



**Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH –
Państwowy Instytut Badawczy**

AUTOREFERAT

***„Zastosowanie adenowirusów onkolitycznych w terapii
przeciwnowotworowej”***

dr Łukasz Kuryk, MBA

Warszawa 2023

SPIS TREŚCI

1. DANE OSOBOWE.....	3
2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE – Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.	3
3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.	4
4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.).....	4
A. TYTUŁ CYKLU POWIĄZANYCH TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH.	5
B. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU POWIĄZANYCH TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH.	5
C. WPROWADZENIE.	6
D. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO PRAC NAUKOWYCH I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA.....	16
1. <i>Prace dotyczące realizacji osiągnięcia pierwszego: Ocena efektywności terapii przeciwnowotworowej z użyciem adenowirusów onkolitycznych – badania przedkliniczne in vitro oraz in vivo (Publikacje: A1, A5, A8, A9 - prace oryginalne; Publikacje: A6, A7 – prace przeglądowe).....</i>	16
2. <i>Prace dotyczące realizacji osiągnięcia drugiego: Ocena bezpieczeństwa stosowania adenowirusów onkolitycznych – badania przedkliniczne in vivo (Publikacje: A1, A2, A5, A9 - prace oryginalne).....</i>	31
3. <i>Prace dotyczące realizacji osiągnięcia trzeciego: Opracowanie produkcji oraz przeprowadzenie charakterystyki adenowirusów onkolitycznych (Publikacje: A3, A4 - prace oryginalne).....</i>	35
E. PODSUMOWANIE.	39
F. NAJWIĘKSZE OSIĄGNIĘCIA W RAMACH CYKLU POWIĄZANYCH TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH ZNACZNY WKŁAD W ROZWÓJ DYSCYPLINY NAUKI O ZDROWIU.....	40
5. WYKAZ POZOSTAŁYCH, OPUBLIKOWANYCH ARTYKUŁÓW W CZASOPISMACH NAUKOWYCH – POZOSTAŁE ISTOTNE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE STANOWIĄCE ZNACZĄCY WKŁAD W ROZWÓJ DYSCYPLINY NAUKI O ZDROWIU (SPOZA CYKLU PRAC, O KTÓRYM MOWA W PUNKCIE 4).	41
A. OMÓWIENIE WYBRANYCH ISTOTNYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH ZNACZĄCY WKŁAD W ROZWÓJ DYSCYPLINY NAUKI O ZDROWIU (SPOZA CYKLU PRAC, O KTÓRYM MOWA W PUNKCIE 4) ZGODNIE Z WYMAGANIAMI USTAWY.....	45
B. PODSUMOWANIE NAJWIĘKSZYCH OSIĄGNIĘĆ STANOWIĄCYCH ZNACZNY WKŁAD W ROZWÓJ DYSCYPLINY NAUKI O ZDROWIU (SPOZA CYKLU PRAC, O KTÓRYM MOWA W PUNKCIE 4).....	51
6. WYKAZ OPUBLIKOWANYCH I RECENZOWANYCH STRESZCZEŃ KONFERENCYJNYCH W CZASOPISMACH NAUKOWYCH – POZOSTAŁE ISTOTNE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE STANOWIĄCE ZNACZNY WKŁAD W ROZWÓJ DYSCYPLINY NAUKI O ZDROWIU.	53
7. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.....	55
8. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ.....	62
9. NAGRODY, WYRÓŻNIENIA, STYPENDIA, GRANTY BADAWCZE, HABILITACJA ZA GRANICĄ, PATENTY.	63

10. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO NA PODSTAWIE ANALIZY BIBLIOMETRYCZNEJ.....	65
LITERATURA	66

AUTOREFERAT

1. DANE OSOBOWE.

Łukasz Kuryk

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE – Z PODANIEM PODMIOTU NADAJĄCEGO STOPIEŃ, ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ.

- **Studia podyplomowe**, Niekomercyjne Badania Kliniczne – projektowanie, realizacja i zarządzanie, **Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu**, 2022
- **MBA**, MBA – Innovation and Data Analysis, **Instytut Podstaw Informatyki Polskiej Akademii Nauk (PAN)**, **Woodbury School of Business UVU (USA)**, 2020
Tytuł rozprawy podyplomowej: *Artificial intelligence in medicine*
- **PhD (Doktor Nauk)**, **University of Helsinki, Helsinki, Finlandia**, Faculty of Pharmacy, Industrial PhD (Biopharmaceutics), Doctoral Program in Biomedicine, Doctoral School of Health Sciences, 2016
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Strategies to enhance efficacy of oncolytic virotherapy*
- **Magister Ochrony Środowiska**, **Uniwersytet Śląski w Katowicach**, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katowice, 2011
Specjalność: *Fizykochemiczne metody ochrony środowiska*
- **Magister Biotechnologii**, **Uniwersytet Śląski w Katowicach**, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katowice, 2010
Specjalność: *Biotechnologia roślin i mikroorganizmów*
 - **University of the Balearic Islands (UIB), Palma de Mallorca, Hiszpania**, studia w ramach program Erasmus, luty-lipiec 2010 (6 miesięcy). Hodowle *in vitro*
 - **Biomedical Research Institute "Alberto Sols" CSIC-UAM, Madryt, Hiszpania**, Staż naukowy w ramach program Erasmus, lipiec-wrzesień 2010 (3 miesiące). Konstrukcja plazmidów, tworzenie bazy cDNA, transfekcja na

liniach nowotworowych, badanie ekspresji, hodowle *in vitro*, cytometria przepływowa, mikroskopia fluorescencyjna, Western blot

- **Licencjat Biotechnologii, Uniwersytet Śląski w Katowicach**, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katowice, 2008

3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH.

- **Valo Therapeutics**, R&D, Helsinki, Finlandia, 2022 – obecnie
 - VP Translational and Clinical Science
- **Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – PIB**, Zakład Wirusologii, Warszawa, 2016 - obecnie
 - Adiunkt (2021 – obecnie)
 - Biotechnolog (spec. inżynierijno-techniczny) (2016 – 2020)
- **Targovax**, R&D, Clinical Science, Helsinki, Finlandia, 2015 – 2022
 - Director, Clinical Science (2017 – 2022)
 - Senior Research Scientist (2016 – 2017)
 - Research Scientist (2015 – 2016)
- **Oncos Therapeutics**, R&D, Helsinki, Finlandia, 2012 – 2015
 - Research Scientist
- **Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego PZH – PIB**, Zakład Wirusologii, Warszawa, 2011 – 2015
 - Biotechnolog (pracownik inżynierijno-techniczny)

4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.).

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie z art. 219 ust. 1. pkt 2b ustawy:

**A. TYTUŁ CYKLU POWIĄZANYCH TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW
NAUKOWYCH.**

**“Zastosowanie adenowirusów onkolitycznych w terapii
przeciwnowotworowej”**

**B. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD CYKLU POWIĄZANYCH
TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH.**

Okres przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. **Kuryk, L.**; Haavisto, E.; Garofalo, M.; Capasso, C.; Hirvinen, M.; Pesonen, S.; Ranki, T.; Vassilev, L.; Cerullo, V. Synergistic anti-tumor efficacy of immunogenic adenovirus ONCOS-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) and standard of care chemotherapy in preclinical mesothelioma model. *International journal of cancer* **2016**, *139*, 1883-1893, doi:10.1002/ijc.30228. **IF₂₀₁₆=6,513, MEiN₂₀₁₆=40 [A1]**

Okres pomiędzy uzyskaniem stopnia doktora a przygotowaniem autoreferatu pracy habilitacyjnej

2. **Kuryk, L*.**; Vassilev, L.; Ranki, T.; Hemminki, A.; Karioja-Kallio, A.; Levalampi, O.; Vuolanto, A.; Cerullo, V.; Pesonen, S. Toxicological and bio-distribution profile of a GM-CSF-expressing, double-targeted, chimeric oncolytic adenovirus ONCOS-102 - Support for clinical studies on advanced cancer treatment. *PloS one* **2017**, *12*, e0182715, doi:10.1371/journal.pone.0182715. **IF₂₀₁₇=2,766, MEiN₂₀₁₇=40 [A2]**
3. **Kuryk, L*.**; Moller, A.W.; Jaderberg, M. Quantification and functional evaluation of CD40L production from the adenovirus vector ONCOS-401. *Cancer Gene Ther* **2019**, *26*, 26-31, doi:10.1038/s41417-018-0038-x. **IF₂₀₁₉=4,534, MEiN₂₀₁₉=100 [A3]**
4. **Kuryk, L*.**; Moller, A.W.; Vuolanto, A.; Pesonen, S.; Garofalo, M.; Cerullo, V.; Jaderberg, M. Optimization of Early Steps in Oncolytic Adenovirus ONCOS-401 Production in T-175 and HYPERFlasks. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20030621. **IF₂₀₁₉=4,556, MEiN₂₀₁₉=100 [A4]**
5. **Kuryk, L*.**; Moller, A.W.; Jaderberg, M. Combination of immunogenic oncolytic adenovirus ONCOS-102 with anti-PD-1 pembrolizumab exhibits synergistic antitumor effect in humanized A2058 melanoma huNOG mouse model. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, e1532763, doi:10.1080/2162402X.2018.1532763. **IF₂₀₁₉=5,869, MEiN₂₀₁₉=140 [A5]**
6. **Kuryk, L*.**; Bertinato, L.; Staniszevska, M.; Pancer, K.; Wieczorek, M.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; Garofalo, M. From Conventional Therapies to Immunotherapy: Melanoma Treatment in Review. *Cancers* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12103057. **IF₂₀₂₀=6,639, MEiN₂₀₂₀=140 [A6]**
7. **Kuryk, L*.**; Rodella, G.; Staniszevska, M.; Pancer, K.W.; Wieczorek, M.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; Garofalo, M. Novel Insights Into Mesothelioma Therapy: Emerging

