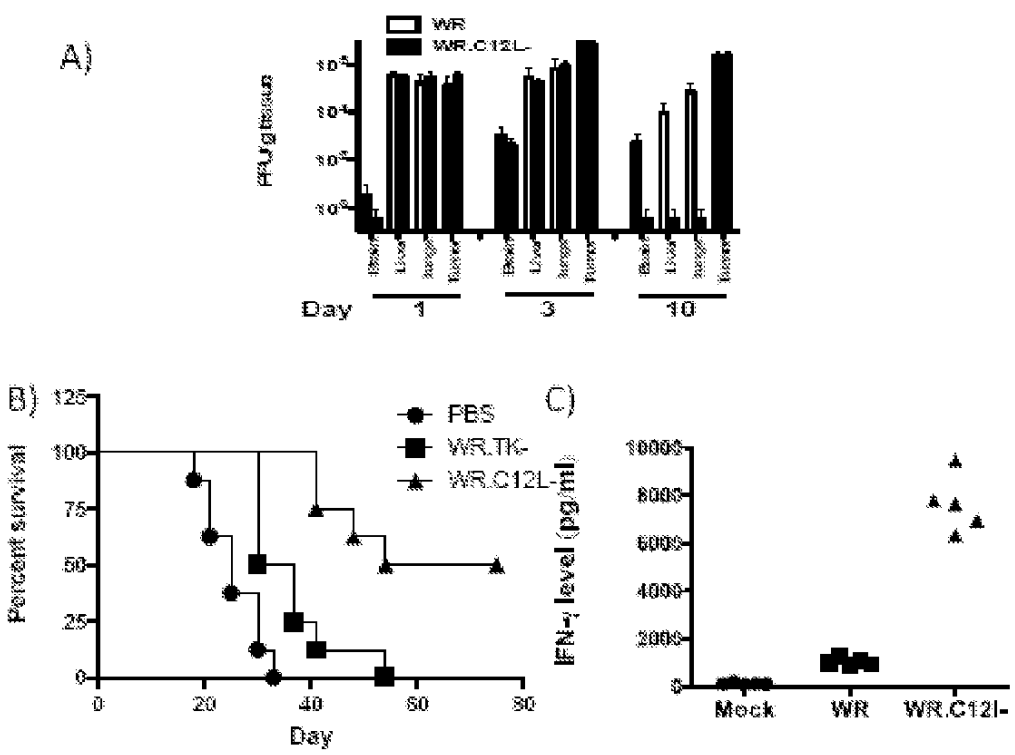


FIGURE 1 A-C

(57) **Abstract**: The present invention relates to oncolytic vaccinia viruses which have been modified to promote anti-tumor immunity and/or reduce host immunity and/or antibody response against the virus. It is based, at least in part, on the discovery that oncolytic vaccinia virus (i) bearing a genome deletion of a gene that reduces T cell immunity (interleukin-18 binding protein); (ii) treated with a sialidase enzyme which is believed to reduce TLR2 activation and therefore the antibody response; (iii) carrying a gene that enhances cytotoxic T lymphocyte induction (e.g., TRIF) and/or (iv) reduces tumor myeloid-derived suppressor cells by reducing prostaglandin E2 reduces tumor growth. Accordingly, the present invention provides for immunooncolytic vaccinia viruses and methods of using them in the treatment of cancers.

WO 2015/027163 A1

IMMUNO-ONCOLYTIC THERAPIES

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to U.S. Provisional Patent Application Serial No. 61/868,978, filed August 22, 2013, which is incorporated by reference herein in its entirety.

1. INTRODUCTION

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

2. BACKGROUND OF THE INVENTION

Oncolytic viruses (OV) are viruses with replication that is naturally or engineered to be selective for tumor cells[1-3]. A variety of different viral backbones have been examined as OV, including strains of vaccinia virus (VV).[4-11] At least three separate oncolytic vaccinia vectors have completed Phase I testing, including strain vvDD.[6,7] The VV OV, JX-594[4,12] (Jennerex), has recently demonstrated highly encouraging responses in Phase II trials for hepatocellular carcinoma (HCC), including systemic tumor delivery[13,14]. Further, encouraging Phase III results have been reported for the herpes virus HSV OV (T-Vec, Amgen[15,16]) in therapy of melanoma (16% responses, compared to 2% in control arm). As such, the true potential of OVs in the treatment of cancer has begun to be revealed (beyond that of the original ONYX-015 (H-101) adenovirus strain[17,18] that remains the only approved OV therapy in any market[19]).

Despite this promise, complete responses with OV remain rare. Significantly, the first and second generation OV strains were primarily designed to destroy tumor cells through selective replication leading directly to cell lysis. Additionally, JX-594 and T-Vec both express a cytokine transgene (GM-CSF) which would be expected to boost host lymphocytes.[12,14,20,21] Pre-clinical studies have demonstrated the critical importance of the immune response in the therapeutic activity of oncolytic VV, with (i) mice being uniformly resistant to re-challenge following a complete response after VV therapy, indicating an absolute requirement for induction of anti-tumor adaptive immunity[22]; (ii) the vaccine effects of VV

demonstrating greater therapeutic benefit than equivalent DC vaccines[23]; (iii) VV infection of the tumor producing a hallmark cytokine profile (the 'Immunologic Constant of Rejection'[24]); (iv) VV therapy reducing the number of immunosuppressive cells in the tumor (MDSC, T-reg and M2 macrophages)[25]; (v) the immune response raised by VV therapy being capable of eradicating residual tumor and metastases well after the virus has been cleared, providing long-term immune surveillance to prevent relapse[22,25,26]; and (vi) in some studies it appears that robust viral replication is not actually needed for therapeutic effect[27,28]. Therefore, the immunotherapeutic effects of OVs, particularly VV, are at least as important as the directly oncolytic effects and that these vectors should probably be considered principally as immunotherapies.

Notably, the current clinical vectors were not designed as immunotherapeutics (beyond the expression of single cytokines) and this area has remained relatively underexplored. As such, there is huge unmet potential to enhance oncolytic vectors through optimizing their interactions with the host immune system and to create vectors capable of *in situ* vaccination against relevant tumor antigens. Alternatively, most traditional therapeutic cancer vaccine approaches have had limited success in the clinic especially against larger tumors, despite evidence of successful immunization[29-31]. Novel vaccine approaches are therefore also needed, ideally mediating induction of responses against relevant antigens in every tumor, overcoming suppression even within large tumors and enhancing T-cell homing to the tumor targets.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to "immuno-oncolytic" vaccinia viruses which have been modified to promote anti-tumor immunity and/or reduce host immune and antibody response against the virus. It is based, at least in part, on the discovery of improved inhibition of tumor growth by oncolytic vaccinia virus that has been treated with an agent that reduces the amount of glycosylation and/or treated with a sialidase enzyme (which are believed to reduce TLR2 activation and to decrease host antibody response against the virus); and/or carries modifications or deletions of viral genomic nucleic acid encoding a product that reduces T cell immunity (viral interleukin-18 binding protein); and/or carries nucleic acid encoding a product that (i) enhances cytotoxic T lymphocyte induction (TRIF) and/or (ii) reduces

tumor myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) by reducing prostaglandin E2. Accordingly, the present invention provides for immuno-oncolytic vaccinia viruses and methods of using them in the treatment of cancers.

4. BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIGURE 1A-C. (A) WR.ΔC12L virus displayed tumor selectivity *in vivo* relative to WR parental virus. C57BL/6 mice bearing CMT-93 tumors were treated IV with 5e8 PFU of viruses, and mice sacrificed at pre-determined times after therapy. Viral PFU were quantified in different tissues post mortem after homogenization. (B) Enhanced anti-tumor effects of WR.ΔC12L. Mice bearing subcutaneous CMT-93 tumors were treated IV with a single dose (1e8 PFU) of virus and survival followed (defined as time to tumor volume reaching 1000mm^3 as determined by caliper measurement). (C) Production of IFN-γ (as a marker of effector T-cell production) from splenocytes recovered from mice previously treated with indicated virus and after ex vivo exposure to WR.

FIGURE 2A-E. Deglycosylation of Vaccinia Virus envelope. (A) Immunoblot showing deglycosylation of Vaccinia virus envelope protein. Purified WR and WR deglycosylated viruses were disrupted and blotted using an anti-B5R antibody. Decrease in protein weight corresponds to deglycosylation of the B5R protein. (B) Deglycosylation of virus envelope has no effect on Vaccinia virus infectivity. Different mouse tumor cell lines were infected with TK- or its deglycosylated version at an MOI of 1, and viral luciferase expression was measured 3 hours after infection by bioluminescence imaging. Mean values +SD of 3 independent experiments are plotted. (C) Deglycosylation reduces TLR2 activation *in vitro*. HEK293 cells expressing mouse TLR2 were transfected with pNiFty (TLR-signaling reporter plasmid). 24 hours after transfection, cells were infected at an MOI of 1 with WR or WR deglycosylated and TLR2 activation was quantified 24 hours after infection by bioluminescence imaging. Means +SD of 3 independent experiments (performed in quadruplicate) are depicted. (D) STAT3 phosphorylation is depleted in splenic lymphocytes of mice injected with deglycosylated Vaccinia. Percentage of pSTAT1-pSTAT3+ lymphocytes was determined by flow cytometry. PBS and PAM(3)CSK(4) were used as controls. Values of individual mice and means ±SEM of the different treatments are plotted. (E) Deglycosylation of Vaccinia envelope increases viral gene expression from tumors *in vivo*. BALB/c mice harboring subcutaneous xenografts of Renca cells (mouse renal adenocarcinoma)

were randomized and injected with a single intravenous dose of $1x10^8$ PFU per mouse of TK- or TK- deglycosylated. Kinetics of viral gene expression from within the tumor was monitored by bioluminescence imaging of viral luciferase expression. Mean values of 12-13 animals +SD are plotted. *, significant P<0.05 compared with PBS or Control. #, significant P<0.05 compared with TK- or WR group. ϕ, significant P<0.05 compared with PAM(3)CSK(4) group.

FIGURE 3A-D. Ablating TLR2 activation through deglycosylation leads to increased therapeutic effects. (A) Treatment of vaccinia strain WR with a sialidase enzyme (DS) results in loss of TLR2 signaling pathway activation in an *in vitro* model (NF-kB activation in HEK293 cells transfected to express TLR2). (B) DS WR virus displayed significantly enhanced systemic delivery to mouse tumors (4T1 subcutaneous tumors in BALB/c mice with virus delivered IV and viral luciferase transgene expression in the tumor determined 24h later by bioluminescence imaging (N.B. non-tumor tissues displayed no difference in viral uptake). (C) Anti-tumor effect in the same model demonstrated therapeutic advantage of DS the virus. (D) Loss of TLR2 activation (in a TLR2 knock out transgenic mouse) after infection with vaccinia leads to significantly reduced induction of anti-viral neutralizing antibody (neutralizing antibody measured as the ability of different dilutions of mouse serum collected 14d after treatment with WR to prevent viral luciferase transgene expression after mixing with WR.TK-Luc+ and infection of a BSC-1 cell layer)

FIGURE 4A-C. (A) Schematic diagram representing the construct of the TK-TRIF virus and a schematic diagram representing the construct of the TK-DAI virus. (B) ELISA assays were utilized to determine concentrations of TRIF in cells with infected with TK- and TK-TRIF. (C) Western blot showing the expression of DAI from the TK-DAI reference.

FIGURE 5A-C. (A) TRIF expression from vaccinia enhances type I IFN production *in vitro*, even beyond that of the B18R-strain. (B) TRIF expression increased production of CTL *in vivo*. (C) Further enhanced therapeutic effect *in vivo* after single IV delivery of 1e8 PFU of virus to BALB/c mice bearing subcutaneous Renca tumors.

FIGURE 6A-D. Oncolytic Vaccinia virus expressing the mouse TRIF protein increased activation of TLR-responding pathways and the release of proinflammatory cytokines and chemokines. (A-B) Activation of NF-κB (A) and IRF3 (B) pathways after infection with TK-TRIF and TK-DAI. ELISA assays were

utilized to determine concentrations of pIKKβ and IRF3 on cytoplasmic and nuclear extracts, respectively, of 4T1 or MEF cells infected with TK-, TK-TRIF, or TK-DAI at an MOI of 1. Analyses were performed 24 hours after infection. Data was obtained in quadruplicated from 2 independent experiments, and is plotted as fold change vs TK- +SD. Dashed line indicates TK- activation level. (C) Release of cytokines and chemokines *in vitro* after TK-TRIF and TK-DAI infection. IL-6, IP-10, TNF-α, and IFN-β concentrations in the supernatant of Renca, 4T1, MC38 and MEF cells was evaluated by Luminex assay 24 hours after infection with TK-, TK-TRIF or TK-DAI (MOI of 1). Data is depicted as fold change vs TK- +SD (2 independent experiments). Dashed line indicates TK- concentrations. (D) *In vivo* intratumoral concentration of cytokines and chemokines. BALB/c mice with established Renca subcutaneous xenografts were randomized and injected with a single intravenous dose of $1x10^8$ PFU per mouse of TK- or TK-TRIF. Fold change vs TK- from 4-5 mice +SD is plotted. Dashed line indicates TK- concentrations. *, significant $P<0.05$ compared with TK- group. #, significant $P<0.05$ compared with TK-DAI group.

FIGURE 7A-E. ELISA assays were utilized to determine concentration of NF-κB (A), HMGB1 (B) and Hsp-70 (C) in cells infected with TK-, TK-TRIF or TK-DAI at an MOI of 1. Analyses were performed 24 hours after infection. Data was obtained and plotted as fold change vs TK- +SD. Dashed line indicates TK- activation level. The level of helper T-cells (D) and regulatory T-cells (E) were analyzed in response to infection with TK- or TK-TRIF virus.

FIGURE 8A-D. Replication and antitumor activity of TK-TRIF and TK-DAI. (A) Viral production of TK-TRIF and TK-DAI in mouse tumor cells. Different tumor cell lines were infected with an MOI of 1 and virus production was measured by plaque-assay at different time points. Viral yield was evaluated in quadruplicate for each cell line, by carrying out two independent experiments. Means +SD are plotted. (B) Comparative cytotoxicity of TK-TRIF and TK-DAI. Cells were infected with the indicated viruses at doses ranging from 75 to 0.00025 PFU/cell. EC_{50} values (MOI required to cause a reduction of 50% in cell culture viability) at day 4 after infection is shown. Four different replicates were quantified for each cell line and mean for each MOI is depicted. (C-D) Viral gene expression and antitumor efficacy *in vivo*. Renca or MC38 xenografts were implanted in BALB/c or C57BL/6 mice, respectively, and mice were injected with PBS or $1x10^8$ PFU of TK-, TK-TRIF or TK-DAI through the tail vein. Viral luciferase expression in the tumors (C) and

tumor volumes (D) were measured at indicated time points. n=12-15 mice/group +SE. *, significant P<0.05 compared with PBS group. #, significant P<0.05 compared with TK- group. ϕ, significant P<0.05 compared with TK-DAI group.

FIGURE 9A-F. (A) Viral gene expression of TK-TRIF and TK-DAI in mouse tumor cells. Different tumor cell lines were infected with an MOI of 1 and viral luciferase expression was quantified by bioluminescence imaging at different time points. Luciferase expression was evaluated in quadruplicate for each cell line, by performing two independent experiments. Means +SD are plotted. (B) Percentage of apoptotic cells after infection with TK-TRIF and TK-DAI. A panel of mouse tumor cell lines was infected with the indicated viruses using an MOI of 1. At 48 hours after infection, percentage of nectrotic and apoptotic cells were determined by flow cytometry by PI and Annexin V staining. Two independent experiments were performed and means +SD are plotted. (C-D) TK-TRIF improves the antitumor efficacy of TK-GMCSF in a mammary semi-orthotopic model. 4T1 cells were implanted in the mammary fat pad of BALB/c mice and, once the tumor was established, mice were injected with PBS or $1x10^8$ pfu of TK-, TK-TRIF, or TK-GMCSF through the tail vein. Viral luciferase expression from within the tumors (C) and tumor volumes (D) were measured at indicated time points. n=12-14 mice/group +SE. (E-F) TK-TRIF improves survival of mice bearing tumors. BALB/c or C57BL/6 mice harboring Renca (E) or MC38 (F) xenografts, respectively, were treated as in Figure 3d and end point was established at a tumor volume of ≥750 mm^3. Kaplan-Meyer survival curves are plotted. n=12-15 mice/group. *, significant P<0.05 compared with PBS or control. #, significant P<0.05 compared with TK- group. ϕ, significant P<0.05 compared with TK-GMCSF group. ω, significant P<0.05 compared with TK-DAI group.

FIGURE 10A-E. (A) Body weight variation after intravenous TK-TRIF deglycosylated administration. BALB/C mice were injected intravenously with 1×10^8 PFU per mouse of TK-, TK-TRIF, or TK-TRIF deglycosylated. Phosphate-buffered saline (PBS) administration was used in the control group. TK-injected mice presented more than 10% reduction in body-weight at day 6 after virus injection, whereas TK-TRIF and TK-TRIF deglycosylated-injected mice presented a similar weight profile than those injected with PBS. (B) Viral gene expression *in vivo* after TK-TRIF deglycosylated administration. Renca tumors were implanted in BALB/c mice, and mice were injected with PBS or $1x10^8$ pfu of TK-, TK-TRIF, or TK-TRIF

deglycosylated through the tail vein. Viral luciferase expression from within the tumors was measured at indicated time points. n=12-14 mice/group +SE. (C-D) Survival of tumor-bearing mice treated with TK-TRIF deglycosylated. (C-D) Renca (C) or MC38 (D) xenografts were established in BALB/C or C57BL/6 mice, respectively, and treated with a single intravenous dose of $1x10^8$ PFU of indicated viruses or PBS. End point was established at a tumor volume of $\geq$750 mm^3 and Kaplan-Meyer survival curves are plotted. n=12-15 mice/group. (E) TK-TRIF deglycosylated improved survival compared with TK-GMCSF treatment. Mice (BALB/c harboring subcutaneous Renca tumors) were treated via tail vein injection of PBS or a single dose of $1x10^8$ pfu of TK-GMCSF or TK-TRIF deglycosylated (n=10-12 per group). Kaplan-Meyer survival curves were obtained after establishing an end point of $\geq$750 mm^3 for the tumor volume. *, significant $P<0.05$ compared with PBS group. #, significant $P<0.05$ compared with TK- group. ϕ, significant $P<0.05$ compared with TK-deglycosylated group. ω, significant $P<0.05$ compared with TK-TRIF group. Ψ, significant $P<0.05$ compared with TK-GMCSF group.

FIGURE 11A-F. Combination of envelope deglycosylation and mouse TRIF expression boosted antitumor cellular responses and exhibited potent antitumor efficacy. (A-B) Cellular immune responses to Vaccinia virus and tumor cells evaluated by IFN-γ ELISpot assay. At day 7 post-virus administration, spleens were harvested from mice injected intravenously with $1x10^8$ PFU of indicated viruses or PBS (BALB/c mice bearing Renca xenografts) and evaluated for the amount of CTLs recognizing Vaccinia virus (A) or Renca cells (B). Values of individual mice and means ±SEM are depicted. (C) Serum neutralizing antibody titers. A neutralizing assay was performed to determine circulating anti-Vaccinia antibody levels for mice injected with $1x10^8$ PFU of TK-, TK-TRIF or TK-TRIF deglycosylated. Nabs titers were determined by the highest dilution of serum that resulted in at least 50% inhibition of infection. Values of individual mice and means ±SEM are plotted. (D-E) *In vivo* antitumor activity in different models. BALB/c bearing Renca (D) or C57BL/6 bearing MC38 (E) tumor xenografts were treated with a single intravenous dose of indicated viruses ($1x10^8$ PFU/mouse). Tumor growth was followed by caliper measurements. Means of 12-15 mice per group +SE are depicted. (F) TK-TRIF deglycosylated exhibited greater antitumor activity than TK-GMCSF. BALB/c mice harboring Renca xenografts were injected intravenously with a dose of $1x10^8$ PFU/mouse of TK-GMCSF or TK-TRIF deglycosylated. Relative tumor volume after

virus administration is plotted (n=12-15 mice/group +SE). *, significant P<0.05 compared with PBS group. #, significant P<0.05 compared with TK- group. ϕ, significant P<0.05 compared with TK- deglycosylated group. ω, significant P<0.05 compared with TK-TRIF group.

FIGURE 12A-C. (A) Vaccinia strain WR with DS treatment, C12L deletion and mTRIF expression (termed UPCI-1812) displayed enhanced anti-tumor effects in BALB/c mice bearing 4T1 tumors relative to current clinical strains WR.TK-GM-CSF+ (as a model of the strain JX-594). The UPCI-1812 virus also displayed increased production of immunotherapeutic cytokines in the tumor microenvironment including (B) interferon gamma and (C) interleukin-12.

FIGURE 13A-C. (A) Survival of various tumor cells lines were analyzed upon viral infection with TK-. (B) Viral gene expression in tumors derived from BALB/c and C57BL/6 mice implanted with certain tumor cell lines, and the volume of tumors obtained from BALB/c and C57BL/6 implanted with certain tumor cell lines and infected with TK-. (C) Detection of phosphorylated Sp6 in myeloid cells in tumors derived from BALB/c and C57BL/6 mice implanted with certain tumor cell lines and treated with TK-.

FIGURE 14A-B. (A) Mice bearing no tumor or subcutaneous tumors derived from LLC or B16 cells (50-100mm^3) were treated within a single intravenous injection of 1x10^7 PFU of WR.TK-. Mice (n=3 per group and time) were sacrificed at indicated times and spleens and serum recovered. Splenocytes were rapidly fixed and permeabilized (according to our previously published protocol) and then stained for phosflow to detect activation of signaling pathways. This was performed for Regulatory T-cells (CD3+CD4+CD8-FoxP3+CD25+), with pSTAT5, pS6 and Ki67 analyzed; for CD4 T-cells (CD3+CD4+CD8-FOXP3-), with pS6, Ki67, CD44 and CD62L analyzed; and for CD8 T-cells (CD3+CD4-CD8+FoxP3-), with pS6, Ki67, CD44 and CD62L analyzed. (B) Anti-viral neutralizing antibody levels were also examined in the serum.

FIGURE 15A-B. (A) Concentration of regulatory T-cells and MDSC cells in various mouse tumor models infected with TK-. (B) Concentration of regulatory T-cells, MDSC cells and CD8+ T-cells in 4T1 and MC38 mouse tumor models infected with TK-.

FIGURE 16A-B. (A) Gating strategies are shown for detection of MDSC (left) and T-cells and T-regs (right) for splenocytes or cells recovered from

disaggregated tumors. (B) The levels of MDSC and T-reg in the spleen are shown for mice bearing different tumors.

FIGURE 17A-C. (A) TK- vaccinia strain displays a very poor ability to increase median survival (relative to PBS control) in mouse tumor models that display high levels of MDSC at baseline. Also, TK- viral therapy can reduce levels of (B) T-reg in treated tumors, but has no impact on (C) MDSC levels.

FIGURE 18. Analysis of the immune response in mice implanted with MC38 tumor cells upon treatment with the immunogenic vaccinia strains, GM-CSF, WR.TK-GM-CSF, WR.B18R-IFNα+, WR.B18R-IFNβ+ and WR.B18R-IFNγ+ in comparison to the immune response elicited by TK- infection.

FIGURE 19. Analysis of the immune response in mice implanted with 4T1 tumor cells upon treatment with the immunogenic vaccinia strains, GM-CSF, WR.TK-GMCSF and WR.B18R-IFNβ+ in comparison to the immune response elicited by TK- infection.

FIGURE 20. Expression of COX2 and HPGD upon expression of WR-TK-HPGD or treatment of the Cox 2 inhibitor, Celecoxib. Beta-actin was detected as a loading control. Expression of PGE2 was determined in Renca cells upon infection with WR-TK-HPGD or WR TK- or treatment of Celecoxib.

FIGURE 21A-D. HPGD expression from oncolytic vaccinia reduced MDSC in the tumor and sensitizes resistant tumors to viral therapy. (A) Effect of HPGD expression on T-reg and MDSC levels in the tumor. Mice bearing Renca tumors were treated with intratumoral, low dose ($1x10^7$ PFU) injection of indicated virus and mice sacrificed at indicated times, tumors recovered, disaggregated and analyzed by flow cytometry as before. HPGD expression reduces MDSC and T-reg levels (*$p<0.05$ compared to control). (B) Enhanced therapeutic activity of WR.TK-.HPGD+. Mice bearing subcutaneous Renca or MC38 tumors were treated with a single intratumoral injection of PBS or $1x10^7$ PFU or WR.TK- or WR.TK-HPGD+ and subsequent tumor growth followed by caliper measurement ($n=15$ per group; WR.TK-HPGD+ significantly ($p<0.05$) delayed tumor growth from day 3 (RENCA) or day 7 (MC38) compared WR.TK- and resulted in 3 complete responses for RENCA and 2 for MC38. No mice from any other group displayed a CR). (C) Comparison of tumor growth and viral gene expression for WR.TK-.HPGD+ treatment. Tumor growth for individual mice with Renca tumors and treated with WR.TK-HPGD+ are plotted, compared to PBS control (grey bar) and divide into good

(solid line) and best (dashed line) responders. The bioluminescence signal (viral gene expression) from the tumor at day 1 and 5 were normalized to tumor volume and shown for both good and best responders. (D) HPGD expression does not reduce viral gene expression. Viral luciferase gene expression from within the tumor at 24h after treatment with WR.TK- or WR.TK-HPGD+ is shown.

FIGURE 22. Tumor volume as a function of days after treatment with PBS control (CTL; circle), thymidine kinase negative Western Reserve VV (WR TK-; square) or thymidine kinase (TK) negative Western Reserve VV carrying HPGD (WR TK- HPGD, triangle) (HPGD is murine equivalent of human 15-PGDH protein).

FIGURE 23A-D. Percent MDSCs in (A) spleen of mice infected with WR TK-; (B) spleen of mice infected with WR TK- HPGD; (C) tumor of mice infected with WR TK-; and (D) tumor of mice infected with WR TK- HPGD.

FIGURE 24A-D. HPGD expression enhanced the immune response and alters immune cell trafficking to the tumor. (A) Cytokine and chemokine profiles in the tumor after different treatments. Mice bearing RENCA tumors were treated as indicated with $1x10^7$ PFU of different viral strains IT and sacrificed after 3 days. Tumor homogenates were run on Luminex assays to quantify different cytokines and chemokines (*$p<0.05$). (B) Anti-tumor CTL response is increased with HPGD expression. Splenocytes collected form RENCA tumor bearing mice 7 days after the indicated treatments were quantified for anti-tumor CTL response as determined by ELISPOT (*$p<0.06$). (C) Systemic alterations in chemokine levels after different treatments. Serum collected from RENCA tumor bearing mice 3 days after the indicated treatments were quantified for chemokine levels by ELISA ($p<0.05$). (D) Activated immune cells preferentially target tumors infected with HPGD-expressing virus. Mice were implanted with bilateral RENCA tumors and when these reached 50-100mm^3, these were injected with $1x10^7$ PFU of WR.TK- on one flank and WR.TK-HPGD+ on the opposite flank, after 24 h $1x10^7$ activated and Cy5.5 labeled NK T (CIK) cells were delivered via tail vein injection. 24h later mice were imaged for bioluminescence (Viral gene expression) and fluorescence (NK T cell trafficking to tumors) (*$p<0.05$). A representative example of fluorescence imaging is shown.

FIGURE 25. COX2 expression in tumors infected with WR.TK- compared to untreated tumors.

FIGURE 26A-B. (A) Survival of various cells lines upon infection with TK-. (B) Viral production and gene expression of TK- in various tumor cells lines.

FIGURE 27 depicts viral gene expression of TK- infected MC-38, LLC and AB12 mouse tumor models after day 4 or day 5 of infection.

FIGURE 28. Tumor growth as a function of days after treatment with PBS or infection with deglycosylated WR.TK-TRIF+- (UPCI-1812), Western Reserve TK- carrying HPGD (VV-HPGD) or UPCI-1812 combined with HPGD expression.

FIGURE 29. Enhanced EEV production (A34R mutation K151E) leads to reduced anti-viral neutralizing antibody (14 days after IP delivery of WR or EEV).

FIGURE 30. TRIF domains. In the human TRIF amino acid sequence there are three TRAF binding domains and the RHIM domain that binds RIP1.

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

For clarity of description, and not by way of limitation, the detailed description of the invention is divided into the following subsections:

(i) viral backbone mutations;

(ii) modification of viral glycosylation;

(iii) modification that promotes T cell response;

(iv) modification that inhibits immunosuppression;

(v) modification that enhances virus spread and activity;

(vi) modified viruses;

(vii) methods of treatment; and

(viii) kits.

The term "homology" as used herein refers to the degree of homology between nucleic acid or amino acid sequences as determined using methods known in the art, for example, but not limited to, software such as BLAST or FASTA.

5.1 VIRAL BACKBONE MUTATIONS

In certain non-limiting embodiments of the invention, a VV contains one or more mutations of its genome that favors replication of the virus in a cancer cell and/or increased induction of a Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) immune response. A mutation may be an insertion, deletion, or substitution of one or more nucleic acids of the native virus.

In particular non-limiting embodiments, the mutation results in decreased functional interleukin-18 binding protein ("IL-18BP") expression. As non-limiting examples, (i) the mutation may result in a protein with weaker binding to IL-18 than the native VV protein; (ii) the mutation may result in expression of a truncated protein with decreased or absent functional activity; or (iii) the mutation may delete the IL-18BP gene. In a specific non-limiting example, the mutation may be a C12L deletion (*e.g.,* see Symons et al., 2002, J. Gen.Virol. 83:2833-2844). In certain embodiments, the C12L deletion can be a complete or partial deletion of C12L. For example, and not by way of limitation, a partial deletion of C12L can include a mutation that results in the deletion of at least about 10%, at least about 20%, at least about 30% or at least about 40% or more of the amino acid sequence of the C12L protein.

In further non-limiting embodiments, the viral backbone may contain, separately or in addition to one or more of the mutations in (including deletion of) a nucleic acid encoding IL-18BP described above, a mutation in nucleic acid encoding B8R (IFN gamma binding protein; *e.g.,* see Symons et al., 1995, Cell. 81(4):551-60), B18R (type I IFN binding protein; *e.g.,* see Colamonici et al., 1995, J. Biol. Chem. 270(27):15974-8), A35R (inhibitor of MHC II presentation; *e.g.,* see Rehm et al., 2010, Virology. 397(1):176-86 and Roper et al., 2006, J. Virol. 80(1):306-13), B15R (IL-1β binding protein; *e.g.,* see Alcami et al., 1992, Cell. 71(1):153-67), Chemokine binding proteins (B29R, G3R, H5R), STAT1 inhibitor (H1L); dsRNA or PKR inhibitors such as E3L (*e.g.,* see Chang et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. 89(11):4825-9) or K3L (*e.g.,* see Davies et al., 1993, J. Virol. 67(3):1688-92 and Langland et al., 2002, Virology. 299(1):133-41); Bcl-2 like proteins (such as N1, N2, B14, F1, C6, A46 and K7), or a combination thereof.

5.2 MODIFICATION OF VIRAL GLYCOSYLATION

In certain non-limiting embodiments of the invention, a VV is treated with an agent that modifies glycosylation. For example, a cell producing the VV may be administered a glycosylation inhibitor and/or cultured in the presence of a glycosylation inhibitor or a VV may be treated with an agent that reduces or removes or modifies glycosylation. In certain embodiments, a VV can be subjected to acid treatment to reduce glycosylation of the virus. In certain embodiments, the VV of the present invention can be produced in a cell line that does not have glycosylation activity, *e.g.*, due to mutations in one or more glycosylation enzymes.

In certain embodiments, the VV treated with an agent that reduces or removes or modifies glycosylation, *e.g.*, a deglycosylated virus, can have less than about 90%, less than about 80%, less than about 70%, less than about 60%, less than about 50%, less than about 40%, less than about 30%, less than about 20% or less than about 10% of the glycosylation of a VV that was not treated with agent that modifies glycosylation.

In particular non-limiting embodiments, a VV of the present invention can be treated with a sialidase enzyme which reduces or removes sialic acid residues from the viral surface (*e.g.*, envelope). In non-limiting embodiments, the VV is treated with a sialidase enzyme prior to administration to a subject. In a specific non-limiting embodiment, the sialidase enzyme is Sialidase A enzyme (Glyko Sialidase A, Code WS0042) for example as part of the Glycopro Enzymatic Deglycosylation kit (Product Code: GK80110, Prozyme). In certain embodiments, the VV can be treated with Sialidase A in combination with N- and O-glycanases. Other enzymes that remove sialic acid or that cleave glycosyl residues from the virus may also be used according to the invention, including but not limited to neuraminidases, PNGases (*e.g.*, PNGase A or PNGase F), β1-4 galactosidase, β-N-acetylglucosaminidase, or the use of chemical treatments such as b-elimination or alkali or hydrazinoyls.

Without being bound to any particular theory, it is believed that reduction of glycosylation, for example by sialidase treatment of the vaccinia virus, reduces TLR2 activation and thereby delays systemic immune activation during the period of viral delivery and/or reduces the production of anti-viral neutralizing antibodies.

5.3 MODIFICATIONS THAT PROMOTE T CELL RESPONSE

In certain non-limiting embodiments of the invention, a VV is modified to include one or more nucleic acids encoding a peptide or protein which promotes a T cell response. In certain embodiments, the peptide or protein which promotes a T-cell response can promote the expression of one or more proinflammatory cytokines. For example, and not by way of limitation, proinflammatory cytokines can include IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, CCL5 and IP-10.

Non-limiting examples of a peptide or protein which promotes a T cell response include Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-β ("TRIF") or a functional domain thereof. In certain non-limiting embodiments, the nucleic acid may encode a human TRIF having an amino acid sequence as set forth in UniProtKB No. Q8IUC6, or an amino acid sequence at least about 90 percent, at least about 95 percent or at least about 98 percent homologous thereto, or a murine TRIF having an amino acid sequence as set forth in UniProtKB No. Q80UF7, or an amino acid sequence at least about 90 percent, at least about 95 percent or at least about 98 percent homologous thereto.

In certain non-limiting embodiments, the nucleic acid may encode one or more TRIF domains as depicted in FIGURE 30. In certain embodiments, the nucleic acid encoding a peptide or protein that promotes a T cell response, *e.g.*, TRIF, can be cloned into the locus of the thymidine kinase (TK) gene of the virus as depicted in FIGURE 4A. The nucleic acid encoding a peptide or protein that promotes a T cell response can be operably linked to any promoter that can result in expression of the nucleic acid. As used herein, "operably linked" means that a promoter is in a correct functional location and/or orientation in relation to a nucleic acid sequence to control transcriptional initiation and/or expression of that sequence. In certain embodiments, the promoter is a vaccinia promoter and/or a synthetic vaccinia promoter. In certain embodiments, the promoter is the synthetic vaccinia promoter pSE/L. In certain embodiments, the nucleic acid encoding a peptide or protein that promotes a T cell response is operably linked to the viral p7.5 promoter.

In other non-limiting embodiments, the nucleic acid may encode granulocyte-macrophage colony stimulating factor ("GM-CSF"), IL-12, IFN-γ or IL-18. In certain embodiments more than one such nucleic acid may be incorporated into VV.

5.4 MODIFICATIONS THAT INHIBIT IMMUNOSUPPRESSION

In certain non-limiting embodiments of the invention, a VV is modified to include one or more nucleic acid encoding a peptide or protein or ribonucleic acid or micro-RNA which inhibits or reduces immunosuppression. Non-limiting examples of measures of immunosuppression include: the level of myeloid derived suppressor cells ("MDSC"); the level of M2 macrophages; and the level of helper T cells versus suppressor regulatory T cells. In particular non-limiting embodiments, the nucleic acid encodes a peptide or protein or ribonucleic acid or micro-RNA that reduces prostaglandin E2 activity ("a PGE2 antagonist"). In specific non-limiting embodiments, the nucleic acid encodes a peptide and/or protein that is a PGE2 antagonist (as that term is used herein) that degrades PGE2. In a specific non-limiting example, the protein that degrades PGE2 is 15-PGDH (human) or HPGD (mouse). For example, and not by way of limitation, 15-PGDH may have an amino acid sequence as set forth in UniProtKB No. P15428, or an amino acid sequence at least about 90 percent, at least about 95 percent or at least about 98 percent homologous thereto, and a nucleic acid encoding 15-PGDH may have a nucleic acid sequence as set forth in GenBank Accession No. U63296.1, or a nucleic acid sequence at least about 90 percent, at least about 95 percent or at least about 98 percent homologous thereto. In further non-limiting embodiments, a nucleic acid encoding a secreted and solubilized version of the extracellular receptor for PGE2 may be included in the VV, for example nucleic acid encoding EP1, EP2, EP3 and/or EP4, where EP3 and 4 are higher affinity. In certain embodiments, the one or more peptides or proteins which inhibits or reduces immunosuppression can result in the reduced expression of one or more suppressive chemokines such as, but not limited to, CXCL12. In certain embodiments, the one or more peptides or proteins which inhibits or reduces immunosuppression can result in the increased expression of one or more immune activating chemokines such as, but not limited to, CXCL9, CXCL10 and CCL5.

In certain embodiments, the nucleic acid encoding a PGE2 antagonist can be cloned into the locus of the thymidine kinase (TK) gene of the virus. The nucleic acid encoding a PGE2 antagonist peptide or protein can be operably linked to any promoter that can result in expression of the nucleic acid. In certain embodiments, the nucleic acid encoding a PGE2 antagonist peptide or protein is

operably linked to the viral p7.5 promoter. In certain embodiments, the promoter is a vaccinia promoter and/or a synthetic vaccinia promoter. In certain embodiments, the promoter is the synthetic vaccinia promoter pSE/L. In certain embodiments, the virus can include a nucleic acid encoding a PGE2 antagonist and a nucleic acid encoding a peptide or protein that promotes a T cell response that are both operably linked to a promoter, *e.g.*, the viral p7.5 promoter, and cloned into the locus of the thymidine kinase (TK) gene of the virus.

In further non-limiting embodiments, an immunooncolytic virus of the invention may be administered together with an agent that inhibits or reduces MDSC, including, for example but not by way of limitation, an antibody that targets a surface marker of MDSC such as an anti-CD33 antibody or variable region thereof; an anti-CD11b antibody or variable region thereof; a COX2 inhibitor, *e.g.*, celecoxib; sunitinib and/or all trans retinoic acid (*e.g.,* see Najjar and Finke, 2013, Frontiers in Oncology, 3(49) 1-9).

5.5 MODIFICATIONS THAT ENHANCE VIRUS SPREADING AND ACTIVITY

In certain non-limiting embodiments of the invention, a VV is modified to enhance the spread and/or activity of virus. In particular non-limiting embodiments, a VV is modified to increase the amount of the extracellular enveloped form of the virus that is produced, for example by introducing one or more of the following mutations: A34R Lys151 to Glu; complete or partial deletion of B5R; mutation/deletion of A36R and/or mutation/deletion of A56R. In certain embodiments, a VV is modified to include a complete or partial deletion of B5R.

5.6 MODIFIED VIRUSES

In non-limiting embodiments, the present invention provides for an immuno-oncolytic VV comprising one or more, or two or more, or three or more, or four or more, of the following modifications, as described in the sections above:

(i) a viral backbone mutation;

(ii) a modification of viral glycosylation;

(iii) a modification that promotes T cell response;

(iv) a modification that inhibits immunosuppression; and/or

(v) a modification that enhances virus spreading and activity.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV comprising a modification of viral glycosylation and one or more of the following modifications, as described in the sections above:

(i) a viral backbone mutation;

(ii) a modification that promotes T cell response;

(iii) a modification that inhibits immunosuppression; and/or

(iv) a modification that enhances virus spreading and activity.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host and comprises or carries or contains one or more of the following modifications, as described in the sections above:

(i) a viral backbone mutation;

(ii) a modification that promotes T cell response;

(iii) a modification that inhibits immunosuppression; and/or

(iv) a modification that enhances virus spreading and activity.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV that has reduced glycosylation (*e.g.*, sialylation) relative to unmodified virus and comprises or carries or contains one or more of the following modifications, as described in the sections above:

(i) a viral backbone mutation;

(ii) a modification that promotes T cell response;

(iii) a modification that inhibits immunosuppression; and/or

(iv) a modification that enhances virus spreading and activity.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV that is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation relative to unmodified virus, *i.e.*, a deglycosylated virus.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV that is treated with sialidase prior to administration to a host or that otherwise has reduced sialic acid residues relative to unmodified virus.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV that comprises or carries or contains a nucleic acid encoding TRIF.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV that comprises or carries or contains a nucleic acid encoding a PGE2 antagonist (*e.g.*, 15-PGDH or HPGD).

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV that comprises one or more modifications that enhance virus spreading and activity selected from the group of a A34R Lys151 to Glu mutation; complete or partial deletion of B5R; mutation/deletion of A36R and/or mutation/deletion of A56R.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which comprises one or more virus backbone modification selected from the group of a mutation that reduces expression of functional IL-18BP (*e.g.*, C12L deletion), B8R deletion, B18R deletion, A35R deletion, or a combination thereof.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation relative to unmodified virus and further comprises or carries or contains a nucleic acid encoding TRIF or a functional domain thereof.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to unmodified virus and further comprises or carries or contains a nucleic acid encoding a PGE2 antagonist (*e.g.*, 15-PGDH or HPGD).

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to unmodified virus and further comprises or carries or contains a nucleic acid encoding TRIF or a functional domain thereof and/or a nucleic acid encoding a PGE2 antagonist (*e.g.*, 15-PGDH or HPGD),

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to unmodified virus and further comprises one or more modifications that enhance virus spreading and activity selected from the group of a A34R Lys151 to Glu mutation; complete or partial

deletion of B5R; mutation/deletion of A36R and/or mutation/deletion of A56R. In certain embodiments, the present invention provides for a deglycosylated VV which comprises a complete or partial deletion of B5R.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to unmodified virus and further comprises one or more virus backbone modification selected from the group of a mutation that reduces expression of functional IL-18BP (*e.g.*, C12L deletion), B8R deletion, B18R deletion, A35R deletion, or a combination thereof. In certain embodiments, the present invention provides for a deglycosylated VV which comprises a C12L deletion.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to unmodified virus and further comprises one or more virus backbone modification selected from the group of a mutation that reduces expression of functional IL-18BP (*e.g.*, C12L deletion), B8R deletion, B18R deletion, A35R deletion, or a combination thereof, and further comprises one or more modifications that enhance virus spreading and activity selected from the group of a A34R Lys151 to Glu mutation; complete or partial deletion of B5R; mutation/deletion of A36R and/or mutation/deletion of A56R. In certain embodiments, the present invention provides for a deglycosylated VV which comprises a C12L deletion and a B5R deletion.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to unmodified virus and further comprises or carries or contains a nucleic acid encoding TRIF or a functional domain thereof and further comprises one or more virus backbone modifications selected from the group of a mutation that reduces expression of functional IL-18BP (*e.g.*, C12L deletion), B8R deletion, B18R deletion, A35R deletion, or a combination thereof. In certain embodiments, the virus comprises the C12L deletion.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to unmodified virus and further comprises or carries or contains a nucleic acid encoding a PGE2 antagonist (*e.g.*, 15-PGDH or HPGD) and further comprises one or more virus backbone modifications selected from the group of a mutation that reduces expression of functional IL-18BP (*e.g.*, C12L deletion), B8R deletion, B18R deletion, A35R deletion, or a combination thereof.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a TK-VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to unmodified virus and further comprises or carries or contains a nucleic acid encoding TRIF or a functional domain thereof and a nucleic acid encoding a PGE2 antagonist (*e.g.,* 15-PGDH or HPGD), and further comprises one or more virus backbone modifications selected from the group of a mutation that reduces expression of functional IL-18BP (*e.g.*, C12L deletion), B8R deletion, B18R deletion, A35R deletion, or a combination thereof.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to unmodified virus and further comprises or carries or contains a nucleic acid encoding TRIF or a functional domain thereof and further comprises one or more modifications that enhance virus spreading and activity selected from the group of a A34R Lys151 to Glu mutation; complete or partial deletion of B5R; mutation/deletion of A36R and/or mutation/deletion of A56R.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to unmodified virus and further comprises or carries or contains a nucleic acid encoding a PGE2 antagonist (*e.g.*, 15-PGDH or HPGD) and further comprises one or more modifications that enhance virus spreading and activity selected from the group of a A34R Lys151 to Glu mutation;

complete or partial deletion of B5R; mutation/deletion of A36R and/or mutation/deletion of A56R.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to unmodified virus and further comprises or carries or contains a nucleic acid encoding TRIF or a functional domain thereof and a nucleic acid encoding a PGE2 antagonist (*e.g.,* 15-PGDH or HPGD), and further comprises one or more modifications that enhance virus spreading and activity selected from the group of a A34R Lys151 to Glu mutation; complete or partial deletion of B5R; mutation/deletion of A36R and/or mutation/deletion of A56R.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation (*e.g.*, sialylation) prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to unmodified virus and further comprises or carries or contains a nucleic acid encoding TRIF or a functional domain thereof and a nucleic acid encoding a PGE2 antagonist (*e.g.,* 15-PGDH or HPGD), and further comprises one or more modifications that enhance virus spreading and activity selected from the group of a A34R Lys151 to Glu mutation; complete or partial deletion of B5R; mutation/deletion of A36R and/or mutation/deletion of A56R and comprises one or more virus backbone modifications selected from the group of a mutation that reduces expression of functional IL-18BP (*e.g.*, C12L deletion), B8R deletion, B18R deletion, A35R deletion, or a combination thereof. In certain embodiments, the virus comprises the C12Ldeletion. In certain embodiments, the VV can comprise the C12L deletion and the B5R deletion.

The above-described modifications may be produced in a VV (vaccinia virus) that is known in the art. Non-limiting examples include the Western Reserve strain, Copenhagen strain; Wyeth (NYCBOH) strain; Tian Tian strain; or USSR strain (and see references 1 and 2, below). The base VV strain modified as set forth herein may itself comprise one or more mutation relative to its parent strain, for example, but not limited to, one or more of the following: deletion in TK (*i.e.*, denoted herein as "TK-"); deletion in VGF; SPI-1 deletion; and/or SPI-2 deletion.

In certain non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV with the following modifications:

(i) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus;

(ii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; and/or

(iii) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV with the following modifications:

(i) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus;

(ii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof;

(iii) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof; and/or

(iv) a C12L deletion.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV with the following modifications:

(i) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus;

(ii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof;

(iii) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof;

(iv) a C12L deletion; and/or

(v) a B5R deletion.

In certain non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV with the following modifications:

(i) a TK deletion;

(ii) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus;

(iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; and/or

(iv) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV with the following modifications:

(i) a TK deletion;

(ii) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus;

(iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof;

(iv) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof; and/or

(v) a C12L deletion.

In non-limiting embodiments, the present invention provides for a VV with the following modifications:

(i) a TK deletion;

(ii) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus;

(iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof;

(iv) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof;

(v) a C12L deletion; and/or

(vi) a B5R deletion.

5.7 METHODS OF TREATMENT

The present invention provides a method of reducing the growth of a cancer cell comprising administering, to the cancer cell of a subject, an effective amount of an immunooncolytic VV, as described above. Reducing the growth of a cancer cell may be manifested, for example, by cell death or a slower replication rate or reduced growth rate of a tumor comprising the cell or a prolonged survival of a subject containing the cancer cell.

A "subject" or "patient," as used interchangeably herein, refers to a human or a non-human subject. Non-limiting examples of non-human subjects include non-human primates, dogs, cats, mice, rats, guinea pigs, rabbits, pigs, fowl, horses, cows, goats, sheep, etc.

The present invention provides a method of reducing the growth of a tumor comprising administering, to the tumor, an effective amount of an immunooncolytic VV, as described above. Reducing the growth of a tumor may be manifested, for example, by reduced growth rate or a prolonged survival of a subject containing the tumor.