8.	Avenues and Future Prospects. <i>Frontiers in oncology</i> 2022 , <i>12</i> , 916839, doi:10.3389/fonc.2022.916839. IF₂₀₂₂=4,7, MEiN₂₀₂₂=100 [A7] Garofalo, M.; Pancer, K.W.; Wieczorek, M.; Staniszevska, M.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; Kuryk, L* . From Immunosuppression to Immunomodulation - Turning Cold Tumours into Hot. <i>J Cancer</i> 2022 , <i>13</i> , 2884-2892, doi:10.7150/jca.71992. IF₂₀₂₂=3,9, MEiN₂₀₂₂=70 [A8]
9.	Kuryk, L* ; Møller, A.-S.W. Next generation of oncolytic viruses with the double transgenes PAD11 and TIMP-2 exhibit anti-tumor activity against melanoma in nude mouse and humanized NOG mouse models. <i>Molecular Therapy - Oncolytics</i> 2023 , doi:10.1016/j.omto.2023.01.002. IF₂₀₂₃=5,7 , MEiN₂₀₂₃=100 [A9]
	*Autor korespondencyjny w 8/9 publikacjach stanowiących cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych (7 publikacji oryginalnych (JCR), 2 publikacje przeglądowe (JCR)).
	Łączny współczynnik oddziaływania IF₂₀₁₆₋₂₀₂₃ 9 artykułów naukowych stanowiących cykl powiązanych tematycznie publikacji: 45,17 (średnia wartość IF przypadająca na jedną publikację: 5,01).
	Pierwszy autor w 8/9 publikacjach, ostatni autor w 1 artykule naukowym (w ramach cyklu)
	Łączny współczynnik oddziaływania IF₂₀₁₃₋₂₀₂₃ wszystkich 41 artykułów naukowych: 181,08 (średnia wartość IF przypadająca na jedną publikację: 4,41).

C. WPROWADZENIE.

Choroby nowotworowe są nadal główną przyczyną umieralności ludzi na całym świecie i w 2020 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) odnotowała ponad 10 milionów zgonów z tego powodu [1]. Każdego roku większość z nich jest spowodowana rakiem płuc, żołądka, wątroby, jelita grubego i piersi [1]. Globalne obciążenie nowotworami stale wzrasta z powodu starzenia się populacji i równocześnie szybkim wzrostem liczby ludności na świecie [2]. Obecnie, choroby nowotworowe stanowią duże wyzwanie dla zdrowia publicznego na całym świecie.

Pomimo znacznych postępów w konwencjonalnych metodach leczenia nowotworów poprzez chirurgię, chemioterapię, radioterapię, immunoterapię i ich kombinację, pozytywny wynik terapii nie zawsze zostaje osiągnięty w przypadku wielu rodzajów nowotworów, takich jak zaawansowany czerniak czy międzybłoniak. Ponadto, ze względu na powstawanie oporności i późniejszą utratę odpowiedzi na stosowane leki, która może wystąpić szybko podczas konwencjonalnych schematów leczenia, istnieje duże zapotrzebowanie na nowe leki przeciwnowotworowe, prezentujące inne mechanizmy działania, w tym pozbawione oporności krzyżowej na powszechnie stosowane terapie.

Chociaż w ciągu ostatnich kilku dekad opracowano wiele metod leczenia chorób nowotworowych, nadal brakuje skutecznych terapii w przypadku zaawansowanych

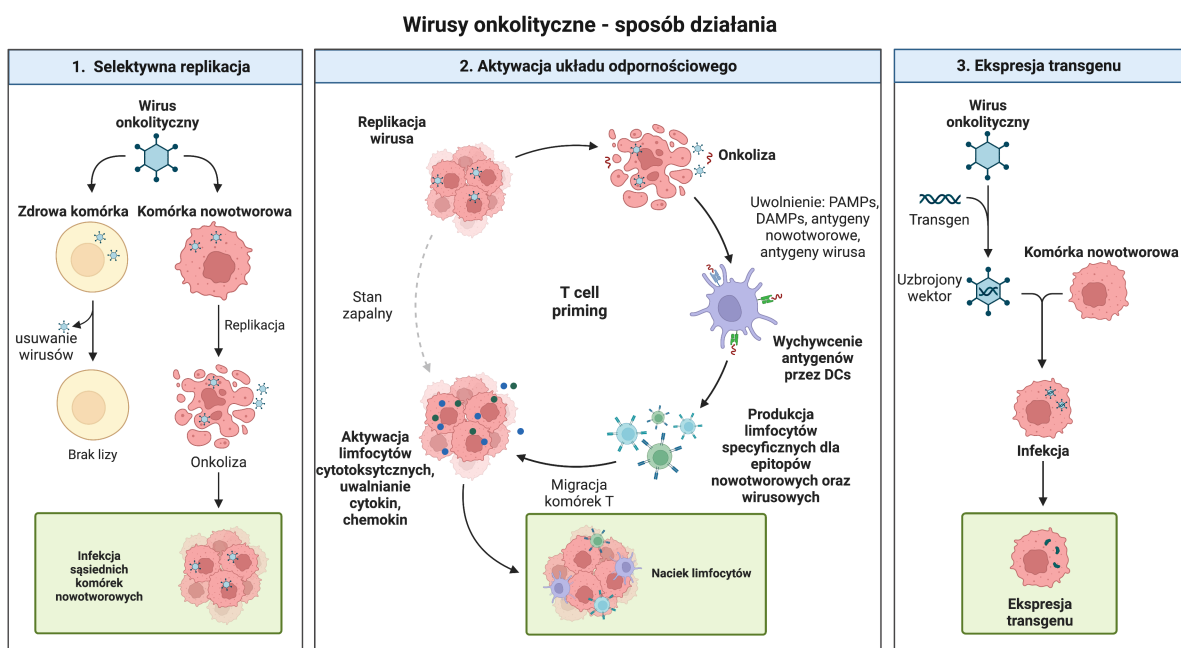
nowotworów, a nowe strategie leczenia są pilnie poszukiwane. Skuteczne związki o działaniu przeciwnowotworowym i ich celowane dostarczanie do masy guza są kluczowym warunkiem skutecznej terapii przeciwnowotworowej [3]. Po drugie, takie procedury powinny być bezpieczne [4] oraz dobrze tolerowane przez pacjentów [5].

Guzy są wysoce niejednorodną mieszaniną komórek, zawierającą komórki zrębu, komórki rakowe i komórki odpornościowe, które stymulują rozwój nowotworu i utrzymują stan immunosupresji [6]. Ponadto, guzy zdolne są do indukcji wielu mechanizmów pozwalających na unikanie wrodzonej i nabytej odpowiedzi immunologicznej [7]. Niektóre komórki układu odpornościowego naciekające na guz mają zdolność negatywnej regulacji odpowiedzi immunologicznych z powodu obecności regulatorowych limfocytów T (Treg), mieloidalnych komórek supresorowych (MDSC) i makrofagów typu 2 (M2). Dodatkowo, same guzy mogą promować supresję odporności przeciwnowotworowej poprzez ekspresję ligandów NKG2D i MICA/B, które hamują funkcjonalność komórek NK i T [8]. Immunosupresory (IL-10, histamina, peroksydaza wodorowa, adenozyne) wytwarzane przez komórki nowotworowe mogą również blokować cytotoksyczne limfocyty T [9]. Z tego powodu, w zaawansowanych chorobach nowotworowych efektywność terapii i immunologiczna odpowiedź przeciwnowotworowa indukowana przez jedną metodę leczenia może być niewystarczająca.

Terapia onkolityczna wyłania się jako potencjalna metoda efektywnego leczenia nowotworów. Wirusoterapia onkolityczna wykorzystuje wirusy onkolityczne (OV), które są genetycznie tak zaprojektowane, aby posiadały zdolność zakażenia, replikacji i zabijania komórek nowotworowych jednocześnie nie uszkadzając zdrowych komórek gospodarza [10-12]. Adenowirusy są doskonałym modelem immunoterapeutycznym o wyjątkowej zdolności pobudzania i wzmacniania odpowiedzi immunologicznej. Rekombinowane adenowirusy powodują immunogenną śmierć komórek nowotworowych, następnie, wskutek czego dochodzi do uwalniania antygenów nowotworowych, które są rozpoznawane przez komórki prezentujące antygen, i ma miejsce stymulacja silnej, swoistej odporności przeciwnowotworowej [10,13,14]. Efekt ten może być dodatkowo wzmocniony przez kodowane przez wirusa onkolitycznego transgeny stymulujące układ odpornościowy gospodarza [15,16] (**Ryc. 1**).

Najbardziej zaawansowane badania wirusów onkolitycznych w leczeniu czerniaka przeprowadzono z talimogenem laherparepvec (T-VEC). Jest to zmodyfikowany wirus opryszczki pospolitej typu 1, zaprojektowany tak, aby kodował czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Preparat ten jest podawany drogą iniekcji bezpośrednio do zmian chorobowych celem stymulacji odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym. Terapia z T-VEC w ramach badań

klinicznych I fazy na 30 pacjentach ze skórnymi lub podskórnymi przerzutami nowotworów złośliwych (piersi, głowy i szyi, czerniaka, przewodu pokarmowego) była dobrze tolerowana [17]. W badaniu fazy II z udziałem 50 pacjentów z przerzutami czerniaka do skóry ogólny odsetek odpowiedzi (RR) na leczenie kształtował się na poziomie 26% [18]. Opublikowane wyniki badania III fazy, porównującego T-VEC z GM-CSF u pacjentów z nieoperacyjnym czerniakiem w stadium IIIB-IV wykazały, że wskaźnik trwałej odpowiedzi (obiektywnej odpowiedzi ogólnoustrojowej trwającej 6 miesięcy lub dłużej w ciągu pierwszych 12 miesięcy) wyniósł 16,3% (95% CI 12,1 – 20,9%), z tendencją do poprawy przeżycia całkowitego, HR 0,79 (95% CI 0,62 – 1,00, $p = 0,051$) [19]. Redukcję wielkości zmiany nowotworowej obserwowano najczęściej w miejscu wstrzyknięcia wirusa (64,3%), ale także w nieleczonych przerzutach skórnych (33,7%, efekt systemowy/abskopalny). Na podstawie tych danych w październiku 2015 r. Agencja Żywności i Leków (FDA) zatwierdziła T-VEC do leczenia czerniaka z przerzutami, co potwierdza skuteczność terapii onkolitycznej. T-VEC jest sprzedawany pod nazwą handlową Imlygic. Obecnie, również Europejska Agencja Leków (EMA) zatwierdziła produkt T-VEC, ale niestety z powodu wysokich kosztów leczenia dostęp do nowoczesnych terapii w Polsce jak i za granicą jest ograniczony.



Ryc. 1. Uproszczony schemat prezentujący sposób działania wirusów onkolitycznych. Wirusy onkolityczne wykazują 3 stopniowy schemat działania: i) selektywnie replikują się w komórkach nowotworowych, ii) aktywują układ odpornościowy pacjenta, prowadząc do stanu zapalnego oraz nacieku limfocytów w mikrośrodowisku guza, iii) kodują geny, których są nośnikami. Grafikę zmodyfikowano przy użyciu oprogramowania z licencją Biorender.

Pojedyncza terapia rzadko jest skuteczna w leczeniu nowotworów, szczególnie z przerzutami lub w fazie zaawansowanej, a wskaźniki przeżycia przy monoterapii są na ogół niskie. Połączenie różnych sposobów leczenia polegających na połączeniu zarówno terapii konwencjonalnych jak i nowatorskich już przyniosło znaczące efekty kliniczne w leczeniu zaawansowanych nowotworów [11,12,20-22]. Strategia ta wykorzystuje połączenie zarówno konwencjonalnych, jak i nowatorskich terapii.

Wirusy onkolityczne wykazują inny mechanizm działania przeciwnowotworowego w porównaniu do konwencjonalnych terapii (chemioterapia, radioterapia, inhibitory punktów kontrolnych), co daje możliwość działania addytywnego lub synergicznego w procesie leczenia nowotworów [12,22-24]. Ponadto, terapie skojarzone mogą prowadzić do zwiększenia skuteczności zwalczania nowotworu bez dodatkowych, negatywnych skutków ubocznych. Wreszcie, ponieważ przeciwnowotworowa odpowiedź immunologiczna wywołana przez adenowirusy onkolityczne (oAdV) może nie być wystarczająca do wyeliminowania guzów, potrzebne są dodatkowe kombinacje leczenia [25].

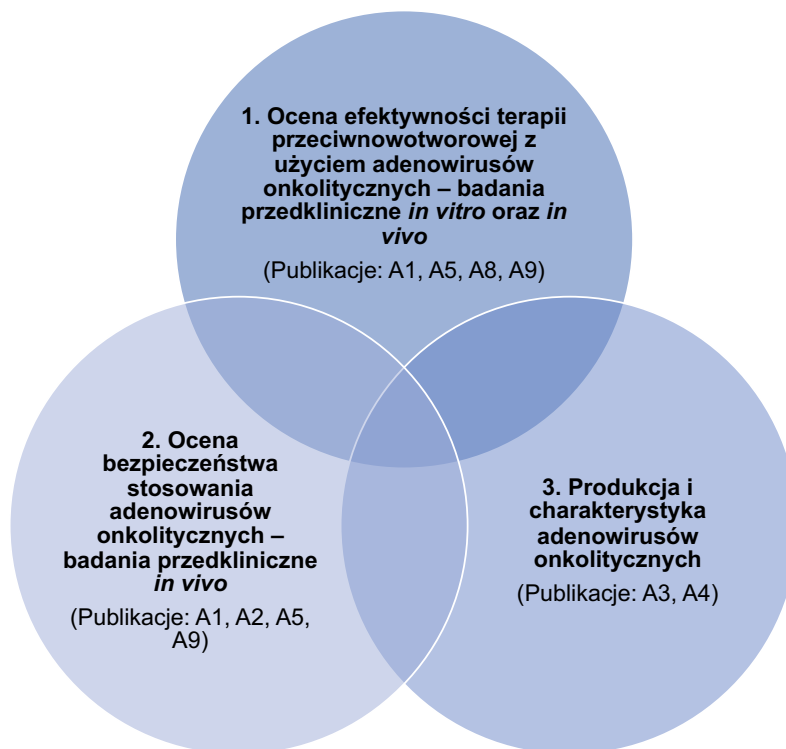
Wraz z wprowadzeniem inhibitorów punktów kontrolnych (CPI) do standardów leczenia, takich jak anty CTLA-4 (ipilimumab) i anty PD-1 (pembrolizumab, niwolumab), zarówno wskaźniki odpowiedzi (RR), jak i przeżycia całkowitego (OS) uległy poprawie. Hodi i wsp. [26] podali RR na poziomie 11% i roczny OS na poziomie 46% dla ipilimumabu. Dalszą poprawę zaobserwowano w przypadku niwolumabu i pembrolizumabu. Topalian i wsp. [27] odnotowali RR na poziomie 31% dla niwolumabu z rocznym OS na poziomie 62%. Dalszy wzrost skuteczności obserwowano w przypadku połączenia ipilimumabu z niwolumabem, z RR wynoszącym 85% [28]. Niestety, pomimo znacznego postępu klinicznego, co najmniej 40% pacjentów z zaawansowanym czerniakiem złośliwym nie reaguje na inhibitory punktów kontrolnych, a większy odsetek prawdopodobnie będzie wymagał dalszej terapii systemowej po CPI. Badania nad opornością guza na CPI koncentrują się na czynnikach wewnętrznych guza, takich jak obciążenie mutacjami [29] lub mikrośrodowisku guza, a w szczególności na nacieku limfocytów i ekspresji PD-L1 [30]. Naciek limfocytów T CD8+ wewnątrz guza był najlepszym wskaźnikiem predykcyjnym odpowiedzi na pembrolizumab w badaniu z udziałem 46 pacjentów z czerniakiem z przerzutami. Kolejne badanie z udziałem 277 pacjentów z czerniakiem złośliwym wykazało, że wysoka ekspresja PD-L1 była związana z najlepszą skutecznością leczenia blokerem PD-L1 [31]. Dane te sugerują, że mechanizm, który wspomaga infiltrację aktywowanych limfocytów T CD4+ i CD8+ oraz obniża tolerancję immunologiczną makrofagów M2 i regulatorowych limfocytów T (Treg) może zwiększyć skuteczność terapii przeciwnowotworowej.

Odkrycie inhibitorów punktów kontrolnych, takich jak anty-CTLA-4, PD-1 i PD-L1, przyczyniło się do imponujących wyników leczenia u wybranych pacjentów onkologicznych. Niestety, sama blokada immunologicznych punktów kontrolnych nie jest skuteczna w zaawansowanych stadiach choroby nowotworowej [32], wykazuje jednak zdolność synergii z innymi lekami, które posiadają zdolność do aktywacji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej [33]. Jedną z najbardziej ekscytujących i naukowo uzasadnionych kombinacji może stanowić połączenie onkolitycznej terapii wirusowej z inhibitorami punktów kontrolnych [34].

Realizowane projekty badawcze, których wyniki opublikowano w cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt. **“Zastosowanie adenowirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej”** miały na celu: opracowanie nowych, bardziej efektywnych metod leczenia czerniaka oraz międzybłoniaka z wykorzystaniem immunogennych wirusów onkolitycznych w terapii skojarzonej z anty PD-1 i chemioterapią, w tym badanie mechanizmu działania terapii na poziomie komórki, organizmu, odpowiedzi immunologicznej w mikrośrodowisku guza (**Osiągnięcie 1**), jak również przeprowadzenie oceny bezpieczeństwa terapii, w badaniach przedklinicznych *in vivo* (**Osiągnięcie 2**); opracowanie oraz zoptymalizowanie procesu produkcji wirusów onkolitycznych w skali laboratoryjnej oraz opracowanie metod analitycznych niezbędnych do charakterystyki transgenów kodowanych przez wektory (**Osiągnięcie 3**).

Schemat cyklu badań przedstawiono na **Ryc. 2**.

**Zastosowanie adenowirusów onkolitycznych w terapii
przeciwnowotworowej -**
cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych



Ryc. 2. Schemat cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt. “Zastosowanie adenowirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej”.

Reasumując, cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt. “**Zastosowanie adenowirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej**” przedstawiony na **Ryc. 2**, składa się z trzech synergistycznych części, stanowiących 3 osiągnięcia, których celem była: **1).** ocena efektywności nowych, unikalnych terapii eksperymentalnych z wykorzystaniem wirusów onkolitycznych - osiągnięcie 1; **2).** ocena bezpieczeństwa terapii – osiągnięcie 2; oraz **3).** ocena procesu optymalizacji oraz charakterystyka wektorów onkolitycznych – osiągnięcie 3.

Zestawienie serii badań przedklinicznych *in vitro* i *in vivo* przedstawiono w **Tabeli 1**.

Tabela 1. Zestawienie wykorzystanych linii komórkowych (badania *in vitro*) oraz modeli nowotworowych czerniaka i międzybłoniaka (badania *in vivo*) w cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt. ‘‘Zastosowanie adenowirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej’’.