The present invention provides a method of treating a subject having a cancer comprising administering, to the subject, an effective amount of an immunooncolytic VV as described above.

An "effective amount" in such a method includes an amount that reduces growth rate or spread of the cancer or that prolongs survival in the subject. In

certain embodiments, an effective amount can include an amount that is sufficient to produce an anti-cancer effect in a subject.

An "anti-cancer effect," as used herein, refers to one or more of a reduction in aggregate cancer cell mass, a reduction in cancer cell growth rate, a reduction in cancer cell proliferation, a reduction in tumor mass, a reduction in tumor volume, a reduction in tumor cell proliferation, a reduction in tumor growth rate and/or a reduction in tumor metastasis.

In certain embodiments, the present invention provides a method of producing an anti-cancer effect in a subject having a cancer comprising administering, to the subject, an effective amount of an immunooncolytic VV, as described above.

In specific non-limiting embodiments, the amount of VV administered (*e.g.*, dose) may be between about 10^3 and 10^{11} plaque forming units (PFU), or between about 10^5 and 10^{10} PFU, or between about 10^5 and 10^8 PFU, or between about 10^5 and 10^{11} PFU or between about 10^8 and 10^{11} PFU. *See also* Thorne and Kirn, 2009, Nat Rev Cancer 9: 64-71. Note that herein 10^X is alternatively expressed as 1eX. In certain embodiments, the oncolytic virus can be administered in a single dose or can be administered in multiple doses. In certain embodiments where the virus is administered in multiple does, the doses can be administered sequentially, *e.g.*, at daily, weekly or monthly intervals, or in response to a specific need of the subject.

In certain embodiments, the immunooncolytic virus can be administered in a pharmaceutical composition, wherein the virus is present in an effective amount and combined with a pharmaceutically acceptable carrier. "Pharmaceutically acceptable," as used herein, includes any carrier which does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the active ingredients and/or that is not toxic to the patient to whom it is administered. Non-limiting examples of suitable pharmaceutical carriers include phosphate buffered saline solutions, water, emulsions, such as oil/water emulsions, various types of wetting agents and sterile solutions. Additional non-limiting examples of pharmaceutically compatible carriers can include gels, bioadsorbable matrix materials, implantation elements containing the oncolytic VV or any other suitable vehicle, delivery or dispensing means or material. Such carriers can be formulated by conventional methods and can be administered to the subject at an effective amount.

The VVs of the present invention can be produced by methods known to one of skill in the art. In certain embodiments, the VV can be propagated in suitable host cells, isolated from host cells and stored in conditions that promote stability and integrity of the virus, such that loss of infectivity over time is minimized. For example, the VV can be stored by freezing or drying, such as by lyophilization. In certain embodiments, prior to administration, the stored VV can be reconstituted (if dried for storage) and diluted in a pharmaceutically acceptable carrier for administration.

The oncolytic virus may be administered to the subject using standard methods of administration. In certain non-limiting embodiments, the oncolytic virus can be administered systemically. Alternatively or additionally, the oncolytic virus can be administered by injection at the site of the cancer, *e.g.*, tumor site. For example, and not by way of limitation, the route of administration may be inhalation, intranasal, intravenous, intraarterial, intrathecal, intratumoral, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, topical, intradermal, local regional, oral administration, or combinations thereof. In certain embodiments, the oncolytic virus can be administered to the patient from a source implanted in the patient. In certain embodiments, administration of the oncolytic virus can occur by continuous infusion over a selected period of time. In certain embodiments, pharmaceutical compositions can be directly administered to a tumor site, *e.g.*, via direct intratumoral injection.

Cancers that may be treated by immunooncolytic VV therapy include but are not limited to adenocarcinoma, osteosarcoma, cervical carcinoma, melanoma, hepatocellular carcinoma, breast cancer, lung cancer, prostate cancer, ovarian cancer, leukemia, lymphoma, renal carcinoma, pancreatic cancer, gastric cancer, colon carcinoma, duodenal cancer, glioblastoma multiforme, astrocytoma and sarcoma.

In certain embodiments, treatment using an immunooncolytic VV, as described above, can be used alone or in combination with one or more anti-cancer agents. An "anti-cancer agent," as used herein, can be any molecule, compound, chemical or composition that has an anti-cancer effect. Anti-cancer agents include, but are not limited to, chemotherapeutic agents, radiotherapeutic agents, cytokines, immune checkpoint inhibitors, anti-angiogenic agents, apoptosis-inducing agents, anti-cancer antibodies and/or anti-cyclin-dependent kinase agents.

In certain embodiments, treatment using an immunooncolytic VV can be used alone or in combination with one or immunomodulatory agents. An

immunomodulatory agent can include any compound, molecule or substance capable of suppressing antiviral immunity associated with a tumor or cancer. In certain embodiments, the immunomodulatory agent is capable of suppressing innate immunity and/or adaptive immunity to the oncolytic virus. Non-limiting examples of immunomodulatory agents include anti-CD33 antibody or variable region thereof, an anti-CD11b antibody or variable region thereof, a COX2 inhibitor, *e.g.*, celecoxib, cytokines, such as IL-12, GM-CSF, IL-2, IFNβ and IFNγ, and chemokines, such as MIP-1, MCP-1 and IL-8. In certain embodiments, the immunomodulatory agent includes immune checkpoint inhibitors such as, but not limited to, anti-CTLA4, anti-PD-1, anti-PDL1 and TLR agonists (*e.g.*, Poly I:C).

"In combination with," as used herein, means that the immunooncolytic VV and the one or more agents are administered to a subject as part of a treatment regimen or plan. In certain embodiments, being used in combination does not require that the immunooncolytic VV and the one or more agents are physically combined prior to administration or that they be administered over the same time frame. For example, and not by way of limitation, the immunooncolytic VV and the one or more agents can be administered concurrently to the subject being treated, or can be administered at the same time or sequentially in any order or at different points in time.

In certain embodiments, a method of treating a subject having a cancer includes administering, to the subject, an effective amount of an immunooncolytic VV comprising: (i) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus; (ii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; and (iii) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof.

In certain embodiments, a method of treating a subject having a cancer includes administering, to the subject, an effective amount of an immunooncolytic VV comprising: (i) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus; (ii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; (iii) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof; and (iv) a C12L deletion.

In certain embodiments, a method of treating a subject having a cancer includes administering, to the subject, an effective amount of an immunooncolytic VV comprising: (i) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation)

relative to the unmodified virus; (ii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; (iii) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof; (iv) a C12L deletion; and (v) a B5R deletion.

In certain embodiments, a method of treating a subject having a cancer includes administering, to the subject, an effective amount of an immunooncolytic VV comprising: (i) a TK deletion; (ii) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus; (iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; and (iv) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof.

In certain embodiments, a method of treating a subject having a cancer includes administering, to the subject, an effective amount of an immunooncolytic VV comprising: (i) a TK deletion; (ii) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus; (iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; (iv) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof; and (v) a C12L deletion.

In certain embodiments, a method of treating a subject having a cancer includes administering, to the subject, an effective amount of an immunooncolytic VV comprising: (i) a TK deletion; (ii) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to the unmodified virus; (iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; (iv) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof; (v) a C12L deletion; and (vi) a B5R deletion.

In certain embodiments, the methods of the present invention can further include administering to the subject an effective amount of one or more agents. For example, and not by way of limitation, the agent can be an anti-cancer agent and/or an immunomodulatory agent, as described above.

5.8 KITS

The present invention further provides for kits that provide an immunooncolytic VV as described above. In certain embodiments, a kit of the present invention can include an immunooncolytic VV or a pharmaceutical composition comprising an immunooncolytic VV as described above. In certain embodiments, a kit of the present invention can further include one or more components such as instructions for use, devices and additional reagents, and components, such as tubes, containers and syringes for performing the methods

disclosed above. In certain embodiments, a kit of the present invention can further include one or more agents, *e.g.*, anti-cancer agents and/or immunomodulatory agents, that can be administered in combination with an immunooncolytic VV.

In certain embodiments, a kit of the present invention can include instructions for use, a device for administering the immunooncolytic VV to a subject, or a device for administering an additional agent or compound to a subject. For example, and not by way of limitation, the instructions can include a description of the immunooncolytic VV and, optionally, other components included in the kit, and methods for administration, including methods for determining the proper state of the subject, the proper dosage amount and the proper administration method for administering the immunooncolytic VV. Instructions can also include guidance for monitoring the subject over the duration of the treatment time.

In certain embodiments, a kit of the present invention can include a device for administering the immunooncolytic VV to a subject. Any of a variety of devices known in the art for administering medications and pharmaceutical compositions can be included in the kits provided herein. For example, and not by way of limitation, such devices include, a hypodermic needle, an intravenous needle, a catheter, a needle-less injection device, an inhaler and a liquid dispenser, such as an eyedropper. In certain embodiments, an immunooncolytic VV to be delivered systemically, for example, by intravenous injection, can be included in a kit with a hypodermic needle and syringe.

In certain embodiments, a kit of the present invention includes an effective amount of an immunooncolytic VV comprising: (i) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus; (ii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; and (iii) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof.

In certain embodiments, a kit of the present invention includes an effective amount of an immunooncolytic VV comprising: (i) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus; (ii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; (iii) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof; and (iv) a C12L deletion.

In certain embodiments, a kit of the present invention includes an effective amount of an immunooncolytic VV comprising: (i) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to the unmodified virus; (ii) a

nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; (iii) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof; (iv) a C12L deletion; and (v) a B5R deletion.

In certain embodiments, a kit of the present invention includes an effective amount of an immunooncolytic VV comprising: (i) a TK deletion; (ii) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus; (iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; and (iv) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof.

In certain embodiments, a kit of the present invention includes an effective amount of an immunooncolytic VV comprising: (i) a TK deletion; (ii) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus; (iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; (iv) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof; and (v) a C12L deletion.

In certain embodiments, a kit of the present invention includes an effective amount of an immunooncolytic VV comprising: (i) a TK deletion; (ii) an envelope with reduced glycosylation (*e.g.*, reduced sialylation) relative to an unmodified virus; (iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; (iv) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof; (v) a C12L deletion; and (vi) a B5R deletion.

The following Examples are offered to more fully illustrate the disclosure, but are not to be construed as limiting the scope thereof.

6. EXAMPLE 1: EFFECT OF THE BACKBONE MUTATION C12L

Western Reserve thymidine kinase negative ("TK-") vaccinia virus (VV) was modified to delete C12L. The Western Reserve vaccinia strain was obtained from BEI Resources (Manassas, VA), and all recombinant vaccinia viruses used or constructed were based on this strain.

A virus deletion mutant lacking 40% of the C12L ORF was constructed using transient dominant selection (Falkner & Moss, 1990, J Virol. 64(6): 3108–3111). Cells were infected with wild type vaccinia WR and simultaneously transfected with a plasmid containing regions 3' and 5' of the C12L gene. Recombination was allowed to occur and a selectable marker used to determine

recombination events. Viruses were titered by plaque assay on BSC-1 cells, manufactured and purified as previously described for *in vivo* use (Sampath, P et al. (2013) *Mol. Ther.*, 21: 620-628).

C57BL/6 mice bearing a CMT-93 tumor were administered 5 x 10^8 plaque forming units ("PFU") of either unmodified WR virus or virus carrying the C12L deletion (WRΔC12L). To test the tumor-specificity of the virus, the amount of virus in brain, liver, lung and tumor was evaluated at 1, 3 and 10 days after infection. The results, in FIGURE 1A, show that although approximately equivalent amounts of WR and WRΔC12L virus were found in liver, lung and tumor 1 day after infection, by ten days very little WRΔC12L virus was found in non-tumor tissue relative to the amount found in tumor, with the differential in tumor/non-tumor expression being much less for unmodified WR virus.

To evaluate the effect of the C12L mutation on survival, C57BL/6 mice (purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) bearing subcutaneous CMT-93 tumors were treated intravenously with a single, 1 x 10^8 PFU dose of WR or WRΔC12L virus, and then monitored. While all mice receiving WR virus had died before 60 days post-infection, after 70 days 50 percent of WRΔC12L animals were still alive (FIGURE 1B).

Animals were first immunized with WR or WRΔC12L and the T-cells from these mice (or control mice) were mixed with WR and the resulting IFN-γ production levels were determined by ELISA. The results are shown in FIGURE 1C and indicate that C12L deletion resulted in greater production of CTL or IFN-γ producing splenocytes.

7. EXAMPLE 2. EFFECT OF DEGLYCOSYLATION TREATMENT

To test the effect of the modification of glycosylation of viral surface proteins, WR TK- VV, N-linked and simple O-linked glycans, *e.g.*, sialic acid, were removed from the viral envelope using Sialidase A (Glyko Sialidase A, Code WS0042) or a cocktail of N- and O-glycanases and Sialidase A (Glycopro Enzymatic Deglycosylation kit, Product Code: GK80110, Prozyme). The non-denaturing protocol for deglycosylation of a virus was to take (i) 20 µl of virus stock; (ii) add 17 µl of deionized water; (iii) add 10ul of 5X reaction buffer; (iv) add 1ul each of N-Glycanase, Sialidase A and O-Glycanase (or any enzyme alone used with 19ul of

deionized water); and (v) incubate at 37°C for 16 hours prior to use. Deglycosylation of the virus was confirmed by western blot analysis (FIGURE 2A).

The effect of deglycosylation on virus infectivity was evaluated in different mouse tumor cell lines infected with TK- ("WR" or "WR.TK-) or its deglycosylated version ("TK- deglyc," "WR deglyc" and "DS WR.TK-") at an MOI of 1. HeLa (human cervix adenocarcinoma), Bsc-1 (green monkey normal kidney cells), 143B (human osteosarcoma), CV-1 (green monkey kidney fibroblasts), Renca (murine renal adenocarcinoma) and 4T1 (murine breast cancer) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). HEK293-mTLR2 cells were purchased from InvivoGen (San Diego, CA). MC38 (murine colon adenocarcinoma) and MEFs (murine embryonic fibroblasts) cell lines were, respectively, a kind gift from Dr. David Bartlett and Dr. Robert Sobol (University of Pittsburgh Cancer Center). All cell lines were maintained in recommended culture media containing 5-10% fetal bovine serum and antibiotics at 37°C, 5% CO_2. Viral infectivity was determined by analyzing viral gene expression. Viral gene expression was measured 3 hours after infection by bioluminescence imaging of luciferase expression *in vitro*. For cultured cells, 10 µl of 30 mg/ml D-luciferin (GoldBio, St Louis, MO) were added to 1 ml of culture media. As observed in FIGURE 2B, deglycosylation of the virus envelope did not have an effect on the infectivity of the virus.

The effect of deglycosylation on TLR2 activation was evaluated in a model system which measures NF-κB activation in HEK293 cells engineered to express TLR2 (HEK293/mTLR2) and transfected with pNiFty, a TLR-signaling reporter plasmid. pNiFty (TLR-signaling reporter plasmid-Luciferase) was obtained from InvivoGen and transfected into HEK293/mTLR2 cells using FuGENE HD transfection reagent (Promega, Madison, WI). HEK293/mTLR2 cells were infected at an MOI of 1 with WR or WR deglycosylated virus and TLR2 activation was quantified 24 hours after infection by bioluminescence imaging. As shown in FIGURE 2C, deglycosylation of the virus resulted in less activation of TLR2 *in vitro* compared to virus that was not deglycosylated. Furthermore, and as can be seen in FIGURE 3A, deglycosylated virus was associated with substantially less TLR2 activation than WR virus.

The deglycosylated virus also exhibited greater uptake by tumors. For these experiments, the luciferase gene under the control of the synthetic vaccinia promoter pE/L (Chakrabarti et al. (1997). Biotechniques 23: 1094-1097) was incorporated into WR.TK- or DS WR.TK- vaccinia virus ("WR.TK-Luc+" and "DS WR.TK-Luc+", respectively), and introduced intravenously into BALB/c mice (purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)) bearing 4T1 subcutaneous tumor. Viral gene expression in the tumor could then be measured by bioluminescence imaging of luciferase expression *in vivo*. For animal models, a dose of 4.5 mg of D-luciferin was injected intraperitoneally per mouse before imaging. An IVIS 2000 model (PerkinElmer, Waltham, MA) was used for the imaging and images were analyzed with LivingImage software (PerkinElmer).

FIGURE 3B shows that 24 hours after infection, there was significantly greater expression of DS WR.TK-Luc+ virus in the tumor relative to its glycosylated counterpart. This difference in uptake was not observed in non-tumor tissues. FIGURE 3C shows that deglycosylated virus infection results in a smaller tumor volume. In addition, BALB/c mice harboring subcutaneous xenografts of Renca cells (mouse renal adenocarcinoma) were randomized and injected with a single intravenous dose of $1x10^8$ PFU per mouse of TK- or TK- deglycosylated virus. Kinetics of viral gene expression from within the tumor was monitored by bioluminescence imaging of viral luciferase expression. As shown in FIGURE 2E, deglycosylation of the viral envelope increased gene expression in tumors *in vivo*.

The effect of the deglycosylation of the virus on the presence of pSTAT1-pSTAT3+ lymphocytes was analyzed in C57BL/6 mice injected intravenously with $1x10^7$ PFU of WR or WR deglycosylated virus. Spleens were harvested from C57BL/6 mice 1 hour after injection of the indicated viruses and splenocytes were isolated, fixated in 1.6% PFA and permeabilized with methanol. Two-color intracellular immunostaining analyses were performed using a LSRFortessa Flow Cytometer (BD Biosciences, San Jose, California). Splenocytes were stained using PacificBlue anti-mouse pSTAT1 and AlexaFluor647 anti-mouse pSTAT3 antibodies (BD Biosciences). The percentage of pSTAT1-pSTAT3+ lymphocytes was determined by flow cytometry, and PBS and PAM(3)CSK(4) were used as controls. FIGURE 2D shows that STAT3 phosphorylation was depleted in splenic lymphocytes of mice injected with deglycosylated vaccinia virus.

To determine the immune response against the virus *in vivo*, neutralizing antibody assays were performed. In brief, antibody-containing serum was obtained from mice treated as indicated at day 14 after virus injection and serial dilutions of the serum (starting at 1/20) were used to neutralize 1000 PFUs of TK- vaccinia virus. $2x10^4$ HeLa cells were plated per well in 96-well and infected with serum-virus mix. At day 4 post-infection, plates were washed with PBS and absorbance was quantified after staining cultures using a nonradioactive cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI). IC_{50} values (dilution of the serum required to neutralize Vaccinia virus capable of inducing 50% of cell inhibition) were estimated from dose-response curves by standard nonlinear regression, using an adapted Hill equation. As shown in FIGURE 3D, the amount of neutralizing antibody against the virus is greater in wild-type C57BL/6 mice than in mice bearing a TLR2 knockout mutation. Accordingly, lower TLR2 activation associated with deglycosylated virus may be associated with less anti-virus antibody production and an improved anti-tumor response.

8. EXAMPLE 3. EFFECT OF TRIF EXPRESSION

A nucleic acid encoding murine TRIF was introduced into WR.TK- virus and its effect on T cells was evaluated. TRIF was expressed from within the thymidine kinase locus, expressed from the viral early/late vaccinia p7.5 promoter ("TK-TRIF" OR "WR.TK-.TRIF"; FIGURE 4A). A WR.TK- virus having a nucleic acid encoding murine DAI (DLM-1/ZBP1) expressed from the p7.5 and cloned into the locus of the viral thymidine kinase gene was generated ("TK-DAI"; FIGURE 4A).

ELISA was performed to confirm expression of TRIF from the TK- TRIF virus (FIGURE 4B). For ELISA, a mouse TRIF ELISA kit was used to determine the concentration of TRIF in supernatant or cell extracts of cells infected at an MOI of 1 (PFU/cell) with TK-TRIF. As shown in FIGURE 4B, the TK-TRIF virus specifically expressed TRIF as compared to TK-. Western blot was used to confirm expression of DAI from the TK-DAI virus (FIGURE 4C). For western blot analysis, cell cultures were seeded in 6-well plates and infected at an MOI of 5 (PFU/cell) and, 24 hours after infection, whole-cell protein extracts were incubated in cell lysis buffer (Cell Signaling Technology Inc, Danvers, MA) for 1 hour at 4°C. Clarified samples (15 μg/lane) were separated by a 10% SDS-PAGE gel and transferred to a

nitrocellulose membrane. Mouse DAI protein was detected by immunoblotting membranes using a polyclonal anti-DAI primary antibody (Rabbit, Abcam, Cambridge, MA) and a polyclonal anti-rabbit conjugated with HRP (Goat, Thermo Scientific, Waltham, MA). A mouse monoclonal anti-β actin antibody (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) and a peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (Goat, Thermo Scientific) were used for immunoblotting of β-actin as a loading control. As shown in FIGURE 4C, TK-DAI virus specifically expressed DAI compared to TK-.

As shown in FIGURE 5A, expression of TRIF resulted in an increase in Type I interferon production by lymphocytes *in vitro*. Expression of TRIF also increased CTL production *in vivo*, as shown by ELISpot assay (FIGURE 5B). For ELISpot assays, splenocytes were prepared from mice. Splenocytes were mixed with tumor cells or splenocytes previously infected with UV-inactivated vaccinia virus at a ratio of 5:1. Naïve splenocytes from each mouse were used as a control. 96-well membrane filter plates (EMD Millipore, Billerica, MA) coated with 15 μg/ml of monoclonal anti-mouse IFN-γ antibody AN18 (Mabtech, Inc., Cincinnati, OH) were used for the assays. Cells were maintained for 48 hours at 37°C and spots were detected using 1 μg/ml of biotinylated anti-mouse IFN-γ antibody R4-6A2-biotin (Mabtech). Plates were developed using an ABC kit and an AEC substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Specific spots were counted and analyzed using an ImmunoSpot Analyzer and software (CTL, Shaker Heights, OH).

Analysis of the release of cytokines and chemokines *in vitro* and *in vivo* following 24 hours after infection of TK-, TK-TRIF or TK-DAI (MOI of 1) was performed by a Luminex assay. For cell culture supernatants, a Miliplex Mouse Cytokine Panel (5-plex) Kit from Milipore (Billerica, MA) and a Mouse 2-plex assay Kit from Panomics (Redwood City, CA) were used. For tumor lysates, a Cytokine Mouse 20-plex Panel Kit from Invitrogen (Carlsbad, CA) was used for determining concentrations in tumors harvested at day 4 after Vaccinia virus administration. Tumors were homogenized using Lysing Matrix D tubes and a FastPrep-24 instrument. As shown in FIGURES 6A and C, the concentrations of pIKKβ, IL-6, IP-10, TNF-α and IFN-β increased significantly upon infection with TK-TRIF as compared to TK- in different tumor cell lines as compared to TK-. In addition, BALB/c mice with established Renca subcutaneous xenografts injected with a single

intravenous dose of $1x10^8$ PFU per mouse of TK- or TK-TRIF were analyzed to determine the *in vivo* intratumoral concentration of cytokines and chemokines. 4 days after injection, tumors were harvested and concentration of a various cytokines and chemokines was determined in tumor lysates by luminex or ELISA assays. FIGURE 6D shows that the intratumoral concentrations of INF-γ, IL-12, IP-10, TNF-α, IL-1β, GM-CSF and KC significantly increased in response to TK-TRIF as compared to TK-.

Activation of NF-κB and IRF3 pathways were analyzed after infection with TK-TRIF and TK-DAI. ELISA assays were utilized to determine concentrations of pIKKβ and IRF3 in cytoplasmic and nuclear extracts, respectively, of 4T1 or MEF cells infected with TK-, TK-TRIF or TK-DAI at an MOI of 1. As shown in FIGURE 6A and B, TK-TRIF increased the activation of the NF-κB and IRF3 signaling pathways as observed by an increase in the concentration of pIKKβ and IRF3 expression following 24 hours after infection. FIGURE 7A shows that the phosphorylation of NF-κB increased following infection of TK-TRIF and TK-DAI. HMGB1 and Hsp-70, which function as regulators of NF-κB, also exhibited altered expression following infection by TK-TRIF (FIGURE 7B and 7C). The presence of CD4+ helper T cells and CD8+ cytotoxic T-cells were analyzed following infection with TK-, TK-TRIF. As shown in FIGURE 7D and E, the number of cytotoxic T-cells and helper T-cells were higher in mice infected with TK-TRIF.

Analysis of the replication and antitumor activity of TK-TRIF was performed in different mouse tumor cells. Various tumor cell lines were infected with an MOI of 1 and virus production was measured by ELISpot plaque-assay, as described above, at different time points. As shown in FIGURE 8A, viral production of both TK-TIRF and TK-DAI was significantly less in the resistant Renca cells as compared to TK-, but viral production of TK-TIRF and TK-DAI in MC38 and 4T1 cells were at similar levels to TK- (*see also* FIGURE 9A).

Further analysis of viral expression in tumors and tumor volumes were performed in BALB/c or C57BL/6 mice implanted with Renca or MC38 xenografts, respectively, and BALB/c mice implanted with 4T1 xenografts. BALB/c or C57BL/6 mice were injected with PBS or $1x10^8$ PFU of TK-, TK-TRIF or TK-DAI through the tail vein. For the 4T1 semi-orthotopic model, $2x10^5$ 4T1 cells were implanted into the fat pad of the mammary gland of BALB/C female mice. FIGURE 8C shows that viral gene expression of TK-TRIF and TK-DAI was at a lower level in tumors of Renca or MC38 xenografts implanted in BALB/c or C57BL/6 mice, respectively, compared to

viral gene expression of TK-. FIGURE 9C shows that viral production and viral expression of TK-DAI and TK-TRIF was reduced in tumors as compared to viral expression of TK- or TK- virus expressing GM-CSF ("TK-GMCSF"). BALB/c mice with Renca tumors implanted subcutaneously were treated with an IV dose of $1x10^8$ PFU once tumors reached 50-100 mm^3. Viruses used were WR.TK- and WR.TK-TRIF+ (or PBS control). The subsequent tumor response was followed by caliper measurement, and a reduction in tumor growth was observed in mice infected with TK-TRIF (FIGURE 5C and FIGURE 8D). A similar response was observed in mice implanted with MC38 tumors (FIGURE 8D) and 4T1 tumors compared to tumors infected with TK-GMCSF (FIGURE 9D).

Cytotoxicity of the modified virus as compared to TK- was determined by performing cytotoxicity assays. Cytotoxity assays were performed by seeding $2x10^4$ cells per well in 96-well plates in DMEM with 5% FBS. Cells were infected with serial dilutions starting at a MOI of 75 and, at day 4 post-infection, plates were washed with PBS and absorbance was quantified after staining cultures using a non-radioactive cell proliferation assay kit (Promega, Madison, WI). IC_{50} values (PFU per cell required to produce 50% inhibition) were estimated from dose-response curves by standard nonlinear regression, using an adapted Hill equation. FIGURE 8B shows comparative cytotoxicity of TK-TRIF and TK-DAI in cells infected with the indicated viruses at doses ranging from 75 to 0.00025 PFU/cell. The modification of the TK- virus to express TRIF or DAI did not result in a change in cytotoxicity compared to TK-. Determination of the number of apoptotic cells by AnnexinV staining, as shown in FIGURE 9B, indicates that infection of Renca and 4T1 cells resulted in an increase in apoptotic cells. Apoptosis/necrosis evaluation of cell lines, cells were infected with an MOI of 1 with indicated viruses and stained using an Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Abcam, Cambridge, MA) 48 hours after infection. Analyses were performed using an Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences).

Experiments were performed to determine if TK-TRIF affects the survival of mice with Renca or MC38 xenografts compared to mice treated with TK- or PBS. Renca or MC38 xenografts were established in BALB/C or C57BL/6 mice, respectively, and treated with a single intravenous dose of $1x10^8$ PFU of indicated viruses or PBS. As shown in FIGURE 9E and F, TK-TRIF significantly improved survival compared to treatment with TK-.

9. EXAMPLE 4. EFFECT OF COMBINED TRIF EXPRESSION AND DEGLYCOSYLATION.

TK- virus modified to express TRIF, as discussed above in 6.3, was deglycosylated ("TK-TRIF deglyc") to analyze the effect such a combination would have on the antitumor cellular responses and antitumor efficacy of the virus.

To determine the toxicity of the virus expressing TK-TRIF, the body weight of BALB/C mice injected intravenously with PBS as a control or 1×10^8 PFU per mouse of TK-, TK-TRIF, or TK-TRIF deglycosylated were analyzed. FIGURE 10A shows that TK-injected mice presented more than 10% reduction in body-weight at day 6 after virus injection, whereas TK-TRIF and TK-TRIF deglyc-injected mice presented a similar weight profile than those injected with PBS, indicating that TK-TRIF and TK-TRIF deglyc are less toxic than TK-.

Viral gene expression of TK-TRIF-deglyc in *in vivo*, as compared to TK- and TK-TRIF, was analyzed. Renca tumors were implanted in BALB/c mice, and mice were injected with PBS or $1x10^8$ pfu of TK-, TK-TRIF, or TK-TRIF deglyc through the tail vein. Viral gene expression was determined by detecting viral luciferase expression from within the tumors and measured at indicated time points. FIGURE 10B shows that 24 hours after infection, there was less expression of TK-TRIF and TK-TRIF deglyc in the tumors compared to TK-.

Experiments were performed to determine if TK-TRIF or TK-TRIF deglyc affected the survival of mice with Renca or MC38 xenografts compared to mice treated with TK- or PBS. Renca or MC38 xenografts were established in BALB/C or C57BL/6 mice, respectively, and treated with a single intravenous dose of $1x10^8$ PFU of indicated viruses or PBS. As shown in FIGURE 10C and D, TK-TRIF and TK-TRIF deglyc significantly improved the survival of the mice compared to treatment with TK-. Also, TK-TRIF deglyc improved survival of mice with Renca tumors compared with TK-GMCSF treatment (FIGURE 10E).

The cellular immune responses to Vaccinia virus and tumor cells were evaluated by IFN-γ ELISpot assay, as described above in section 6.3. At day 7 post-virus administration, spleens were harvested from mice injected intravenously with $1x10^8$ PFU of indicated viruses or PBS (BALB/c mice bearing Renca xenografts) and evaluated for the amount of CTLs recognizing Vaccinia virus or Renca cells. FIGURE 11A shows that deglycosylation and expression of TRIF resulted in a significant increase in CTL production recognizing the Vaccinia virus *in vivo*, as

compared to the modifications alone, *e.g.*, TK-TRIF or TK-deglyc. In particular, the deglycosylated virus expressing TRIF resulted in an increase in CTL production that was greater than the increases in CTL production observed by the individual modifications. Additionally, FIGURE 11B shows that deglycosylation and expression of TRIF resulted in an increase in the amount of CTLs production recognizing RENCA cells *in vivo*, as compared to the modifications alone, *e.g.*, TK-TRIF or TK-deglyc.

A neutralizing assay was performed to determine circulating anti-Vaccinia antibody levels for mice injected with $1x10^8$ PFU of TK-, TK-TRIF, or TK-TRIF deglycosylated. Nabs titers were determined by the highest dilution of serum that resulted in at least 50% inhibition of infection. FIGURE 11C shows that the amount of neutralizing antibody is greater in wild-type C57BL/6 mice infected with TK- compared to mice infected with TK-TRIF, TK-deglyc or TK-TRIF-deglyc. Mice infected with TK-TRIF-deglyc showed the greatest reduction in the amount of neutralizing antibody in the serum.

The effect of deglycosylated virus expressing TRIF on tumor growth was analyzed in BALB/c mice bearing Renca or C57BL/6 mice bearing MC38 tumor xenografts. For Renca or MC38 tumor xenografts, tumor cell lines were implanted subcutaneously at $5x10^5$ cells per mouse into BALB/c or C57BL/6 mice, respectively. When tumor reached ~50-100 mm^3, mice were treated with a single intravenous dose of indicated viruses ($1x10^8$ PFU/mouse) into the tail vein. Tumor growth was monitored by caliper measurement and was defined by the equation $V(mm^3)= \pi/6 \text{ X } W^2 \text{ X } L$, where W and L are the width and the length of the tumor, respectively. Data was expressed as relative tumor size to the beginning of the therapy, which was set as 100%. Surprisingly, TK-TRIF deglycosylated virus resulted in a greater reduction in the tumor size of RENCA and MC38 xenograft-bearing mice as compared to the additive effect of the individual modifications combined or the TK- virus (FIGURES 11D and E). Further, TK-TRIF deglycosylated exhibited improved anti-tumor activity compared to TK-GMCSF, as observed by a significant reduction in tumor size in BALB/c mice harboring Renca xenografts (FIGURE 11F) or 4T1 subcutaneous tumors in BALB/c mice (FIGURE 9D). Accordingly, deglycosylated TK- vaccinia virus expressing TRIF exhibits a significantly improved anti-tumor response and results in a reduction in anti-virus antibody production.

10. EXAMPLE 5. EFFECT OF COMBINED TRIF EXPRESSION, DE-SIALYLATION AND C12L DELETION IN UPCI-1812

The above modifications, namely C12L deletion, de-sialylation, and introduction of TRIF were incorporated together to create new VV strain UPCI-1812, and the effect of this triply modified virus was evaluated for its therapeutic and immunologic effects. As shown in FIGURE 12A, UPCI-1812 infection resulted in significantly better survival than WR.TK- encoding GM-CSF. Relative to the de-sialylated virus with the C12L deletion ("vvDD"), UPCI-1812 produced significantly higher levels of interferon gamma (IFN-γ) (FIGURE 12B) and interleukin-12 (IL-12) (FIGURE 12C).

11. EXAMPLE 6. EFFECT OF PGE2 TARGETING

Oncolytic viral therapies have finally begun to demonstrate clinical efficacy in randomized studies highlighting the real potential of the platform. However, among the current generation of clinical vectors, those found to be most successful have expressed an immune activating cytokine (GM-CSF), reinforcing a plethora of pre-clinical data indicating that the immune response is a key mediator of viral effectiveness. However, despite this observation, it is still unclear how or why some patients respond well and others appear resistant to oncolytic virotherapy.

Initial experiments were performed to correlate the *in vitro* sensitivity of a tumor cell line to viral infection and replication with *in vivo* responses of the same cell line when used to form syngeneic tumors in immunocompetent mice. 14 different tumor mouse cell lines of different tumor types and mouse strains were analyzed *in vitro* by infecting the cell lines with TK- (FIGURE 26A). Viral production and viral gene expression was observed in the 14 different tumor mouse cell lines. Viral production was analyzed by seeding $2x10^5$ cells in 24-well plates, followed by infection at an MOI of 1 (PFU/cell) with indicated Vaccinia viruses. Four hours after infection, cultures were washed twice with PBS and incubated in fresh virus-free medium. At indicated time points after infection, cultures were harvested and frozen-thawed three times to obtain the cell extract (CE). Viral titers were determined by plaque assay on BSC-1 cells.

Seven of the 14 lines were further tested *in vivo* using direct intratumoral injection of TK- (FIGURE 13A and B and FIGURE 26A and B). Direct

intratumoral injection was used to reduce variability that may occur due to differences in viral delivery. As shown in FIGURE 13A and B, no direct correlation was observed between either viral replication or viral-mediated cell killing and *in vivo* anti-tumor effect, indicating factors other than direct oncolytic activity mediate anti-tumor effects.

Oncolytic vaccinia expressing luciferase was used during these experiments to allow analysis of viral gene expression over time in individual mice (as a surrogate for viral replication and persistence), and allow comparisons to subsequent response. Two distinct patterns appeared to emerge from the data. For the more resistant tumor models, defined as viral therapy increasing overall survival by less than 2 weeks, as seen with Renca, B16, PAN02 and 4T1, a direct correlation could be drawn within each individual tumor model, such that the level of viral gene expression at 24h corresponded to the subsequent response (FIGURE 13B). Therefore even though *in vitro* replication does not correlate with *in vivo* activity when comparing tumor models (presumably due to the influence of factors such as ECM and non-tumor cells in the tumor), within any one individual tumor model there is a correlation between early viral gene expression and subsequent response. Without being bound to a particular theory, it appears that viral replication and direct oncolytic activity is the key mediator of the limited response in the more resistant tumor models. However, a different pattern was observed in tumors that responded well to viral therapy, which includes tumor models AB12, LLC, MC38. In these models, the best responders within each model demonstrated a rapid and robust clearance of the virus after initial infection and early replication (FIGURE 13B and FIGURE 27). This robust clearance suggests the induction of a strong immune response to enhance the viral direct oncolytic effects in the better responding tumor models.

In order to examine this observation in more detail, two tumor models in the same genetic background were initially chosen that displayed comparable responses after viral treatment *in vivo*, but one of which (LLC) displayed indications of a robust immune induction (early viral clearance) and limited viral-mediated cell killing *in vitro* (FIGURE 13B and FIGURE 26A and B). The other (B16) was more sensitive to viral killing *in vitro*, and any response *in vivo* appeared to correlate with early viral gene expression (FIGURE 13B and FIGURE 26A and B). A comprehensive examination of activation of systemic immune markers after viral infection were compared between mice with no tumors, mice with B16 tumors and

mice with LLC tumors. These included early innate signaling activation markers such as pS6, pSTAT1, pSTAT3, pSTAT5 in different cell populations (FIGURE 13C and FIGURE 14A), T-cell proliferation markers such as pS6 and Ki67 (FIGURE 14A) and activation markers such as CD44 and CD62L (FIGURES 14A), and neutralizing antibody responses (FIGURES 14D). Minor differences were seen in the systemic immune response to viral therapy between tumor bearing and non-tumor bearing animals, with the one exception being the phosphorylation of S6 in some myeloid cells early after infection (FIGURE 13C). pS6 levels were observed to be reduced in tumor bearing animals, but the reduction in immune activation was most pronounced in the B16 tumor-bearing mice (FIGURE 13C and FIGURE 14A). This was verified in other tumor models, again confirming that pS6 levels were reduced in the more resistant tumor models (including 4T1 and RENCA), indicating a defect in the dendritic cell (DC) response which may mediate resistance in these mice (FIGURE 13C).

As there were little differences observed in the systemic immune response, the effects of more localized immune suppression within the tumor were examined. Different immune cells are associated with a suppressive phenotype, including myeloid-derived suppressor cells (MDSC) and regulatory T-cells (T-regs) (and M2 macs). The level of these different cell types in both the spleen and the tumor of all the tumor models as compared to untreated animals were analyzed. For evaluation of immune populations in tumors, tumors were harvested from mice treated as indicated, and mechanically disaggregated and digested with triple enzyme mixture (Collagenase type IV, DNase type IV, and Hyaluronidase type V (Sigma-Aldrich, St Louis, MO)). Four-color cell surface immunostaining analyses were performed using a Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA). Tumor-disaggregated cells were stained using PE-Cy7 anti-mouse CD3 (BD Biosciences, San Jose, CA), FITC anti-mouse CD4, PerCP-Cy5.5 anti-mouse CD8, and PE anti-mouse CD25 (eBioscience, San Diego, CA).

The level of MDSCs found in the tumor for different tumor models correlated closely with the resistance or sensitivity of that model to viral therapy (FIGURE 15A and B and FIGURE 16). For example, Renca, which exhibits resistance to viral therapy, resulted in tumors with high MDSC levels. FIGURE 17A shows the number of MDSC in untreated tumors as a function of increased survival after intravenous treatment with 1e8 PFU of WR.TK- for a number of various tumor

model systems. Vaccinia strains display a very poor ability to increase survival in mouse tumor models that display high levels of MDSC at baseline. Cells of each of the tumor model cell lines listed (FIGURE 17A) were implanted in syngeneic immunocompetent mice. Mice were then either sacrificed in order to determine the average baseline level of MDSC in the resulting tumors for each model or the mice were treated with WR.TK- (or PBS control)(1e8 PFU given intratumorally) and the increase in life expectancy (for 50% survival) determined after treatment (in days). The graph plots "relative MDSC numbers in tumors at baseline" vs "median increase in survival after WR.TK- treatment (relative to untreated control)". More MDSC at baseline correlated with reduced effectiveness of therapy.

Further changes that occurred in the tumor after viral therapy were examined and it was observed that for multiple tumor models, such as 4T1, RENCA and MC38, the addition of vaccinia therapy resulted in a loss of T-reg, but that MDSC levels were unaffected and continued to increase over time, as they did in the control groups (FIGURE 15A and B and FIGURE 16A and B). Viral therapy reduced levels of T-reg in treated tumors but had no impact on MDSC levels. In the Renca tumor model (implanted subcutaneously in BALB/c mice), relative numbers of T-regs or MDSC in the tumor/ mg of tumor were determined at different times before or after WR.TK- treatment (1e8 PFU given intratumorally) (FIGURES 17B and C). It therefore appears that oncolytic vaccinia's inability to target MDSC reduced its therapeutic activity in some tumors where the levels of MDSC are high. In the tumors with low background levels of MDSC (MC38), the viral therapy was also found to enhance the level of CD8+ T-cells into the tumor, whereas the more resistant tumor models (4T1) did not display any increase (FIGURE 15B).

Analysis of the immunogenic vaccinia strain GM-CSF, which expresses the cytokine colony-stimulating factor (CSF) was performed. GM-CSF has been previously shown to result in more dramatic clinical responses and has also been associated with MDSC proliferation. FIGURES 18 and 19 show that although the more immunogenic vaccinia strains (WR.TK-GMCSF and WR.B18R-IFNβ+) did further enhance some aspects of the immune response in the sensitive tumor models, such as further reducing T-reg and increasing CD8+ T-cell levels, no such advantage was seen in the otherwise resistant tumor models. Without being bound to a particular theory, it appears that the main difference between sensitive and resistant tumors relates to the inability of the virus to induce a robust immunotherapeutic effect

in tumors with high levels of MDSC-mediated immune suppression within the tumor microenvironment.

Recent reports have identified COX2-mediated production of the prostaglandin PGE2 as a key determinant of MDSC infiltration and maintenance of MDSC phenotype. Two approaches were used to target this pathway. One approach was through the application of a COX2 inhibitor. The second approach was the expression of the prostaglandin-degrading enzyme HPGD directly from the viral vectors. A nucleic acid encoding hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15 (HPGD), a mouse enzyme that degrades PGE2, was introduced into WR.TK- by insertion into the thymidine kinase locus by homologous recombination, and under control of the viral p7.5 promoter ("TK-HPGD" or "WR.TK-.HPGD"). As shown in FIGURE 20, HPGD was specifically expressed from TK-HPGD and significantly reduced PGE2 levels in Renca cells infected with TK-HPGD. As shown in FIGURE 25, it appears that infection with WR.TK- may alter COX2 expression in the tumors locally at the site of infection, without producing significant levels of COX2 expression overall in the tumor, or the virus may selectively replicate in regions with low COX2 levels. Initial *in vitro* and *in vivo* experiments determined that even at toxic levels, the COX2 inhibitors were unable to reduce PGE2 levels to anywhere near the level achieved with HPGD expression (FIGURE 20).

Oncolytic vaccinia expressing HPGD was then tested in several mouse tumor models. It was seen that the number of MDSC cells in the tumor were rapidly and significantly reduced in the spleen and tumors after treatment with WR-TK-HPGD only (FIGURE 21 and FIGURE 23A-D). Inclusion of HPGD also was found to reduce MDSC in tumor and spleen relative to unmodified WR.TK- virus. This was specific to tumors, with no systemic toxicity seen (FIGURE 21A). Interestingly, TK-HPGD also induced a more rapid and robust reduction in T-reg numbers in the tumor. As shown in FIGURE 21B and C, and FIGURE 22, infection with WR-TK-HPGD correlated with an enhanced therapeutic effect in several mouse tumor models *in vivo* and resulted in lower tumor volumes. Of note, the tumor model that was previously most resistant to viral therapy, RENCA, which displayed an "oncolytic only" phenotype and high baseline levels of MDSC, surprisingly displayed the greatest increase in therapeutic benefit after HPGD expression (FIGURE 21B).

The patterns of viral gene expression were also compared for WR.TK- and WR.TK-HPGD in the RENCA tumor. It was seen that whereas for WR.TK- an

"oncolytic only" phenotype was seen (higher gene expression at day 1 correlated with greatest therapeutic benefit), WR.TK-HPGD+ displayed the "oncolytic and immunotherapeutic" phenotype, with the best responders displaying a robust and rapid clearance of the virus by day 5 (FIGURE 21D). Without being bound to a particular theory, it appears that HPGD expression is capable of returning the immunotherapeutic activity of the vector in these more resistant models, and so can sensitize otherwise resistant tumors to oncolytic viral therapy. This was despite no overall loss in oncolytic potential of the HPGD expression.

Analysis of the mechanisms mediating the therapeutic advantages seen with WR.TK-HPGD+ were performed. At 3 days after treatment, by which time the levels of MDSC and T-regs had already been dramatically reduced within the tumor environment, it was noted that only modest changes occurred in the levels of cytokines and chemokines in the tumor (FIGURE 24A). However, the level of chemokines in the serum changed markedly (FIGURE 24B). In particular, chemokines associated with attraction of activated T-cells, including CCL5 were upregulated, while CXCL12 (sdf-1, associated with an immunosuppressive phenotype and poor prognosis) had been dramatically reduced (FIGURE 24A and B). This change in the systemic chemokine effect may be responsible for mediating the changes in the immune cell repertoire in the tumor. This was further examined using a bilateral tumor assay, where one tumor was injected with WR.TK- and the tumor on the opposite flank was injected with WR.TK-HPGD. It was seen that activated T-cells trafficked significantly more to the HPGD expressing tumor (FIGURE 24D). Furthermore, at later time points it was seen that WR.TK-HPGD expression resulted in dramatically increased levels of tumor-targeting CTL in the spleen. These data indicates that the expression of HPGD is acting to not only limit the suppressive environment within the tumor, but is also enhancing attraction of T-cells leading to a more robust anti-tumor adaptive immune response. Furthermore, incorporation of HPGD into UPCI-1812 resulted in a virus which inhibited tumor growth significantly more than UPCI-1812 ("combined"; FIGURE 28). As shown in FIGURE 28, the combined virus resulted in a greater reduction in the tumor growth than the additive effect of the UPCI-1812 virus and VV-HPGD virus. Viral-mediated targeting of PGE2 was capable of overcoming localized immune suppression leading to profound changes in the tumor microenvironment and resulting in sensitization of previously resistant tumors to viral therapy.

13. EXAMPLE 7. MODIFICATION THAT INCREASES ACTIVITY AND SPREAD

FIGURE 29 shows the level of anti-vaccinia neutralizing antibody present in the serum of mice vaccinated with (1e4 PFU) of either WR or WR with an EEV-enhancing point mutation in the A34R viral gene (Lys151 to Glu). The A34R mutant strain produces less anti-vaccinia neutralizing antibody compared to WR-.

14. REFERENCES

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., Gentschev, I., Goebel, W. & Szalay, A.A. Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. Nat Biotechnol 22, 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., MacDougal, 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., Rosenzwajg, 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. & Alcami, A. Vaccinia virus immune evasion. Immunol Rev 159, 137-54 (1997).

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

43. Symons, J.A., Alcami, 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'Keeffe, 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., Trumpfheller, 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. Trumpfheller, 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. & Falo, 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).

Various publications are cited herein, the contents of which are hereby incorporated by reference in their entireties.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An oncolytic vaccinia virus comprising two or more of the following modifications:

(i) a viral backbone mutation;

(ii) a modification of viral glycosylation;

(iii) a modification that promotes T cell response;

(iv) a modification that inhibits immunosuppression; and/or

(v) a modification that enhances virus spread and activity.

2. An oncolytic vaccinia virus comprising a modification of viral glycosylation and one or more of the following modifications:

(i) a viral backbone mutation;

(ii) a modification that promotes T cell response;

(iii) a modification that inhibits immunosuppression; and/or

(iv) a modification that enhances virus spread and activity.

3. An oncolytic vaccinia virus which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation relative to unmodified virus.