Osiągnięcie	Model zwierzęcy – badania <i>in vitro</i>	Linie komórkowe – badania <i>in vitro</i>	Testowany wektor onkolityczny	Wykonane badania, analizy
Osiągnięcie 1 Ocena efektywności terapii z użyciem adenowirusów onkolitycznych – badania <i>in vitro</i> oraz <i>in vivo</i>	Model ludzkiego ksenograftu H226 międzybłoniaka opłucnej - BALB/c nu (n=56, 7 osobników na grupę) (Publikacja A1)	H226, MSTO-211H, JL-1	AdV5/3-D24-GM-CSF (ONCOS-102)	<ul style="list-style-type: none"> Wielkość guza nowotworowego (<i>in vivo</i>) Przeżywalność myszy (<i>in vivo</i>) Ekspresja GM-CSF (ELISA) (<i>ex vivo</i>) test cytotoksyczności (MTS) (<i>in vivo</i>) Ocena apoptozy i nekrozy komórek (aneksyna V, PI), (cytometria przepływowa) (<i>in vitro</i>) Poziom ekspresji receptorów CAR, DSG2, CD46 (cytometria przepływowa) (<i>in vitro</i>) Immunogeniczna śmierć komórek (ATP, kalretikulina, HMGB1), (pomiar spektrofotometryczny, ELISA) (<i>in vitro</i>) Miano infekcyjne – metoda immunohistochemiczna (ICC) Ocena synergicznego efektu przeciwnowotworowego (terapia skojarzana) (<i>in vivo</i>)
	Model ludzkiego ksenograftu A2058 czerniaka - huNOG CD34+ (myszy humanizowane) (n=60, od 6 do 8 osobników na grupę) (Publikacja A5)	A375, A2058, Sk-Mel-2, Sk-Mel-28	AdV5/3-D24-GM-CSF (ONCOS-102)	<ul style="list-style-type: none"> Wielkość guza nowotworowego (<i>in vivo</i>) Test cytotoksyczności (MTS) (<i>in vitro</i>) Ocena apoptozy i nekrozy komórek (aneksyna V, PI), (cytometria przepływowa) (<i>in vitro</i>) Poziom ekspresji receptorów CAR, DSG2, CD46 (cytometria przepływowa) (<i>in vitro</i>) Immunogeniczna śmierć komórek (ATP, kalretikulina, HMGB1), (pomiar spektrofotometryczny, ELISA) (<i>in vitro</i>) Badanie immunofenotypu limfocytów naciekających na guz oraz ich ilościowa ocena (CD45+, CD3+, CD4+,

				<p>CD8+), (cytometria przepływowa) (<i>ex vivo</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> Ocena ekspresji PD-L1 na powierzchni komórek nowotworowych (cytometria przepływowa) (<i>in vitro</i>) Ocena synergicznego efektu przeciwnowotworowego (terapia skojarzana) (<i>in vivo</i>)
	<p>Model ludzkiego ksenograftu A2058 czerniaka - huNOG CD34+ (myszy humanizowane) (n=68, od 6 do 8 osobników na grupę) (Publikacja A9)</p>	<p>A375, A2058, Sk-Mel-2, Sk-Mel-28</p>	<p>AdV5/3-D24-TIMP2 (ONCOS-207)</p> <p>AdV5/3-D24-PADI1 (ONCOS-209)</p> <p>AdV5/3-D24-TIMP2-PADI1 (ONCOS-210 and ONCOS-212)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Wielkość guza Nowotworowego (<i>in vivo</i>) test cytotoksyczności (MTS) (<i>in vitro</i>) Ocena apoptozy i nekrozy komórek (aneksyna V, PI), (cytometria przepływowa) (<i>in vitro</i>) Poziom ekspresji receptorów CAR, DSG2, CD46 (cytometria przepływowa) (<i>in vitro</i>) Immunogeniczna śmierć komórek (ATP, kalretikulina), (pomiar spektrofotometryczny) (<i>in vitro</i>) Badanie immunofenotypu limfocytów naciekających na guz oraz ich ilościowa ocena (CD45+, CD3+, CD4+, CD8+, Tregs, PD1+, GrB+), (cytometria przepływowa) (<i>ex vivo</i>) Ocena ekspresji PD-L1, PD-L2 na powierzchni komórek nowotworowych (cytometria przepływowa) (<i>in vitro</i>) Ocena poziomu humanizacji myszy (H indeks) (<i>in vivo</i>) poziom ekspresji PADI1, TIMP2 (ELISA) (<i>in vitro</i>) Korelacja między wielkością guza a infiltracją limfocytów naciekających na guz (test Spearmana) (<i>in vivo</i>)
	<p>Model ludzkiego ksenograftu A2058 czerniaka – BALB/c nu (n=48, 8 osobników na grupę) (Publikacja A9)</p>	-	<p>AdV5/3-D24-TIMP2 (ONCOS-207)</p> <p>AdV5/3-D24-PADI1 (ONCOS-209)</p> <p>AdV5/3-D24-TIMP2-PADI1 (ONCOS-210 and ONCOS-212)</p>	<ul style="list-style-type: none"> Wielkość guza nowotworowego Przeżywalność

	Model mysiego ksenograftu AB12 międzybłoniaka opłucnej - BALB/c (n=32, od 6 do 10 guzów nowotworowych na grupę) (Publikacja A8)	AB12	AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L	<ul style="list-style-type: none"> Wielkość guza nowotworowego (<i>in vivo</i>) Waga guza nowotworowego (<i>in vivo</i>) Badanie immunofenotypu limfocytów naciekających na guz oraz ich ilościowa ocena (CD45+, CD3+, CD4+, CD8+), (cytometria przepływowa) (<i>ex vivo</i>) Korelacja między wielkością guza a infiltracją limfocytów naciekających na guz (test Spearmana) (<i>in vivo</i>)
	Model mysiego ksenograftu B16V czerniaka - C57BL/6 (n=24, 6 guzów nowotworowych na grupę) (Publikacja A8)	B16V		<ul style="list-style-type: none"> Wielkość guza nowotworowego (<i>in vivo</i>) Waga guza nowotworowego (<i>in vivo</i>) Badanie immunofenotypu limfocytów naciekających na guz oraz ich ilościowa ocena (CD45+, CD3+, CD4+, CD8+), (cytometria przepływowa) (<i>ex vivo</i>) Korelacja między wielkością guza a infiltracją limfocytów naciekających na guz (test Spearmana) (<i>in vivo</i>)
Osiągnięcie 2 Ocena bezpieczeństwa stosowania adenowirusów onkolitycznych – badania <i>in vivo</i>	Model ludzkiego ksenograftu H226 międzybłoniaka opłucnej - BALB/c nu (n=56, 7 osobników na grupę) (Publikacja A1)	-	AdV5/3-D24-GM-CSF (ONCOS-102)	<ul style="list-style-type: none"> Biodystrybucja kopii DNA adenowirusów (qPCR) Waga ciała Objawy kliniczne
	Chomik syryjski, badania GLP (n=300, od 10 do 50 osobników na grupę) (Publikacja A2)	-		<ul style="list-style-type: none"> Hematologia Chemia kliniczna Autopsja Badania histopatologiczne przeciwciała neutralizujące (NAbs) Biodystrybucja kopii DNA adenowirusów (qPCR) Waga ciała Konsumpcja pokarmu Objawy kliniczne
	Model ludzkiego ksenograftu A2058 czerniaka - huNOG CD34+ (myszy humanizowane) (n=60, od 6 do 8 osobników na grupę) (Publikacja A5)	-		<ul style="list-style-type: none"> Waga ciała Objawy kliniczne

	Model ludzkiego ksenograftu A2058 czerniaka - huNOG CD34+ (myszy humanizowane) (n=68, od 6 do 8 osobników na grupę) (Publikacja A9)	-	AdV5/3-D24-TIMP2 (ONCOS-207) AdV5/3-D24-PADI1 (ONCOS-209)	<ul style="list-style-type: none"> • Waga ciała • Objawy kliniczne
	Model ludzkiego ksenograftu A2058 czerniaka – BALB/c nu (n=48, 8 osobników na grupę) (Publikacja A9)	-	AdV5/3-D24-TIMP2-PADI1 (ONCOS-210, ONCOS-212)	<ul style="list-style-type: none"> • Waga ciała • Objawy kliniczne
Osiągnięcie 3 Produkcja i charakterystyka adenowirusów onkolitycznych	-	HEK-293 BLUE (Publikacja A3)	AdV5/3-D24-CD40L (ONCOS-401)	<ul style="list-style-type: none"> • Ilościowa ocena produkcji CD40L (ELISA) przez wektor onkolityczny • Ocena funkcjonalności CD40L (HEK-293 BLUE, Test Quanti-BLUE) kodowanego przez wektor onkolityczny
	-	A549 (Publikacja A4)		<ul style="list-style-type: none"> • Opracowanie procesu produkcji wektora w skali laboratoryjnej (T-175, HypeFlask), (czas zbioru, dawka infekcyjna (MOI), metoda lizy komórek) • Ocena produktywności (liczba cząstek wirusa (VP) na komórkę, całkowita liczba VP) • Ocena miana infekcyjnego – metoda immunohistochemiczna (ICC)

D. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO PRAC NAUKOWYCH I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA.

1. Prace dotyczące realizacji osiągnięcia pierwszego: Ocena efektywności terapii przeciwnowotworowej z użyciem adenowirusów onkolitycznych – badania przedkliniczne *in vitro* oraz *in vivo* (Publikacje: A1, A5, A8, A9 - prace oryginalne; Publikacje: A6, A7 – prace przeglądowe)

- I. **Kuryk, L.**; Haavisto, E.; Garofalo, M.; Capasso, C.; Hirvinen, M.; Pesonen, S.; Ranki, T.; Vassilev, L.; Cerullo, V. Synergistic anti-tumor efficacy of immunogenic adenovirus ONCOS-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) and standard of care chemotherapy in preclinical mesothelioma model. *International journal of cancer* **2016**, 139, 1883-1893, doi:10.1002/ijc.30228. IF₂₀₁₆=6,513, MEiN₂₀₁₆=40 [A1]

Synergiczny efekt przeciwnowotworowy terapii skojarzonej z immunogennym adenowirusem onkolitycznym ONCOS-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) w połączeniu ze standardową chemioterapią w leczeniu międzybłoniaka – badania przedkliniczne *in vitro* oraz *in vivo*

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, udział w realizacji badań (badania *in vitro* oraz *in vivo*), analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu.