4. An oncolytic vaccinia virus which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation relative to unmodified virus and comprises one or more of the following modifications:

(i) a viral backbone mutation;

(ii) a modification that promotes T cell response;

(iii) a modification that inhibits immunosuppression; and/or

(iv) a modification that enhances virus spread and activity.

5. The oncolytic vaccinia virus of claim 1, 2 or 4, wherein the viral backbone mutation is a deletion or functional deletion of interleukin 18-binding protein.

6. The oncolytic vaccinia virus of claim 1, 2 or 4, wherein the viral backbone mutation is a B8R deletion, a B18R deletion, an A35R deletion, or a combination thereof.

7. The oncolytic vaccinia virus of claim 1, 2, 4, 5 or 6, wherein the modification that promotes T cell response is the incorporation of a nucleic acid

encoding a Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing interferon beta (TRIF) protein or a functional domain thereof.

8. The oncolytic vaccinia virus of claim 1, 2, 4, 5 or 6, wherein the modification that promotes T cell response is the incorporation of a nucleic acid encoding granulocyte macrophage colony stimulating factor.

9. The oncolytic vaccinia virus of claim 1, 2, 4, 5, 6, 7 or 8, wherein the modification that inhibits immunosuppression is the incorporation of a nucleic acid encoding a prostaglandin E2 antagonist.

10. The oncolytic vaccinia virus of claim 9, wherein the prostaglandin E2 antagonist is 15-PGDH.

11. The oncolytic vaccinia virus of claim 1, 2, 4, 5, 6, 7 , 8, 9 or 10, wherein the modification that enhances viral spread and activity is a modification that increases the amount of the extracellular enveloped form of the virus produced.

12. The oncolytic vaccinia virus of claim 11, wherein the modification is one or more of the following mutations: A34R Lys151 to Glu; complete or partial deletion of B5R; mutation/deletion of A36R and/or mutation/deletion of A56R.

13. An oncolytic vaccinia virus which is treated with an agent that reduces the amount of glycosylation prior to administration to a host or that otherwise has reduced glycosylation relative to unmodified virus, comprising, a nucleic acid encoding TRIF or a functional domain thereof and/or a nucleic acid encoding a PGE2 antagonist.

14. An oncolytic vaccinia virus comprising:

(i) a TK deletion;

(ii) an envelope with reduced glycosylation relative to an unmodified virus; and/or

(iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof.

15. An oncolytic vaccinia virus comprising:

(i) a TK deletion;

(ii) an envelope with reduced glycosylation relative to an unmodified virus; and/or

(iii) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof.

16. An oncolytic vaccinia virus comprising:

(i) a TK deletion;

(ii) an envelope with reduced glycosylation relative to an unmodified virus;

(iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof; and/or

(iv) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof.

17. An oncolytic vaccinia virus comprising:

(i) a TK deletion;

(ii) an envelope with reduced glycosylation relative to an unmodified virus;

(iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof;

(iv) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof; and/or

(v) a C12L deletion.

18. An oncolytic vaccinia virus comprising:

(i) a TK deletion;

(ii) an envelope with reduced glycosylation relative to an unmodified virus;

(iii) a nucleic acid encoding TRIF, or a functional domain thereof;

(iv) a nucleic acid encoding 15-PGDH, or a functional domain thereof;

(v) a C12L deletion; and/or

(vi) a B5R deletion.

19. A method of reducing the growth of a cancer cell comprising administering, to the cancer cell, an effective amount of an oncolytic vaccinia virus of any of the preceding claims 1-18.

20. A method of reducing the growth of a tumor comprising administering, to the tumor, an effective amount of an oncolytic vaccinia virus of any of the preceding claims 1-18.

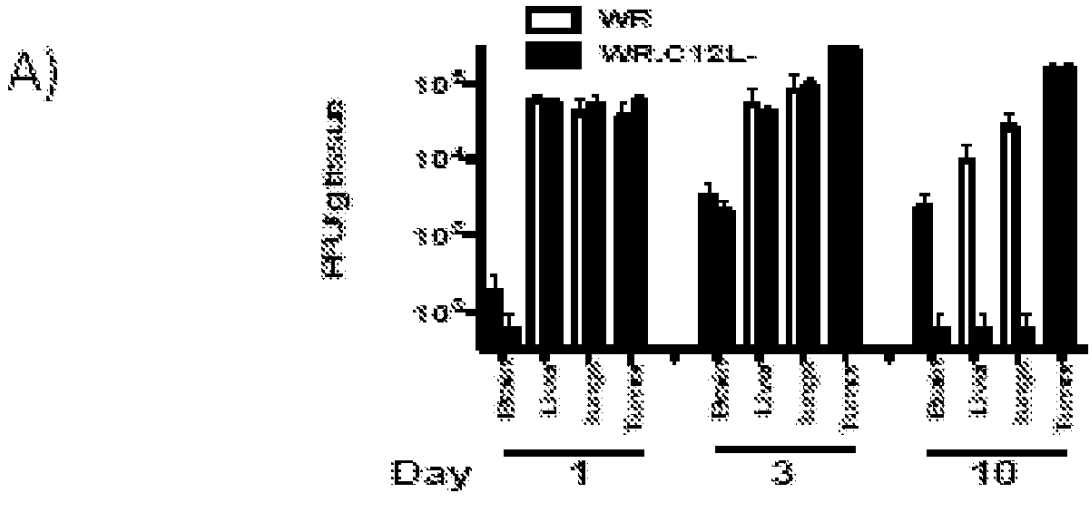
21. A method of treating a subject having a cancer comprising administering, to the subject, an effective amount of an oncolytic vaccinia virus of any of the preceding claims 1-18.

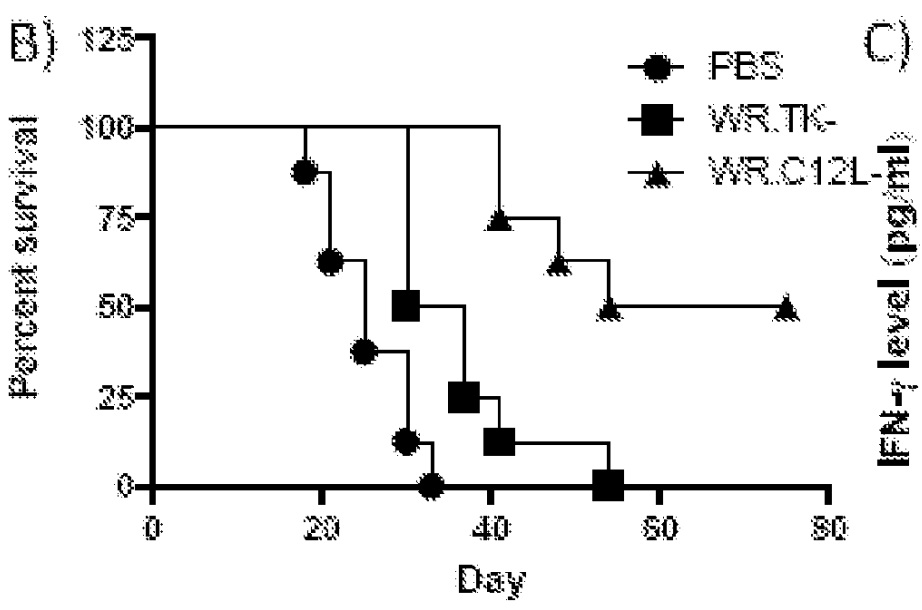
22. A method of producing an anti-cancer effect in a subject comprising administering, to the subject, an effective amount of an oncolytic vaccinia virus of any of the preceding claims 1-18.

23. The method of claim 19, 20, 21 or 22, further comprising administering one or more agents selected from the group consisting of an anti-cancer agent, an immunomodulatory agent, and a combination thereof.

24. An oncolytic vaccinia virus of any of the preceding claims 1-18, for use in the treatment of cancer in a subject.

FIGURE 1 A-C


A)
WR
WR.C12L-
PFU/g tissue
Day
1
3
10


B)
PBS
WR.TK-
WR.C12L-
Percent survival
Day
0
20
40
60
80
100
125
75
50
25

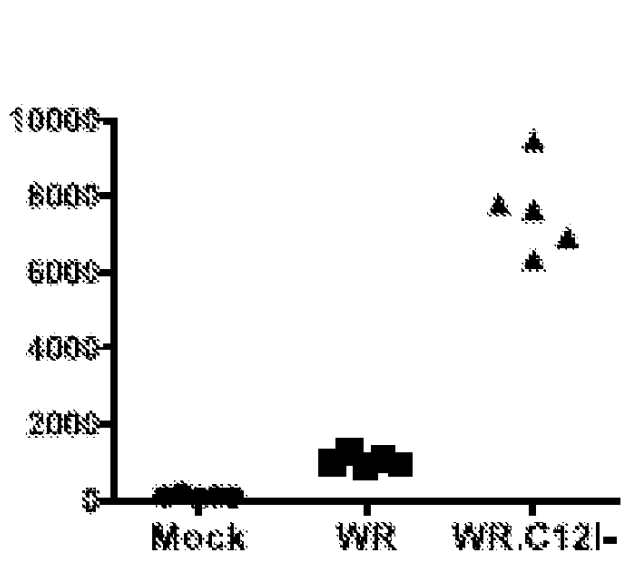

C)
IFN-γ level (pg/ml)
Mock
WR
WR.C12L-

FIGURE 2A-E

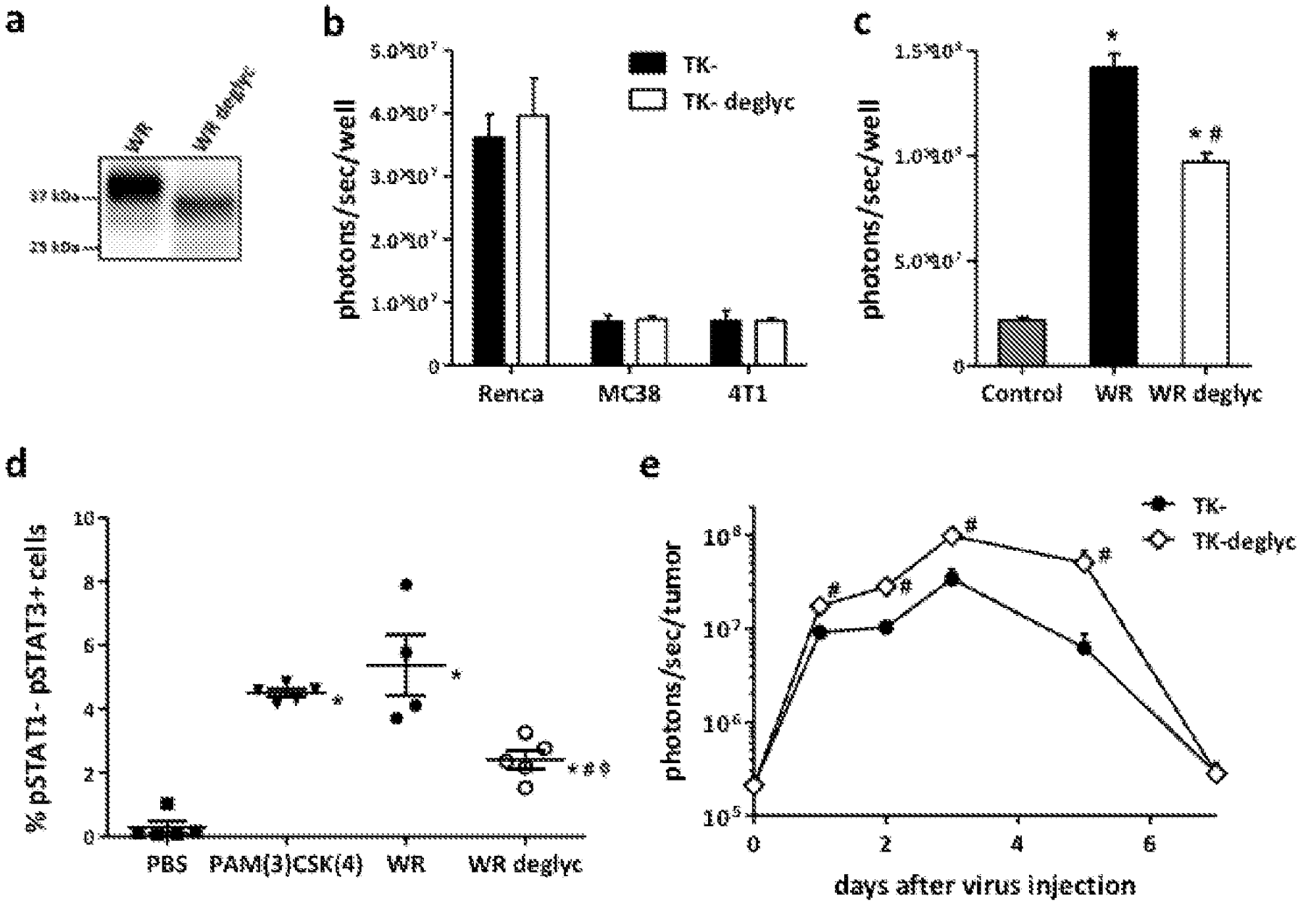

a
WR
WR deglyc
37 kDa
25 kDa
b
TK-
TK- deglyc
photons/sec/well
Renca
MC38
4T1
c
photons/sec/well
Control
WR
WR deglyc
d
% pSTAT1- pSTAT3+ cells
PBS
PAM(3)CSK(4)
WR
WR deglyc
e
TK-
TK-deglyc
photons/sec/tumor
days after virus injection

FIGURE 3A-C

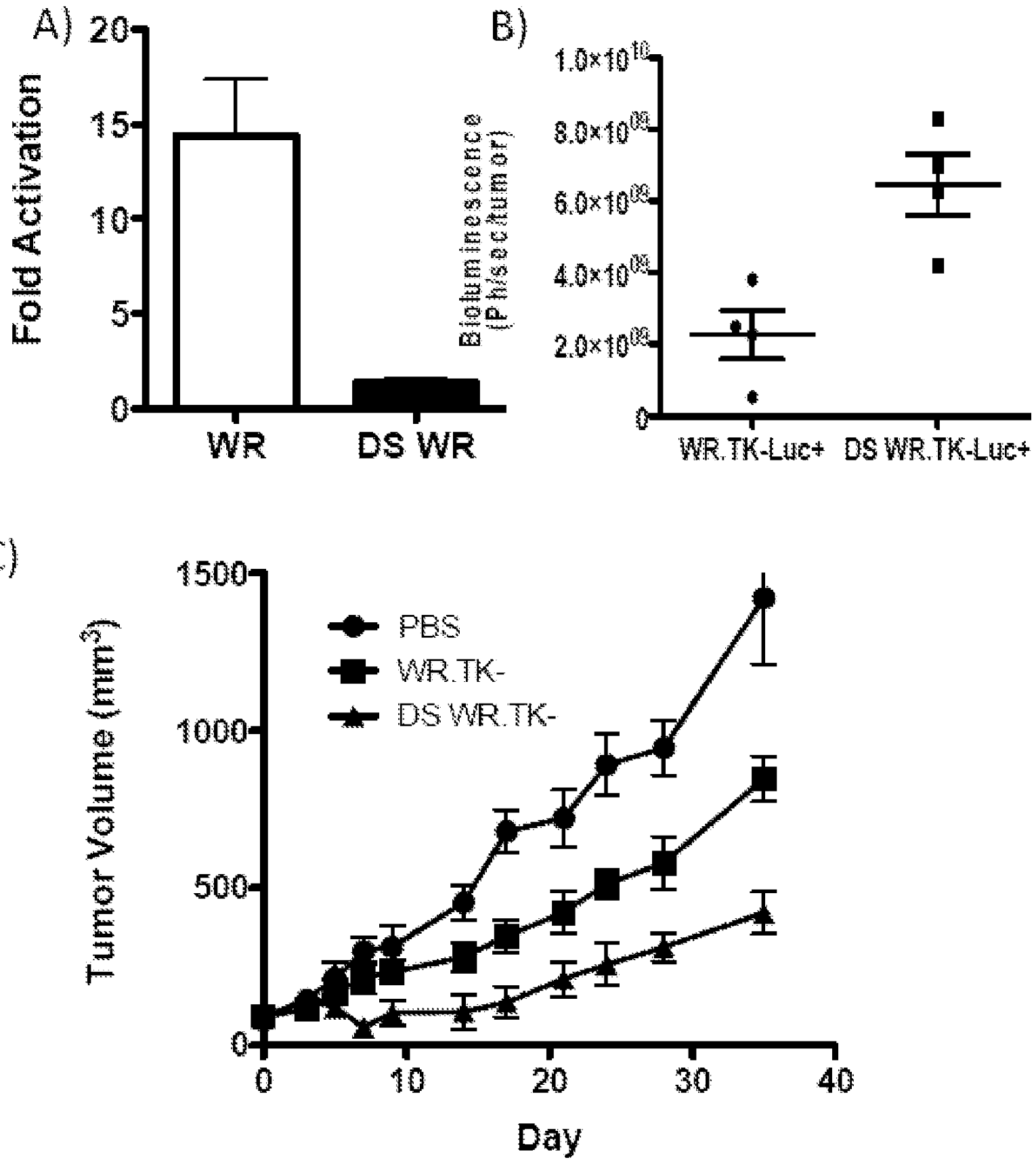

A)
Fold Activation
20
15
10
5
0
WR
DS WR
B)
Bioluminescence (P/s/cm²/sr)
1.0×10¹⁰
8.0×10⁰⁹
6.0×10⁰⁹
4.0×10⁰⁹
2.0×10⁰⁹
0
WR.TK-Luc+
DS WR.TK-Luc+
C)
Tumor Volume (mm³)
1500
1000
500
0
PBS
WR.TK-
DS WR.TK-
0
10
20
30
40
Day

FIGURE 3D

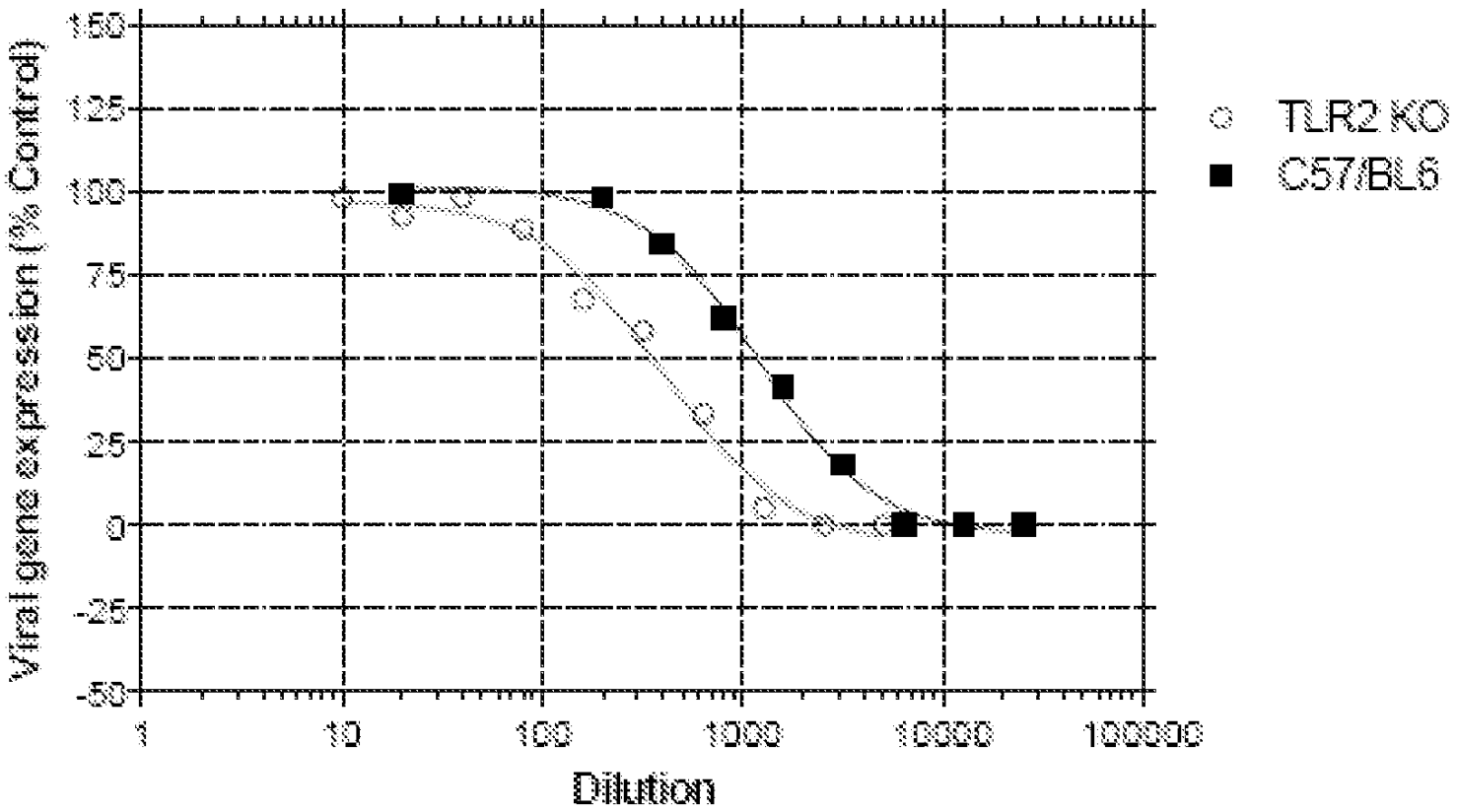

Viral gene expression (% Control)
150
125
100
75
50
25
0
-25
-50
1
10
100
1000
10000
100000
Dilution
TLR2 KO
C57/BL6

FIGURE 4A

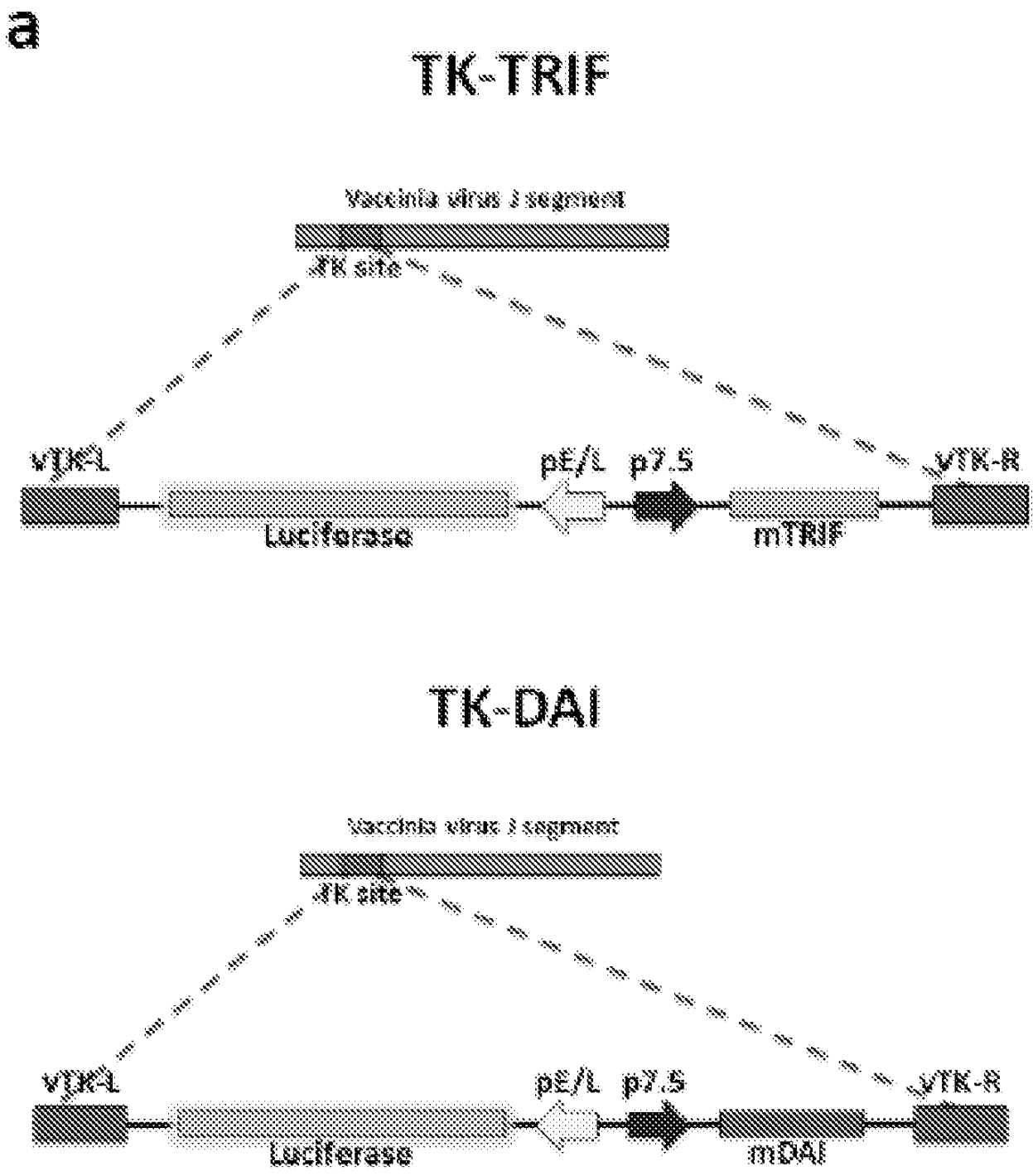

a
TK-TRIF
Vaccinia virus J segment
TK site
vTK-L
pE/L
p7.5
vTK-R
Luciferase
mTRIF
TK-DAI
Vaccinia virus J segment
TK site
vTK-L
pE/L
p7.5
vTK-R
Luciferase
mDAI

FIGURE 4B-C

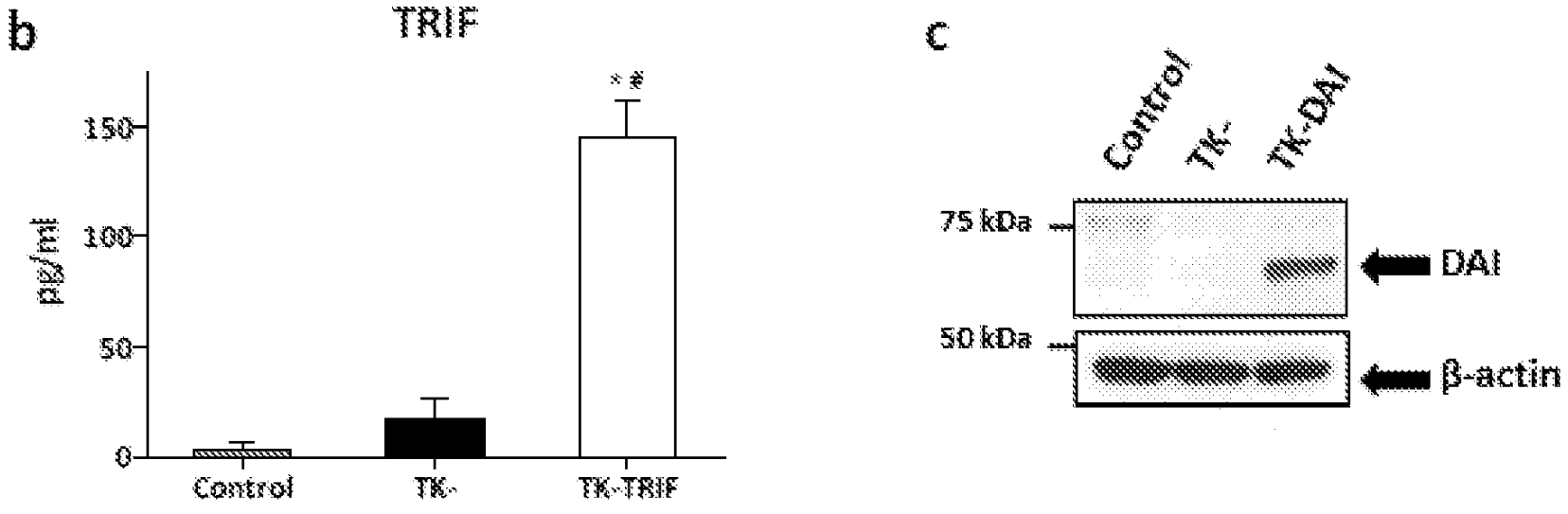

b
TRIF
pg/ml
150
100
50
0
* *
Control
TK-
TK-TRIF
c
Control
TK-
TK-DAI
75 kDa
50 kDa
DAI
β-actin

FIGURE 5A

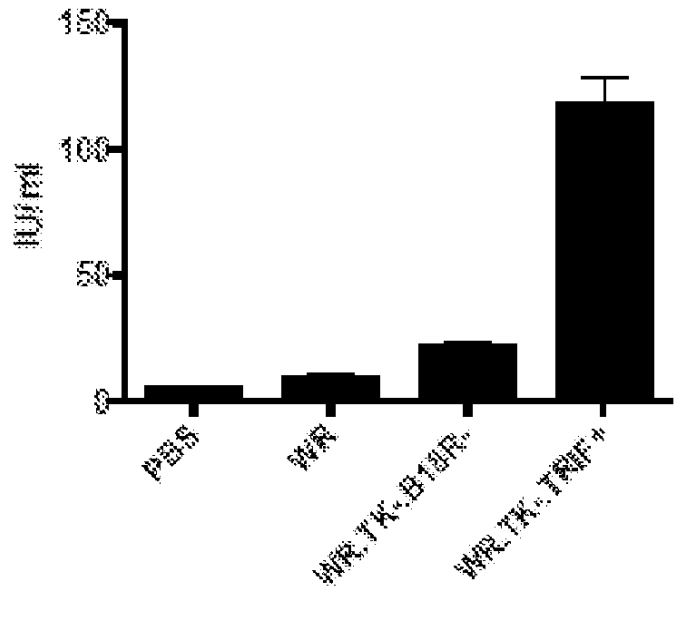


FIGURE 5B

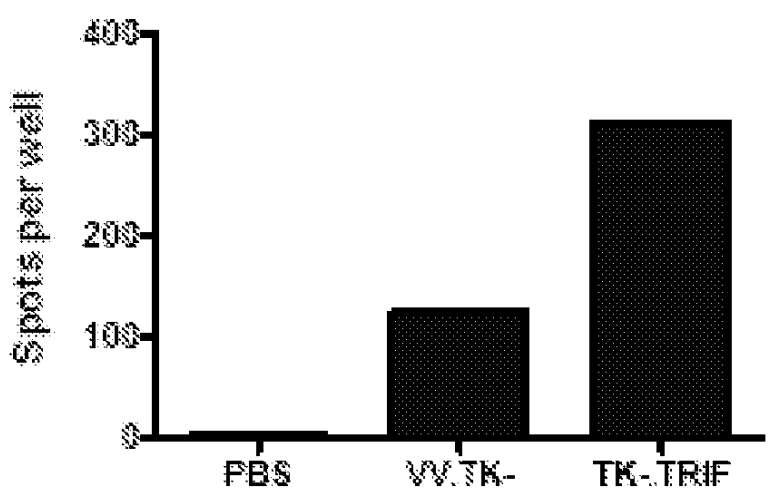


FIGURE 5C

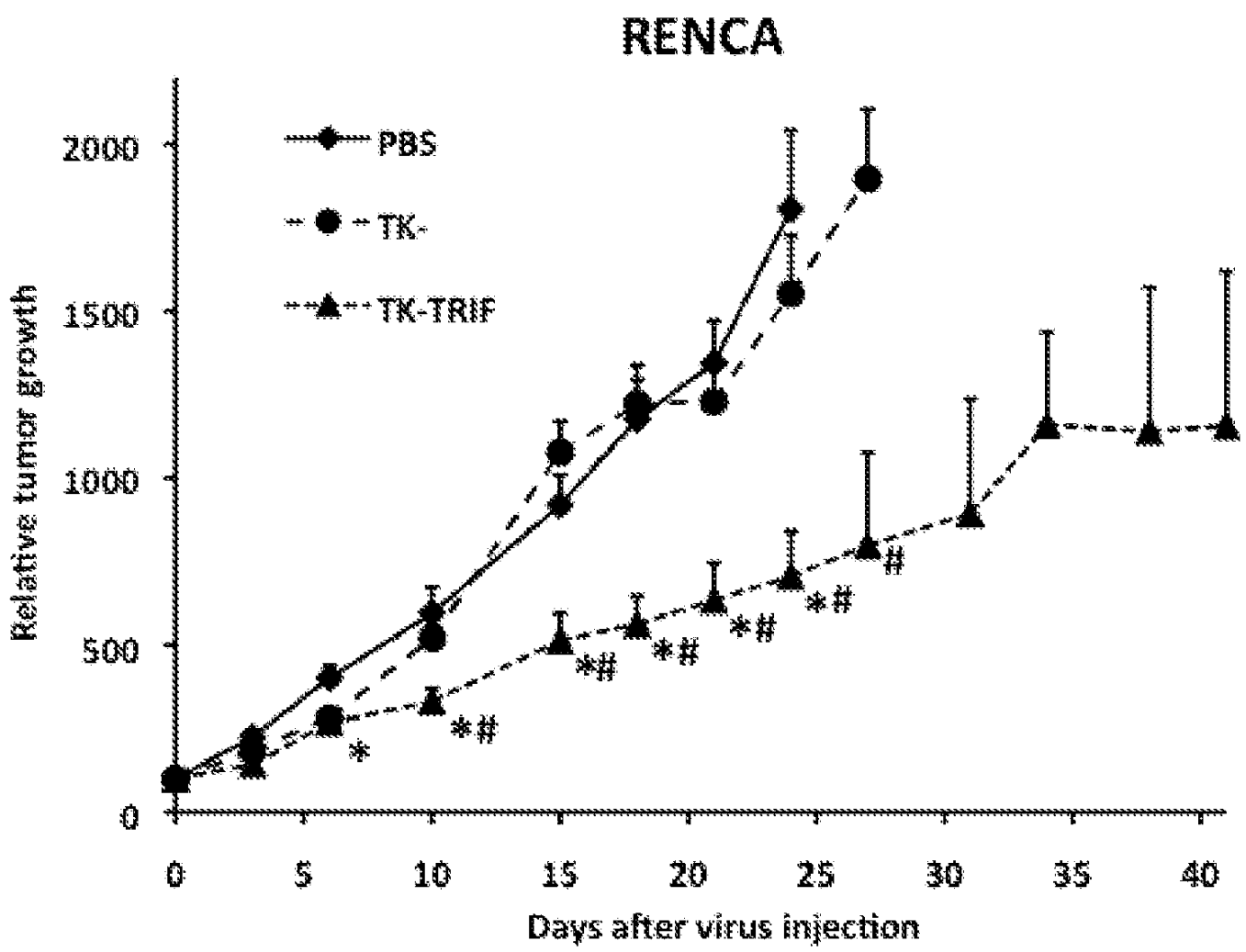

RENCA
PBS
TK-
TK-TRIF
Relative tumor growth
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Days after virus injection
*
*#
*#
*#
*#
*#
#

FIGURE 6A-D

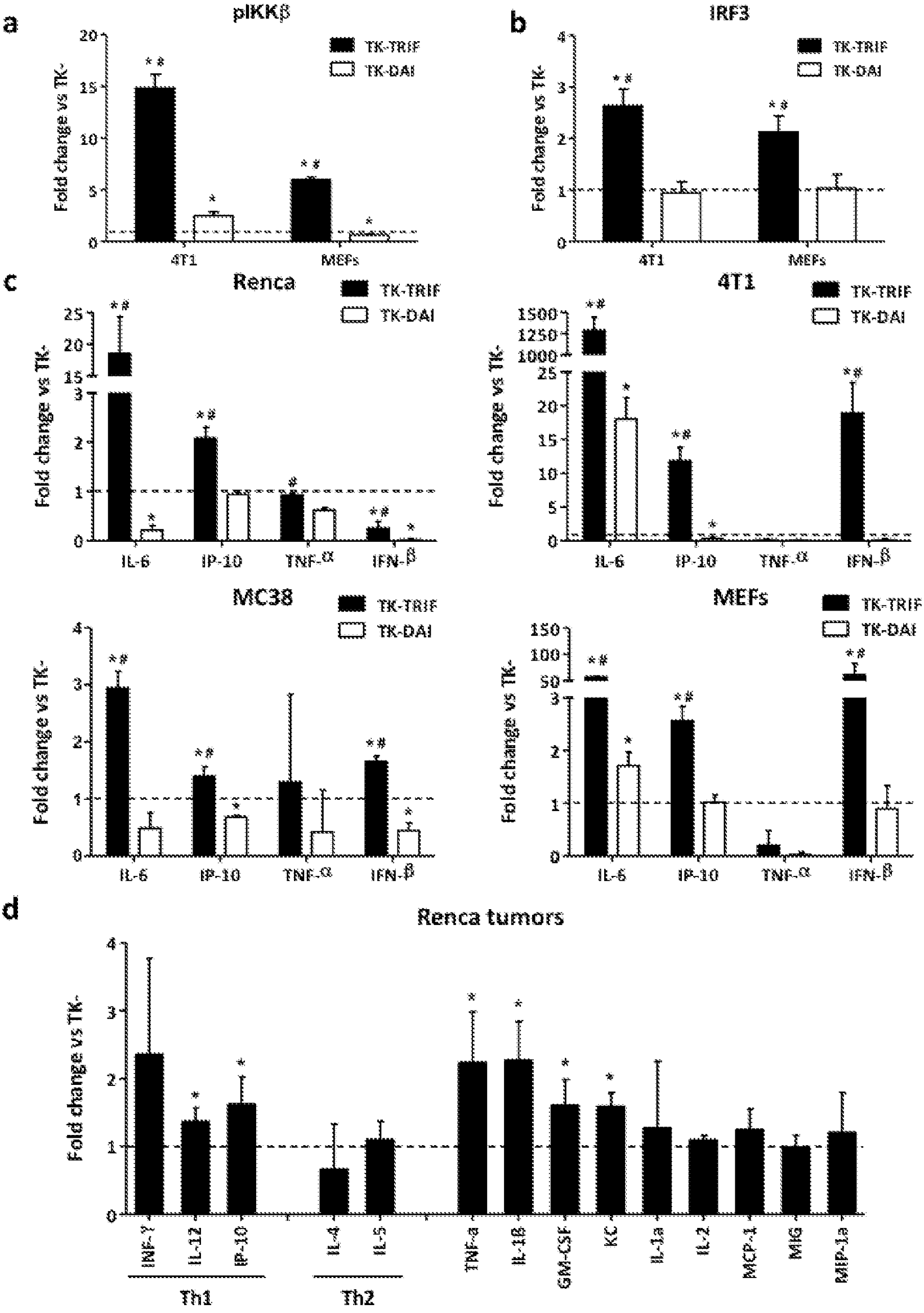
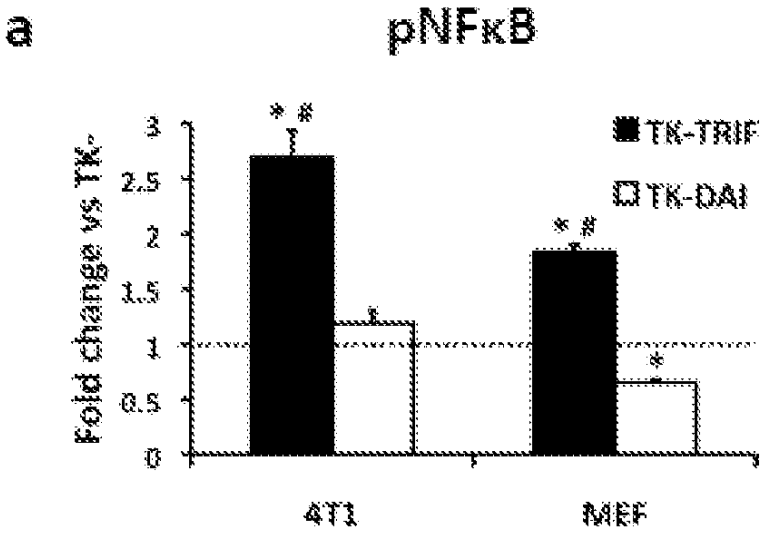
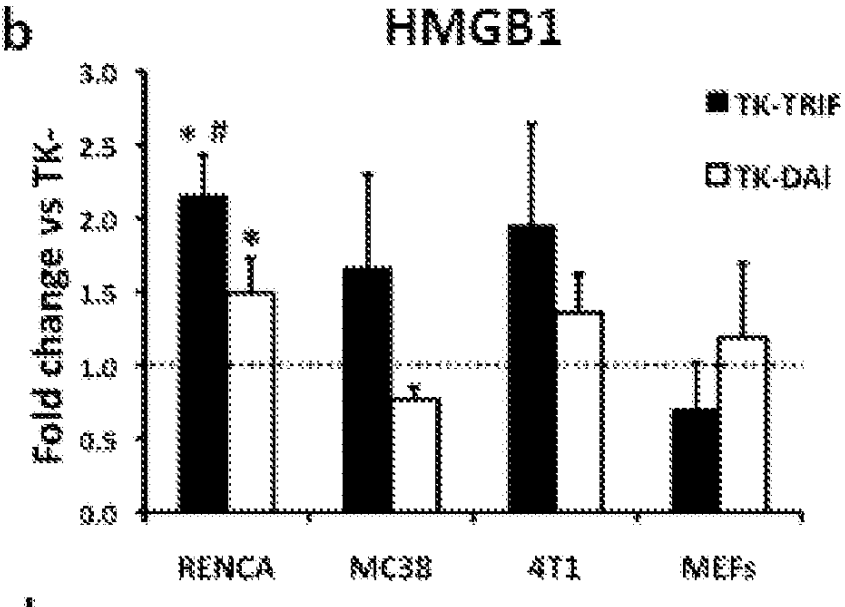
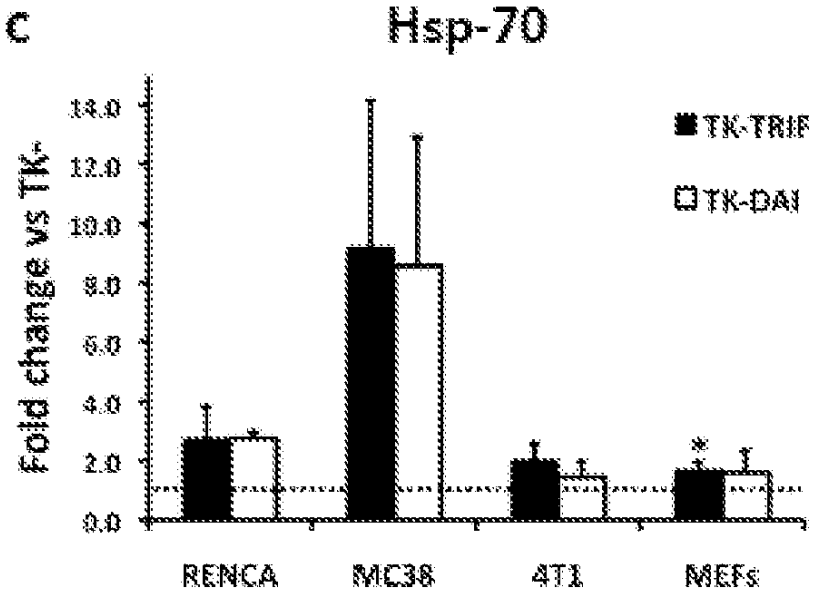
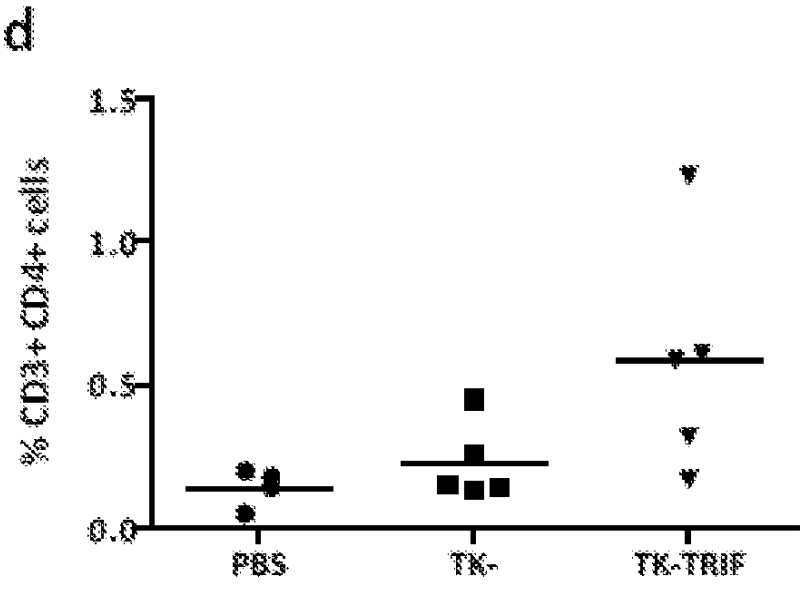

a
pIKKβ
TK-TRIF
TK-DAI
Fold change vs TK-
4T1
MEFs
b
IRF3
c
Renca
4T1
MC38
MEFs
IL-6
IP-10
TNF-α
IFN-β
d
Renca tumors
INF-γ
IL-12
IP-10
IL-4
IL-5
TNF-a
IL-1β
GM-CSF
KC
IL-1a
IL-2
MCP-1
MIG
MIP-1a
Th1
Th2

FIGURE 7A-E


a
pNFκB
Fold change vs TK-
TK-TRIF
TK-DAI
4T1
MEF


b
HMGB1
Fold change vs TK-
TK-TRIF
TK-DAI
RENCA
MC38
4T1
MEFs


c
Hsp-70
Fold change vs TK-
TK-TRIF
TK-DAI
RENCA
MC38
4T1
MEFs


d
% CD3+ CD4+ cells
PBS
TK-
TK-TRIF

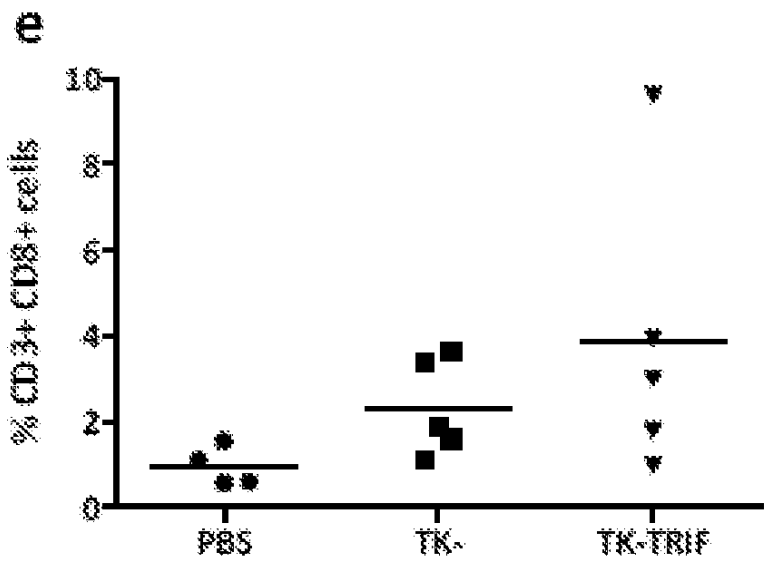

e
% CD3+ CD8+ cells
PBS
TK-
TK-TRIF

FIGURE 8A

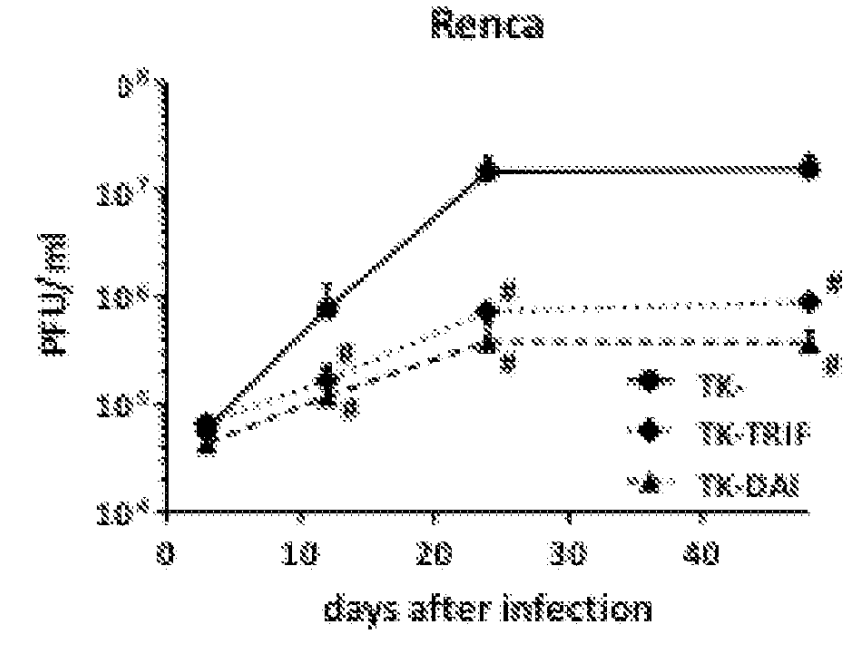

Renca
PFU/ml
days after infection
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
MC38
PFU/ml
days after virus injection
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
4T1
PFU/ml
days after virus injection
TK-
TK-TRIF
TK-DAI

FIGURE 8B

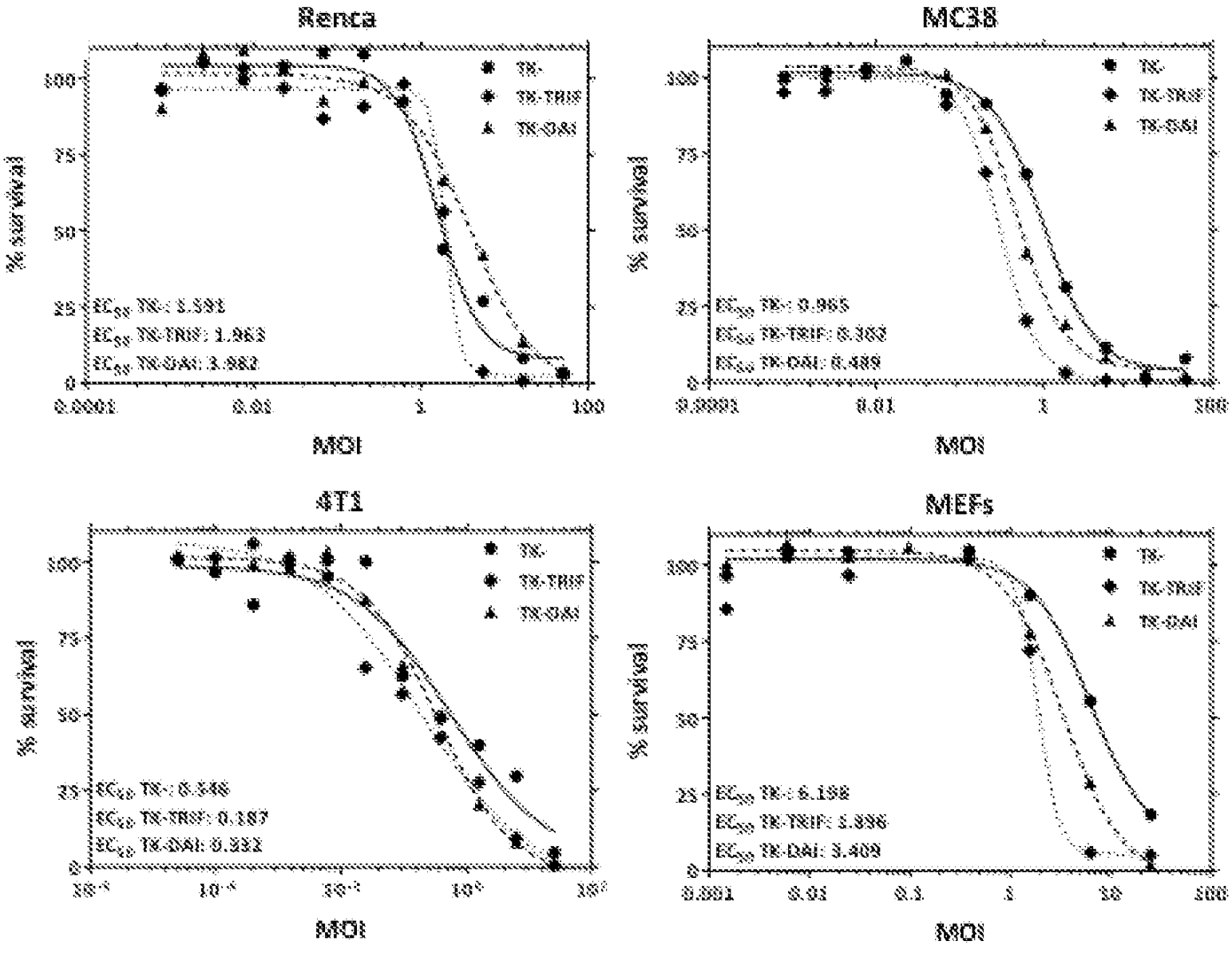

Renca
MC38
4T1
MEFs
MOI
MOI
MOI
MOI
% survival
% survival
% survival
% survival
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
100
75
50
25
0
0.0001
0.01
1
100
0.0001
0.01
1
100
10⁻⁴
10⁻³
10⁻²
10⁻¹
10⁰
10¹
0.0001
0.01
0.1
1
10
100

FIGURE 8C

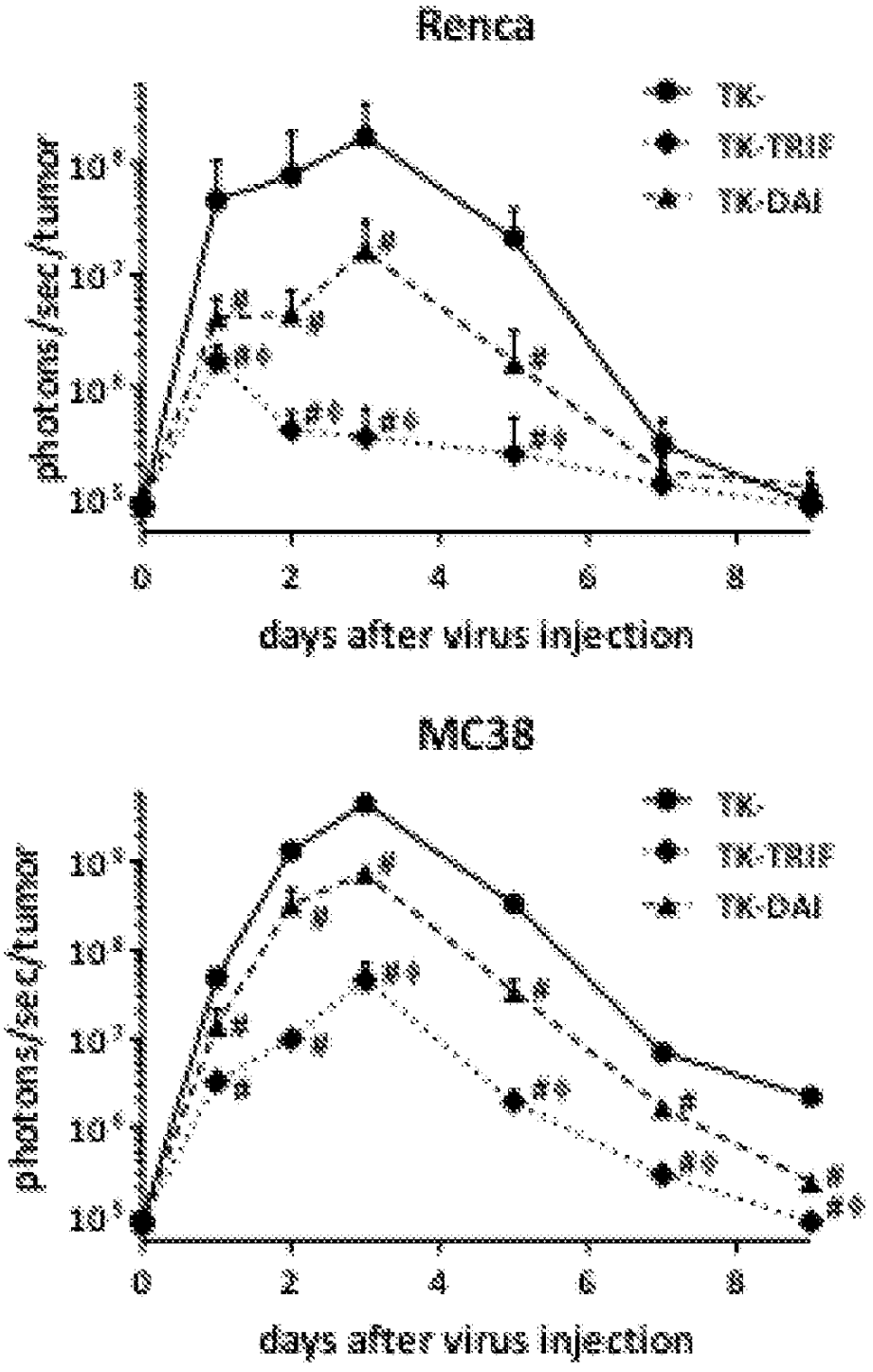

Renca
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
photons/sec/tumor
10^8
10^7
10^6
10^5
0
2
4
6
8
days after virus injection
MC38
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
photons/sec/tumor
10^8
10^7
10^6
10^5
0
2
4
6
8
days after virus injection

FIGURE 8D

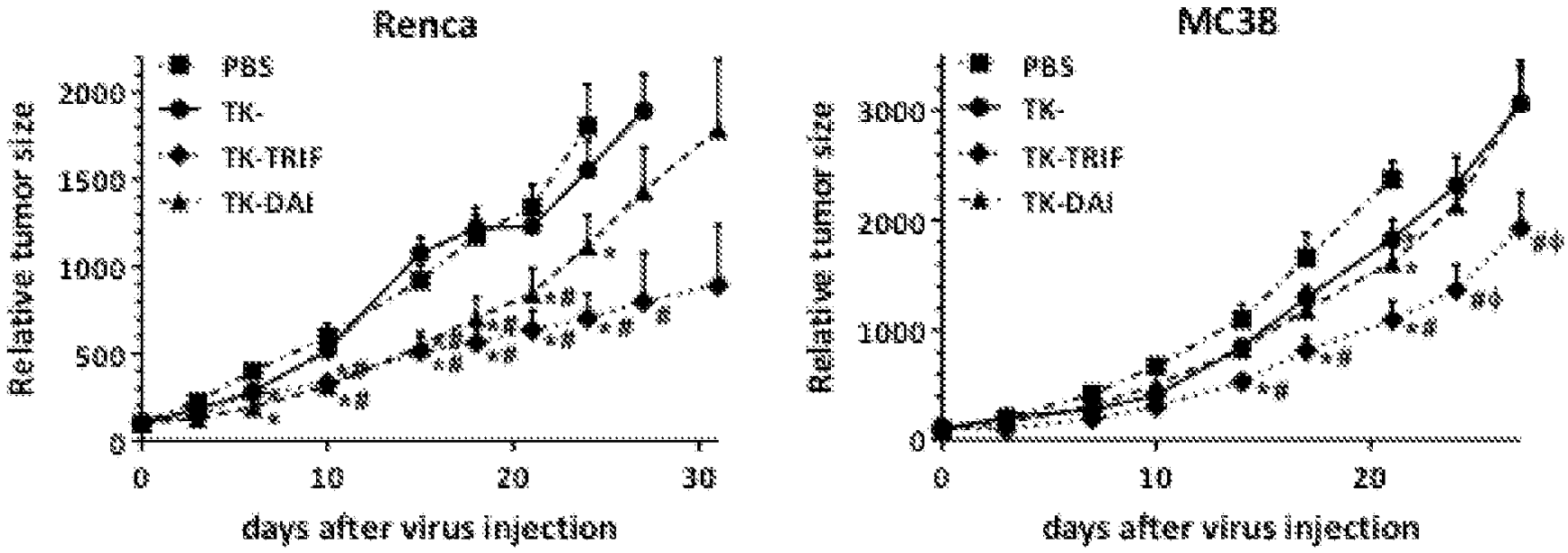

Renca
PBS
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
Relative tumor size
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
days after virus injection
MC38
PBS
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
Relative tumor size
3000
2000
1000
0
0
10
20
days after virus injection

FIGURE 9A-F

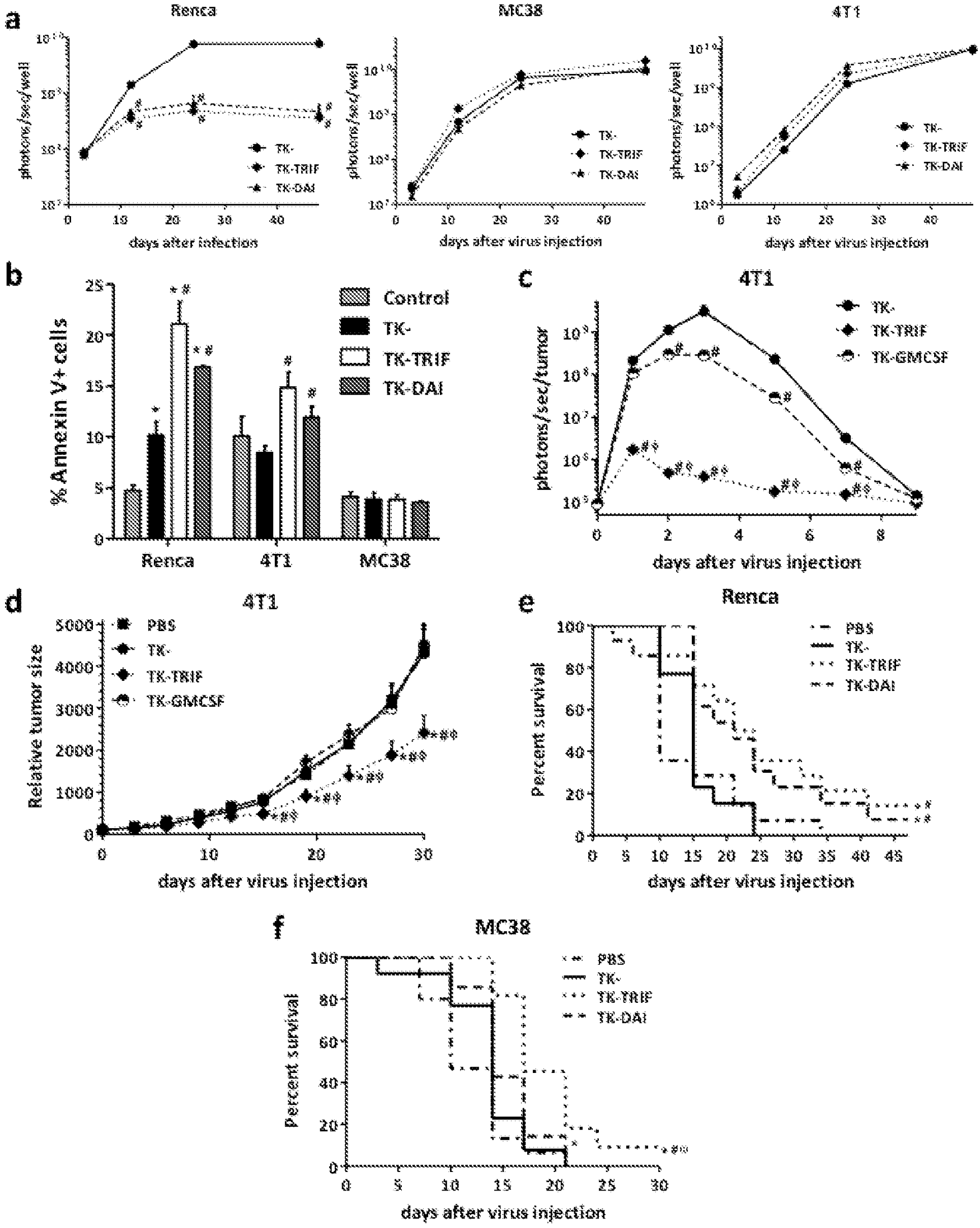

a
Renca
MC38
4T1
photons/sec/well
days after infection
days after virus injection
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
b
% Annexin V+ cells
Control
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
Renca
4T1
MC38
c
4T1
photons/sec/tumor
TK-GMCSF
d
4T1
Relative tumor size
PBS
e
Renca
Percent survival
f
MC38

FIGURE 10A-E

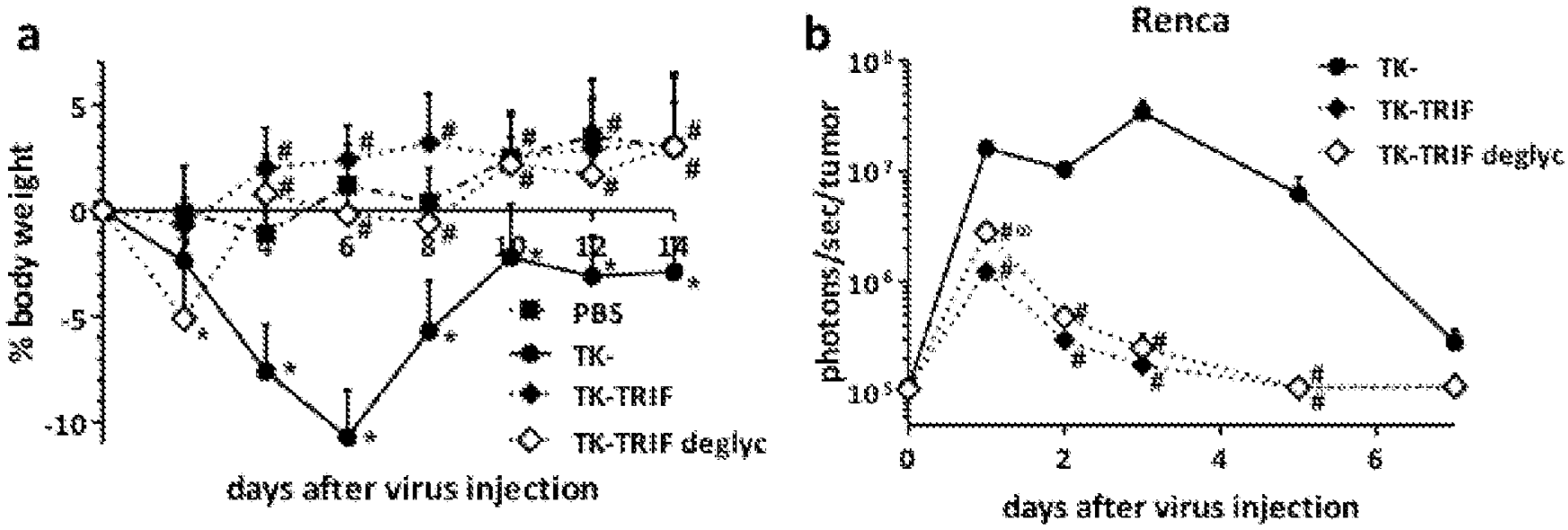

a
% body weight
days after virus injection
PBS
TK-
TK-TRIF
TK-TRIF deglyc
b
Renca
photons/sec/tumor
days after virus injection
TK-
TK-TRIF
TK-TRIF deglyc
c
Renca
Percent survival
days after virus injection
PBS
TK-
TK-TRIF
TK- deglyc
TK-TRIF deglyc
d
MC38
Percent survival
days after virus injection
PBS
TK-
TK-TRIF
TK- deglyc
TK-TRIF deglyc
e
Renca
Percent survival
days after virus injection
PBS
TK-GMCSF
TK-TRIF deglyc

FIGURE 11A-F

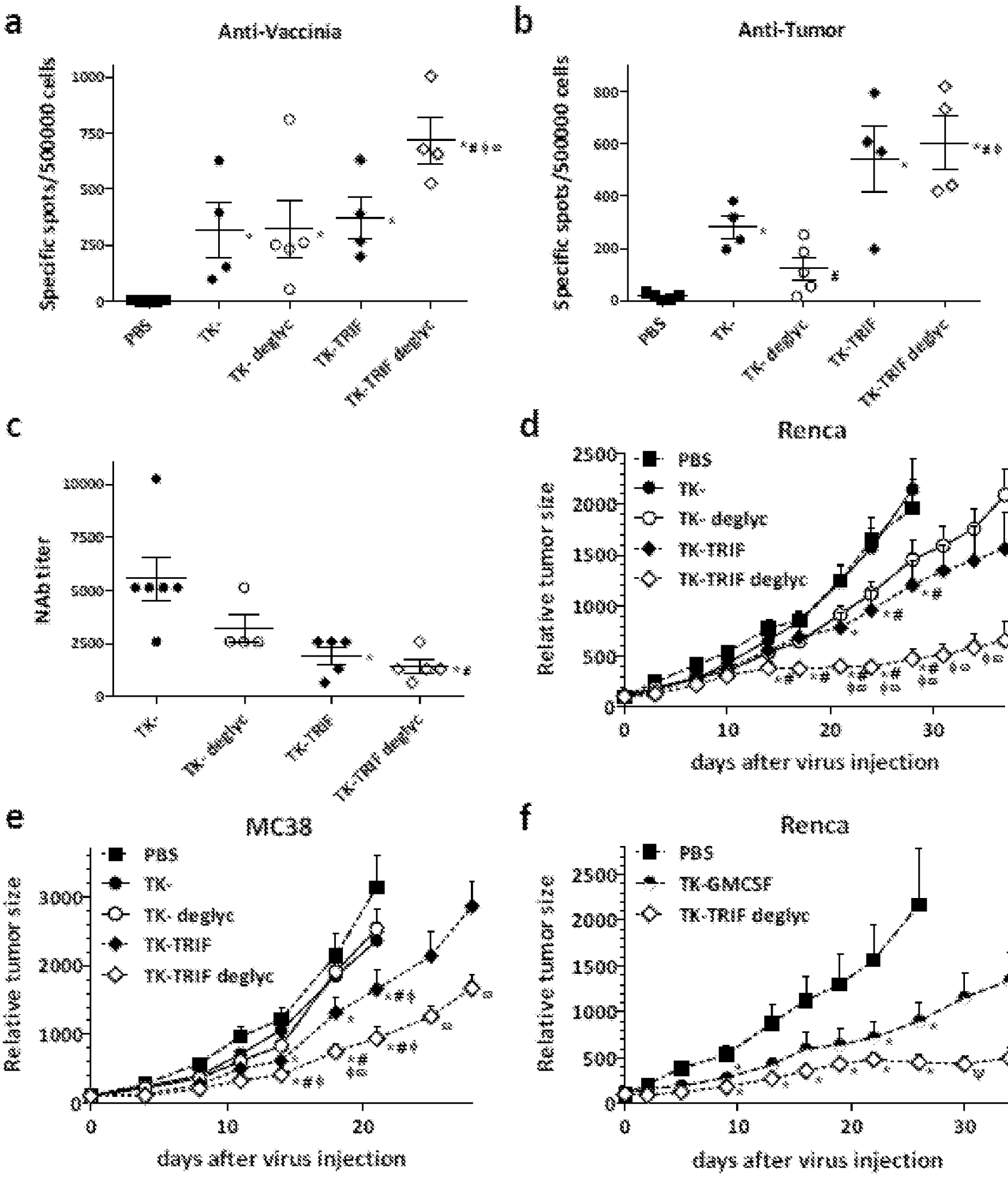

a
Anti-Vaccinia
Specific spots/500000 cells
PBS
TK-
TK- deglyc
TK-TRIF
TK-TRIF deglyc
b
Anti-Tumor
Specific spots/500000 cells
c
NAb titer
d
Renca
Relative tumor size
PBS
TK-
TK- deglyc
TK-TRIF
TK-TRIF deglyc
days after virus injection
e
MC38
f
TK-GMCSF

FIGURE 12A

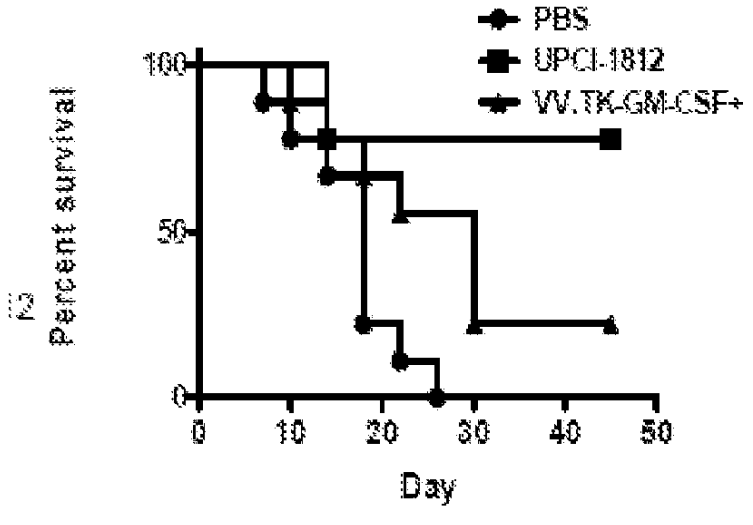


FIGURE 12B

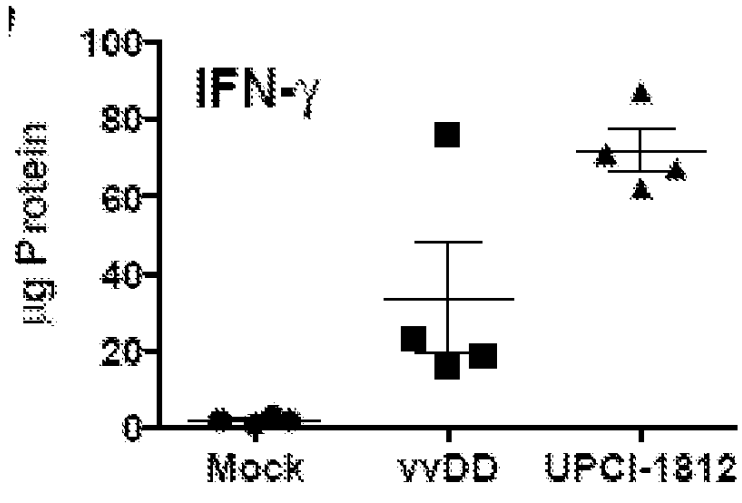


FIGURE 12C

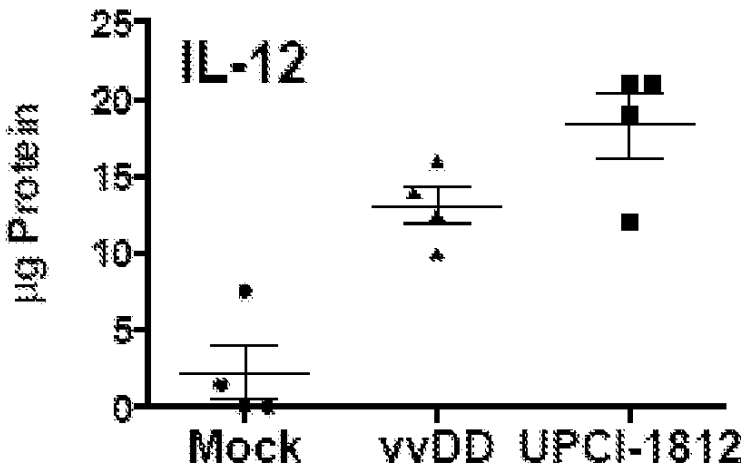


FIGURE 13A

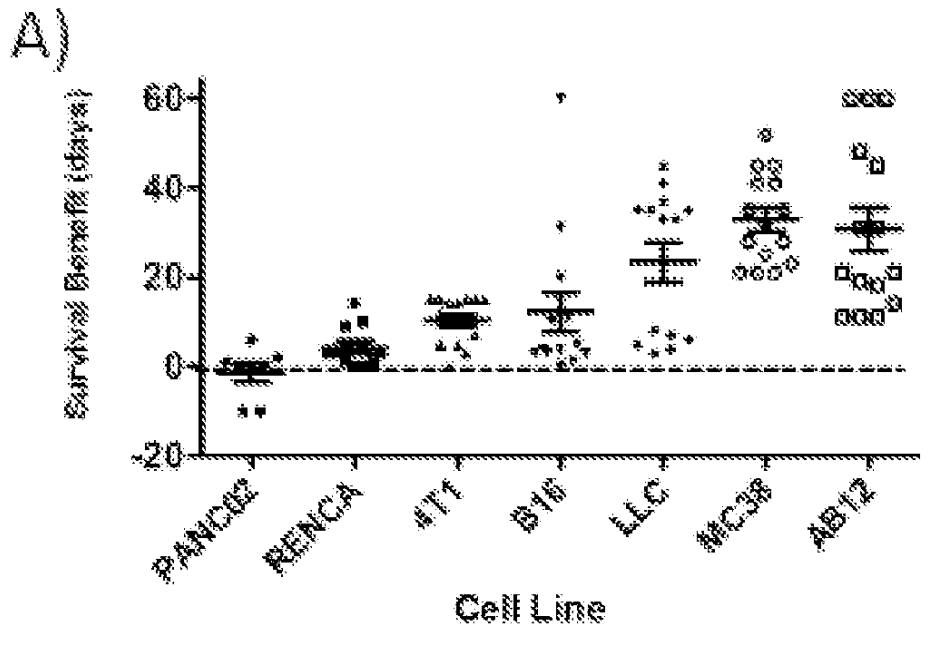

A)
Survival Benefit (days)
60
40
20
0
-20
PANC02
RENCA
4T1
B16
LLC
MC38
AB12
Cell Line

FIGURE 13B

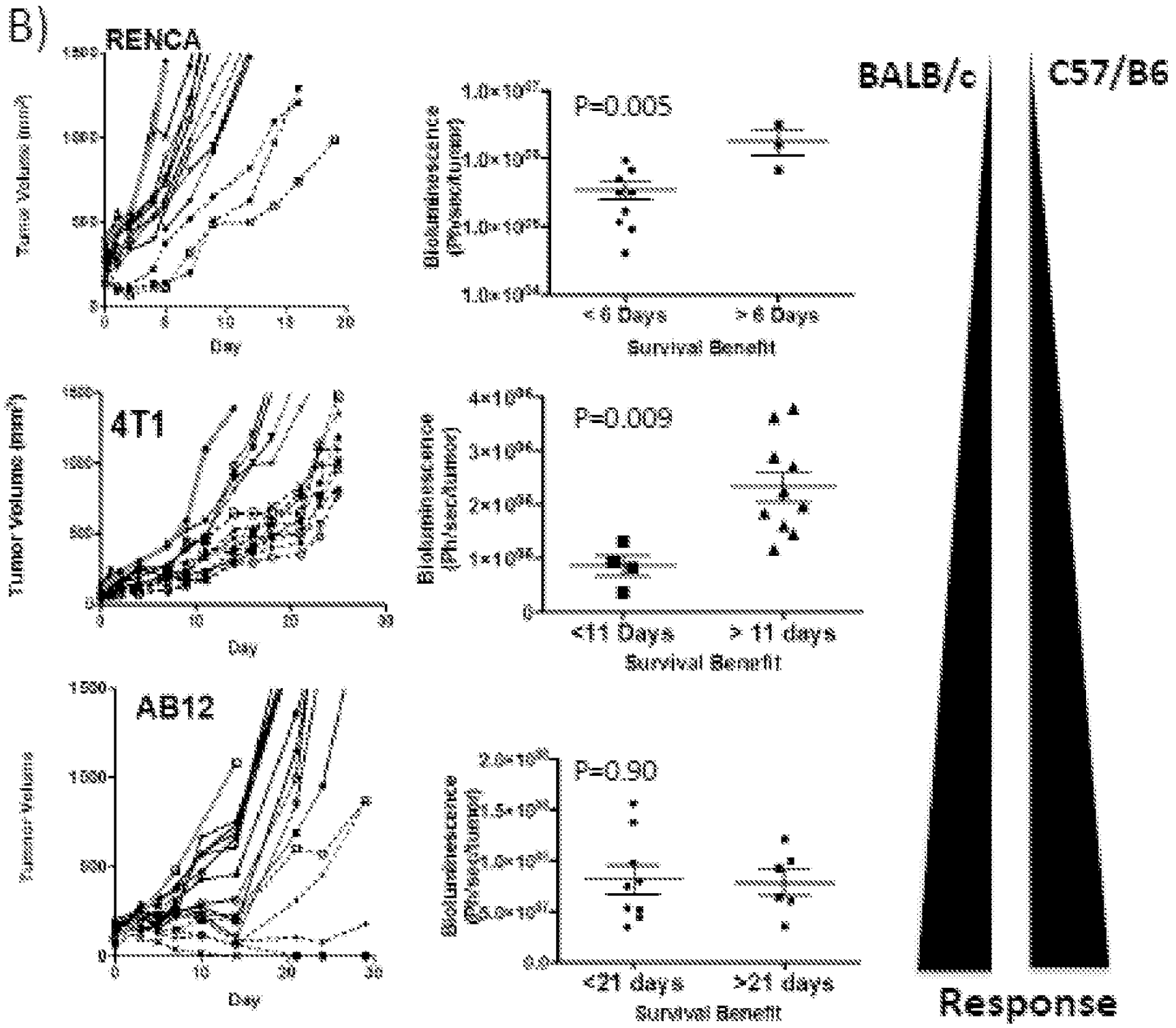

B)
RENCA
Tumor Volume (mm3)
Day
P=0.005
Bioluminescence (Photons/Second)
< 6 Days
> 6 Days
Survival Benefit
4T1
Tumor Volume (mm3)
Day
P=0.009
<11 Days
> 11 days
Survival Benefit
AB12
Tumor Volume
Day
P=0.90
<21 days
>21 days
Survival Benefit
BALB/c
C57/B6
Response

FIGURE 13B (continued)

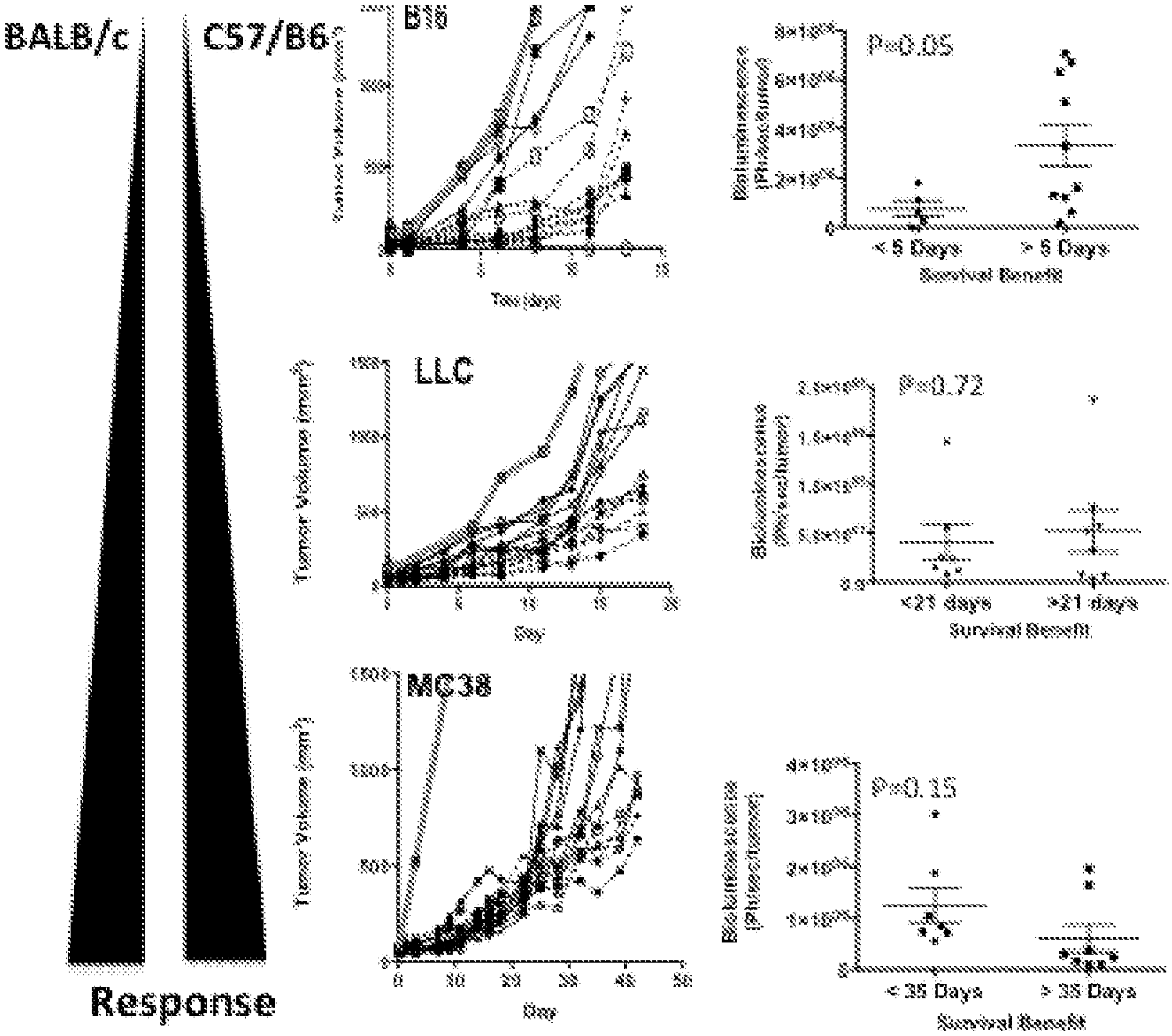


FIGURE 13C

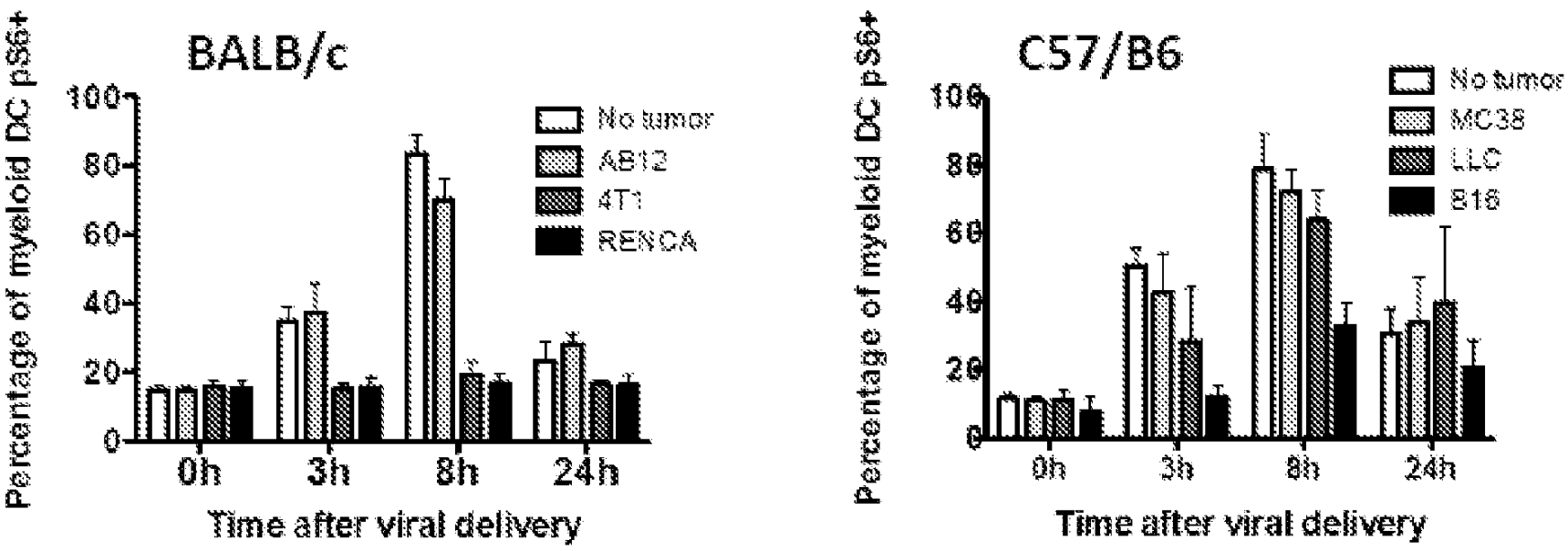
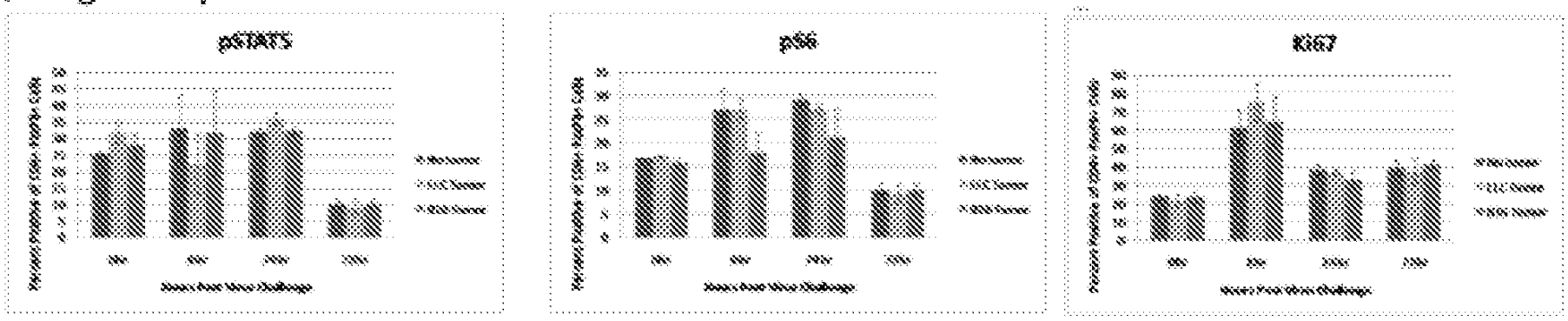
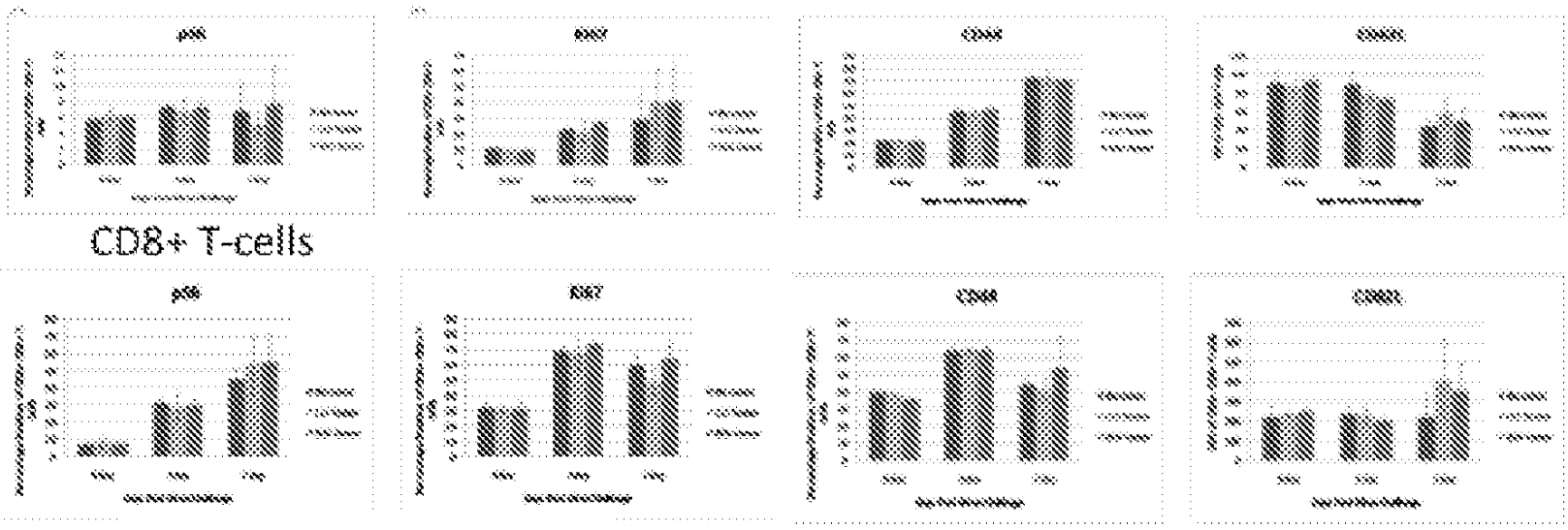

BALB/c
Percentage of myeloid DC pS6+
100
80
60
40
20
0
0h
3h
8h
24h
Time after viral delivery
No tumor
AB12
4T1
RENCA
C57/B6
Percentage of myeloid DC pS6+
100
80
60
40
20
0
0h
3h
8h
24h
Time after viral delivery
No tumor
MC38
LLC
B16

FIGURE 14A-B

A) Regulatory T-cells

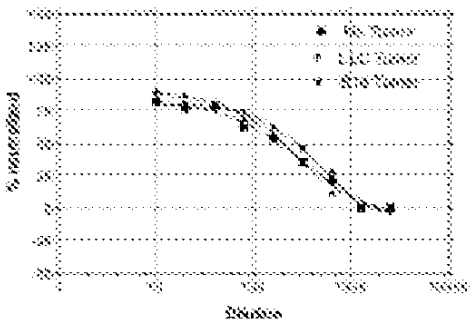


CD4+ T-cells



CD8+ T-cells

B)



Myeloid dendritic cells (mDC) were gated for (CD11c+, CD11b+, B220-, CD8a-)