Międzybłoniak złośliwy (MM) jest rzadkim typem nowotworu, którego głównym czynnikiem etiologicznym jest ekspozycja na działanie azbestu. Obecnie nie ma skutecznych metod leczenia złośliwego międzybłoniaka, jednak zabiegi takie jak chirurgia, chemioterapia, radioterapia, immunoterapia mogą wydłużyć długość życia. Najczęściej stosowaną metodą leczenia jest obecnie chemioterapia (pemetreksed + cisplatyna, pemetreksed + karboplatyna). Skojarzona terapia, składająca się z niwolumabu (anty PD-1) i ipilimumabu (anty CTLA-4)), jest dostępna dla pacjentów nieoperacyjnych. Niemniej jednak średnia długość przeżycia dla osób z zaawansowaną chorobą, leczonych chemioterapią bądź immunoterapią to zaledwie 14,1 i 18,1 miesięcy odpowiednio [35]. Z klinicznego punktu widzenia istnieje duże zapotrzebowanie na nowe oraz efektywniejsze strategie leczenia międzybłoniaka złośliwego, co stanowi duże wyzwanie dla zdrowia publicznego na świecie.

Celem badań była ocena właściwości przeciwnowotworowych unikalnej i eksperymentalnej terapii składającej się z wirusa onkolitycznego AdV5/3-D24-GM-CSF (ONCOS-102) w połączeniu z chemioterapeutykami pierwszego rzutu (pemetreksed +

cisplatyna oraz pemetreksed + karboplatyna)) w badaniach *in vitro* na liniach międzybłoniaka oraz *in vivo* na modelu ksenoprzeszczepu międzybłoniaka H226 (BALB/c nu) *in vivo*.

Wyniki badań zostały wykorzystane do oceny potencjału leczniczego testowanych terapeutów w badaniach przedklinicznych, celem weryfikacji koncepcji terapii eksperymentalnej oraz podjęcia dalszych decyzji w sprawie rozpoczęcia badań klinicznych (A Randomised Phase II Open-label Study With a Phase Ib Safety lead-in Cohort of ONCOS-102, an Immune-priming GM-CSF Coding Oncolytic Adenovirus, and Pemetrexed/Cisplatin in Patients With Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02879669).

ONCOS-102 jest to adenowirus onkolityczny, selektywnie replikujący się w komórkach nowotworowych, kodujący ludzki czynnik GM-CSF.

Właściwości przeciwnowotworowe terapii skojarzonej badano na trzech liniach międzybłoniaka: MSTO-211H, JL-1 oraz H226. Najbardziej efektywną terapią w eliminacji komórek nowotworowych w warunkach *in vitro* było połączenie adenowirusa onkolitycznego ONCOS-102 z chemioterapią (test cytotoksyczny MTS; ocena śmierci komórek: apoptozy (aneksyna V) i nekrozy (jodek propidyny)) (**Ryc. 1, Publikacja A1**). Co ważne przy zastosowaniu terapii łączonej zaobserwowano synergiczny efekt przeciwnowotworowy przy zastosowaniu metody FTV (ang. fractal tumor volume, $R > 1$) (**Tabela 2, Publikacja A1**).

Poziom markerów immunogennej śmierci komórek, takich jak ekspozycja kalretikuliny na powierzchni komórki, czy zewnątrzkomórkowe uwalnianie ATP i HMGB1 zostały zmierzone dla testowanych grup badawczych: ONCOS-102, chemioterapeutyki, terapia skojarzona. Najbardziej immunogenna śmierć komórek nowotworowych była indukowana leczeniem z użyciem terapii łączonej na wszystkich testowanych liniach komórkowych (**Ryc. 2, Publikacja A1**).

Celem weryfikacji badań *in vitro* oraz dalszej potrzeby oceny właściwości przeciwnowotworowych zastosowanych terapii, przeprowadzono serię badań na modelu ksenotransplantu ludzkiego międzybłoniaka H226 u myszy BALB/c, z upośledzonym układem odpornościowym zgodnie ze schematem leczenia w **Tabeli 1 (Publikacja A1)**.

Nowotwory okazały się być odporne na zastosowane standardowe chemioterapeutyki (pemetreksed + cisplatyna, pemetreksed + karboplatyna), a terapia z ich zastosowaniem nie przyczyniła się do redukcji objętości guza nowotworowego (**Ryc. 4a, S1, S1, Publikacja A1**).

U dwóch myszy, u których zastosowano leczenie ONCOS-102 w połączeniu z pemetreksem oraz cisplatyną zaobserwowano całkowitą remisję choroby. Ta skojarzona terapia okazała się być najbardziej efektywną metodą leczenia prowadzącą do redukcji wielkości guza

nowotworowego. Po zakończeniu terapii średnia wielkość guza międzybłoniaka u zwierząt (w porównaniu do wielkości guza z dnia przed rozpoczęciem terapii – 100%) wynosiła następująco: 473% (grupa kontrolna), 563% (pemetreksed + cisplatyna), 672% (pemetreksed + karboplatyna), 206% (ONCOS-102), 97% terapia skojarzona (ONCOS-102 + pemetreksed + cisplatyna) (**Ryc. 4, Publikacja A1**). Co ważne, ONCOS-102 w połączeniu z chemioterapeutykami wykazał silny synergiczny efekt przeciwnowotworowy ($R>1$) w dniu 21, 48 i 60 od rozpoczęcia terapii (**Tabela 2, Publikacja A1**).

Detekcję liczby kopii DNA regionu E4 adenowirusa i oznaczenie poziomu ludzkiego GM-CSF wykonano odpowiednio metodą qPCR i ELISA w wątrobie, guzie nowotworowym oraz we krwi. Najwyższa koncentracja kopii DNA wirusa była obecna w guzach nowotworowych (miejscowo). Natomiast nie wykryto obecności DNA w surowicy czy wątrobie (**Ryc. 4d, Publikacja A1**). Najwyższy poziom ludzkiego GM-CSF kodowanego przez ONCOS-102, zmierzono w guzach nowotworowych (**Ryc. 4c, Publikacja A1**).

Uzyskane wyniki pokazują, że kombinacja ONCOS-102 z chemioterapią może doprowadzić do korzystnego efektu terapeutycznego w leczeniu międzybłoniaka.

Otrzymane wyniki stanowiły uzasadnienie dla rozpoczęcia prowadzenia w Hiszpanii oraz Francji (A Randomised Phase II Open-label Study With a Phase Ib Safety lead-in Cohort of ONCOS-102, an Immune-priming GM-CSF Coding Oncolytic Adenovirus, and Pemetrexed/Cisplatin in Patients With Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02879669) testów klinicznych z użyciem testowanych terapeutyków w leczeniu międzybłoniaka.

- II. Kuryk, L.; Moller, A.W.; Jaderberg, M.** Combination of immunogenic oncolytic adenovirus ONCOS-102 with anti-PD-1 pembrolizumab exhibits synergistic antitumor effect in humanized A2058 melanoma huNOG mouse model. *Oncoimmunology* **2019**, 8, e1532763, doi:10.1080/2162402X.2018.1532763. **IF₂₀₁₉=5,869, MEiN₂₀₁₉=140 [A5]**

Synergiczny efekt przeciwnowotworowy terapii skojarzonej z adenowirusem onkolitycznym ONCOS-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) w połączeniu z inhibitorami punktów kontrolnych anty PD-1 w leczeniu czerniaka – badania przedkliniczne *in vitro* oraz *in vivo*

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, nadzór nad realizacją badań, analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu, korespondencja z redakcją. Autor korespondencyjny.

W porównaniu do konwencjonalnych metod leczenia nowotworów, takich jak chemioterapia, radioterapia czy nawet immunoterapia (terapia komórkowa, inhibitory punktów kontrolnych, bi-specyficzne przeciwciała), wirusy onkolityczne wykazują inny mechanizm działania co teoretycznie pozwala na uzyskanie synergicznego lub addytywnego efektu leczenia, bez interakcji krzyżowych w terapiach łączonych.

Odpowiedź immunologiczna moduluje przebieg chorób nowotworowych, między innymi za pośrednictwem szlaku zaprogramowanej śmierci komórki z udziałem limfocytów T posiadających receptor PD-1. Komórki nowotworowe posiadające na swojej powierzchni ligand PD-L1 przyłączają się do receptora PD-1 na limfocytach T i hamują ich funkcje obronne. Przeciwciała monoklonalne, blokując PD-1, zapobiegają łączeniu się ligandu z receptorem, co przywraca aktywność przeciwnowotworową limfocytów T.

Inhibitory punktów kontrolnych zrewolucjonizowały leczenie zaawansowanego czerniaka, poprzez uwolnienie supresji limfocytów T w środowisku guza, co prowadzi do aktywacji przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologiczej.

Pembrolizumab (Keytruda®) jest przeciwciałem monoklonalnym, które wiąże się z receptorem PD-1 na powierzchni limfocytów, co blokuje jego interakcję z PD-L1, inhibując w ten sposób sygnał dla limfocytów T.

Czerniak jest wysoce immunogennym nowotworem, co czyni go bardziej wrażliwym na immunoterapie niż chemioterapię. Jednoczesne podawanie terapeutyków, takich jak przeciwciała anty PD-1 oraz ONCOS-102 mogą reaktywować limfocyty naciekające na guz, swoiste dla epitopów antygenów uwolnionych w wyniku onkolizy. Mając na uwadze fakt, iż wirusy onkolityczne mają zdolności indukcji odpowiedzi cytotoksycznej oraz humoralnej, a inhibitory punktów kontrolnych posiadają właściwości immunomodulacyjne, w tym reaktywujące właściwości efektorowe limfocytów T, połączenie tych terapii jest wysoce uzasadnione z naukowego punktu widzenia.

Reasumując co powyżej, oraz mając na uwadze wyniki prac opublikowanych w International Journal of Cancer (**Publikacja A1**), celem kolejnych prac eksperymentalnych było zbadanie efektu terapeutycznego nowej i unikalnej skojarzonej terapii eksperymentalnej polegającej na podaniu testowanego wirusa onkolitycznego ONCOS-102 w połączeniu z przeciwciałami anty PD-1.

Początkowo, właściwości przeciwnowotworowe terapii skojarzonej badano *in vitro* na czterech liniach czerniaka: Sk-Mel-2, Sk-Mel-28, A2058, A375. Efektywność terapii była uzależniona od dawki wirusa ONCOS-102 oraz długości ekspozycji komórek nowotworowych na testowany terapeutyk. Terapia z wirusem w dawce od 100 do 1000 cząstek wirusa na

komórkę po 72 godzinach doprowadziła niemalże do 100% eradykacji komórek linii Sk-Mel-2, Sk-Mel-28, A375 w warunkach *in vitro* (**Ryc. S1a-d, Publikacja A5**).

Terapia z zastosowaniem wirusa ONCOS-102 wywołała umiarkowaną do wysokiej ekspresję kalretikuliny na powierzchni komórek nowotworowych, co sugeruje indukcję stresu endoplazmatycznego. Zakażenie wirusem ONCOS-102 miało różny wpływ na uwalnianie ATP w czterech badanych liniach komórkowych czerniaka: wysoki poziom uwalniania ATP zaobserwowano w komórkach linii Sk-Mel-2, poziom ATP był natomiast niższy w Sk-Mel-28 i A2058, oraz nie uległ zmianie w komórkach A375 (**Ryc. 3, Publikacja A5**).

Ludzki adenowirus, serotyp 5 (ONCOS-102) jest wirusem swoistym gatunkowo i w modelach zwierzęcych nie replikuje się w takim samym stopniu jak u ludzi. W celu oceny zarówno właściwości onkolitycznych jak i immunomodulacyjnych wirusa oraz przeciwciał anty PD-1 opracowano humanizowany model czerniaka na bazie myszy huNOG CD34+.

W celu weryfikacji badań *in vitro* oraz przeprowadzenia dalszej oceny właściwości przeciwnowotworowych testowanych terapii, wykonano serię badań na mysim modelu ludzkiego ksenoprzeszczepu czerniaka A2058 na myszach humanizowanych (huNOG CD34+). Zaobserwowano, że u myszy, którym podano wirusa ONCOS-102, w 40 dniu wielkość guza uległa redukcji o 51,5% ($p=0,02$) w porównaniu do grupy kontrolnej. Terapia z pembrolizumabem nie wykazała efektu terapeutycznego. Natomiast terapia wirusem onkolitycznym ONCOS-102 w połączeniu z przeciwciałami anty PD-1 w dawkach 200 i 400 μg doprowadziła do redukcji wielkości guza o 61% ($p = 0,02$) i 69% ($p = 0,004$), odpowiednio (**Ryc. 4, Publikacja A5**).

Następnie przeprowadzono analizę FTV w celu oceny możliwości synergicznej interakcji między tymi dwiema modalnościami (**Tabela 1, Publikacja A5**). Synergiczne interakcje przeciwnowotworowe zaobserwowano w grupie myszy leczonych z udziałem ONCOS-102 + pembrolizumab w dawkach 200 μg oraz 400 μg .

Terapia z zastosowaniem wirusa onkolitycznego ONCOS-102 przyczyniła się do znacznego wzrostu liczby cytotoksycznych limfocytów CD8+ naciekających na guz (**Ryc. 7A, Publikacja A5**), natomiast zaobserwowano spadek liczby limfocytów CD4 + (**Ryc. 7B, Publikacja A5**). Terapia pembrolizumabem nie wykazała wpływu na poziom limfocytów CD8+ w mikrośrodowisku guza (**Ryc. 7A, Publikacja A5**). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji PD-L1 na powierzchni komórek w badanych grupach (**Ryc. 7C, Publikacja A5**).

Podsumowując, synergiczny efekt przeciwnowotworowy zaobserwowano u humanizowanych myszy leczonych terapią skojarzoną z udziałem ONCOS-102 +

pembrolizumab, co przełożyło się na istotną statystycznie redukcję wielkości guza. Pozwalając na postawienie hipotezy, że podanie ONCOS-102 indukuje śmierć komórek nowotworowych za pośrednictwem i) onkolizy oraz ii) komórek odpornościowych, głównie limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ naciekających na guz. Terapia z użyciem przeciwciał anty PD-1 moduluje oraz aktywuje limfocyty T poprzez hamowanie interakcji między receptorem PD-1 a ligandem PD-L1, blokując w ten sposób sygnał dla limfocytów T.

Uzyskane wyniki wskazały, że kombinacja ONCOS-102 z inhibitorem anty PD-1, takim jak pembrolizumab, może doprowadzić do korzystnego efektu terapeutycznego w leczeniu zaawansowanego czerniaka i zostały one wykorzystane do oceny potencjału leczniczego testowanych terapeutów, celem weryfikacji koncepcji terapii eksperymentalnej oraz podjęcia dalszych decyzji w sprawie rozpoczęcia badań klinicznych (A Pilot Study of Sequential ONCOS-102, an Engineered Oncolytic Adenovirus Expressing GM-CSF, and Pembrolizumab in Patients With Advanced or Unresectable Melanoma Progressing After Programmed Cell Death Protein 1 (PD1) Blockade, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT030036769).

- III. Garofalo, M.; Pancer, K.W.; Wieczorek, M.; Staniszevska, M.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; **Kuryk, L.** From Immunosuppression to Immunomodulation - Turning Cold Tumours into Hot. *J Cancer* **2022**, 13, 2884-2892, doi:10.7150/jca.71992. **IF₂₀₂₂=3,9**, **MEiN₂₀₂₂=70 [A8]**

Od immunosupresji do immunomodulacji - transformacja "zimnych" guzów nowotworowych na "gorące" – badania przedkliniczne *in vivo*

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, udział w realizacji badań (badania *in vitro* oraz *in vivo*), analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu, korespondencja z redakcją. Autor korespondencyjny.

Limfocyty naciekające guz (ang. tumor infiltrating lymphocytes, TILs) są reprezentowane przez heterogenne grupy komórek odpornościowych, w tym komórki jedno- i wielojądrzaste odporności wrodzonej: NK, makrofagi, komórki dendrytyczne (DCs), mastocyty, bazofile, neutrofile, eozynofile oraz nabytej: limfocyty T i B.

Na podstawie licznych badań klinicznych w zakresie immunoterapii, potwierdzono jak ważna jest analiza ilościowa oraz jakościowa limfocytów naciekających na guz w mikrośrodowisku guza (ang. tumor microenvironment, TME). Stosunek między

przeciwnowotworowymi komórkami odpornościowymi a komórkami immunosupresyjnymi naciekającymi na guz jest ściśle skorelowany z klinicznym rokowaniem w terapii onkologicznej. Gdy aktywator układu odpornościowego (np. wirus onkolityczny) dotrze do tkanki nowotworowej, wyzwalana jest odpowiedź immunologiczna, mająca na celu zwiększenie liczby limfocytów naciekających na guz, swoistych dla komórek nowotworowych. W konsekwencji mikrośrodowisko guza staje się coraz bardziej prozapalne, przewyższając stan immunosupresyjny, który umożliwia ucieczkę komórkom nowotworowym przed immunologicznym nadzorem.

Istnieje coraz więcej dowodów klinicznych potwierdzających istotną rolę immunoterapii w leczeniu nowotworów guzów litych, takich jak czerniak i międzybłoniak. Sobhani i wsp. wykazali, że guzy o umiarkowanym poziomie nacieku limfocytów u pacjentów z międzybłoniakiem ściśle korelowały z poprawą przeżywalności w porównaniu z guzami bez lub z ich niskim poziomem [4]. Ponadto, u pacjentów z czerniakiem, zaobserwowano pozytywną korelację między przeżywalnością a gęstością nacieku cytotoksycznych limfocytów CD8⁺, podczas gdy dla kontrastu, naciek immunosupresyjnych makrofagów związanych z nowotworem (ang. tumor associated macrophages, TAM) i komórek regulatorowych (Treg) w guzie okazał się mieć negatywny wpływ na regresję nowotworu [5,6]. Wyniki te podkreśliły znaczenie immunoterapii w leczeniu nowotworów. Jednak ważne jest, aby rozróżnić mikrośrodowisko guza o charakterze zapalnym, „gorącym”, z obecnością limfocytów T od „zimnego” bez komórek T [7,8]. Oprócz stopnia naciekania limfocytów T istotnym czynnikiem jest również ilość i różnorodność cytokin prozapalnych [9].

W konsekwencji podjęto intensywne wysiłki w celu opracowania nowych strategii leczenia chorób nowotworowych mających za zadanie transformację mikrośrodowiska guza z „zimnego na gorący” aby u pacjentów leczonych immunoterapeutykami [10] poprawić skuteczność terapii.

Dlatego też na podstawie własnych wyników badań opublikowanych w Oncoimmunology (**Publikacja A5**) oraz licznych doniesień naukowych opisanych we wstępie podjęto się przeprowadzenia oceny efektywności przeciwnowotworowej nowo sklonowanego wirusa onkolitycznego AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L w połączeniu z przeciwciałami anti-PD1. Co ważne oceniono zdolność zastawianych terapii do indukcji infiltracji limfocytów naciekających na guz oraz dokonano korelacji z obrazem klinicznym (objętością guza i masą guza) w serii badań przedklinicznych na mysich modelach nowotworowych międzybłoniaka oraz czerniaka.