FIGURE 15A-B

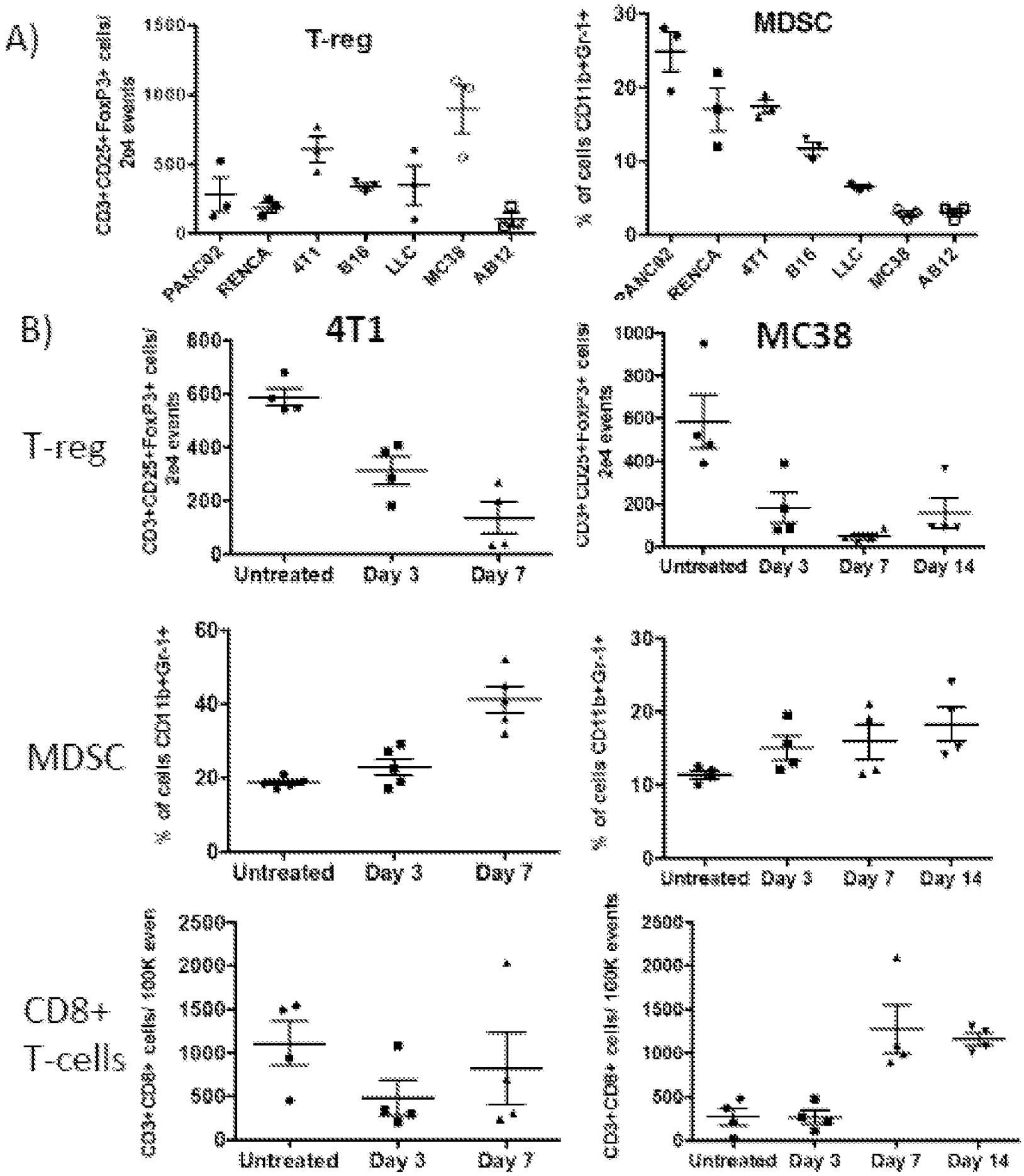
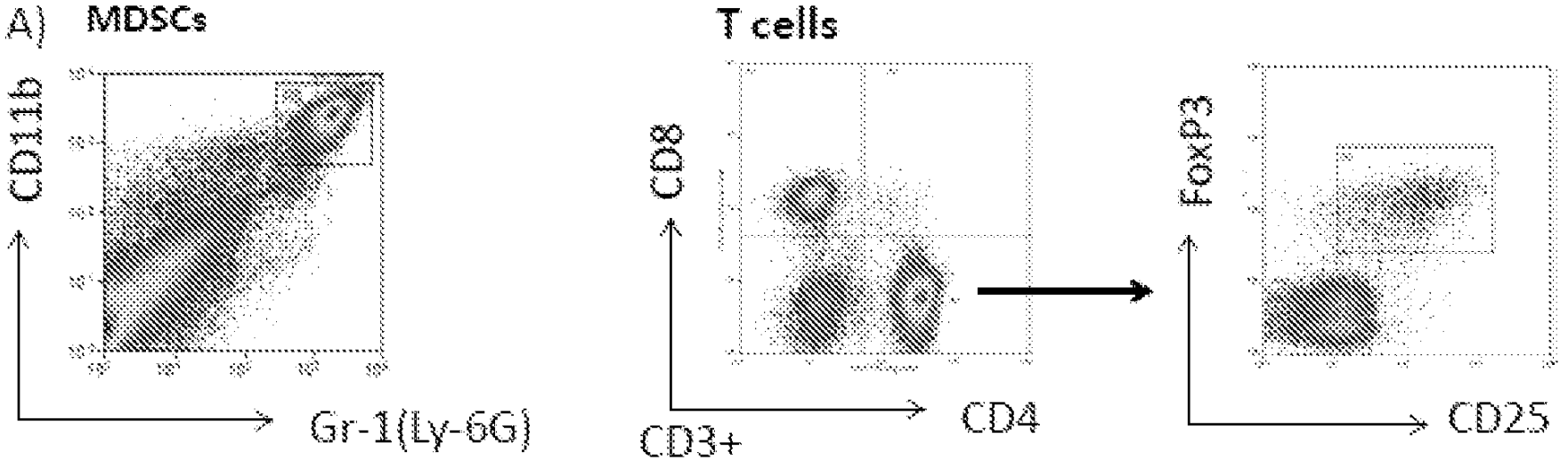

A)
T-reg
CD3+CD25+FoxP3+ cells/ 2e4 events
MDSC
% of cells CD11b+Gr-1+
PANC02
RENCA
4T1
B16
LLC
MC38
AB12
B)
4T1
MC38
T-reg
MDSC
CD8+ T-cells
CD3+CD8+ cells/ 100K events
Untreated
Day 3
Day 7
Day 14

FIGURE 16A-B


A)
MDSCs
CD11b
Gr-1(Ly-6G)
T cells
CD8
CD3+
CD4
FoxP3
CD25

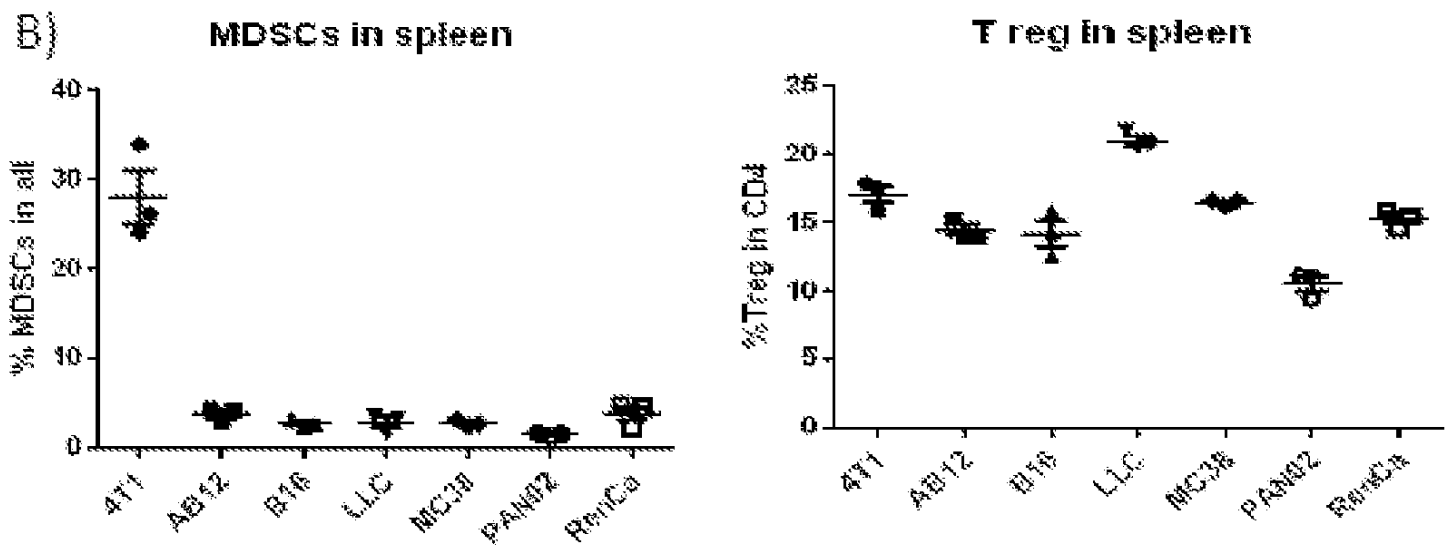

B)
MDSCs in spleen
% MDSCs in all
40
30
20
10
0
4T1
AB12
B16
LLC
MC38
PAN02
RenCa
T reg in spleen
%Treg in CD4
25
20
15
10
5
0
4T1
AB12
B16
LLC
MC38
PAN02
RenCa

FIGURE 17A

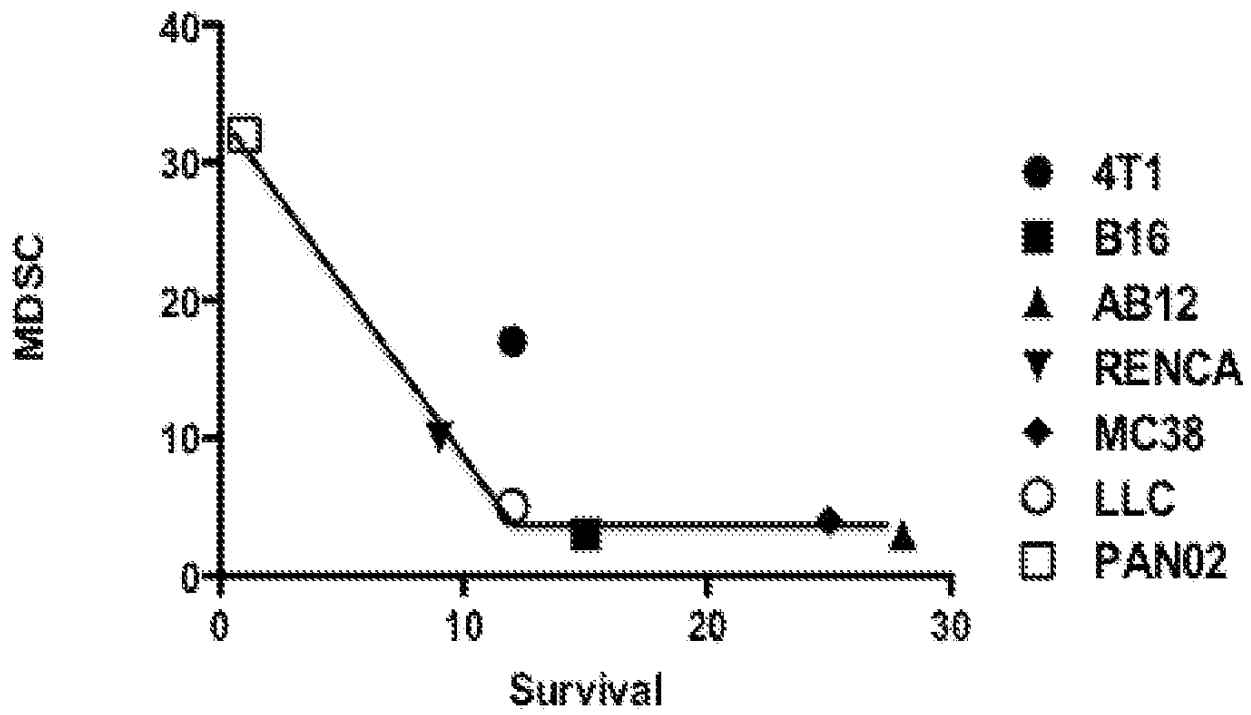


FIGURE 17B

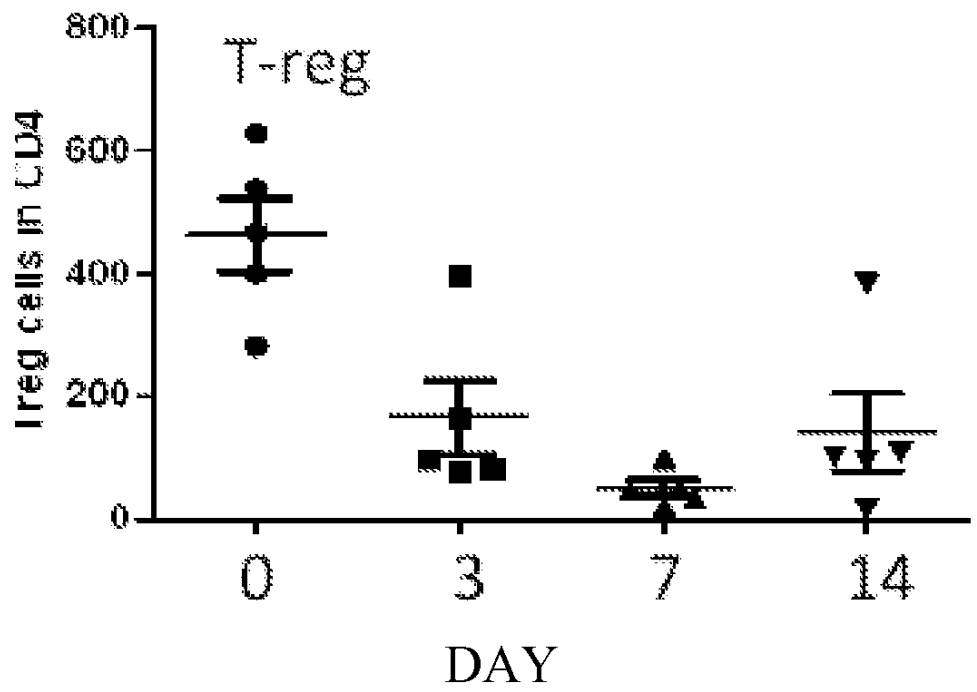


FIGURE 17C

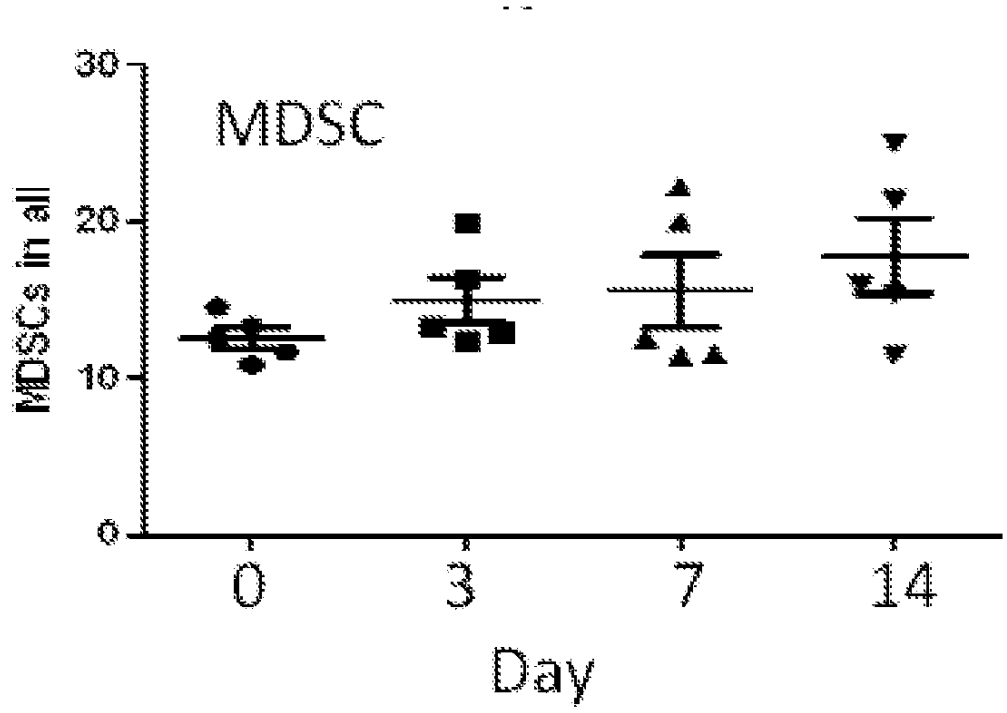


FIGURE 18

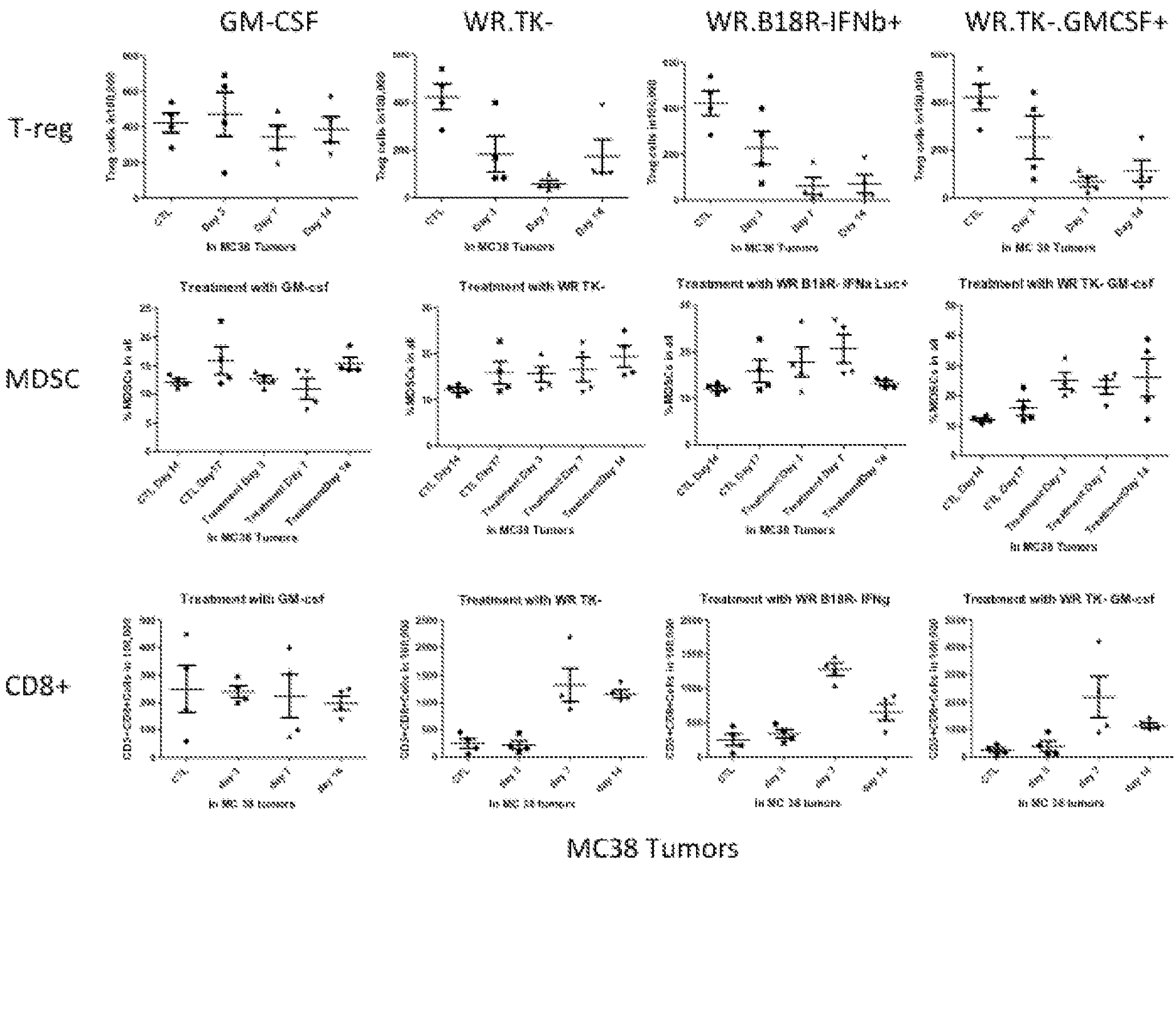


FIGURE 19

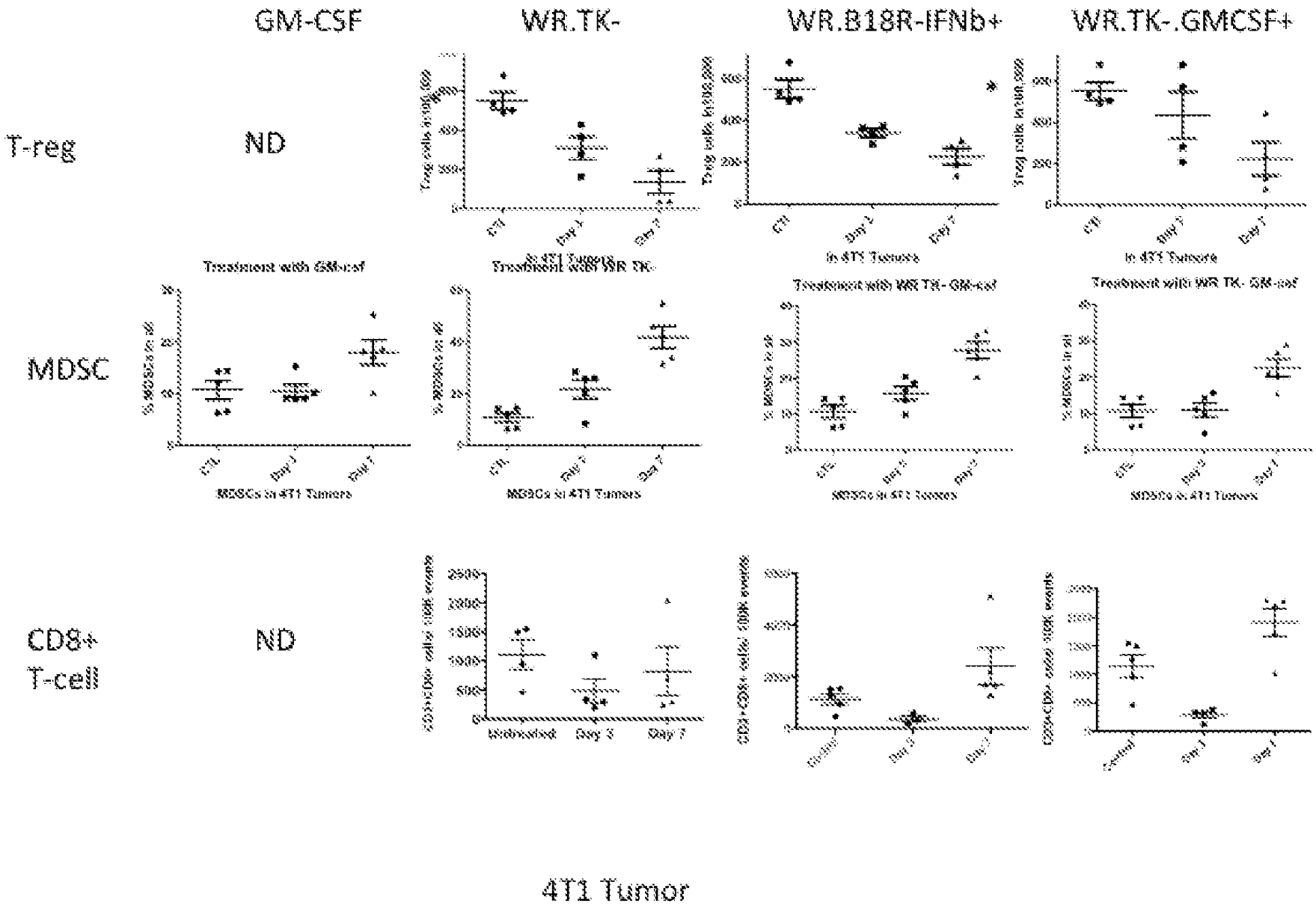
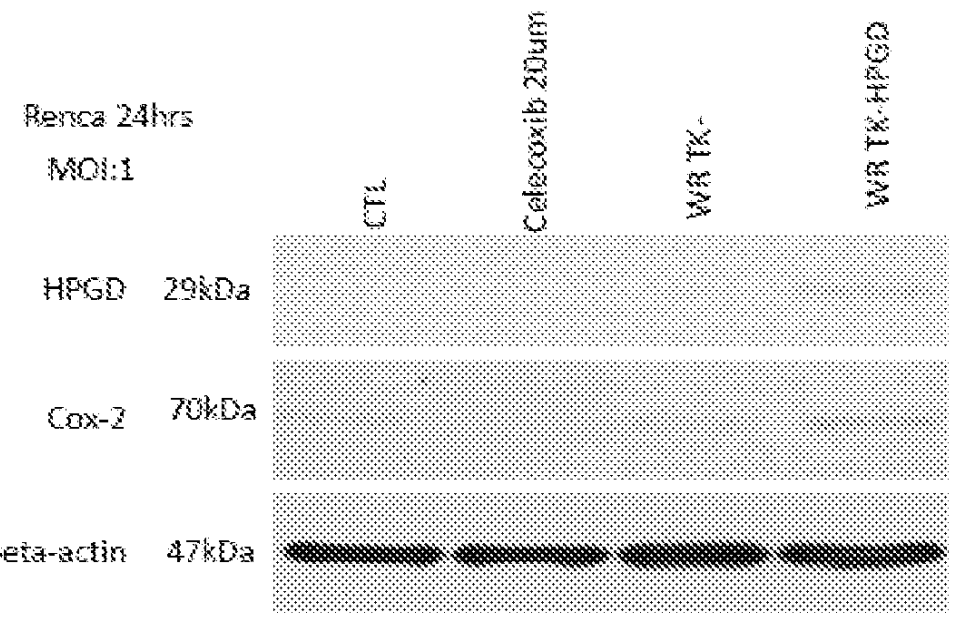

GM-CSF
WR.TK-
WR.B18R-IFNb+
WR.TK-.GMCSF+
T-reg
ND
MDSC
CD8+
T-cell
4T1 Tumor

FIGURE 20



Celecoxib:20um

Treat with 20um AA(arachidonic acid) 4 hours prior to harvest samples

CTL vs Celecoxib:
P=0.0017 **

CTL vs WR TK-HPGD:
P=0.0005 ***

Celecoxib vs WR TK-HPGD:
P=0.0002 ***

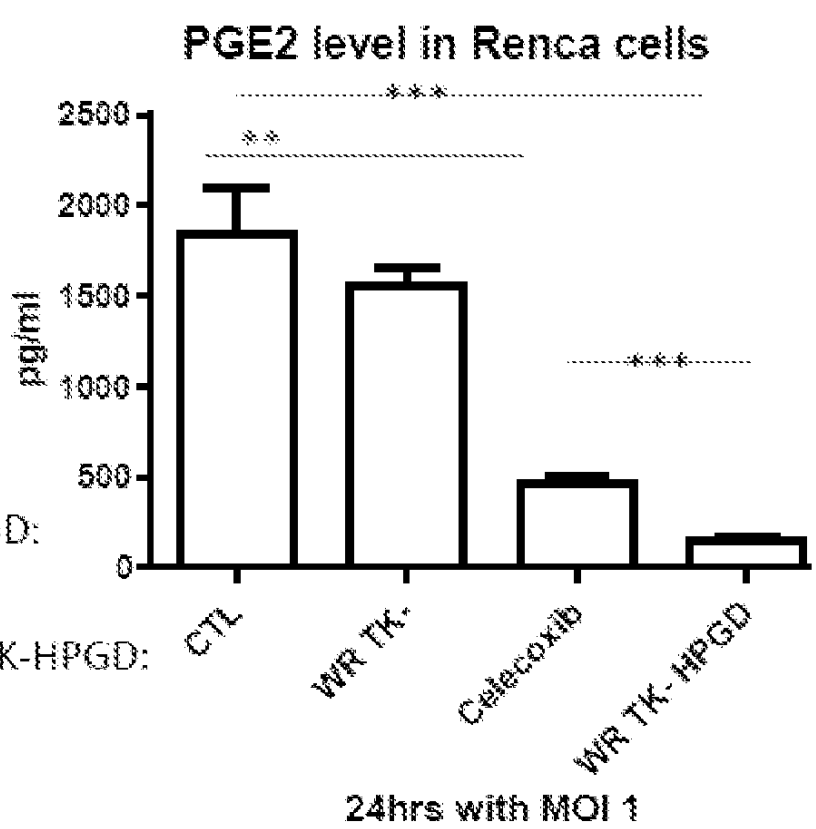


FIGURE 21A-D

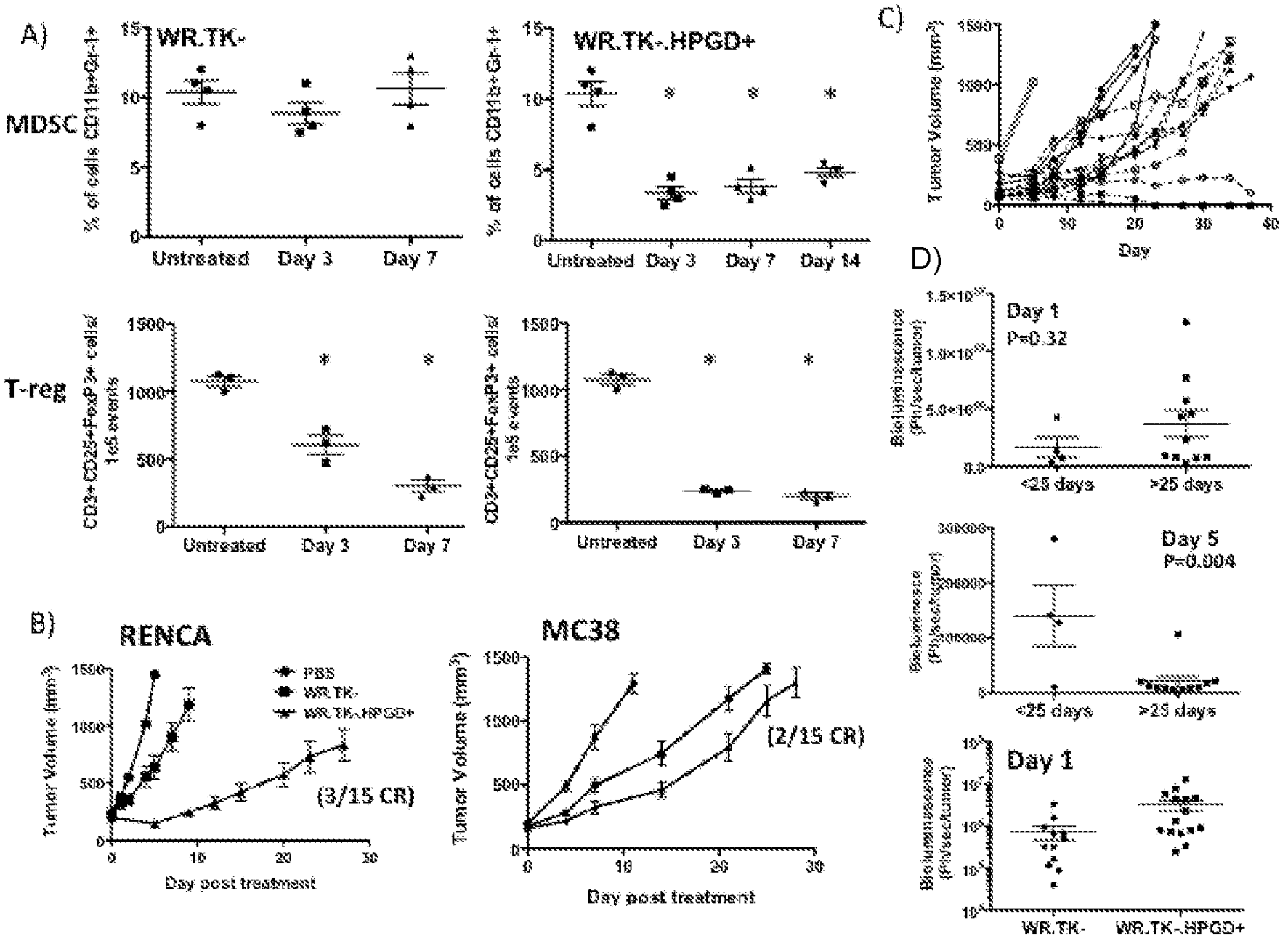

A)
MDSC
WR.TK-
WR.TK-.HPGD+
% of cells CD11b+Gr-1+
Untreated
Day 3
Day 7
Day 14
T-reg
CD3+CD25+FoxP3+ cells/ 1e5 events
B)
RENCA
MC38
PBS
WR.TK-
WR.TK-.HPGD+
Tumor Volume (mm3)
(3/15 CR)
(2/15 CR)
Day post treatment
C)
Tumor Volume (mm3)
Day
D)
Day 1
P=0.32
<25 days
>25 days
Day 5
P=0.004
Bioluminescence (Ph/sec/cm2/sr)
WR.TK-
WR.TK-.HPGD+

FIGURE 22

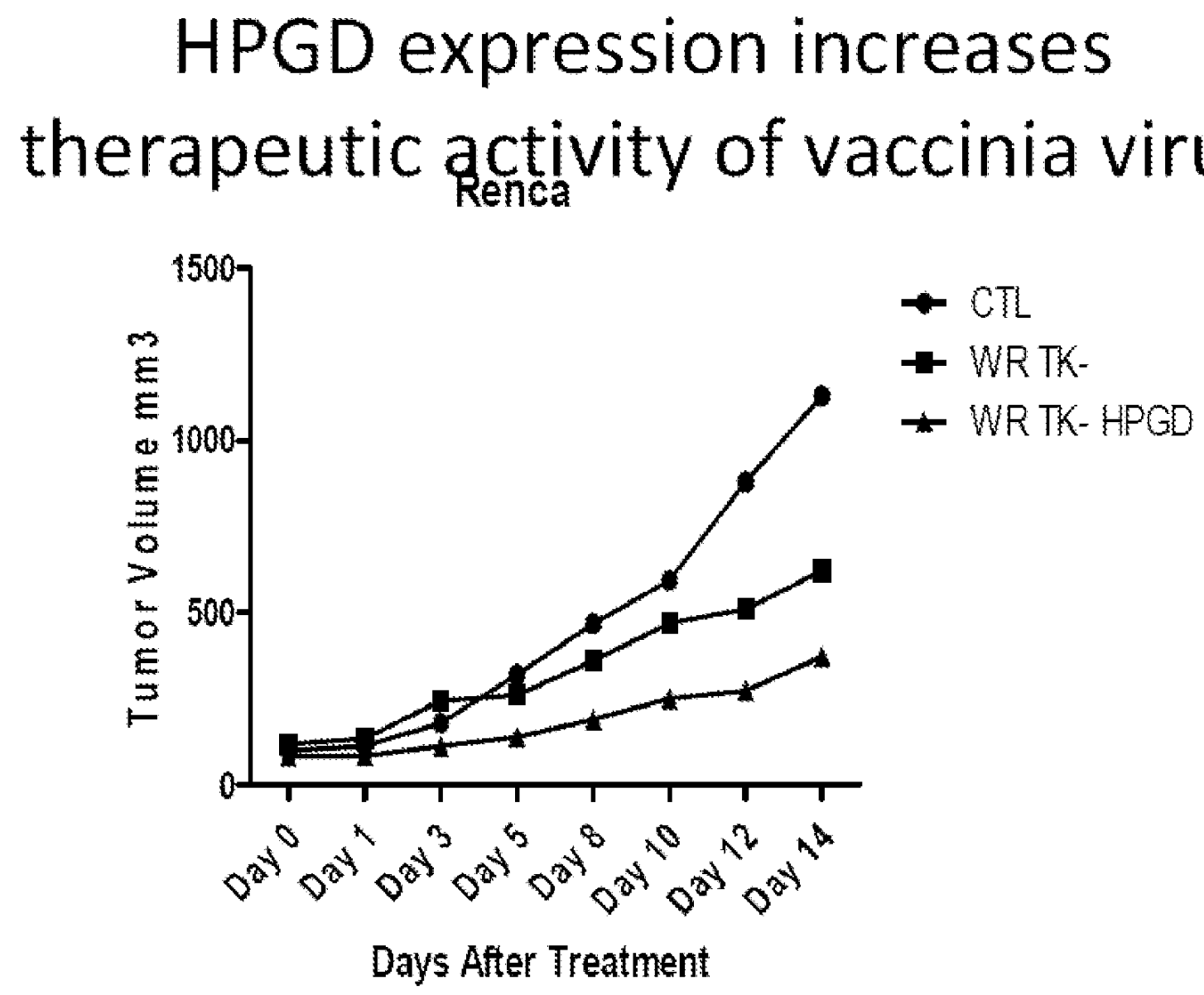

HPGD expression increases therapeutic activity of vaccinia virus
Renca
Tumor Volume mm3
1500
1000
500
0
Day 0
Day 1
Day 3
Day 5
Day 8
Day 10
Day 12
Day 14
Days After Treatment
CTL
WR TK-
WR TK- HPGD

FIGURE 23A

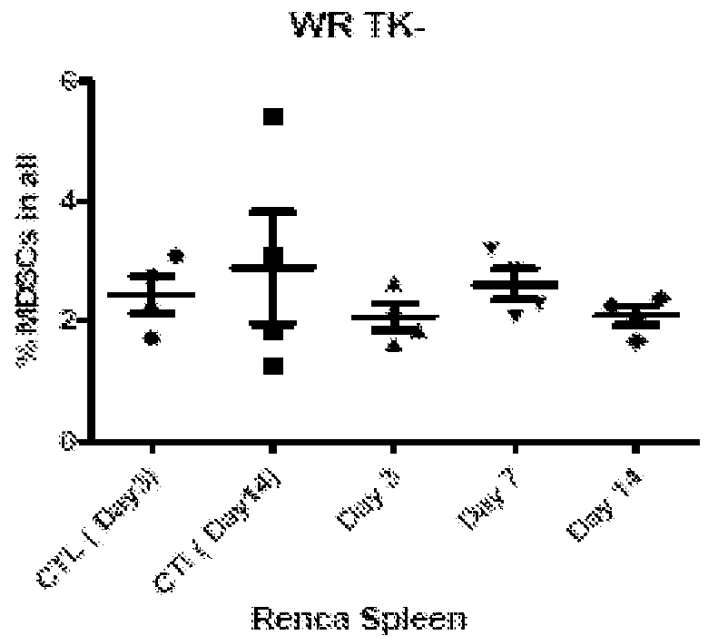


FIGURE 23B

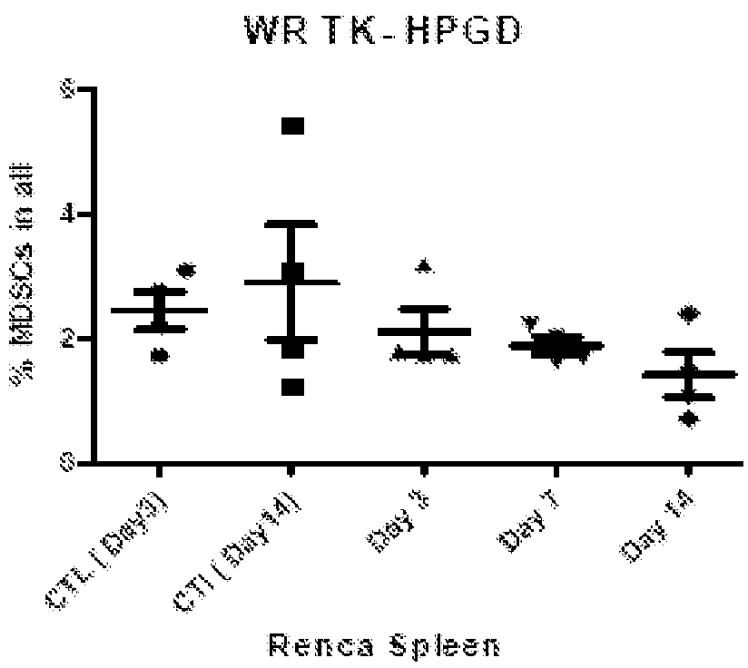


FIGURE 23C

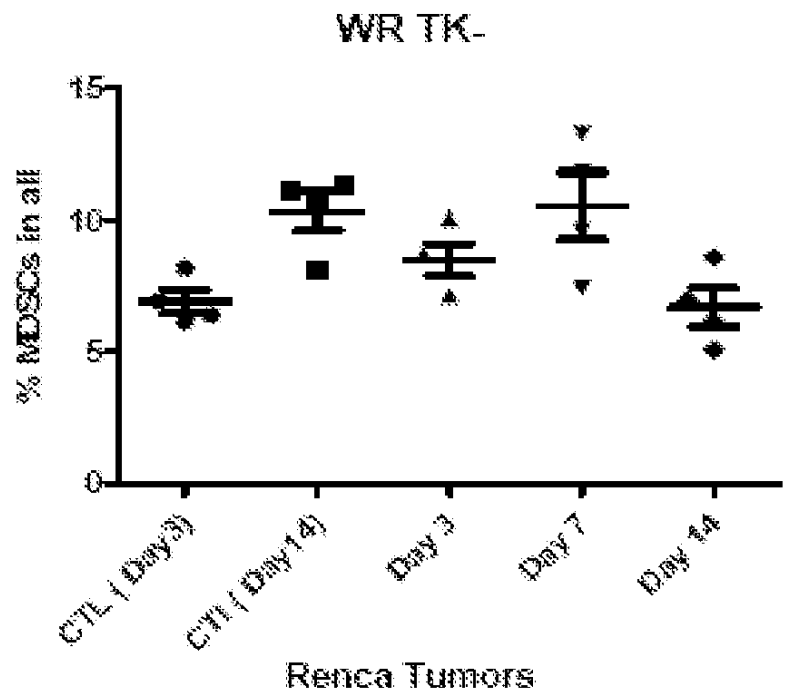


FIGURE 23D

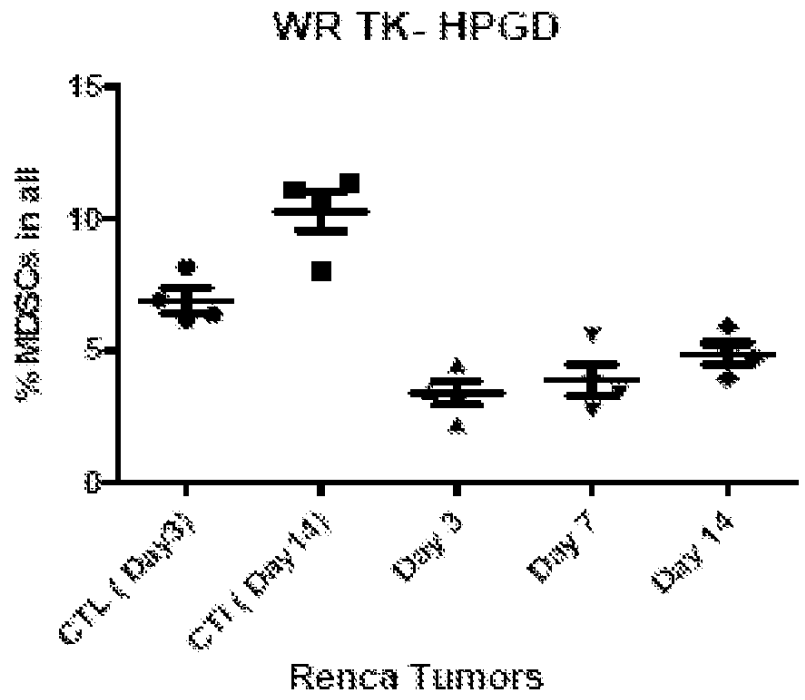


FIGURE 24A-D

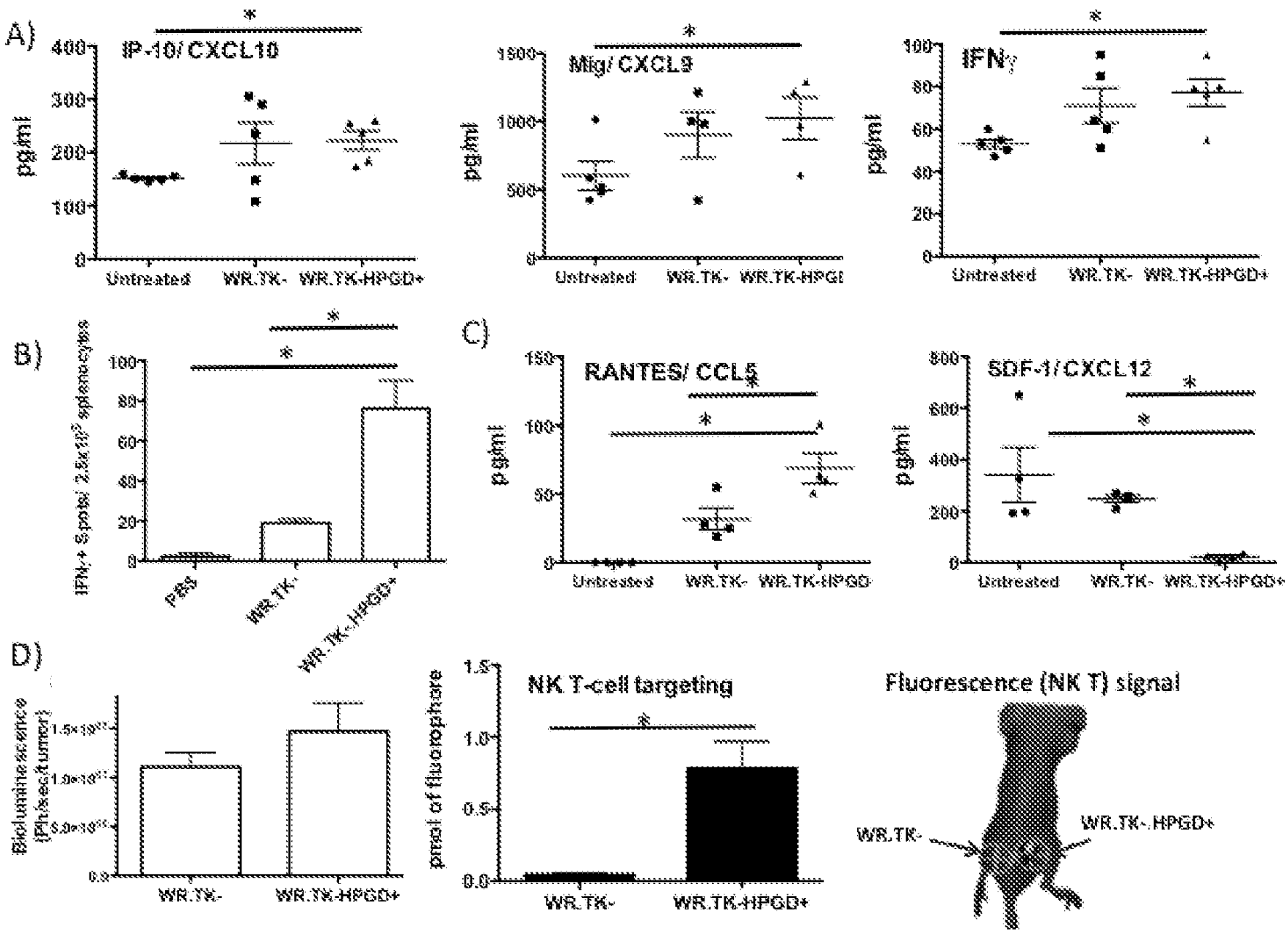
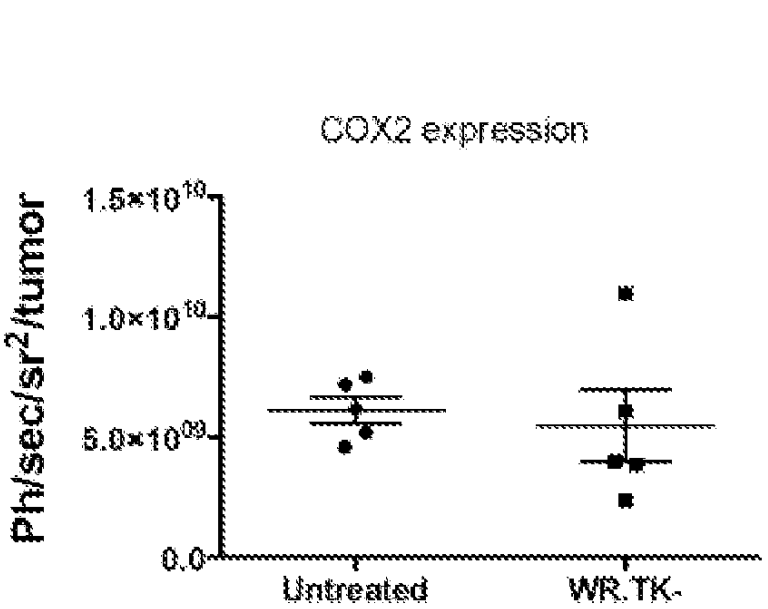

A)
IP-10/ CXCL10
pg/ml
Untreated
WR.TK-
WR.TK-HPGD+
Mig/ CXCL9
IFNγ
B)
IFN-γ Spots/ 2.5x10^5 splenocytes
PBS
WR.TK-
WR.TK-HPGD+
C)
RANTES/ CCL5
SDF-1/CXCL12
D)
Bioluminescence (Photons/tumor)
NK T-cell targeting
pmol of fluorophore
Fluorescence (NK T) signal

FIGURE 25


COX2 expression
Ph/sec/sr2/tumor
1.5×10^10
1.0×10^10
5.0×10^09
0.0
Untreated
WR.TK-