W tym celu został zaprojektowany oraz skonstruowany unikalny wektor onkolityczny

AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L kodujący białka kostymulujące: ICOSL i CD40L [12], zdolny do indukowania nacieku oraz aktywacji limfocytów w mikrośrodku guza nowotworowego. Następnie na modelach zwierzęcych ocenialiśmy korelację między stopniem nacieku limfocytów na guz a skutecznością przeciwnowotworową. Główną hipotezą naukową eksperymentu było zweryfikowanie czy, terapia skojarzona z udziałem adenowirusa onkolitycznego AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L i przeciwciał anty PD-1 wykaże zdolności immuno-aktywacyjne, poprzez zwiększenie infiltracji limfocytów naciekających na guz, i czy będzie to korelować z efektem klinicznym.

Właściwości onkolityczne AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L oceniono za pomocą testu cytotoksyczności MTS (**Ryc. S1, Publikacja A8**). Oceniono również zdolność wektora onkolitycznego do selektywnej replikacji w komórkach nowotworowych. Wykazano, że wirusy onkolityczne nie replikowały się w komórkach nienowotworowych (fibroblastach) (żywołność komórek > 90%).

Następnie, aby ocenić zdolności przeciwnowotworowe oraz immunomodulacyjne wektora AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L, przeciwciał anty PD-1 oraz terapii skojarzonej opracowano dwa syngeniczne modele kenotransplantu czerniaka i międzybłoniaka na bazie myszy C57BL/6 i BALB/c, odpowiednio.

Wykazaliśmy, że terapia z zastosowaniem unikalnego wirusa AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L, w połączeniu z przeciwciałami anty PD-1 była najskuteczniejszym schematem leczenia w obu testowanych modelach zwierzęcych. W punkcie końcowym (dzień 33), objętości guza międzybłoniaka AB12 u myszy leczonych terapią skojarzoną były znacznie mniejsze w porównaniu z grupą traktowaną samym wirusem lub w grupie kontrolnej (9,9 mm³, 72 mm³, 219 mm³, p ≤ 0,001, odpowiednio) (**Ryc. 1A, Publikacja A8**). Zastosowanie przeciwciał anty PD-1 nie zmniejszyło w sposób istotny statystycznie objętości guza (vs kontrola). Podobne obserwacje odnotowano na modelu czerniaka B16V, gdzie leczenie skojarzone AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L + przeciwciała anty PD-1 było najefektywniejsze spośród testowanych terapii (odpowiednio 102 mm³, 137 mm³, 484 mm³, p ≤ 0,001 dla terapii skojarzonej, wirusa i kontrolnej grupy) (**Ryc. 1B, Publikacja A8**). Zgodnie z wcześniejszymi spostrzeżeniami również w tym przypadku podanie samych przeciwciał anty PD-1 nie wykazało skuteczności przeciwnowotworowej.

W obu modelach badań analizy fenotypowe limfocytów wyizolowanych od myszy z pobranych zmian nowotworowych wykazały, że sam wirus lub w połączeniu z anty PD-1 był w stanie zwiększyć poziom nacieków komórek odpornościowych, zwłaszcza komórek CD8⁺ (międzybłoniak AB12: kontrola: 1,36%, wirus: 6%, anty PD-1: 2,4%, terapia skojarzona:

7,38%; czerniak B16V: kontrola: 0,33%, wirus: 1,94%, anty PD-1: 0,31%, terapia skojarzona: 2,33%) (**Ryc. 2, Ryc. S4, Publikacja A8**). Na podstawie wyników można spekulować, że ten unikalny chimeryczny adenowirus jest zdolny do zwiększania infiltracji limfocytów cytotoksycznych T CD8⁺ w środowisku guza. Nasze wyniki pokazują, że liczba limfocytów cytotoksycznych T CD8⁺ (ale nie CD4⁺) istotnie statystycznie korelowała z objętością guza (odpowiednio $p = 0,001$, $p = 0,007$ dla modeli AB12 i B16V) (**Ryc. 2B, Publikacja A8**) i masą guza (odpowiednio $p = 0,001$, $p = 0,012$ dla modeli AB12 i B16V) (**Ryc. 2C, Publikacja A8**).

Reasumując badania wykazały, że skojarzona terapia AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L + przeciwciała anty PD-1 wykazała najefektywniejszą aktywność przeciwnowotworową i synergistyczne działanie przeciwnowotworowe zarówno na modelu czerniaka, jak i międzybłoniaka. Co ważne, efekt kliniczny (redukcja wielkości guza) korelował z immunologiczną odpowiedzią tj. naciekiem limfocytów cytotoksycznych T CD8⁺ na guz (zwiększona infiltracja). Opracowany unikalny wektor onkolityczny uzbrojony w cząsteczki kostymulujące może trwale indukować immunologiczną odpowiedź przeciwnowotworową oraz mieć ważne implikacje dla rozwoju dalszych klinicznych strategii w leczeniu litych nowotworów złośliwych, takich jak czerniak i międzybłoniak. Korzyści terapeutyczne z łączenia różnych inhibitorów punktów kontrolnych z wirusami onkolitycznymi, kodującymi cząsteczki immunomodulujące, mogą stać się obszarem większego zainteresowania w nadchodzących latach.

- IV. Kuryk, L.; Møller, A.-S.W.** Next generation of oncolytic viruses with the double transgenes PADI1 and TIMP-2 exhibit anti-tumor activity against melanoma in nude mouse and humanized NOG mouse models. *Molecular Therapy - Oncolytics* **2023**, doi:10.1016/j.omto.2023.01.002. **IF₂₀₂₃=5,7, MEiN₂₀₂₃=100 [A9]**

Konstrukcja wektora onkolitycznego następnej generacji z dwoma transgenami PADI1 oraz TIMP-2 o właściwościach przeciwnowotworowych w leczeniu czerniaka – badania przedkliniczne *in vitro* oraz *in vivo*

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, nadzór nad realizacją badań, analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu, korespondencja z redakcją. Autor korespondencyjny.

Regulator macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM), zwany tkankowym inhibitorem metaloproteazy typu 2 (TIMP-2), ulega nadekspresji w komórkach czerniaka ulegającego

regresji. TIMP-2 jest jednym z czterech rodzajów TIMP, które regulują macierz zewnątrzkomórkową w środowisku nowotworu poprzez modulację aktywności katalitycznej rodziny endoproteaz zależnych od cynku zwanych metaloproteazami macierzy (MMP). Degradacja ECM przez MMP może stymulować wzrost guza, tworzenie naczyń krwionośnych (angiogeneza), uwalnianie czynników wzrostu i umożliwiać migrację przerzutowych komórek nowotworu. TIMP nie tylko hamują aktywność różnych MMP, ale także może modulować angiogenezę, proliferację i apoptozę przez mechanizmy niezależne od MMP. TIMP-2 może wiązać integrynę $\alpha 3 \beta 1$ na komórkach śródbłónka, hamować proliferację, migrację i angiogenezę komórek śródbłónka w sposób niezależny od MMP. Ponadto TIMP-2 może inaktywować VEGFR2 i FGFR1 w komórkach śródbłónka, co zmniejsza ich proliferację i angiogenezę. Miejscowa nadekspresja TIMP-2 w tkance nowotworowej może zapewniać działanie przeciwnowotworowe w czerniaku.

Niedobór argininy może wywoływać autofagię, apoptozę, działanie antyangiogenne i zmniejszoną produkcję tlenku azotu (NO) w nowotworach zależnych od argininy, w tym w czerniaku i międzybłoniaku. Około 70% pierwotnych czerniaków nie wykazuje ekspresji syntetazy argininobursztynianowej-1 (ASS-1), która wytwarza argininę. Rokowanie u pacjentów z czerniakiem z brakiem ekspresji ASS-1 (-) jest negatywne. Lokalna ekspresja deiminazy peptydyloargininowej (PADI1) w nowotworach może indukować apoptozę guza nowotworowego, działanie antyangiogenne i zmniejszoną produkcję tlenku azotu (NO) wywołane niedoborem argininy.

W ramach zaprojektowanych badań postanowiono kontynuować prace badawcze nad opracowaniem efektywniejszych terapii leczenia czerniaka. W tym celu na podstawie wyników badań z użyciem wcześniej opracowanych i przetestowanych wektorów onkolitycznych (**Publikacja A1, A5, A8**), postanowiono zaprojektować oraz skonstruować nowe, unikalne konstrukty wirusa onkolitycznego na bazie wcześniejszej platformy.

Postawiliśmy hipotezę badawczą, że ukierunkowane dostarczanie białek (TIMP-2, PADI1) przez adenowirusy onkolityczne o aktywności przeciwnowotworowej do mikrośrodowiska guza czerniaka może zwiększyć efektywność terapii przeciwnowotworowej oraz zredukować potencjalne efekty uboczne. Wirusy onkolityczne są zaprojektowane tak, aby replikowały się selektywnie w komórkach nowotworowych, z pominięciem zdrowych komórek. Adenowirusy onkolityczne stanowią platformę przeciwnowotworową, która nie tylko może powodować lizę komórek nowotworowych, ale może również dostarczać egzogenne geny, które zwiększają aktywność przeciwnowotworową za pomocą różnych mechanizmów działania.

Zastosowaliśmy rozwiązanie wykorzystane w konstrukcji wektorów kodujących GM-CSF, ICOSL, czy CD40L (**Publikacje A1, A5, A8**). Po pierwsze, wykonano modyfikację włókien adenowirusa, zastępując je sekwencją z adenowirusa o serotypie 3 (chimera włókien Ad5/3) wiążącą się z białkiem błonowym desmogleiną 2 (DSG2), która często ulega nadekspresji w komórkach czerniaka. Po drugie, zmodyfikowano gen E1A dokonując delecji 24 pz, która umożliwia selektywną replikację w komórkach nowotworowych, z defektywnym szlakiem siatkowczaka (Rb). Następnie dokonaliśmy insercji 2 transgenów (TIMP-2, PADI1) do genomu adenowirusa w różnej konfiguracji.