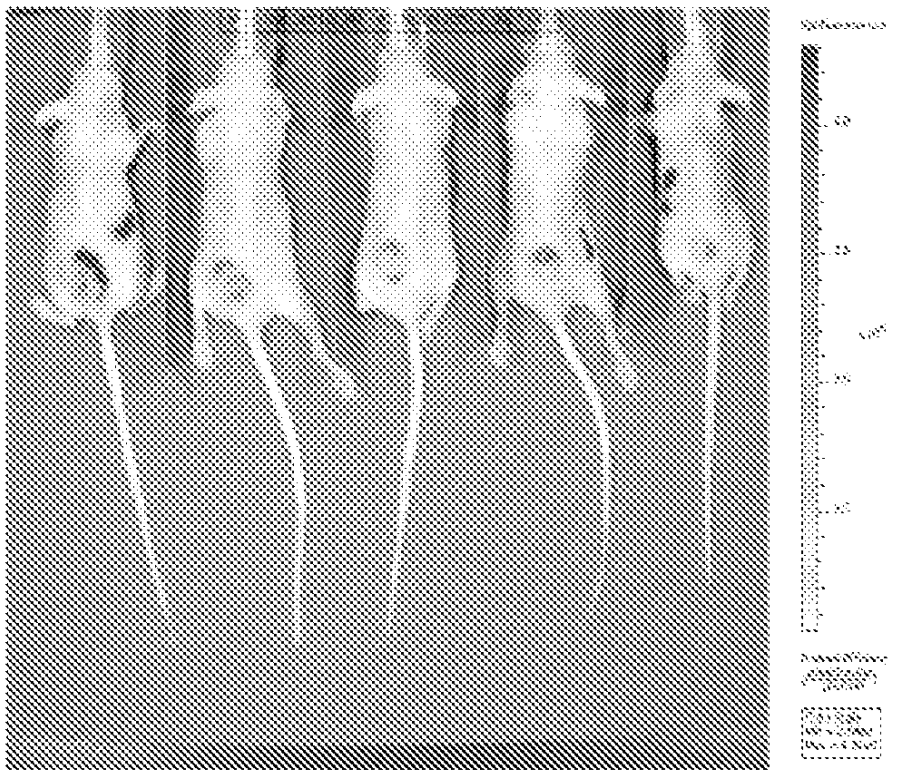


FIGURE 26A-B

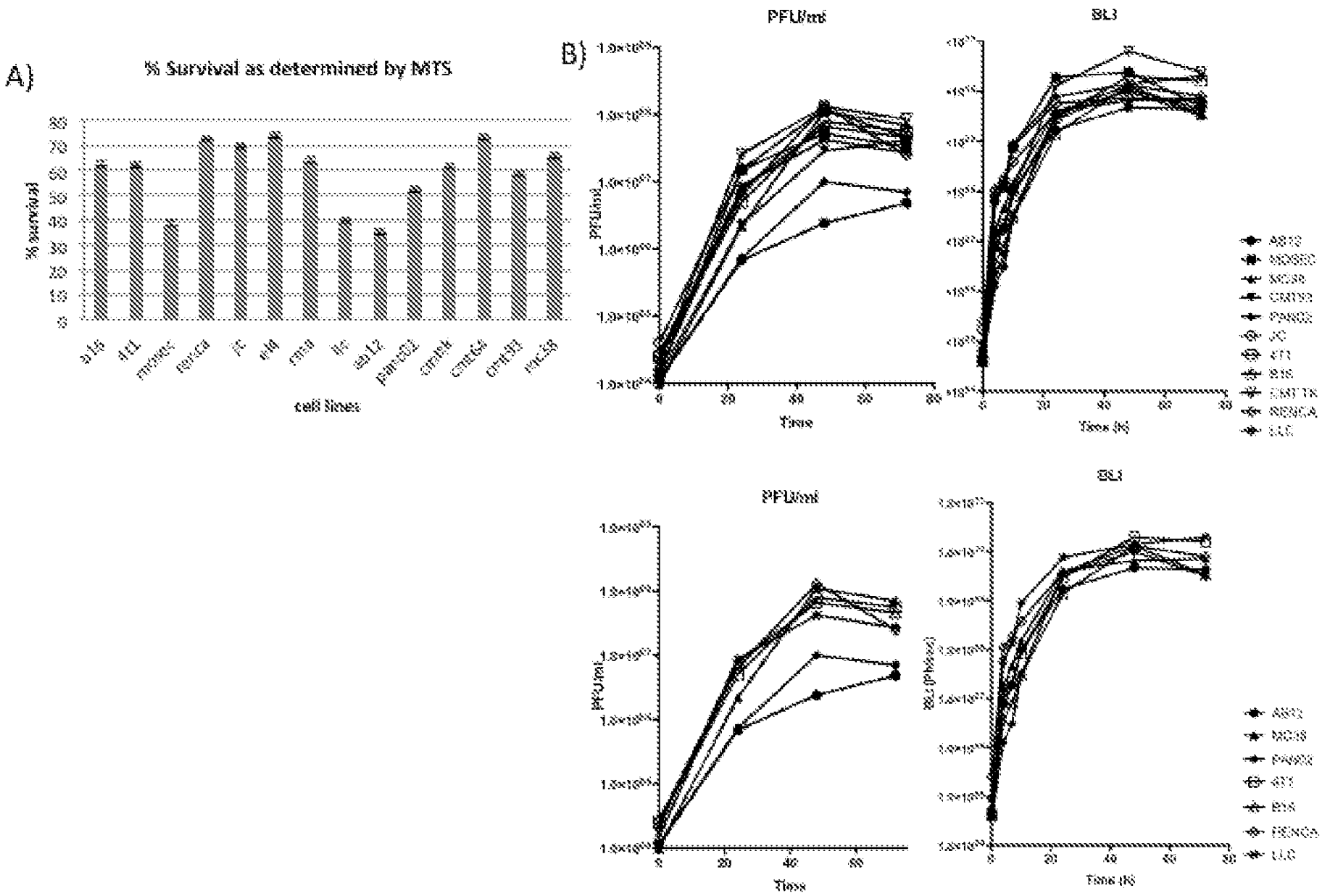

A)
% Survival as determined by MTS
% survival
cell lines
B)
PFU/ml
Time
BL3
Time (h)
ABT2
MDSC
PANC2
4T1
B16
RENCA
LLC

FIGURE 27

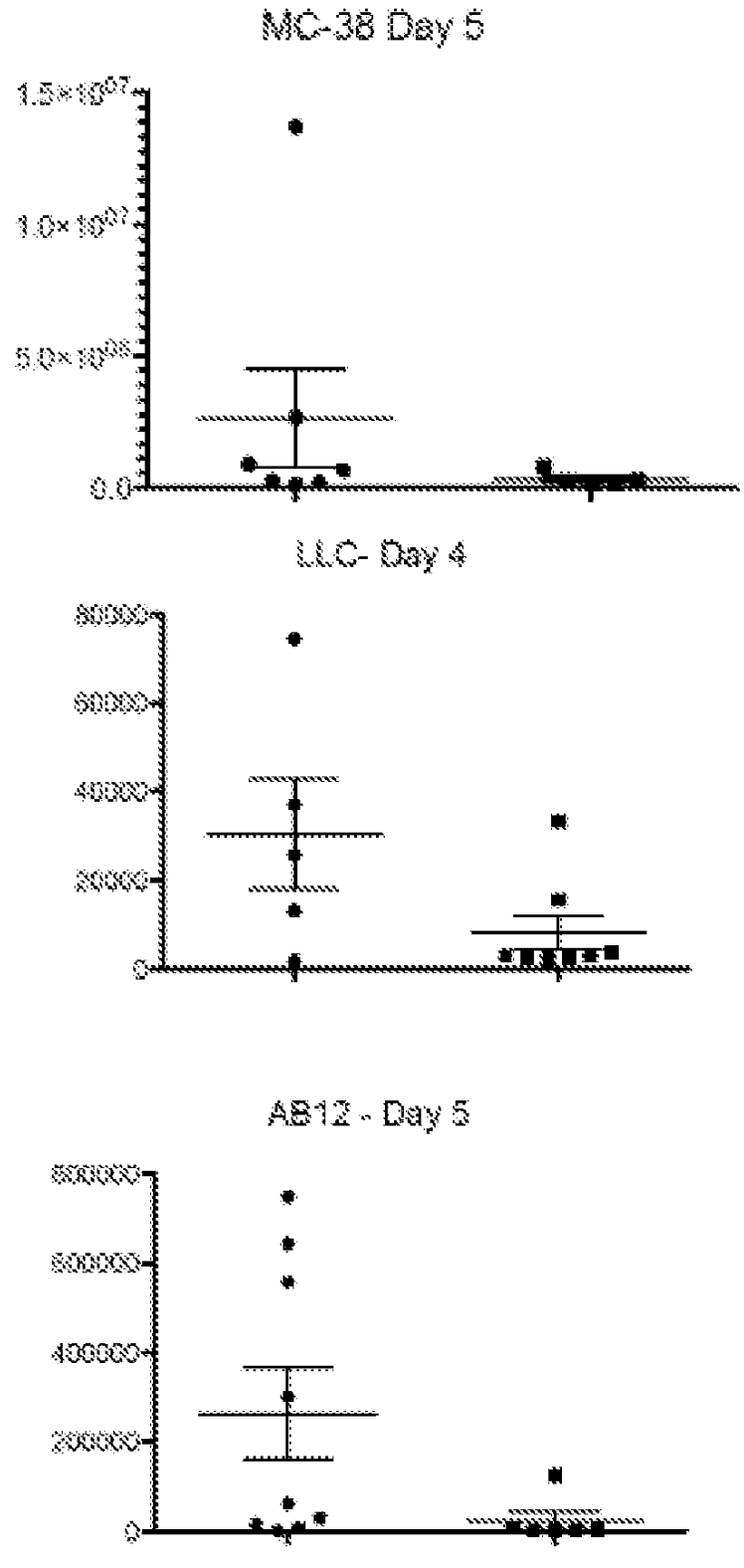

MC-38 Day 5
1.5×10^07
1.0×10^07
5.0×10^06
0.0
LLC- Day 4
60000
40000
20000
0
AB12 - Day 5
600000
400000
200000
0

FIGURE 28

Addition of HPGD expression to our UPCI-1812 virus further enhances therapeutic acivity

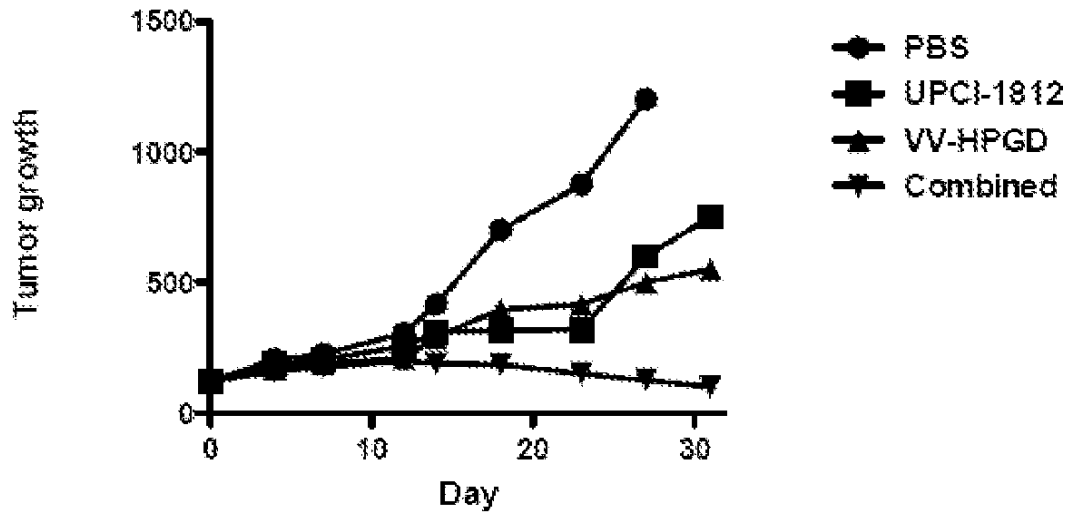


FIGURE 29

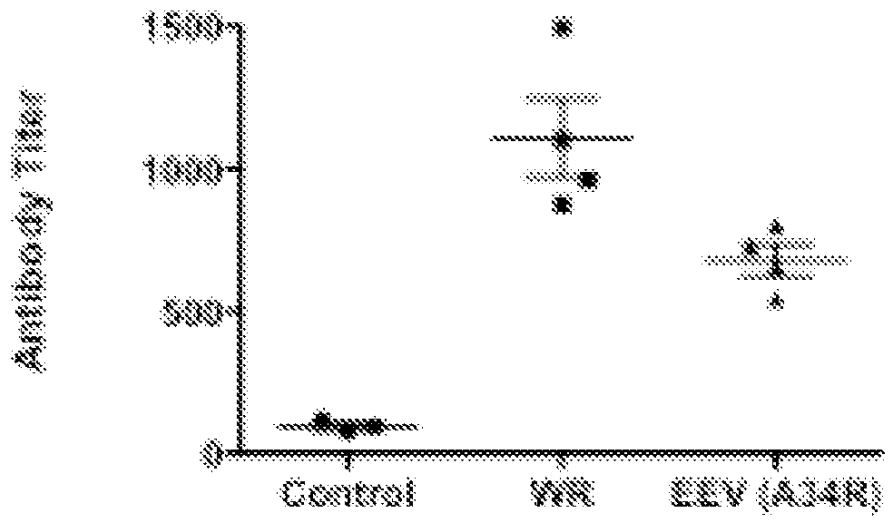
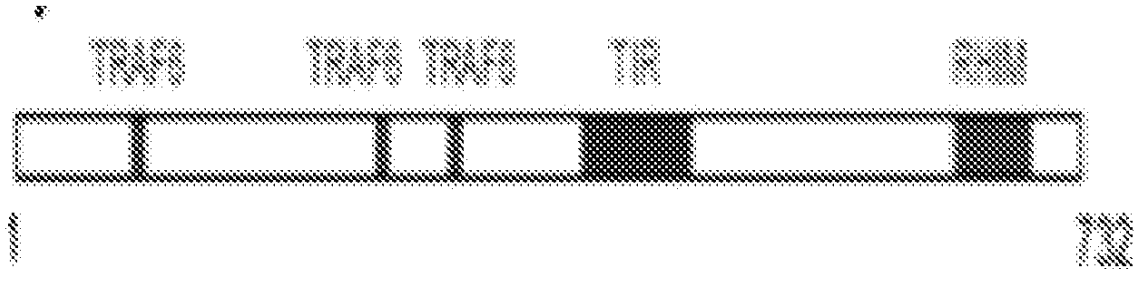


FIGURE 30



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/052308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/39 (2006.01) A61K 39/285 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DATABASES: EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, HCAPLUS, EMBASE with KEYWORDS: IMMUNE, ONCOLYTIC, CANCER, TUMOR, VACCINIA, DEGLYCOSYLATE, SIALIDASE, 15-PGDH, CXCL, TRIF & like terms. DATABASES: AusPat, The Lens, Google Scholar with KEYWORDS: Applicant / Inventor names.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C [X] See patent family annex

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 November 2014	07 November 2014
Name and mailing address of the ISA/AU	**Authorised officer**
AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au	Catriona Bruce AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6283 7940

INTERNATIONAL SEARCH REPORT C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		International application No. **PCT/US2014/052308**
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X L	AU 2012/244210 A1 (JENNEREX, INC.) 15 November 2012 Examples 1, 4; claim 6; page 13, lines 28-29; page 16, line 1; page 19, line 14; page 22, lines 6-14; page 23, lines 5-6; page 64, line 24 to page 65, line 9 Lack of Unity	1, 5-6, 8-12, 14-24
X L	EP 2269618 A1 (JENNEREX BIOTHERAPEUTICSULC) 05 January 2011 Abstract; paras [0006, 0026, 0089, 0093, 0099, 0242-0243]; claim 32 Lack of Unity	1, 5-6, 8-12, 14-24
A	WO 2012/142529 A2 (GENELUX CORPORATION) 18 October 2012	
A	WO 2004/014314 A2 (KIRN, D.) 19 February 2004	
A	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	
A	WANG, L.-C. S., et al., 'Treating tumors with a vaccinia virus expressing IFNβ illustrates the complex relationships between oncolytic ability and immunogenicity', Molecular Therapy, 2012, vol. 20, pages 736-748	
A	LI, J., et al., 'Chemokine expression from oncolytic vaccinia virus enhances vaccine therapies of cancer', Molecular Therapy, 2011, vol. 19, pages 650-657	
A	LAPORTE, A. N., 'Enhancing the oncolytic efficacy of vaccinia virus by mutagenic augmentation of EEV production', MSc Thesis, 2012, University of Ottawa, Ontario, Canada	
A	THORNE, S. H., 'Immunotherapeutic potential of oncolytic vaccinia virus', Immunologic Research, 2011, vol. 50, pages 286-293	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/052308

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a)

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See Supplemental Box for Details

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US2014/052308

Supplemental Box

Continuation of: **Box III**

Note that Rule 13.2 states that where a group of inventions is claimed in one and the same international application, the requirement of unity of invention referred to in Rule 13.1 shall be fulfilled only where there is a technical relationship among those inventions involving one or more of the same corresponding special technical features. The expression "special technical features" shall mean those technical features that define a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into two distinct groups.

Invention 1. Claims 1-24 (all partially). The feature of oncolytic vaccinia virus with modified glycosylation, and uses thereof, is specific to this group of claims.

Invention 2. Claims 1-24 (all partially). The feature of oncolytic vaccinia virus with any of the following alterations: TK deletion, backbone mutation; modification that promotes T cell response; modification that inhibits immunosuppression; modification that enhances virus spread and activity, and uses thereof, wherein each alteration represents a separate invention, is specific to this group of claims.

PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art.

When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention.

In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is modified oncolytic vaccinia virus. However this feature does not make a contribution over the prior art because it is well known in the prior art, for example as disclosed in D-D2.

Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied *a posteriori*.

The International Searching Authority believes that a search and examination for the all of the claimed inventions will not involve more than negligible additional search and examination effort over that for the first invention and so no additional search fee is required in order to search and examine that invention.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. **PCT/US2014/052308**

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
AU 2012/244210 A1	15 November 2012	AU 2012244210 B2	02 Oct 2014
EP 2269618 A1	05 January 2011	AU 2003258168 A1	25 Feb 2004
		AU 2003258168 B2	29 Oct 2009
		AU 2010200333 A1	18 Feb 2010
		AU 2010200333 B2	13 Sep 2012
		AU 2012261681 A1	10 Jan 2013
		AU 2012261681 B2	02 Oct 2014
		CA 2494844 A1	19 Feb 2004
		CA 2818693 A1	19 Feb 2004
		CN 1754002 A	29 Mar 2006
		CN 1754002 B	08 Sep 2010
		CN 101912421 A	15 Dec 2010
		EP 1578396 A2	28 Sep 2005
		EP 2044948 A1	08 Apr 2009
		EP 2044948 B1	30 Oct 2013
		EP 2269619 A1	05 Jan 2011
		HK 1130196 A1	04 Jul 2014
		JP 2006506974 A	02 Mar 2006
		JP 4796299 B2	19 Oct 2011
		JP 2011078427 A	21 Apr 2011
		KR 20050074436 A	18 Jul 2005
		KR 101170653 B1	03 Aug 2012
		KR 20120002613 A	06 Jan 2012
		KR 20130012595 A	04 Feb 2013
		US 2009004723 A1	01 Jan 2009
		US 8329164 B2	11 Dec 2012
		US 2006099224 A1	11 May 2006
		US 2013183271 A1	18 Jul 2013
		WO 2004014314 A2	19 Feb 2004
WO 2012/142529 A2	18 October 2012	CA 2836299 A1	18 Oct 2012
		CN 104093830 A	08 Oct 2014
		EP 2697368 A2	19 Feb 2014
		JP 2014513938 A	19 Jun 2014
		US 2012308484 A1	06 Dec 2012

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. **PCT/US2014/052308**

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**
WO 2004/014314 A2	19 February 2004	AU 2003258168 A1	25 Feb 2004
		AU 2003258168 B2	29 Oct 2009
		AU 2010200333 A1	18 Feb 2010
		AU 2010200333 B2	13 Sep 2012
		AU 2012261681 A1	10 Jan 2013
		AU 2012261681 B2	02 Oct 2014
		CA 2494844 A1	19 Feb 2004
		CA 2818693 A1	19 Feb 2004
		CN 1754002 A	29 Mar 2006
		CN 1754002 B	08 Sep 2010
		CN 101912421 A	15 Dec 2010
		EP 1578396 A2	28 Sep 2005
		EP 2044948 A1	08 Apr 2009
		EP 2044948 B1	30 Oct 2013
		EP 2269618 A1	05 Jan 2011
		EP 2269619 A1	05 Jan 2011
		HK 1130196 A1	04 Jul 2014
		JP 2006506974 A	02 Mar 2006
		JP 4796299 B2	19 Oct 2011
		JP 2011078427 A	21 Apr 2011
		KR 20050074436 A	18 Jul 2005
		KR 101170653 B1	03 Aug 2012
		KR 20120002613 A	06 Jan 2012
		KR 20130012595 A	04 Feb 2013
		US 2009004723 A1	01 Jan 2009
		US 8329164 B2	11 Dec 2012
		US 2006099224 A1	11 May 2006
		US 2013183271 A1	18 Jul 2013

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members	International application No. **PCT/US2014/052308**

This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent Document/s Cited in Search Report		**Patent Family Member/s**	
Publication Number	**Publication Date**	**Publication Number**	**Publication Date**

End of Annex

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.

Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 de 1995 del Ministerio de Justicia, del documento expedido en Estados Unidos de América correspondiente a un documento de cesión otorgado a favor de la sociedad **UNIVERSITY OF PITTSBURGH – OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION,** domiciliada en Pittsburgh, Pensilvania, Estados Unidos de América.

OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS

Subsecretario de Comercio para la Propiedad Intelectual y Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Julio 30 de 2014

BAKER BOTTS LLP
30 ROCKEFELLER PLAZA
NEW YORK, NY 10112-4498

502912684

Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos
Notificación de Registro de Documento de Cesión

El documento anexo ha sido registrado por la División de Cesiones de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos. Una copia completa en microfilm está disponible en el cuarto de búsqueda de cesiones en el número de rollo y marco indicados abajo.

Por favor revise toda la información contenida en esta notificación. La información contenida en esta notificación de registro refleja los datos presentes en el sistema de cesiones de patentes y marcas. En caso de que usted encuentre algún error o tenga preguntas relacionadas con esta notificación, usted puede contactar al empleado cuyo nombre aparece en esta notificación al 571-272-3350. Por favor envíe la solicitud de corrección a: Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos, Sucursal de Servicios de Cesiones, P. O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313.

Fecha de registro: 07/29/2014 Rollo/Marco: 033415/0240
Número de páginas: 4

Expediente: Cesión del interés del cedente (ver documento para detalles).
Número de archivo: 072396.0530

Cedente:
THORNE, STEPHEN HOWARD
Fecha del documento: 07/22/2014

Cesionario:
UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION
THACKERAY AND O'HARA STREETS
200 GARDNER STEEL CONF. CENTER
PITTSBURGH, PENNSYLVANIA 15260

Número de serie: 61868978 Fecha de presentación: 08/22/2013

Número de patente: Fecha de expedición:

Título: TERAPIAS INMUNO-ONCOLÍTICAS

Sucursal de Registro de Cesiones
División de Registros Públicos

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 – WWW.USPTO.GOV

_____

Expediente de abogado No. 072396.0530

CESIÓN MUNDIAL

CONSIDERANDO que, **Stephen Howard Thorne**, ciudadana del Reino Unido y cuya dirección de oficina postal es 805 Fairview Road, Pittsburgh, Pensilvania 15238 (de ahora en adelante denominado como el "CEDENTE"), inventó una nueva invención según ha sido revelada en una solicitud de patente titulada "**TERAPIAS INMUNO-ONCOLÍTICAS**", identificada con el Expediente de Abogado No. 072396.0530; la cual

__ está siendo presentada concurrentemente con el registro de esta Cesión
X la solicitud provisional fue presentada el 22 de agosto de 2013 como la Solicitud No. 61/868.978
__ la solicitud no provisional fue presentada el _____ como la Solicitud No.
__ la solicitud PCT fue presentada el _____ como la Solicitud No.

CONSIDERANDO QUE, **UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION,** una sociedad constituida y existente bajo las leyes de los **Estados Unidos**, con su sede principal de negocios en **200 Gardner Steel Conference Center, Thackeray & O' Hara Streets, Pittsburgh, Pensilvania 15260, Estados Unidos de América** (de ahora en adelante denominada el "CESIONARIO"), desea adquirir la totalidad de nuestro derecho, título e interés en, sobre y bajo dicha invención y dicha solicitud;

AHORA, POR LO TANTO, por una contraprestación onerosa, el recibo y la suficiencia de la cual es reconocida por medio del presente, el CEDENTE ha vendido, cedido, transferido y traspasado, y por medio del presente vende, cede, transfiere y traspasa al CESIONARIO, sus sucesores, representantes legales ya asignatarios, la totalidad del derecho, título e interés en, sobre y bajo dicha invención y dicha solicitud provisional de los Estados Unidos o dicha solicitud para título de patente de los Estados Unidos, según sea el caso, y dicha invención en todas las solicitudes que reivindiquen prioridad de las mismas o que se hayan convertido de las mismas, y todas las divisiones, renovaciones, continuaciones y continuaciones en parte de las mismas, y todas las Patentes de los Estados Unidos que puedan ser otorgadas para las mismas y todas las reexpediciones, reexaminaciones y prórrogas de las mismas; y todas las solicitudes para protección de propiedad industrial, incluyendo, sin limitación, todas las solicitudes para patentes, modelos de utilidad, y diseños que puedan ser presentados de ahora en adelante para dicha invención en cualquier país o países diferentes de los Estados Unidos, junto con el derecho de presentar dichas solicitudes y el derecho de reivindicar para las mismas los derechos de prioridad derivados de dichas solicitudes mencionadas bajo las Leyes de Patentes de los Estados Unidos, la

Convención Internacional para la Protección de la Propiedad Industrial, y cualquier otro acuerdo internacional o leyes domésticas del país en el cual cualquiera de dichas solicitudes sea presentada, según se aplicable; y todas las formas de (…)

Activo 11494626.1

(…) protección de la propiedad industrial, incluyendo, sin limitación, patentes, modelos de utilidad, certificados de inventores y diseños que puedan ser otorgados para dicha invención en cualquier país o países extranjeros a los Estados Unidos y todas las prórrogas, renovaciones y reexpediciones de los mismos;

El CEDENTE por medio del presente autoriza al Comisionado de Patentes y Marcas de los Estados Unidos, y cualquier Funcionario de cualquier país o países extranjeros a los Estados Unidos cuyo deber será la expedición de patentes u otra evidencia o formas de protección de la propiedad industrial sobre las solicitudes mencionadas con anterioridad, para expedir las mismas al CESIONARIO, sus sucesores, representantes legales y asignatarios, de conformidad con los términos de este instrumento;

El CEDENTE por medio del presente se compromete y acuerda que el CEDENTE tienen todo el derecho para traspasar la totalidad del derecho, título e interés que está siendo cedido por medio del presente, que dicho derecho,

título e interés se encuentra libre de gravámenes, y que el CEDENTE no ha ejecutado, y no ejecutará, ningún acuerdo que esté en conflicto con el presente;

El CEDENTE además se compromete a ejecutar cualquiera y todos los poderes, solicitudes, cesiones, declaraciones, declaraciones juramentadas y cualquier otro documento en conexión con el presente necesario para perfeccionar dichos derechos, título e interés al CESIONARIO, sus sucesores, representantes legales y asignatarios;

El CEDENTE además se compromete y acuerda que el CEDENTE comunicará al CESIONARIO, sus sucesores, representantes legales, y asignatarios, cualquier hecho conocido por nosotros con respecto a dicha invención, y a testificar en cualquier procedimiento legal, firmarán cualquier documento legal, ejecutarán todas las divisionales, continuaciones, reexpediciones, reexaminaciones, solicitudes extranjeras y cualquier otro Título de Patente, harán todos los juramentos legales, y en general harán todo lo posible para ayudar al CESIONARIO, o sus sucesores, representantes legales y asignatarios, a obtener y ejecutar la adecuada protección para dicha invención en todos los países;

El CEDENTE por medio del presente autoriza al abogado de patentes del CESIONARIO para completar este formato por medio de la adición del número de la solicitud, la fecha de presentación de la solicitud y el número de expediente del abogado, si fuera necesario.

Activo 11494626.1

Expediente de abogado No. 072396.0530

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he puesto mi firma y sello este día 22 de julio de 2014

Firmado por firma ilegible
Stephen Howard Thorne

Testigo: Firmado por firma ilegible (Firma)
David Roger Critchley (Nombre)

Testigo: Firmado por firma ilegible (Firma)
Rebecca Jane Thorne (Nombre)

Activo 11494626.1

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

JULY 30, 2014

PTAS

BAKER BOTTS LLP
30 ROCKEFELLER PLAZA
NEW YORK, NY 10112

502912684

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 07/29/2014

REEL/FRAME: 033415/0240
NUMBER OF PAGES: 4

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: 072396.0530

ASSIGNOR:
THORNE, STEPHEN HOWARD

DOC DATE: 07/22/2014

ASSIGNEE:
UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE
COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER
EDUCATION
THACKERAY AND O'HARA STREETS
200 GARDNER STEEL CONF. CENTER
PITTSBURGH, PENNSYLVANIA 15260

APPLICATION NUMBER: 61868978
PATENT NUMBER:
TITLE: IMMUNO-ONCOLYTIC THERAPIES

FILING DATE: 08/22/2013
ISSUE DATE:

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

WORLDWIDE ASSIGNMENT

WHEREAS,

Stephen Howard Thorne, a citizen of the United Kingdom, and whose post office address is 805 Fairview Road, Pittsburgh, Pennsylvania 15238; (hereinafter referred to as "ASSIGNOR"), invented a new invention as disclosed in a patent application entitled **"IMMUNO-ONCOLYTIC THERAPIES,"**

☐ is being filed concurrently with the recordation of this Assignment.
☒ the Provisional Application was filed on August 22, 2013 as Application No. 61/868,978.
☐ the United States Application was filed on _____ as Application No. _____.
☐ the PCT Application was filed on _____ as Application No. _____.

WHEREAS, **UNIVERSITY OF PITTSBURGH - OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION**, a corporation organized and existing under the laws of the **United States,** having its principal place of business at **200 Gardner Steel Conference Center, Thackeray & O'Hara Streets, Pittsburgh, Pennsylvania 15260** (hereinafter referred to as "ASSIGNEE"), is desirous of obtaining our entire right, title and interest in, to and under the said invention and the said application:

NOW, THEREFORE, for good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, ASSIGNOR has sold, assigned, transferred and set over, and by these presents do hereby sell, assign, transfer and set over, unto ASSIGNEE, its successors, legal representatives and assigns, the entire right, title and interest in, to and under said invention and said United States provisional application or said application for United States Letters Patent, as the case may be, and said invention in all applications claiming priority thereto or converted therefrom, and all divisions, renewals, continuations and continuations-in-part thereof, and all Patents of the United States which may be granted thereon and all reissues, reexaminations and extensions thereof; and all applications for industrial property protection, including, without limitation, all applications for patents, utility models, and designs which may hereafter be filed for said invention in any country or countries other than the United States, together with the right to file such applications and the right to claim for the same the priority rights derived from said applications above under the Patent Laws of the United States, the International Convention for the Protection of Industrial Property, or any other international agreement or the domestic laws of the country in which any such application is filed, as may be applicable; and all forms of

industrial property protection, including, without limitation, patents, utility models, inventors' certificates and designs which may be granted for said invention in any country or countries foreign to the United States and all extensions, renewals and reissues thereof;

ASSIGNOR hereby authorize and request the Commissioner of Patents and Trademarks of the United States, and any Official of any country or countries foreign to the United States, whose duty it is to issue patents or other evidence or forms of industrial property protection on applications as aforesaid, to issue the same to ASSIGNEE, its successors, legal representatives and assigns, in accordance with the terms of this instrument;

ASSIGNOR hereby covenant and agree that ASSIGNOR has full right to convey the entire right, title and interest herein assigned, that such right, title and interest is unencumbered, and that ASSIGNOR has not executed, and will not execute, any agreement in conflict herewith;

ASSIGNOR further agree to execute any and all powers of attorney, applications, assignments, declarations, affidavits and any other papers in connection therewith necessary to perfect such rights, title and interest in ASSIGNEE, its successors, legal representatives and assigns;

ASSIGNOR further covenant and agree that ASSIGNOR will communicate to ASSIGNEE, its successors, legal representatives and assigns, any facts known to us respecting said invention, and testify in any legal proceeding, sign all lawful papers, execute all divisional, continuing, reissue, reexamination, foreign applications or other such Letters Patent, make all rightful oaths, and generally do everything possible to aid ASSIGNEE or, its successors, legal representatives and assigns, to obtain and enforce proper protection for said invention in all countries;

ASSIGNOR hereby authorize ASSIGNEE's patent attorney to complete this form by the addition of the application number, application filing date, and attorney docket number, if necessary.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and seal this 22ND day of JULY, ~~2013~~ 2014

Stephen Howard Thorne

Witness: _____ [signature]

David Roger Critchley [name]

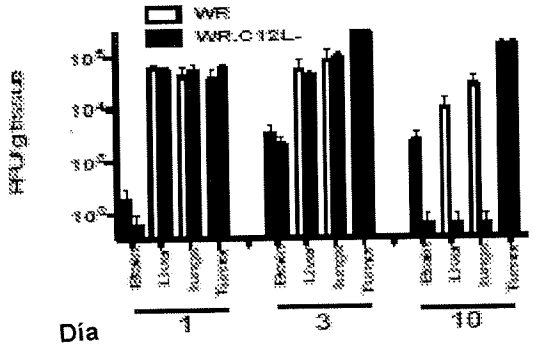
Witness: _____ [signature]

REBECCA JANE THORNE [name]

RESUMEN

La presente invención se refiere a virus de vaccinia oncolítico los cuales se han modificado para promover la inmunidad anti-tumor y/o reducir la inmunidad de anfitrión y/o la respuesta anticuerpo en contra del virus. Esto se basa, por lo menos en parte, sobre el descubrimiento de que el virus de vaccinia oncolítico (i) llevando una supresión de genoma de un gen que reduce la inmunidad de célula T (proteína aglutinante interleucin-18); (ii) tratado con enzima sialidasa que se cree que reduce la activación TLR2 y por tanto la respuesta anticuerpo; (iii) llevando un gen que mejora la inducción de linfocito T citotóxico (por ejemplo TRIF) y/o (iv) reduce las células supresoras derivadas de mieloide mediante reducir prostaglandina E2 reduce el crecimiento de tumor. Por tanto la presente invención proporciona virus de vaccinia inmunooncolíticos y métodos de usarlos en el tratamiento de cánceres.

FIGURA 1A



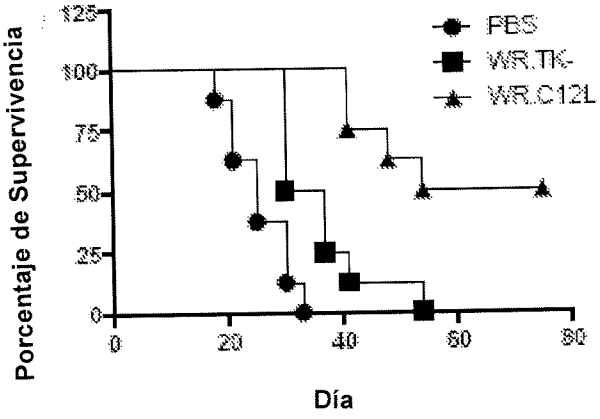


FIGURA 1B

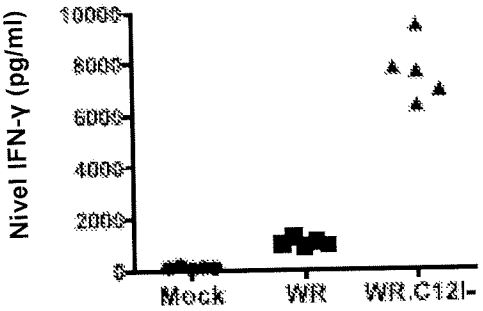
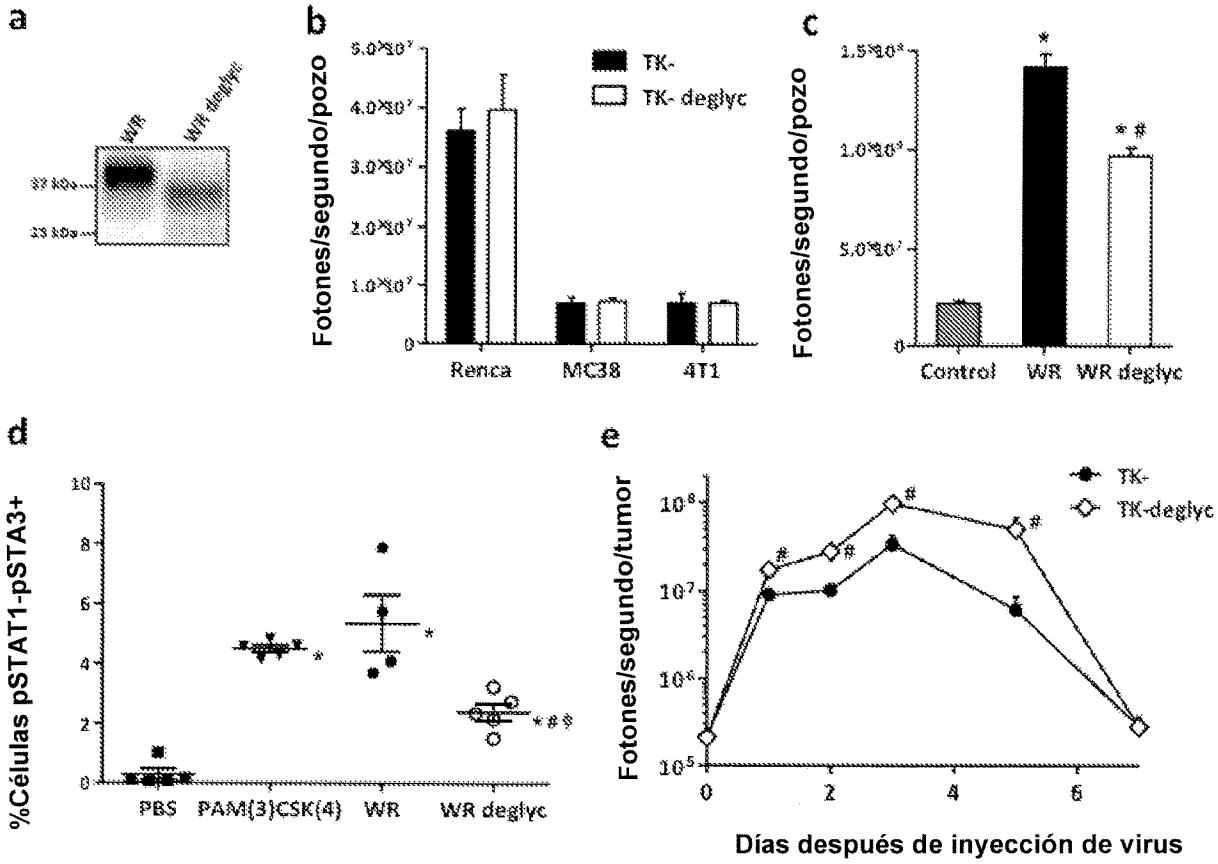
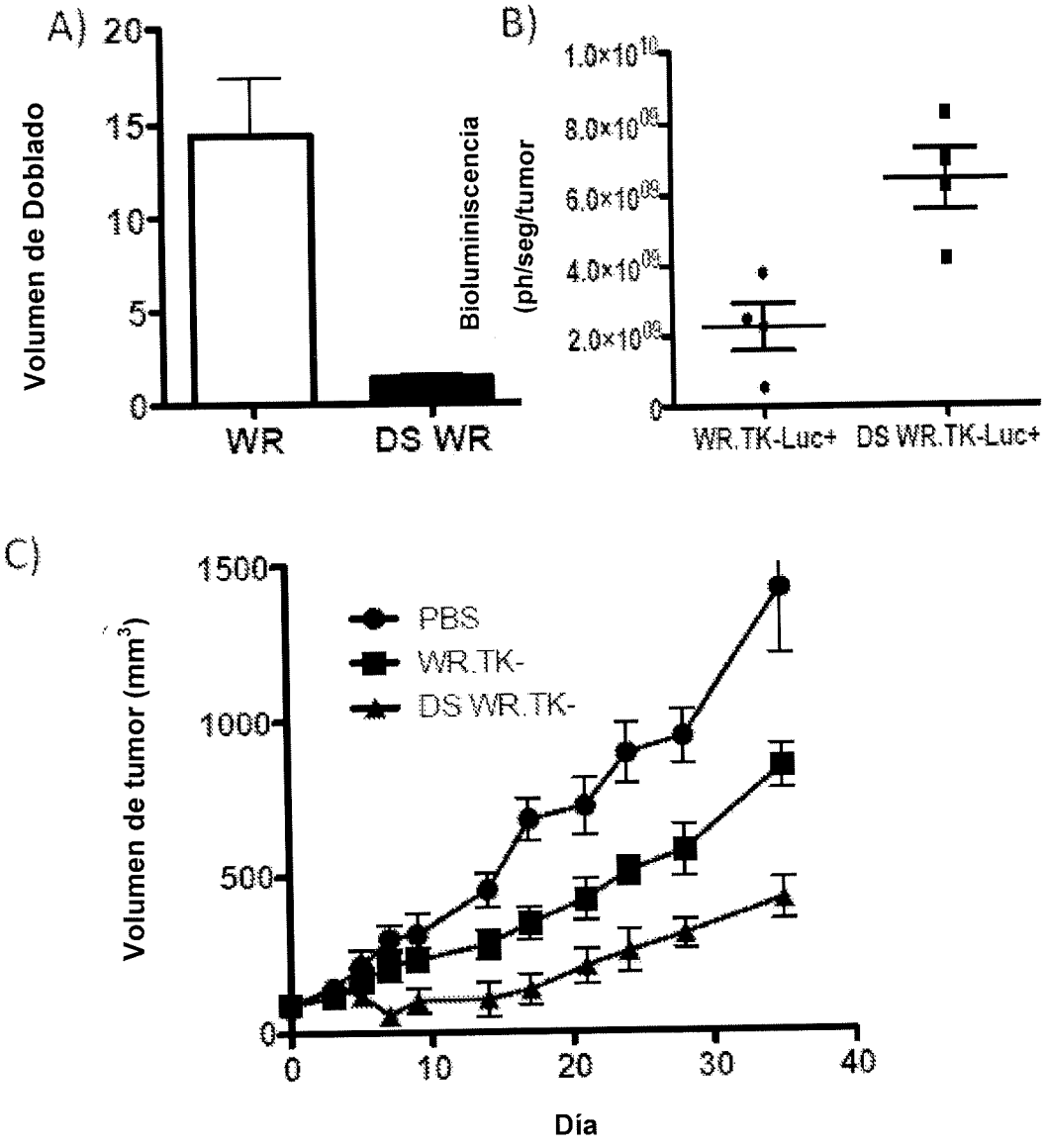


FIGURA 1C


a
WR
WR deglyc
37 kDa
23 kDa
b
Fotones/segundo/pozo
TK-
TK- deglyc
Renca
MC38
4T1
c
Fotones/segundo/pozo
Control
WR
WR deglyc
d
%Células pSTAT1-pSTA3+
PBS
PAM(3)CSK(4)
WR
WR deglyc
e
Fotones/segundo/tumor
TK-
TK-deglyc
Días después de inyección de virus

FIGURAS 2A-E


A)
Volumen de Doblado
20
15
10
5
0
WR
DS WR
B)
Bioluminiscencia
(ph/seg/tumor
1.0×10
8.0×10
6.0×10
4.0×10
2.0×10
0
WR.TK-Luc+
DS WR.TK-Luc+
C)
Volumen de tumor (mm³)
1500
1000
500
0
PBS
WR.TK-
DS WR.TK-
0
10
20
30
40
Día

FIGURAS 3A-C

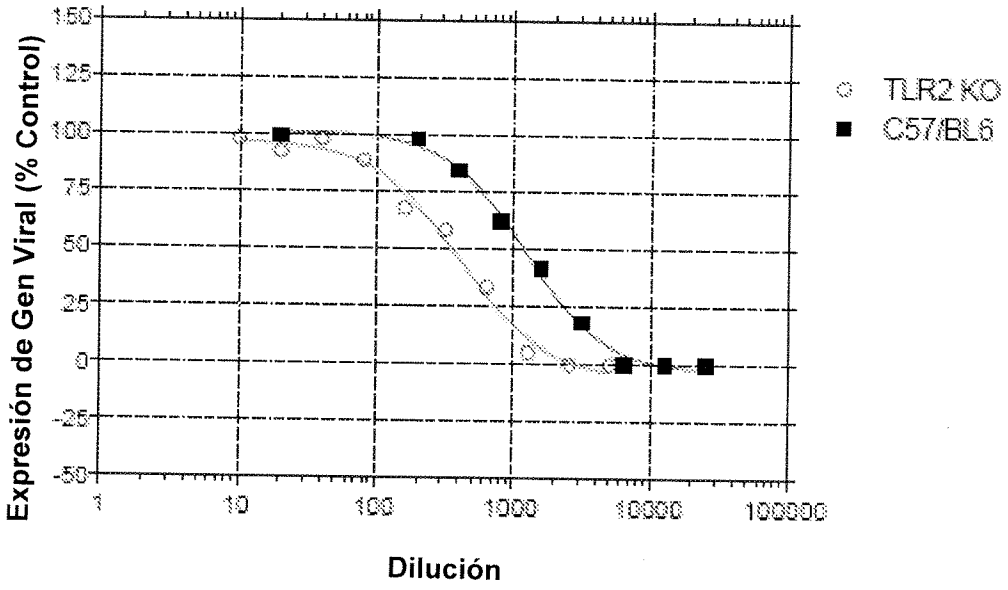
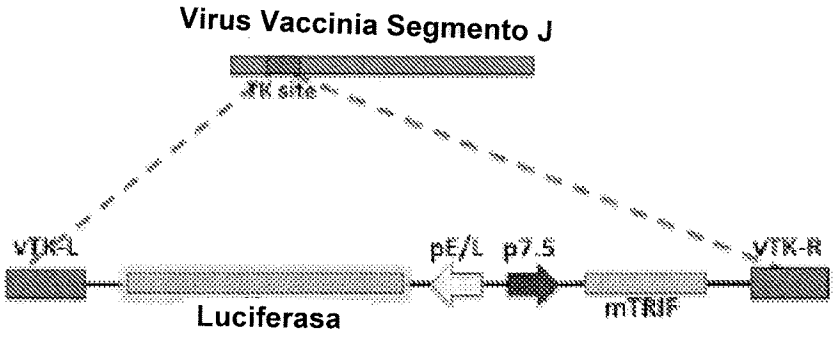

Expresión de Gen Viral (% Control)
150
125
100
75
50
25
0
-25
-50
1
10
100
1000
10000
100000
Dilución
TLR2 KO
C57/BL6

FIGURA 3D

a

TK-TRIF



TK-DAI

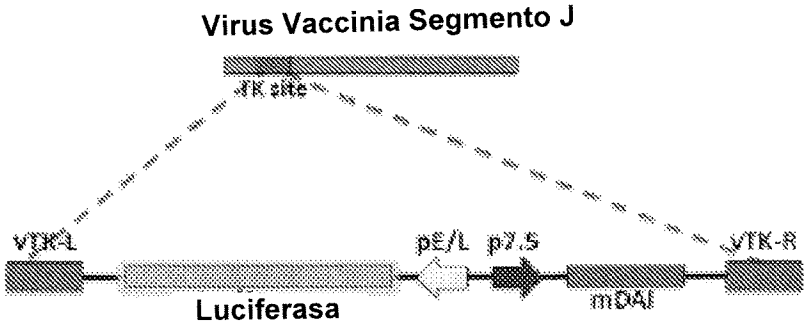
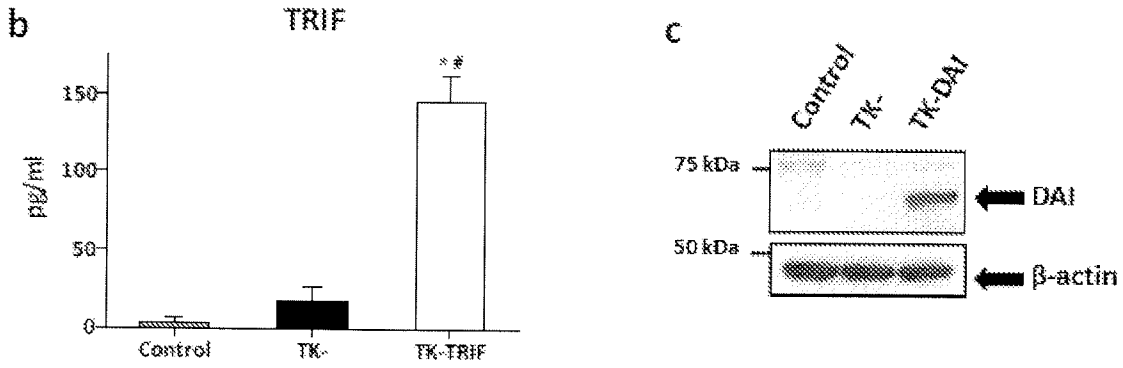


FIGURA 4A


b
TRIF
pg/ml
150
100
50
0
**
Control
TK-
TK-TRIF
c
Control
TK-
TK-DAI
75 kDa
50 kDa
DAI
β-actin

FIGURAS 4B-C

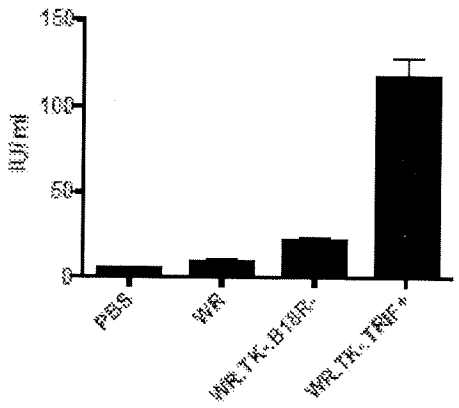


FIGURA 5A

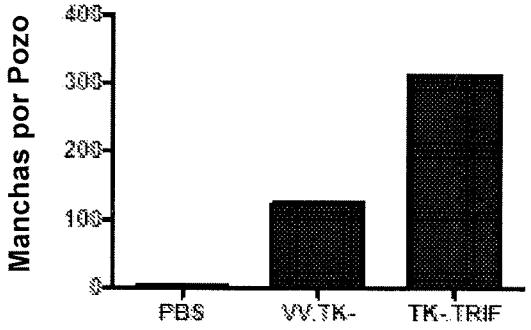


FIGURA 5B

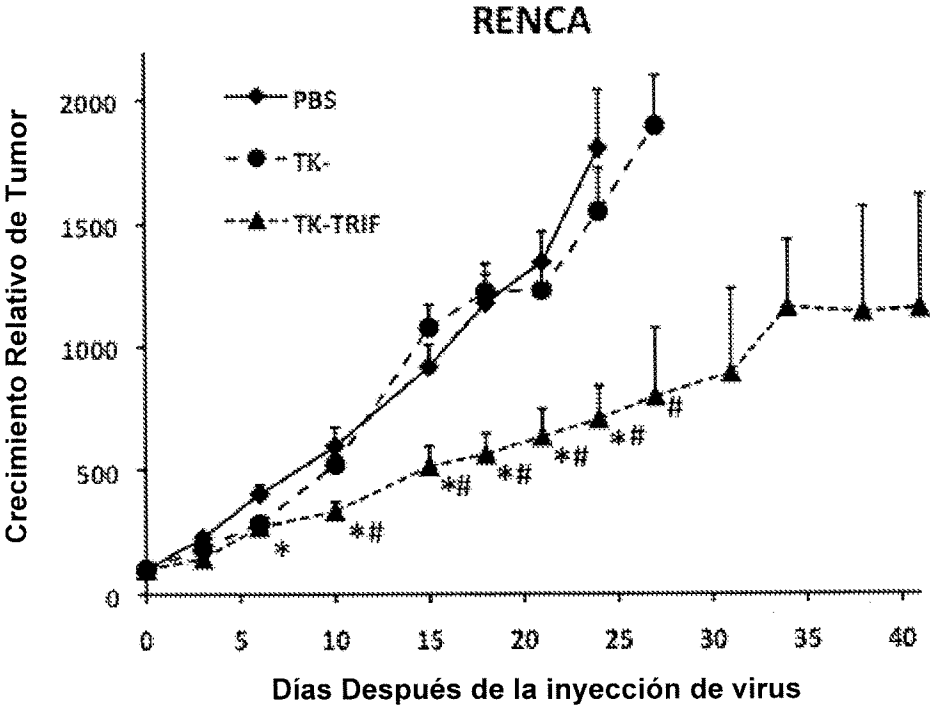
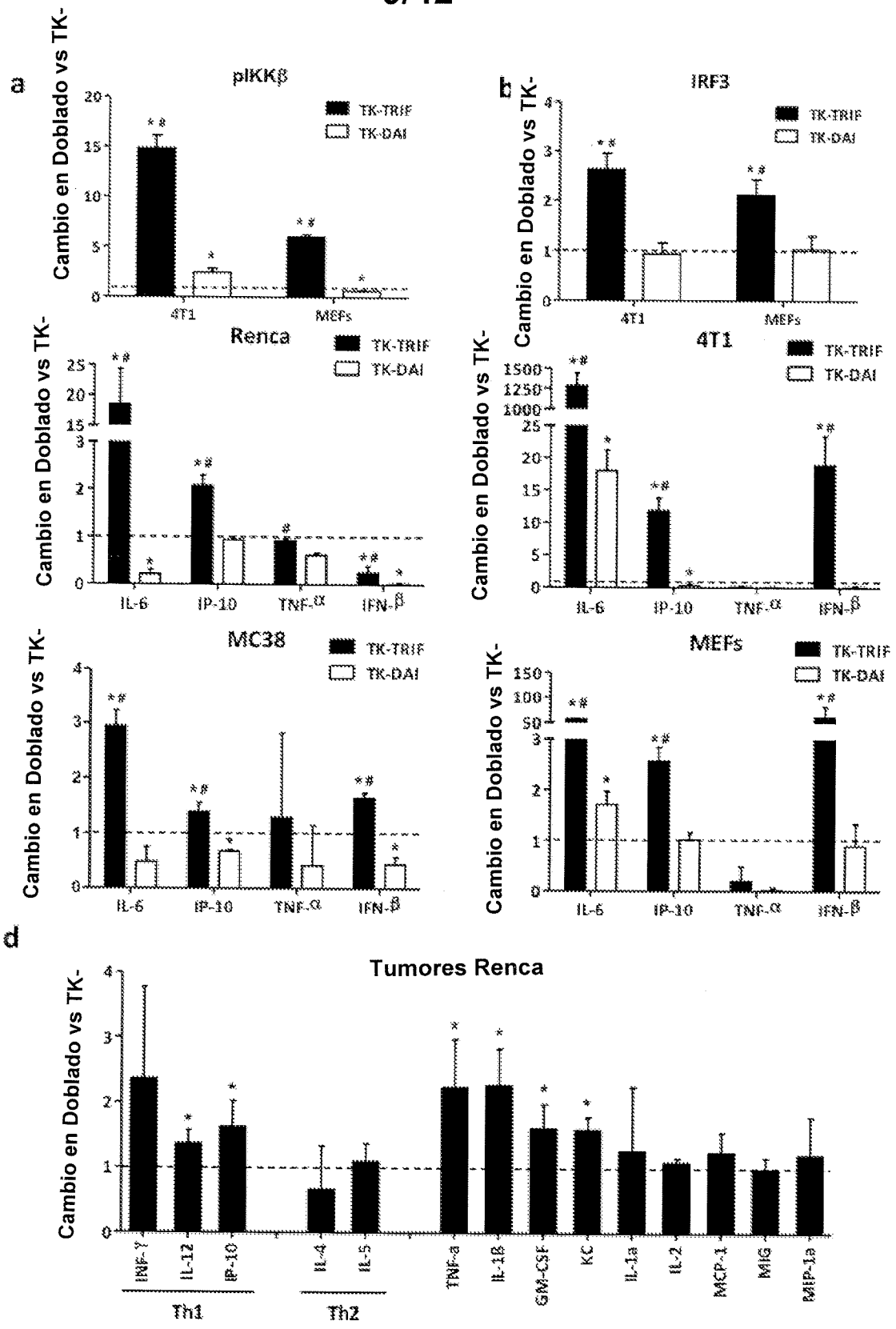
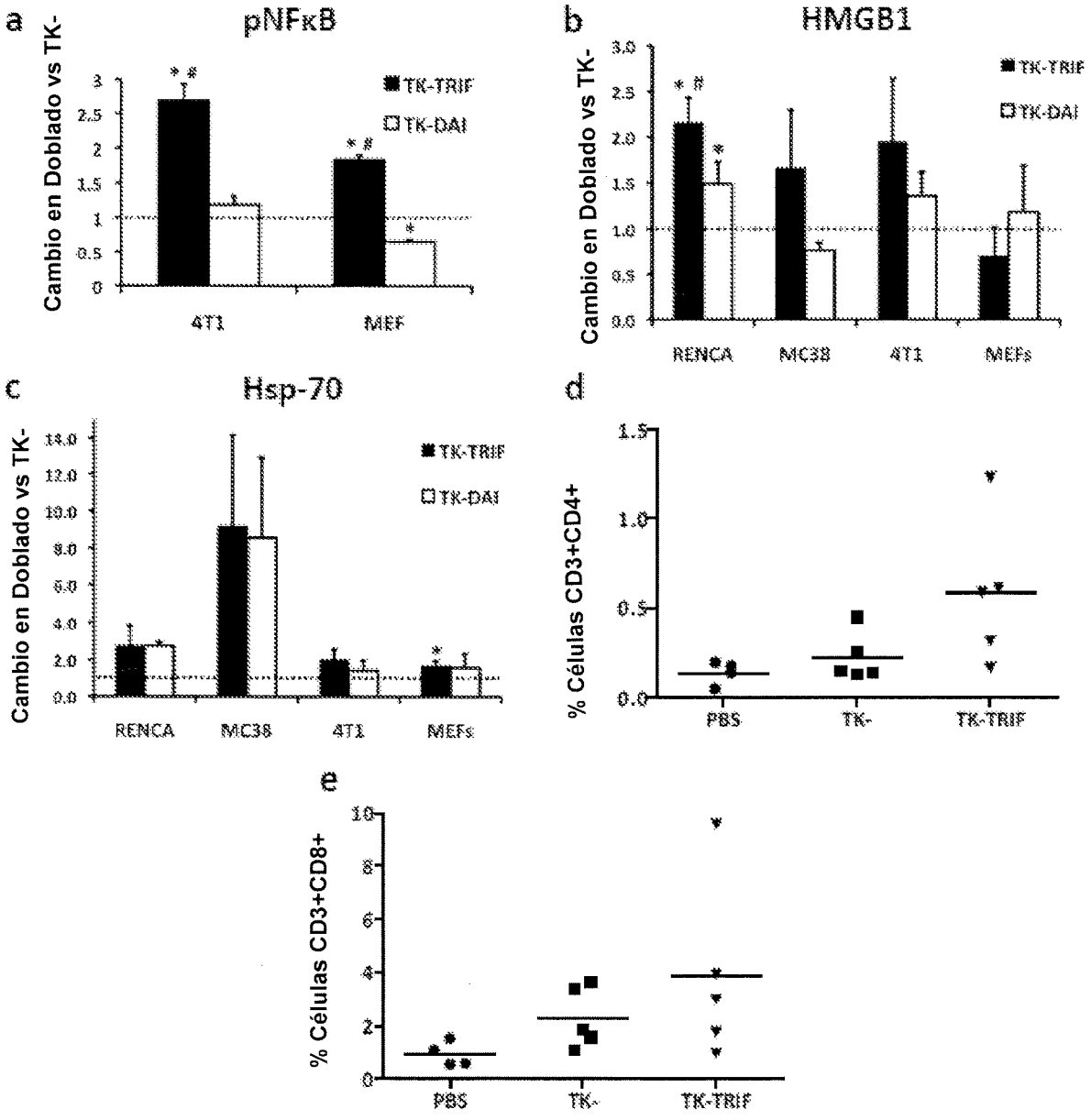

RENCA
Crecimiento Relativo de Tumor
2000
1500
1000
500
0
PBS
TK-
TK-TRIF
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Días Después de la inyección de virus

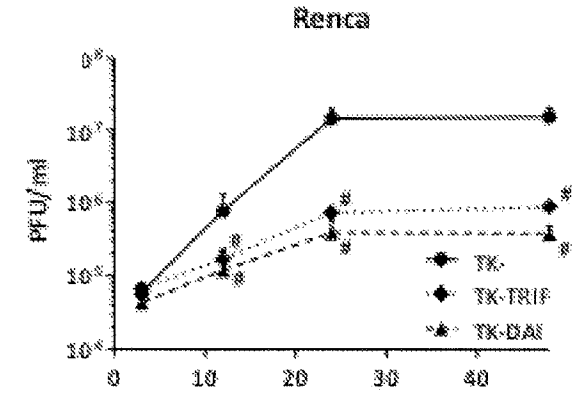
FIGURA 5C

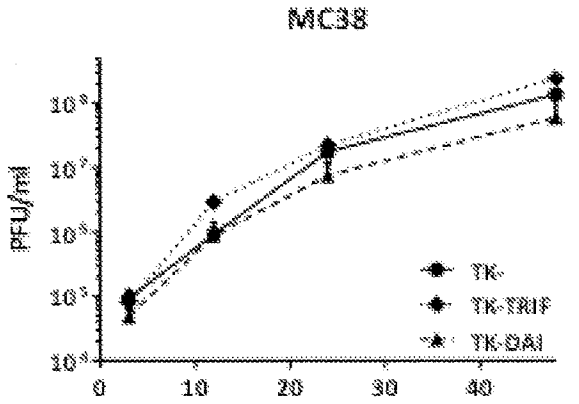

a
pIKKβ
Cambio en Doblado vs TK-
TK-TRIF
TK-DAI
4T1
MEFs
b
IRF3
Renca
4T1
MC38
MEFs
IL-6
IP-10
TNF-α
IFN-β
c
Tumores Renca
INF-γ
IL-12
IP-10
IL-4
IL-5
TNF-a
IL-1β
GM-CSF
KC
IL-1a
IL-2
MCP-1
MIG
MIP-1a
Th1
Th2

FIGURAS 6A-D


a
pNFκB
Cambio en Doblado vs TK-
TK-TRIF
TK-DAI
4T1
MEF
b
HMGB1
Cambio en Doblado vs TK-
TK-TRIF
TK-DAI
RENCA
MC38
4T1
MEFs
c
Hsp-70
Cambio en Doblado vs TK-
TK-TRIF
TK-DAI
RENCA
MC38
4T1
MEFs
d
% Células CD3+CD4+
PBS
TK-
TK-TRIF
e
% Células CD3+CD8+
PBS
TK-
TK-TRIF

FIGURAS 7A-E


Renca
PFU/ml
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
Días Después de infección


MC38
PFU/ml
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
Días después de inyección de virus

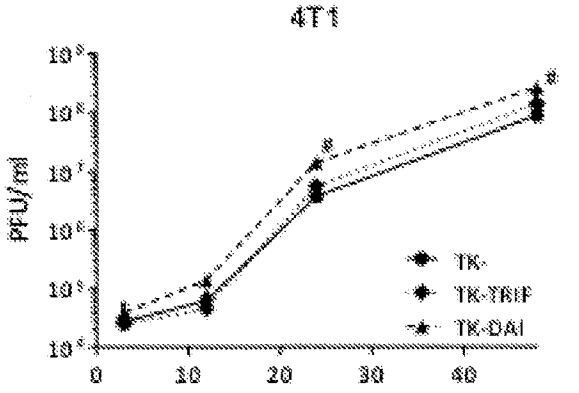

4T1
PFU/ml
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
Días después de inyección de virus

FIGURA 8A

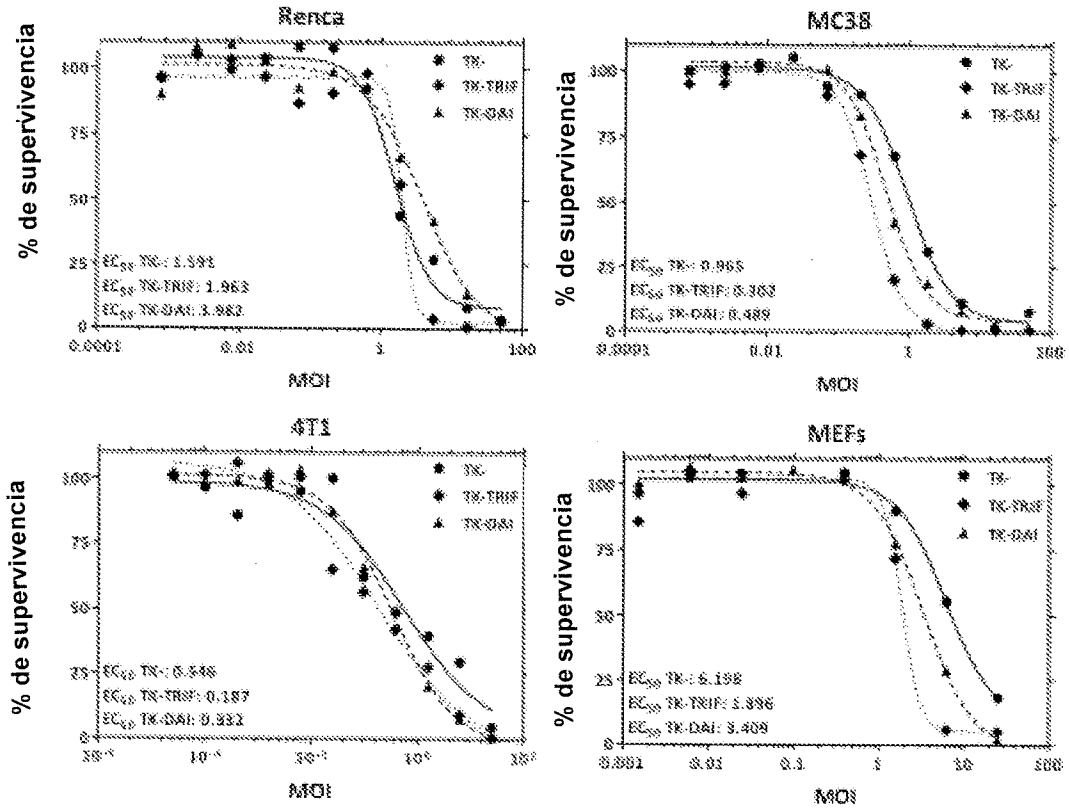


FIGURA 8B

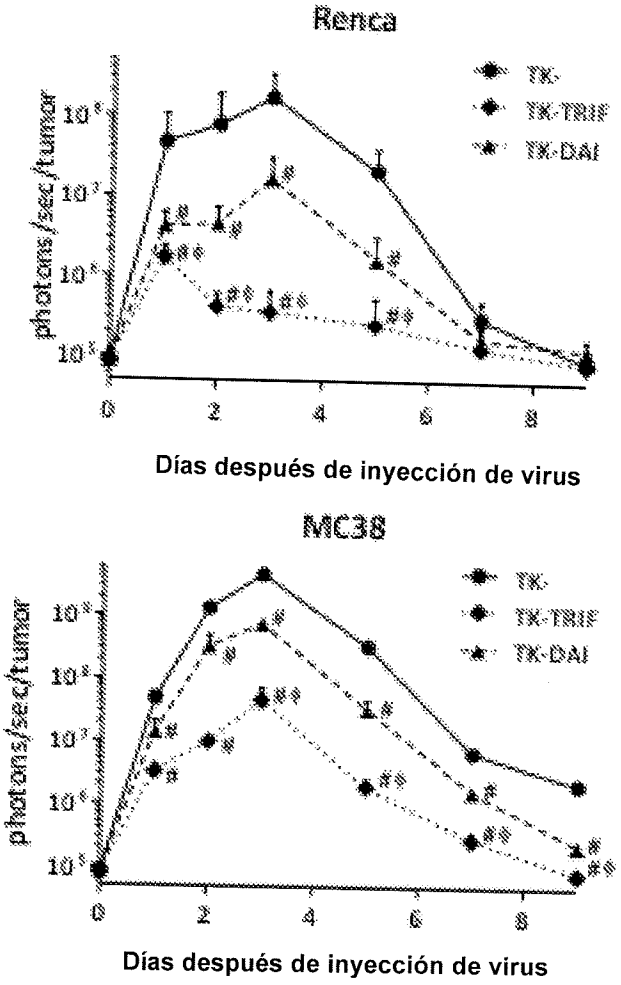

Renca
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
photons/sec/tumor
Días después de inyección de virus
MC38
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
photons/sec/tumor
Días después de inyección de virus

FIGURA 8C

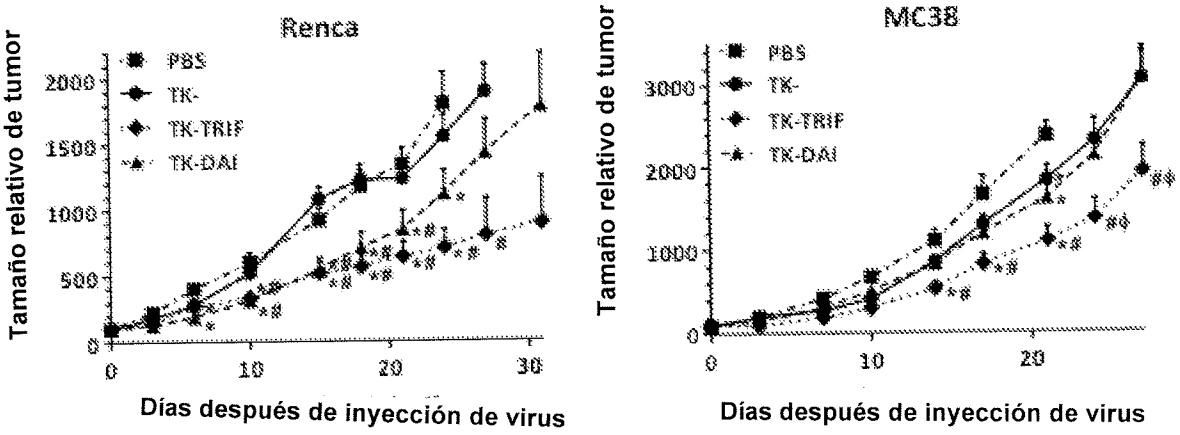
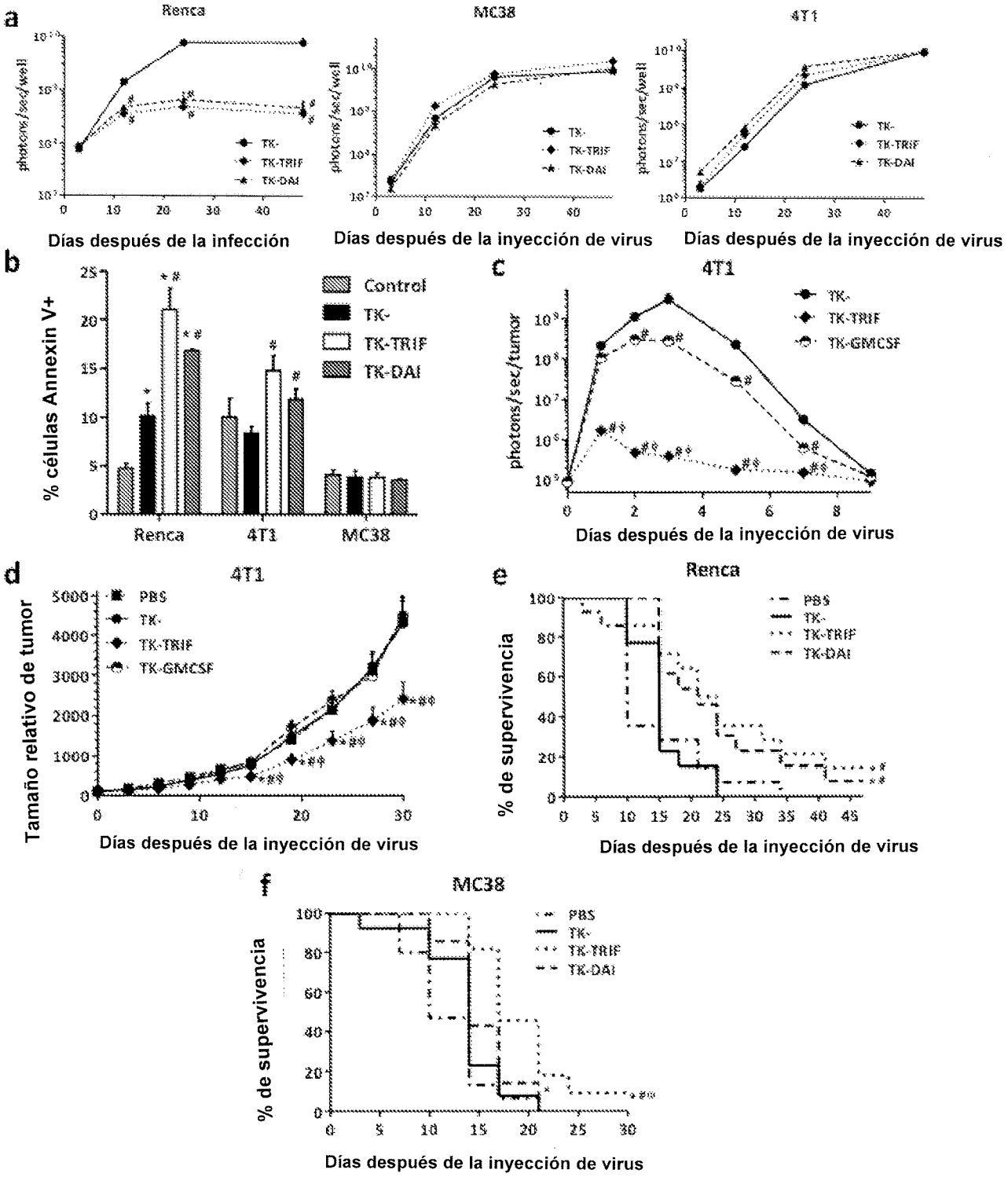
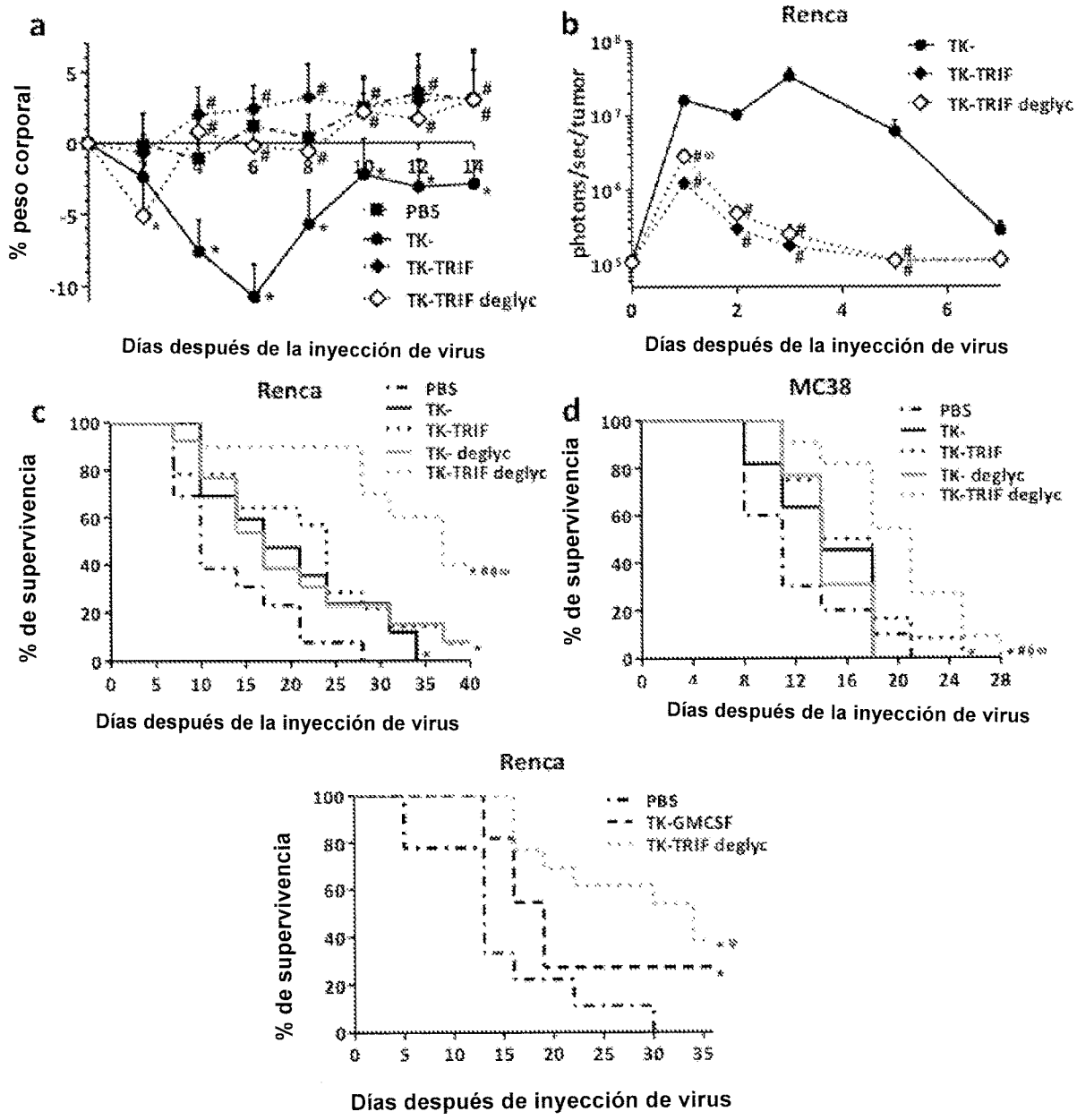

Renca
PBS
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
Tamaño relativo de tumor
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
Días después de inyección de virus
MC38
PBS
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
Tamaño relativo de tumor
3000
2000
1000
0
0
10
20
Días después de inyección de virus

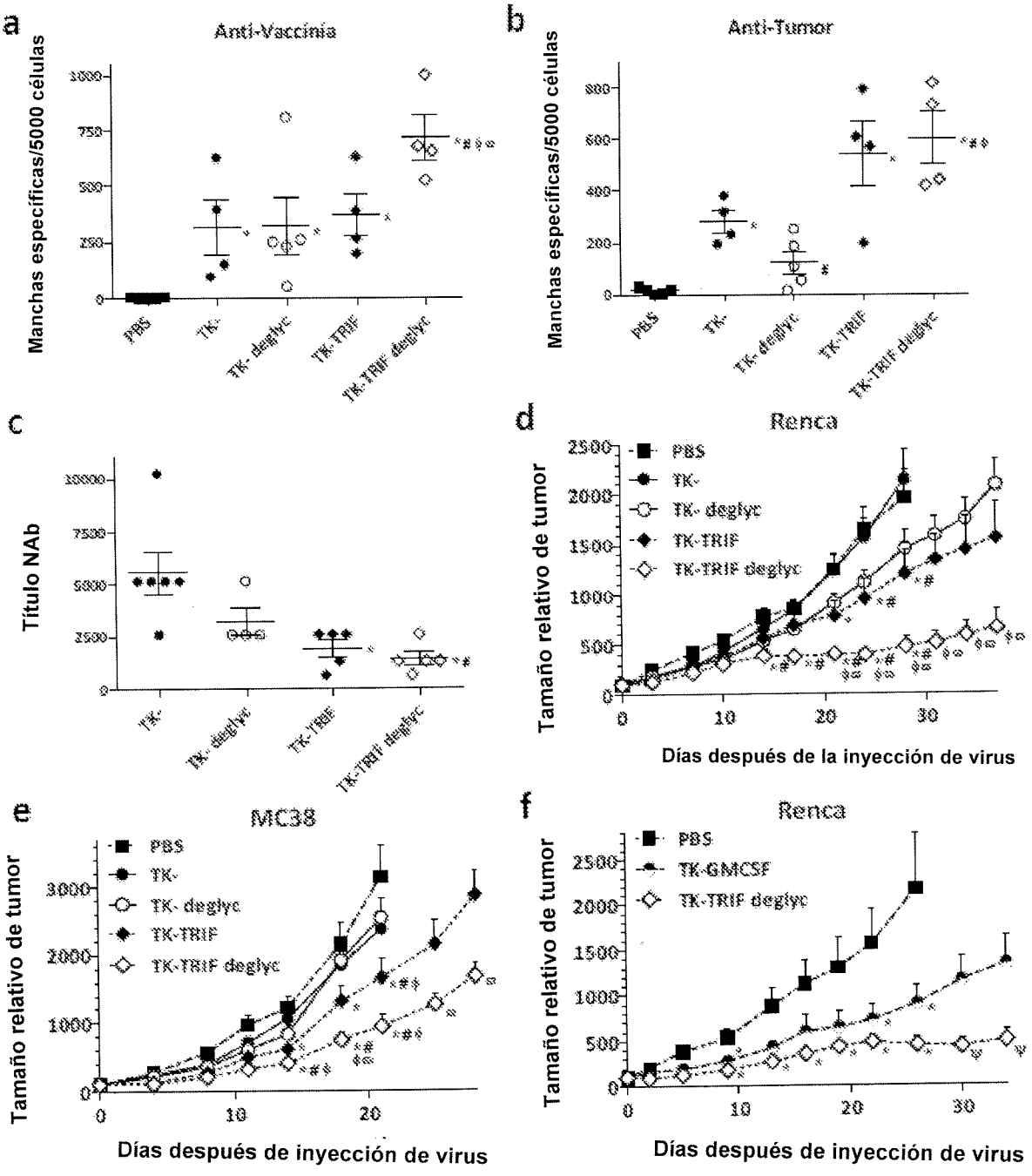
FIGURA 8D


a
Renca
MC38
4T1
photons/sec/well
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
Días después de la infección
Días después de la inyección de virus
Días después de la inyección de virus
b
% células Annexin V+
Control
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
Renca
4T1
MC38
c
4T1
photons/sec/tumor
TK-
TK-TRIF
TK-GMCSF
Días después de la inyección de virus
d
4T1
Tamaño relativo de tumor
PBS
TK-
TK-TRIF
TK-GMCSF
Días después de la inyección de virus
e
Renca
% de supervivencia
PBS
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
Días después de la inyección de virus
f
MC38
% de supervivencia
PBS
TK-
TK-TRIF
TK-DAI
Días después de la inyección de virus

FIGURAS 9A-F



FIGURAS 10A-E



FIGURAS 11A-F

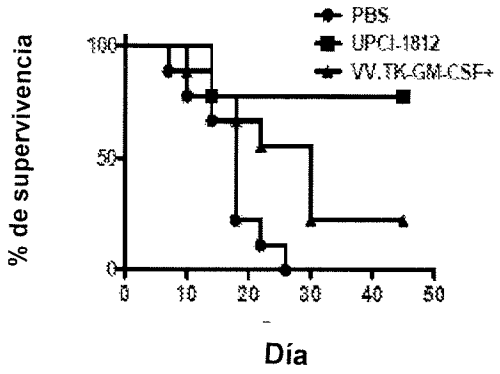


FIGURA 12A

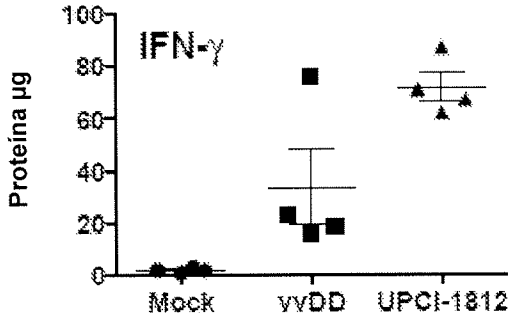


FIGURA 12B

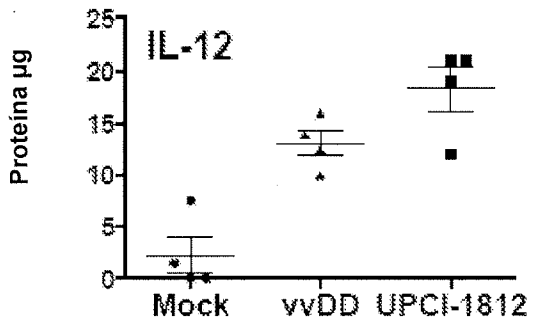


FIGURA 12C

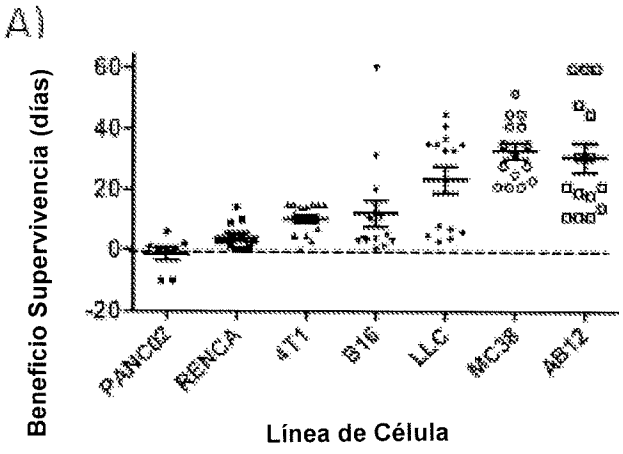

A)
Beneficio Supervivencia (días)
60
40
20
0
-20
PANC02
RENCA
4T1
B16
LLC
MC38
AB12
Línea de Célula

FIGURA 13A

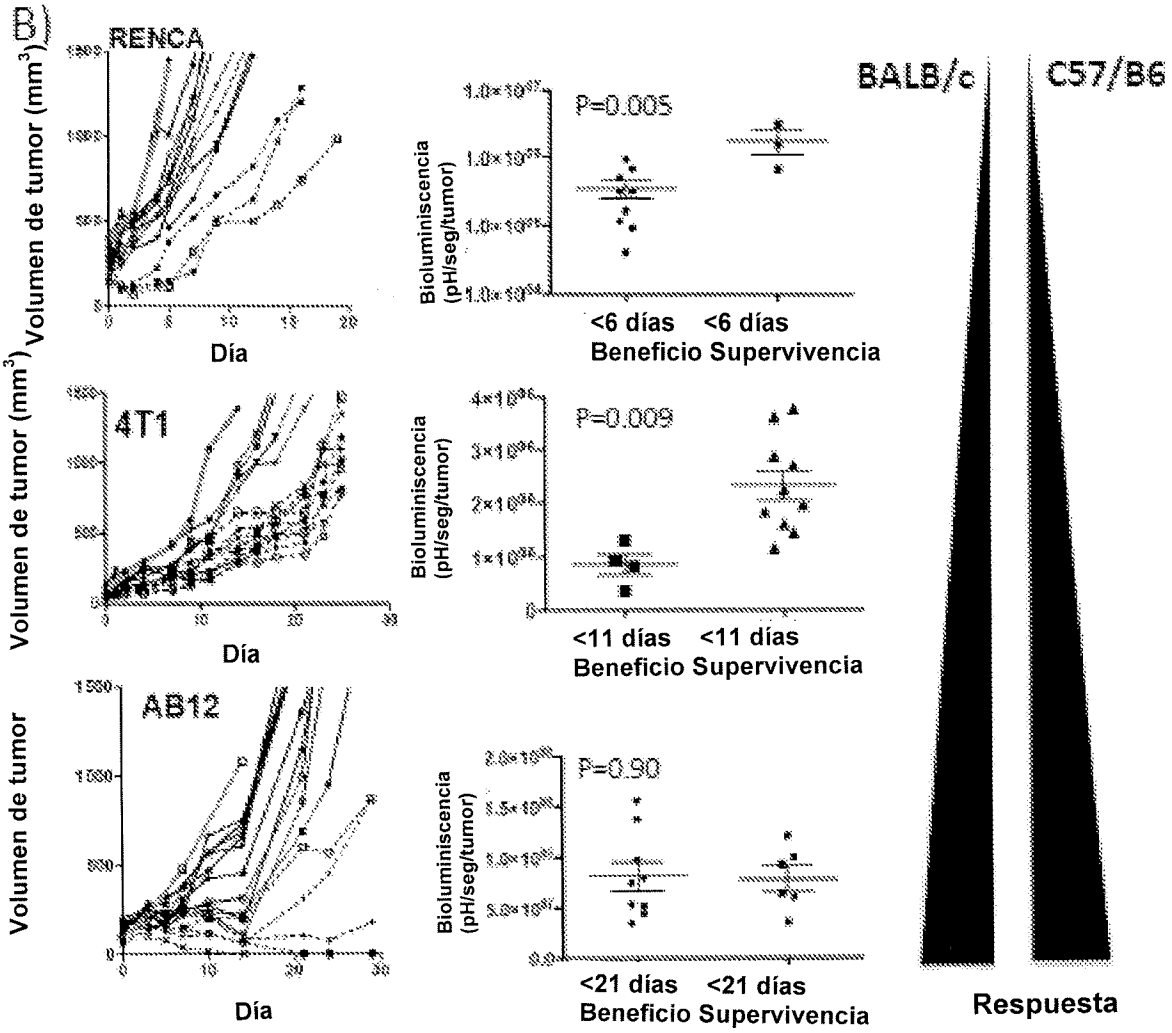

B)
RENCA
Volumen de tumor (mm3)
Día
4T1
Volumen de tumor (mm3)
Día
AB12
Volumen de tumor
Día
Bioluminiscencia (pH/seg/tumor)
P=0.005
<6 días
<6 días
Beneficio Supervivencia
Bioluminiscencia (pH/seg/tumor)
P=0.009
<11 días
<11 días
Beneficio Supervivencia
Bioluminiscencia (pH/seg/tumor)
P=0.90
<21 días
<21 días
Beneficio Supervivencia
BALB/c
C57/B6
Respuesta

FIGURA 13B

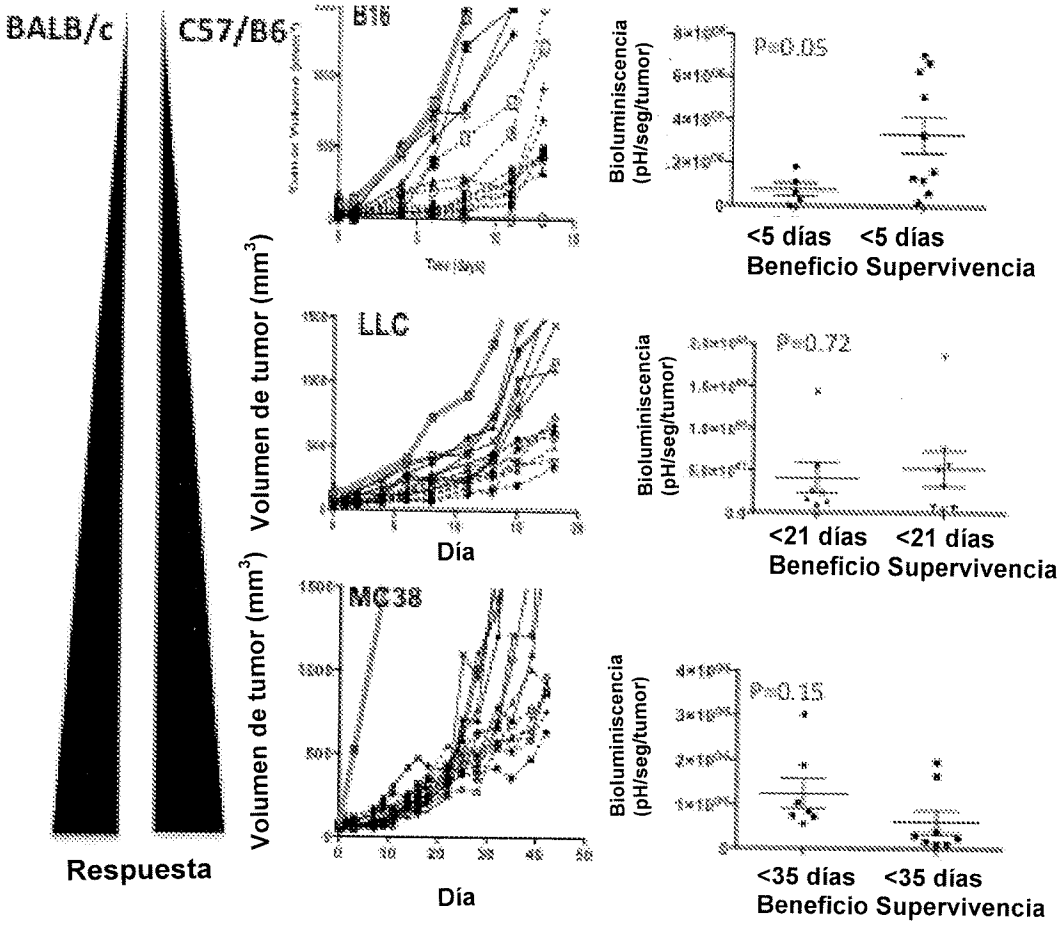


FIGURA 13B (Continuación)

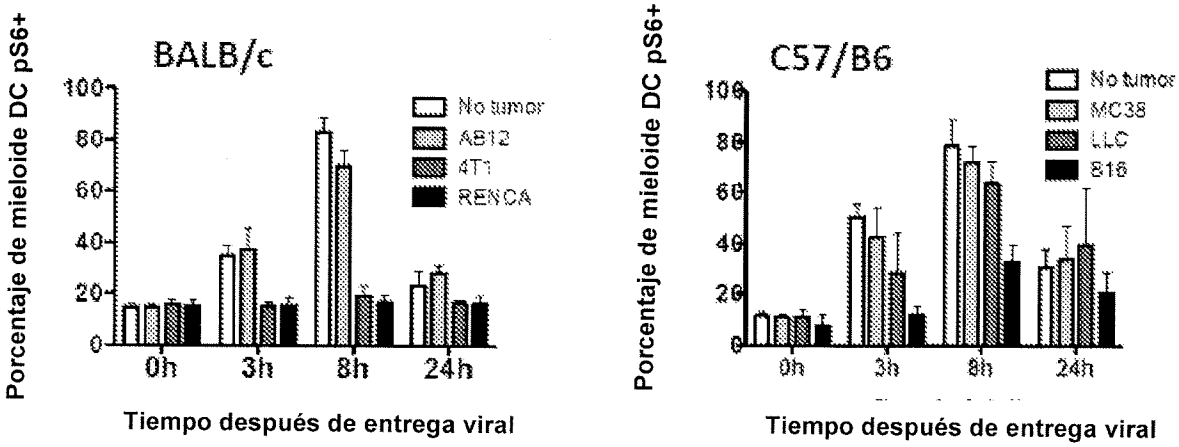
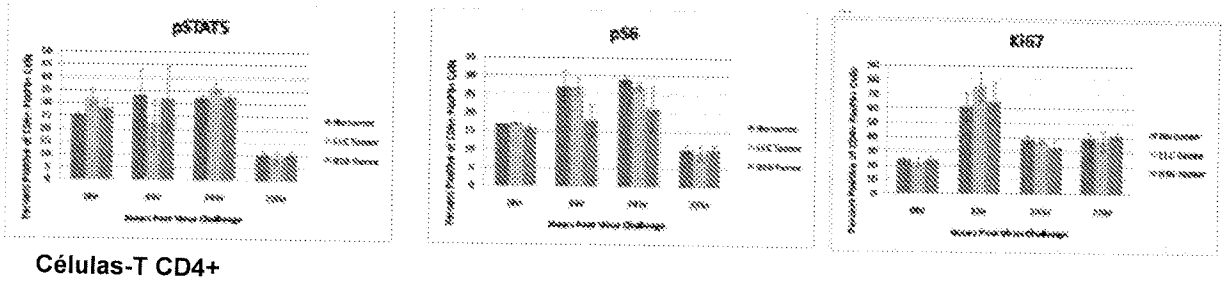
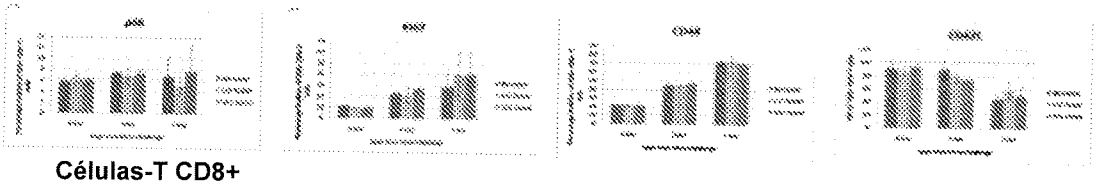

BALB/c
Porcentaje de mieloide DC pS6+
100
80
60
40
20
0
0h
3h
8h
24h
No tumor
AB12
4T1
RENCA
Tiempo después de entrega viral
C57/B6
Porcentaje de mieloide DC pS6+
No tumor
MC38
LLC
B16
Tiempo después de entrega viral

FIGURA 13C

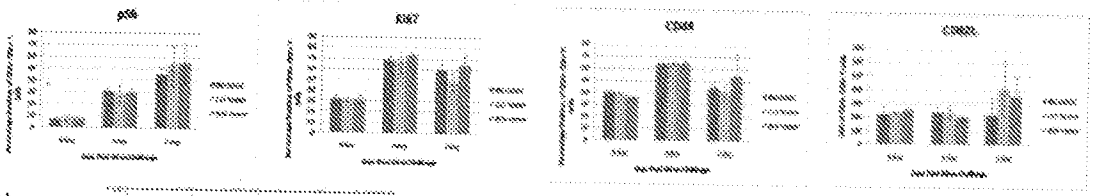
A) Células-T regulatorias



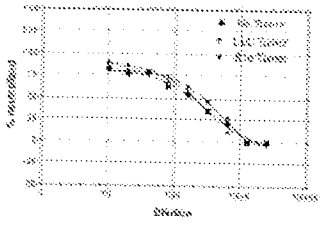
Células-T CD4+



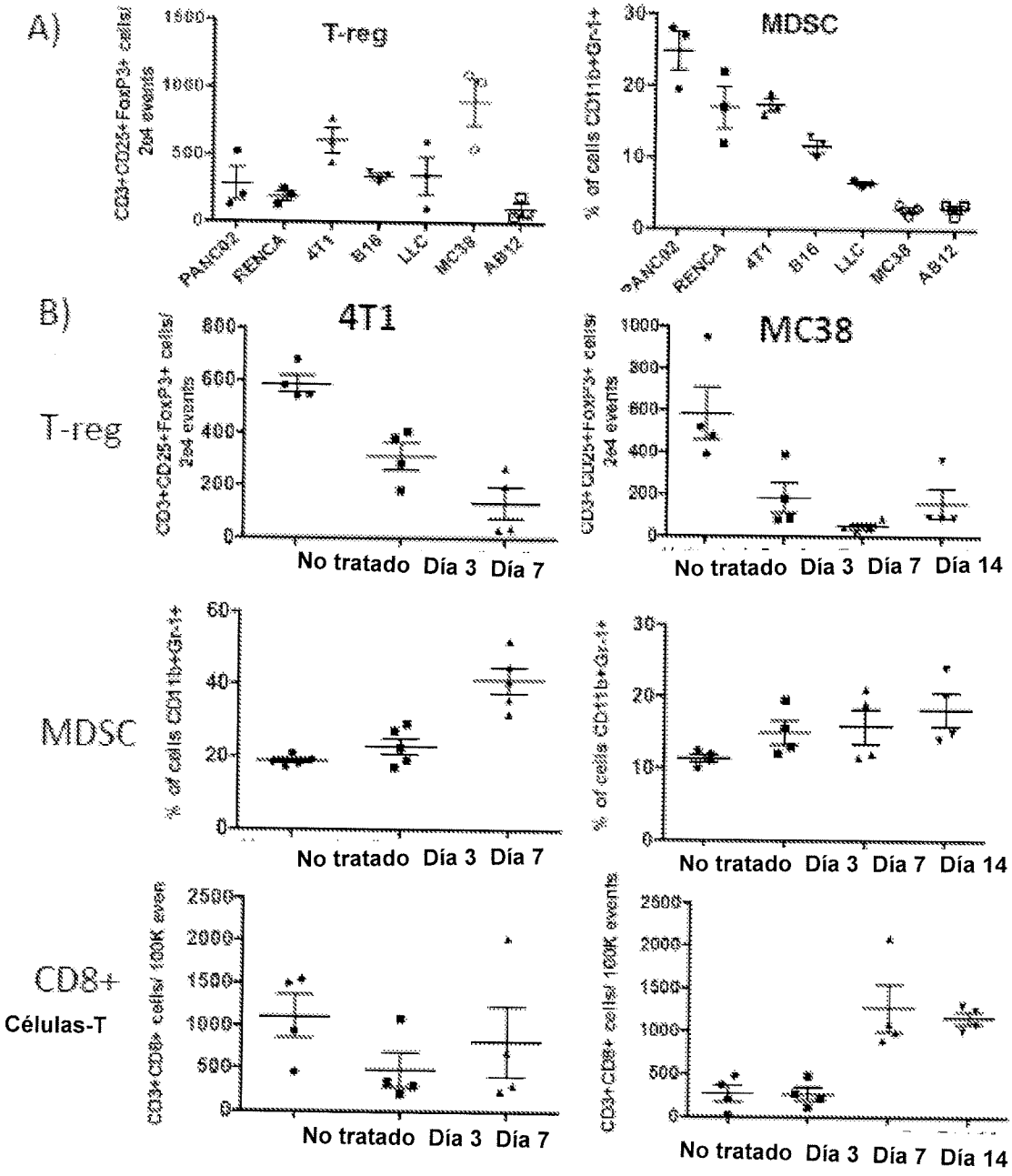
Células-T CD8+



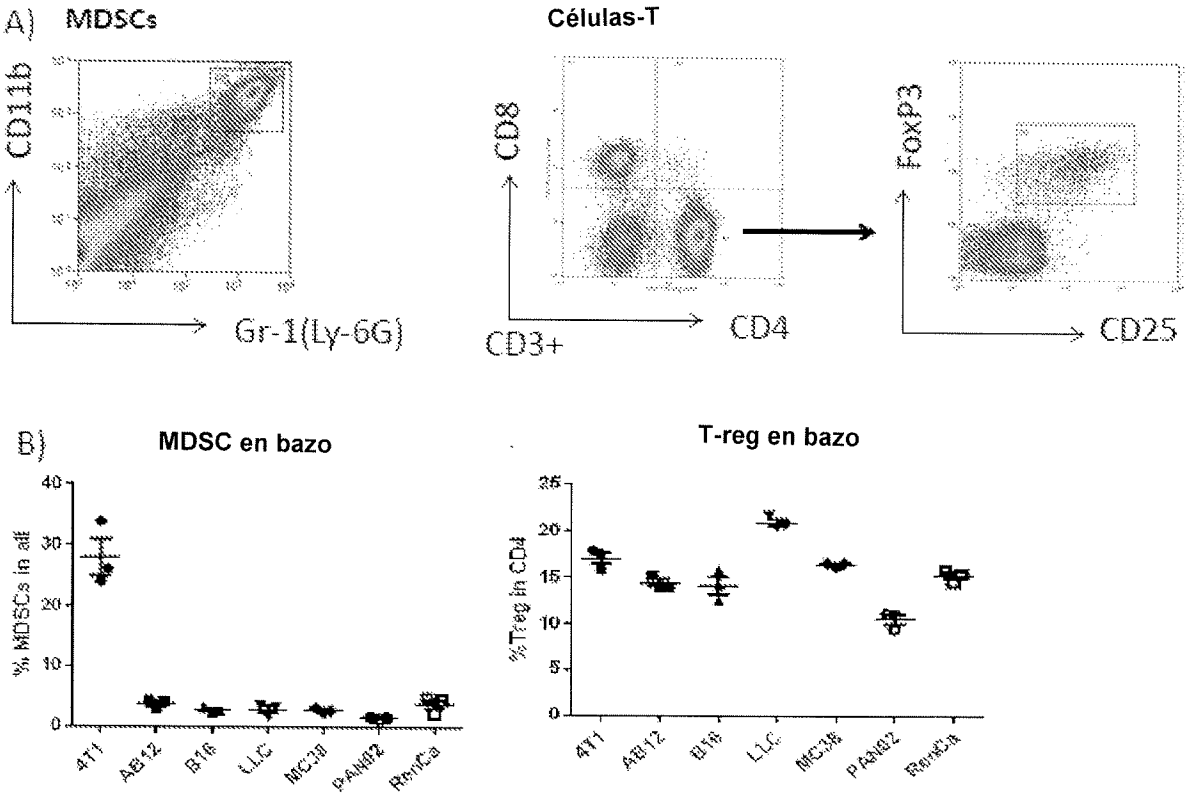
B)



Células dendríticas mieloides (mDC)
Fueron cerradas por (CD11c+, CD11b+, B220-, CD8a-)



FIGURAS 15A-B



FIGURAS 16A-B

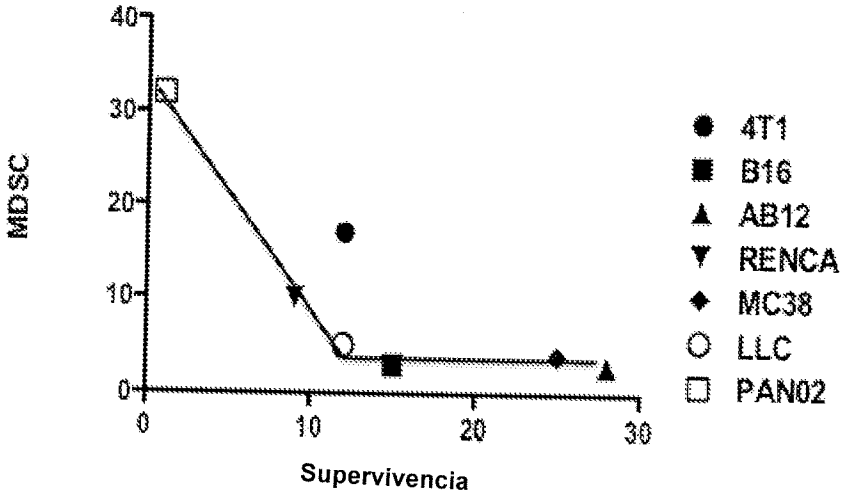


FIGURA 17A

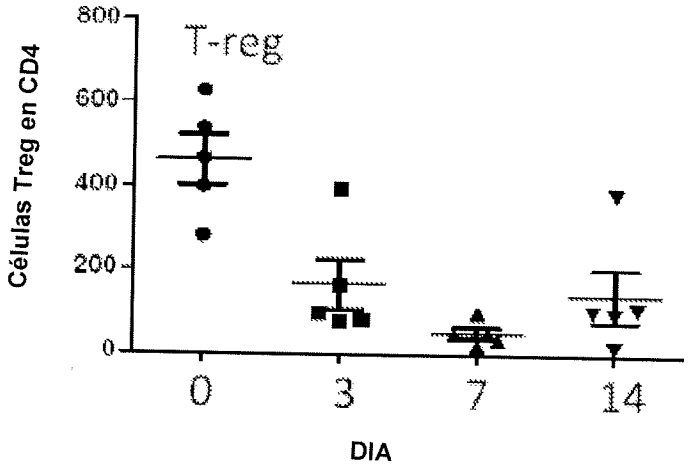


FIGURA 17B

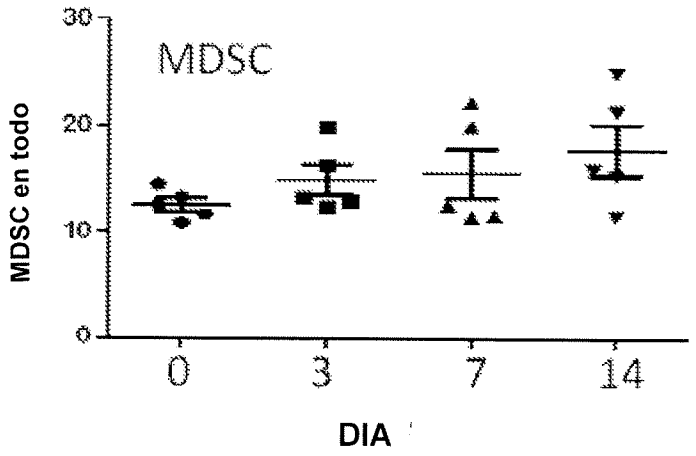
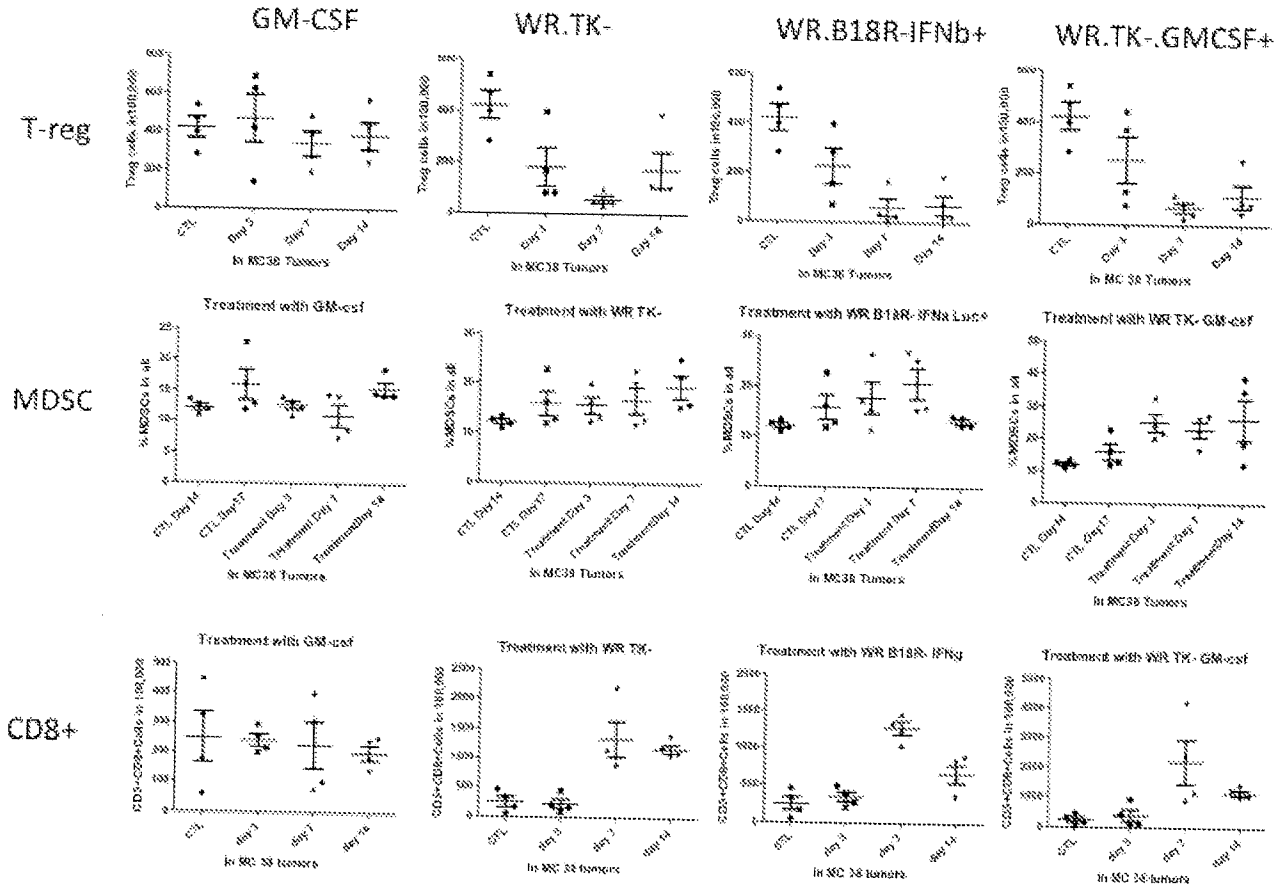
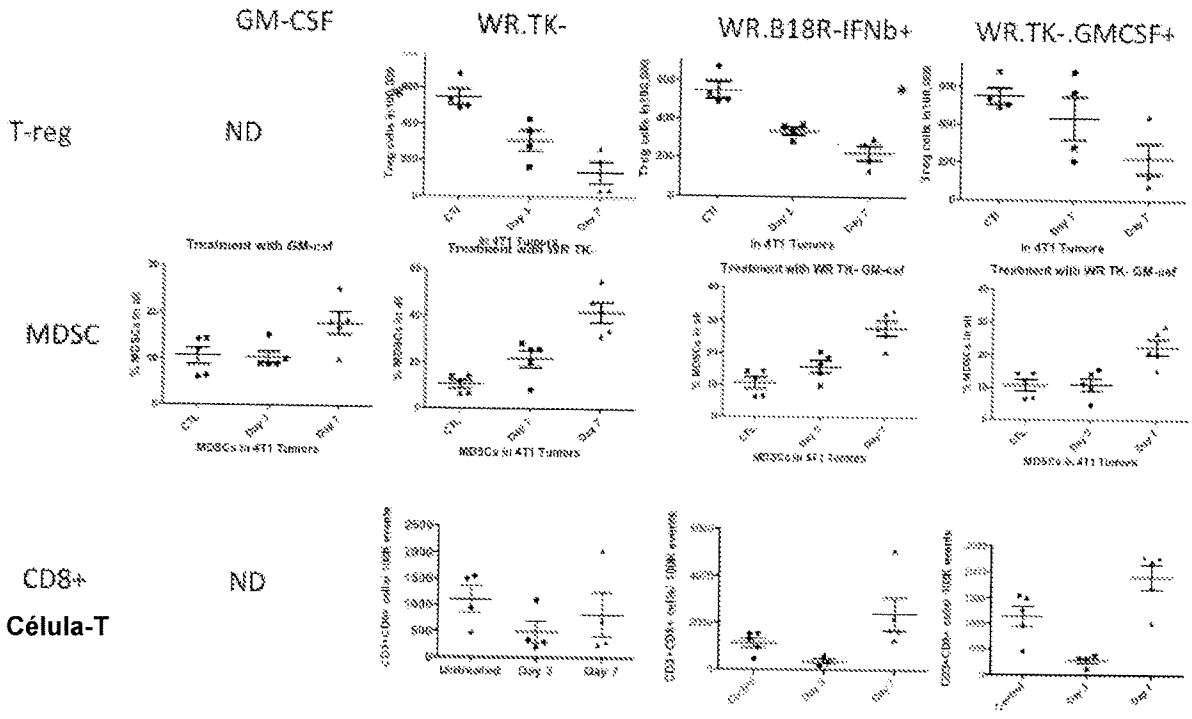


FIGURA 17C

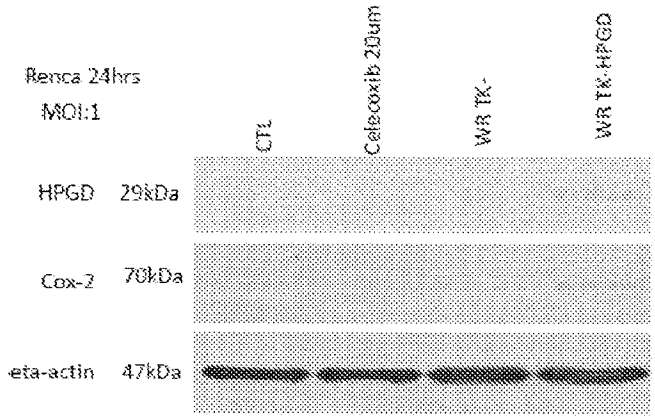


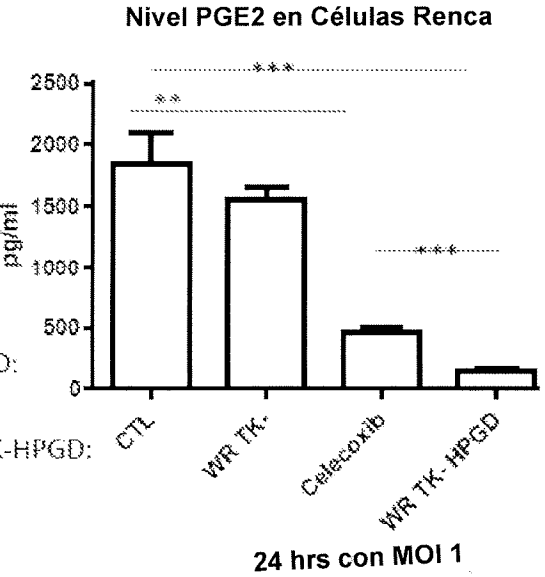
Tumores MC38



Tumor 4T1

FIGURA 19





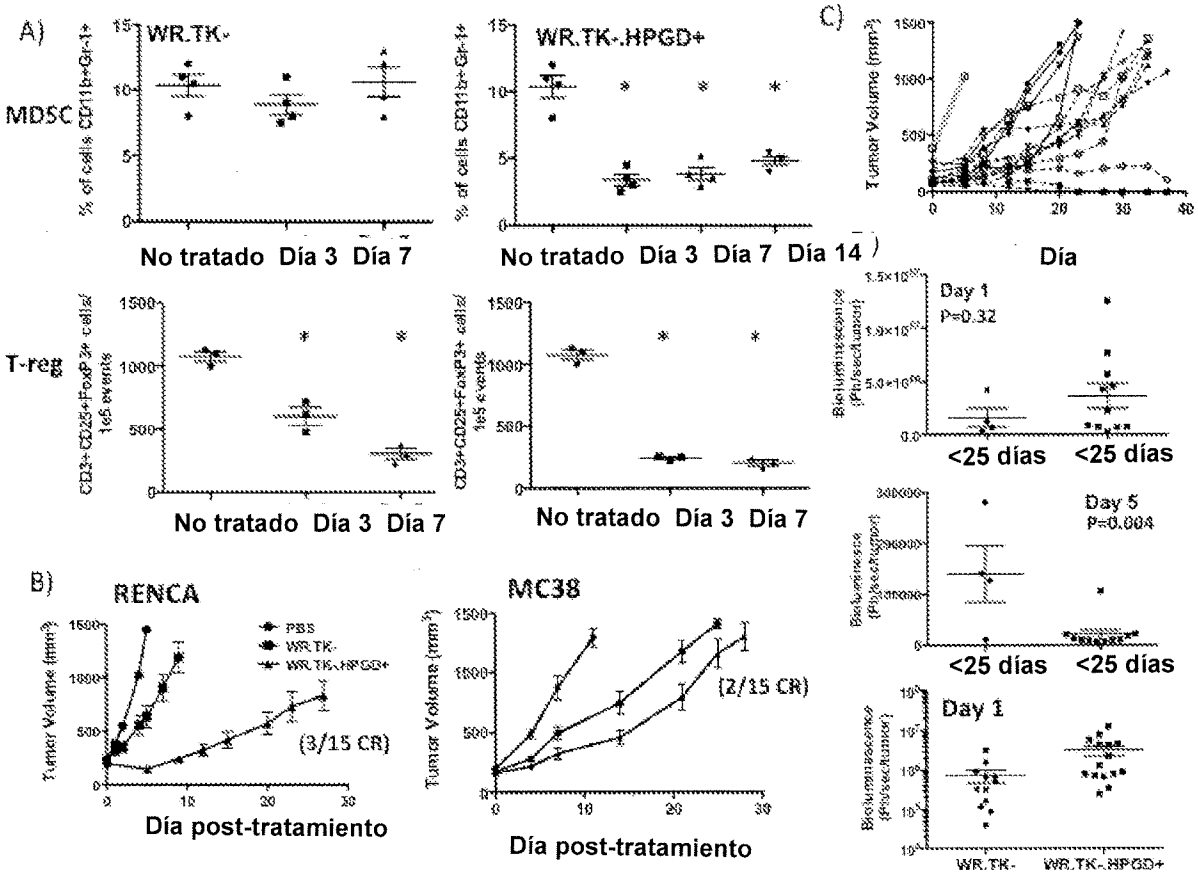
Celecoxib:20um
Tratar con 20 um
AA (ácido araquidóico)
4 horas antes para cultivar
Muestras

CTL vs Celecoxib:
P=0.0017 **

CTL vs WR TK-HPGD:
P=0.0005 ***

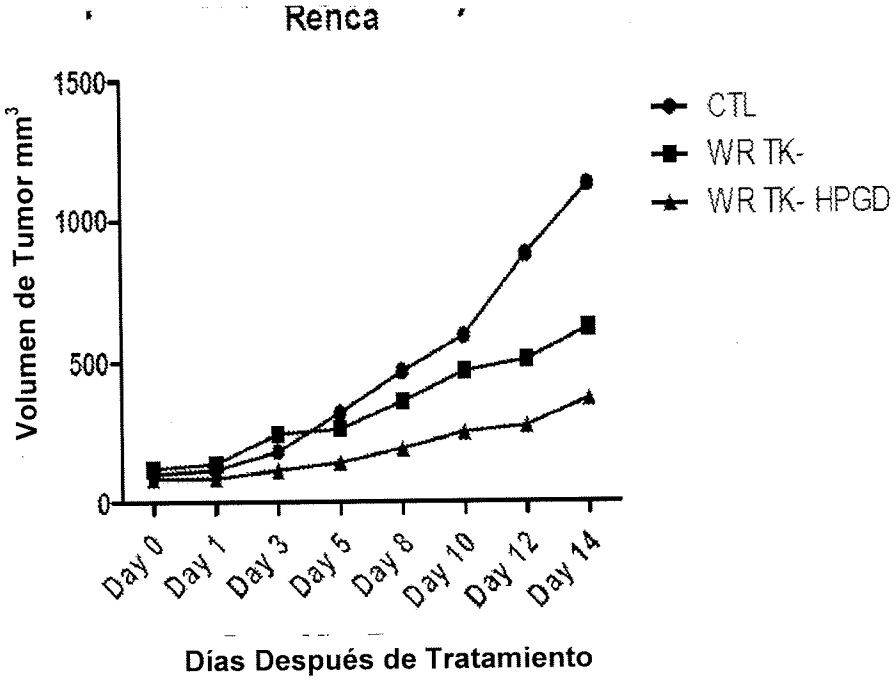
Celecoxib vs WR TK-HPGD:
P=0.0002 ***

FIGURA 20



FIGURAS 21A-D

Expresión HPGD aumenta
Actividad terapéutica de virus vaccinia



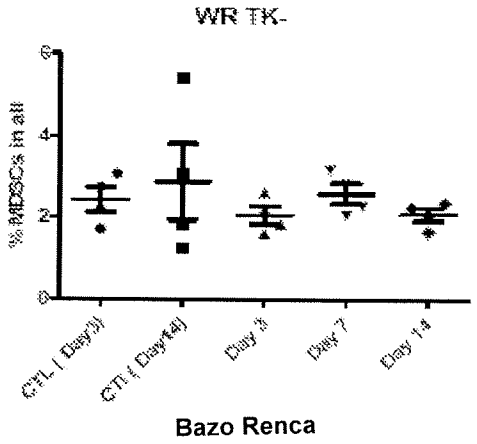


FIGURA 23A

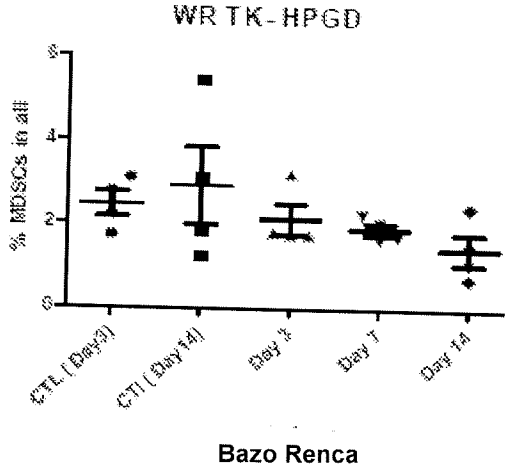


FIGURA 23B

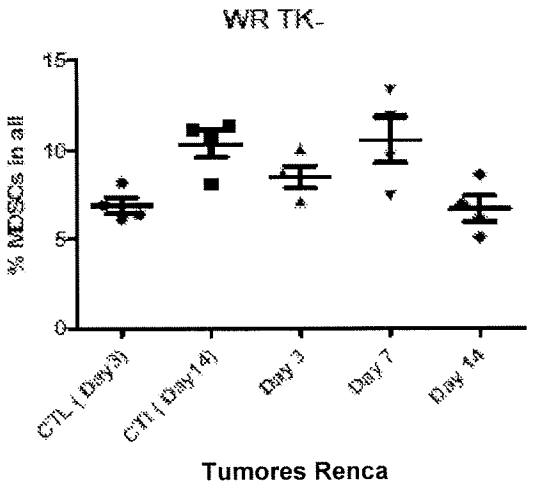
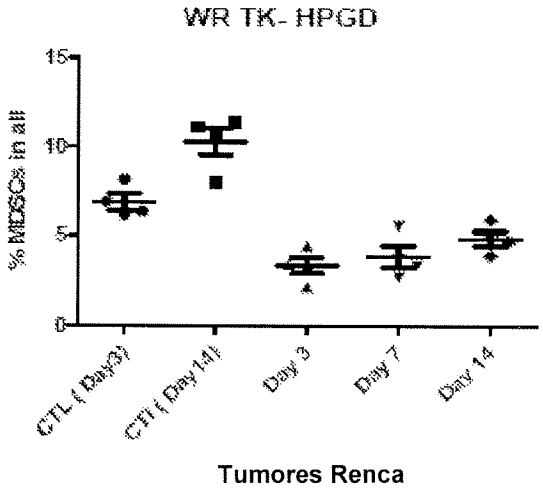
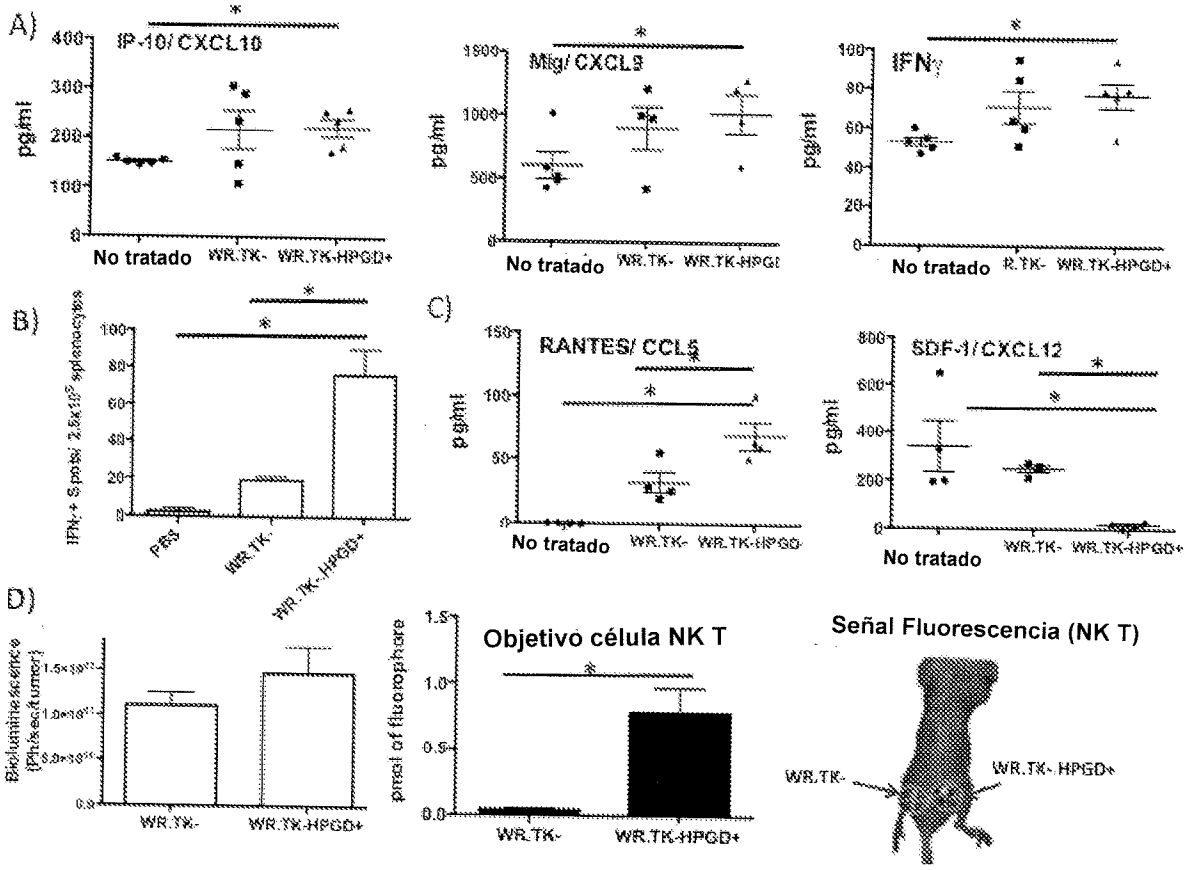
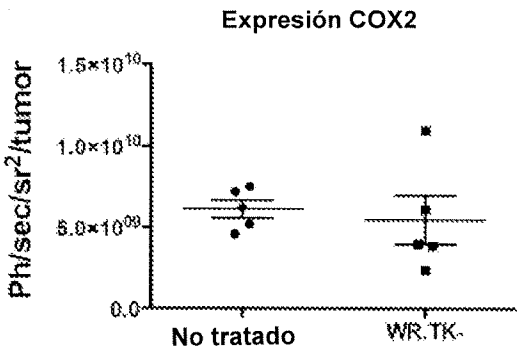

WR TK-
% MDSCs in all
15
10
5
0
CTL (Day3)
CTL (Day14)
Day 3
Day 7
Day 14
Tumores Renca

FIGURA 23C


WR TK- HPGD
% MDSCs in all
15
10
5
0
CTL (Day3)
CTL (Day14)
Day 3
Day 7
Day 14
Tumores Renca



FIGURAS 24A-D


Expresión COX2
Ph/sec/sr²/tumor
1.5×10¹⁰
1.0×10¹⁰
5.0×10⁰⁹
0.0
No tratado
WR.TK-

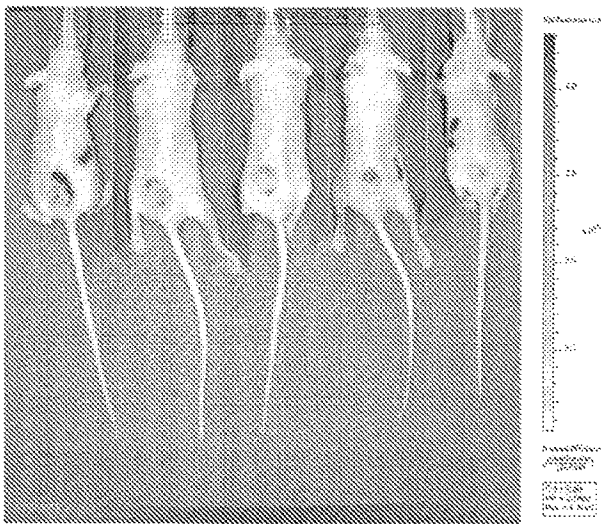
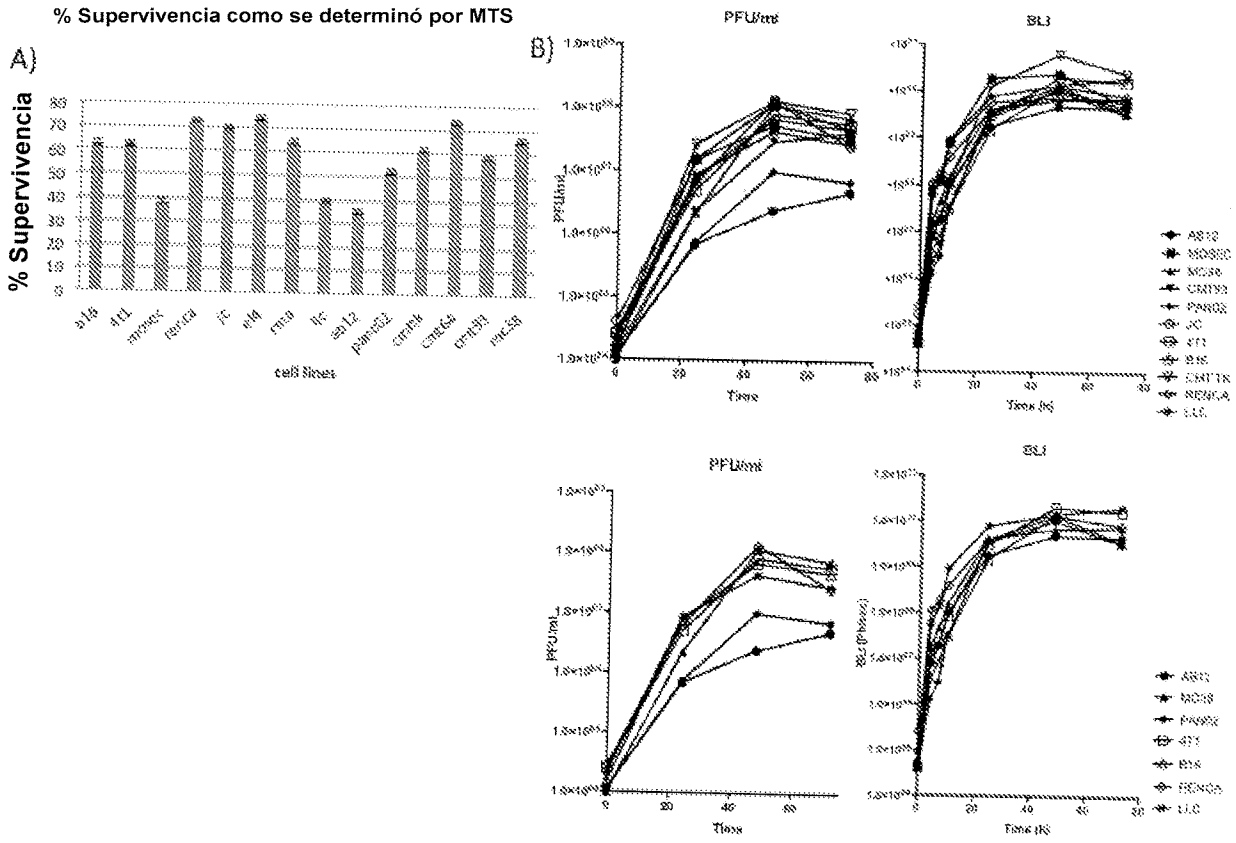


FIGURA 25



FIGURAS 26A-B

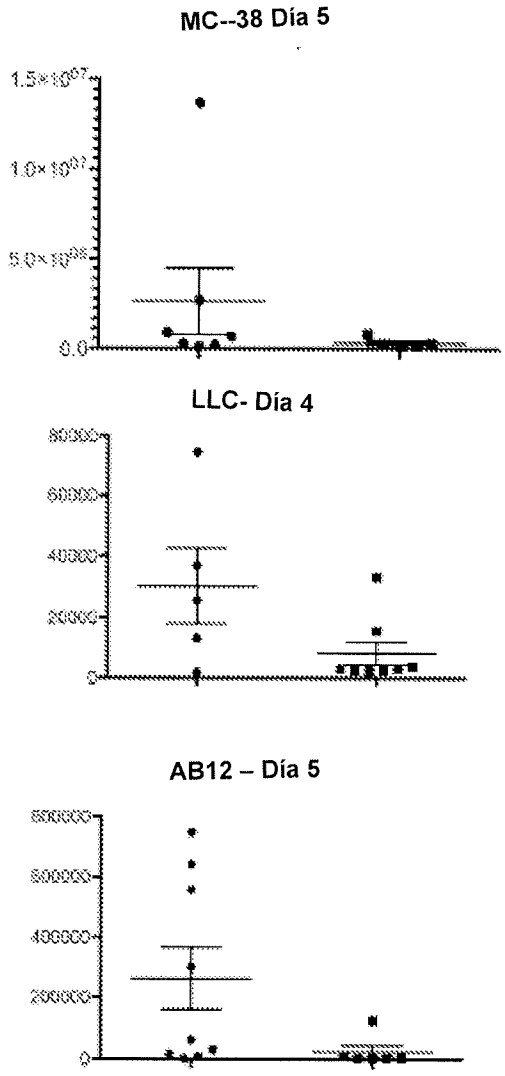


FIGURA 27

Adición de expresión HPGD a nuestro Virus UPCI-1812 aumenta adicionalmente Actividad terapéutica

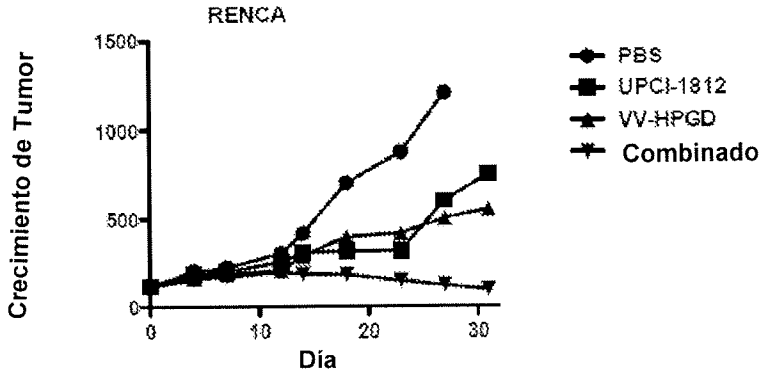


FIGURA 28

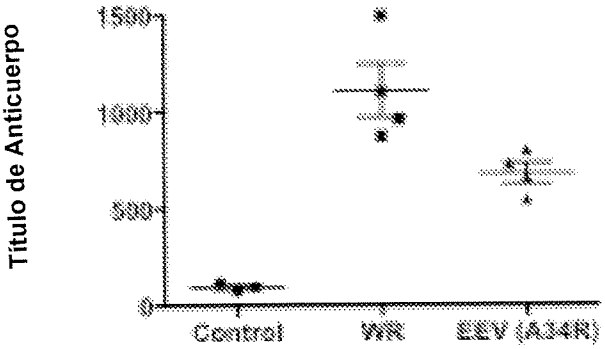


FIGURA 29

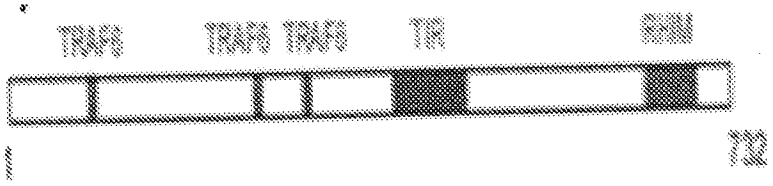


FIGURA 30

REIVINDICACIONES

1. Un virus de vaccinia oncolítica que comprende dos o más de las siguientes modificaciones

(i) una mutación de columna viral;

(ii) una modificación de glicosilación viral;

(iii) una modificación que promueve la respuesta de célula T;

(iv) una modificación de inhibe la inmunosupresión; y/o

(v) una modificación que mejora la actividad y esparcimiento de virus.

2. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende una modificación de glicosilación viral y una o más de las siguientes modificaciones:

(i) una mutación de columna viral;

(ii) una modificación que promueve la respuesta de célula T;

(iii) una modificación que inhibe la inmunosupresión; y/o

(iv) una modificación que mejora el esparcimiento y actividad de virus.

3. Un virus de vaccinia oncolítico que es tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación antes (por ejemplo sialilación) de la administración a un anfitrión o que

de otra manera tiene glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado.

4. Un virus de vaccinia oncolítico el cual es tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a virus no modificado y comprende una o más de las siguientes modificaciones:

(i) una mutación de columna viral;

(ii) una modificación que promueve la respuesta de célula T;

(iii) una modificación que inhibe la inmunosupresión; y/o

(iv) una modificación que mejora el esparcimiento y actividad de virus.

5. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2 o 4, caracterizado porque la mutación de columna viral es una supresión o una supresión funcional de proteína aglutinante-interleucina 18.

6. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2 o 4, caracterizado porque la

mutación de columna viral es una supresión B8R, una supresión B18R, una supresión A35R o una combinación de los mismos.

7. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2, 4, 5, o 6, caracterizado porque la modificación que promueve la respuesta de célula T es la incorporación de un ácido nucléico codificando un adaptador conteniendo-dominio Toll/IL-IR induciendo interferón beta (TRIF) proteína o un dominio funcional de la misma.

8. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2, 4, 5, o 6, caracterizado porque la modificación que promueve la respuesta de célula T es la incorporación de un ácido nucléico codificando un factor estimulando colonia de macrófago granulocito.

9. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2, 4, 5, 6, 7 u 8 caracterizado porque la modificación que inhibe la inmunosupresión es la incorporación de un ácido nucléico codificando una prostaglandina E2 antagonista.

10. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en la cláusula 9, caracterizado porque la prostaglandina E2 antagonista es 15-PGDH.

11. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en las cláusulas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, caracterizado porque la modificación que mejora es esparcimiento y actividad viral es una modificación que aumenta la cantidad de envoltura extracelular desde el virus producido.

12. El virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en la cláusula 11, caracterizado porque la modificación es una o más de las siguientes mutaciones: A34R Lysl51 a Glu; supresión completa o parcial de B5R; mutación/supresión de A36R y/o mutación/supresión de A56R.

13. Un virus de vaccinia oncolítico el cual es tratado con un agente que reduce la cantidad de glicosilación (por ejemplo sialilación) antes de la administración a un anfitrión o que de otra manera tiene glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a virus no modificado, comprendiendo, un ácido nucléico codificando TRIF o un dominio funcional del mismo y/o un ácido nucléico codificando un antagonista PGE2 antagonista.

14. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; y/o

(iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo;

15. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado; y/o

(iii) un ácido nucléico codificando 15-PGDH, o un domino funcional del mismo;

16. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende:

(i) una supresión TK,

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo; y/o

(iv) un ácido nucléico codificando 25-PGDH, o un dominio funcional del mismo.

17. Un virus de vaccinia oncolítica que comprende:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo;

(iv) un ácido nucléico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo; y/o

(v) una suppression C12L.

18. Un virus de vaccinia oncolítico que comprende:

(i) una supresión TK;

(ii) una envoltura con glicosilación reducida (por ejemplo sialilación reducida) en relación a un virus no modificado;

(iii) un ácido nucléico codificando TRIF, o un dominio funcional del mismo;

(iv) un ácido nucléico codificando 15-PGDH, o un dominio funcional del mismo;

(v) una suppression C12L; y/o

(vi) una suppression B5R.

19. Un método para reducir el crecimiento de célula de cáncer que comprende administrar a la célula de cáncer, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia oncolítico de cualquiera de las cláusulas 1-18.

20. Un método para reducir el crecimiento de un tumor que comprende administrar al tumor, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia oncolítico de cualquiera de las cláusulas 1-18.

21. Un método para tratar a un sujeto teniendo cáncer que comprende administrar al sujeto, una cantidad efectiva de un virus de vaccinia oncolítico de cualquiera de las cláusulas 1-18.

22. Un método para producir un efecto anti-cáncer en un sujeto que comprende administrar, al sujeto, una cantidad efectiva del virus de vaccinia oncolítico de una cualquiera de las cláusulas 1-18.

23. El método tal y como se reivindica en las cláusulas 19, 20, 21 o 22 que además comprende administrar uno o más agentes seleccionados del grupo que consiste de un agente anti cáncer, un agente inmunomodulatorio, y una combinación de los mismos.

24. Un virus de vaccinia oncolítico tal y como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-18 anteriores, para usarse en el tratamiento de cáncer en un sujeto.