W ramach badań przedklinicznych *in vitro* oraz *in vivo*, oceniliśmy właściwości przeciwnowotworowe skonstruowanych wektorów na różnych modelach czerniaka wykorzystując metodykę oraz metodologie opracowane wcześniej (**Publikacje A1, A5, A8**).

Immunoterapia czerniaka złośliwego (MM) znacznie poprawia długość życia tylko niewielkiej części pacjentów. Celem opracowania nowych i bardziej efektywnych metod leczenia czerniaka, zbadaliśmy skuteczność miejscowej inhibicji proliferacji komórek nowotworowych i angiogenezy, na wzrost czerniaka poprzez skonstruowanie i charakterystykę unikalnych adenowirusów onkolitycznych: ONCOS-207 (TIMP-2), ONCOS-209 (PADI1), ONCOS-210 i ONCOS-212 (TIMP-2 + PADI1) (**Tabela S1, Publikacja A9**) wykorzystując wyniki i doświadczenie z prac wcześniejszych (**Publikacja A1, A5, A8**).

Zgodnie z oczekiwaniami, komórki zakażone ONCOS-207, ONCOS-210 i ONCOS-212 produkowały białko TIMP-2; natomiast ONCOS-209, ONCOS-210, ONCOS-212 - PADI1 (**Ryc. S1, Publikacja A9**).

Aktywność onkolityczną czterech wektorów adenowirusów onkolitycznych oceniano w liniach komórkowych czerniaka ludzkiego: A2058, A375, Sk-Mel-2 i Sk-Mel-28, które nie wykazują ekspresji syntetazy argininobursztynianu. Wszystkie wektory wykazywały aktywność onkolityczną w warunkach *in vitro* na czterech liniach czerniaka (**Ryc. 1, Publikacja A9**).

Oceniono zdolności skonstruowanych wektorów do indukcji apoptozy i nekrozy komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*. Komórki A2058, A375 i Sk-Mel-2 traktowane ONCOS-212 (0,1 VP, 1VP, 10VP) wykazały znacznie silniejszy efekt apoptotyczny (aneksyna V) niż kontrola negatywna (**Ryc 2, Publikacja A9**). ONCOS-212 indukował również znacznie większą liczbę komórek nekrotycznych (PI) A2058, A375 i SK-MEL-2 (0,1 VP, 10 VP) niż kontrola negatywna (**Ryc. 2, Publikacja A9**).

Efekt leczenia z zastosowaniem wektorów onkolitycznych nowej generacji był zależny od dawki wirusa i długości terapii. Traktowanie komórek wirusem ONCOS-212 (10 cząstek

wirusa/komórkę, 100 cząstek wirusa/komórkę, 1000 cząstek wirusa/komórkę) i ONCOS-210 (1000 cząstek wirusa/komórkę) znacząco zwiększyło ekspresję kalretikuliny na powierzchni komórek Sk-Mel-28 w porównaniu z kontrolą ($p < 0,01$). Eksperymentalna terapia we wszystkich dawkach znacząco hamowała wydzielanie ATP (A375 i A2058). Terapia nie wpłynęła na poziom wydzielania HMGB1 (**Ryc. 3, Publikacja A9**).

Następnie, aby ocenić zdolności przeciwnowotworowe oraz immunomodulacyjne nowych wektorów onkolitycznych wykorzystano modele kenotransplantu czerniaka A2058 na myszach BALB/c nu oraz humanizowanych (huNOG CD34+), na podstawie metodologii z wcześniejszych publikacji (**Publikacje A1, A5, A8**).

Terapeutyczną skuteczność czterech wirusów onkolitycznych (ONCOS-207, ONCOS-209, ONCOS-210, ONCOS-212) porównano z grupą kontrolną (PBS). Średnia objętość guza w grupie ONCOS-210 i ONCOS-212 oraz kombinacji grupy ONCOS-207 + ONCOS-209 była znacznie mniejsza niż w grupie kontrolnej, czy grupie ONCOS-207 i ONCOS-209 na myszach BALB/c nu (**Ryc. 4A, $p < 0,01$, Publikacja A9**). Synergiczny efekt przeciwnowotworowy (ONCOS-210, ONCOS-212) zaobserwowano w dniu 21 i dniu 33 po rozpoczęciu leczenia (**Tabele S2, Publikacja A9**). Ponieważ myszy BALB/c nu posiadają upośledzony układ immunologiczny, obserwowane efekty przeciwnowotworowe nie obejmowały wkładu nabytej odpowiedzi immunologicznej gospodarza.

Mając na uwadze powyższe, wykorzystano model czerniaka A2058 na bazie humanizowanych myszy huNOG, który dokładniej naśladuje ludzką odpowiedź immunologiczną. Po humanizacji myszy NOG, a następnie wszczepieniu A2058 i randomizacji w oparciu o wskaźnik humanizacji i objętości guza (**Ryc. S2, Publikacja A9**), eksperyment przeprowadzono zgodnie ze schematem dawkowania (**Ryc. S3, Publikacja A9**). Grupy leczone ONCOS-212, ONCOS-207, ONCOS-209 w dawce $2,5 \times 10^6$ cząstek wirusa/nowotwór oraz kombinacją ONCOS-207 + ONCOS-209 miały znacznie zmniejszoną objętość guza w dniu 28 (koniec badania) w porównaniu z kontrolą (**Ryc. 5, Publikacja A9**). Myszy leczone ONCOS-212 miały istotną statystycznie zmniejszoną objętość guza w porównaniu do kontroli ($p \leq 0,01$). Dawka ONCOS-212 (5×10^8 cząstek wirusa) znacznie zmniejszyła wzrost guza prawego boku, lewego boku i obu stron w porównaniu z grupą kontrolną (odpowiednio $p \leq 0,001$, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,05$) (**Ryc. 5, Publikacja A9**).

Przerzuty pozostają głównym wyzwaniem w leczeniu późnego stadium czerniaka. Indukcja odpowiedzi immunologicznej w leczonym guzie nowotworowym może hamować proces powstawania przerzutów (efekt abskopalny). W tym celu oceniliśmy, czy leczenie z użyciem ONCOS-212 (guzy prawej strony) może mieć wpływ na wzrost guzów nieleczonych

(guzy po lewej stronie). Zaobserwowano, iż nieleczone guzy nowotworowe wykazały znacząco wolniejszy wzrost ($p \leq 0,01$) niż leczone guzy strony prawej (**Ryc. 6, Publikacja A9**). Efekt abskopalny w terapii z ONCOS-212 na modelu czerniaka A2058 hNOG potwierdza hipotezę, że odpowiedź immunologiczna odgrywa znaczącą rolę w procesie powstawania odpowiedzi przeciwnowotworowej indukowanej terapią z ONCOS-212.

Istnieje coraz więcej dowodów na to, że profil limfocytów naciekających na guz może działać jako niezależny czynnik predykcyjny rokowań pacjentów nowotworowych. Ponadto mając na uwadze opublikowane wyniki prac w zakresie oceny infiltracji limfocytów naciekających na guz na modelach czerniaka i międzybłoniaka (**Publikacje A5, A8**) dokonaliśmy również oceny właściwości immunomodulacyjnych testowanych wektorów w tym eksperymencie.

Często uważa się, że odsetek wykrywalnych limfocytów T CD8⁺ z granzymem B⁺ koreluje z liczbą aktywowanych limfocytów T CD8⁺ (powszechnie określanych jako cytotoksyczne limfocyty T). Grupy leczone ONCOS-210, ONCOS-212 wykazywały znacznie wyższy odsetek limfocytów T CD8⁺ granzym B⁺ naciekających na guz w 28 dniu niż kontrola (**Ryc. 7, Publikacja A9**), co wskazuje, że mechanizmy immunologiczne obejmujące aktywowane limfocyty T CD8⁺ przyczyniły się do zmniejszenia objętości guza.

Reasumując, wszystkie testowane wektory nowej generacji wykazywały aktywność onkolityczną na czterech liniach czerniaka w warunkach *in vitro*. Leczenie z ONCOS-212 znacząco hamowało wzrost guza w modelu nowotworu A2058 BALB/c nu w porównaniu z grupą kontrolą. Zaobserwowano synergistyczny efekt przeciwnowotworowy w terapii z ONCOS-212. Wirusy onkolityczne również znacząco hamowały wzrost guza w humanizowanym modelu czerniaka huNOG CD34⁺. Wszystkie wirusy znacząco zwiększyły odsetek aktywowanych limfocytów T CD8⁺ naciekających na guz. Zaobserwowany abskopalny efekt leczenia terapii z ONCOS-212 w modelu huNOG potwierdza hipotezę, że odpowiedź immunologiczna odgrywa kluczową rolę w aktywności przeciwnowotworowej ONCOS-212.

- V. **Kuryk, L.**; Bertinato, L.; Staniszevska, M.; Pancer, K.; Wieczorek, M.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; Garofalo, M. From Conventional Therapies to Immunotherapy: Melanoma Treatment in Review. *Cancers* **2020**, 12, doi:10.3390/cancers12103057. **IF₂₀₂₀=6,639, MEiN₂₀₂₃=140 [A6]**

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji pracy przeglądowej, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką

przeglądu zakresu literatury, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu. Autor korespondencyjny.

Moje zainteresowanie immunoterapią, wirusami onkolitycznymi, onkologią zaowocowało analizą obecnego stanu wiedzy w zakresie obecnych jak i nowych obiecujących terapii w leczeniu czerniaka z wykorzystaniem wirusoterapii.

W pracy przeglądowej omówiono zastosowanie wirusów onkolitycznych i inhibitorów punktów kontrolnych w immunoterapii czerniaka, ze szczególnym uwzględnieniem terapii skojarzonych. Wirusy onkolityczne są obiecującymi i unikalnymi czynnikami przeciwnowotworowymi, obecnie badanymi w wielu badaniach klinicznych zarówno w monoterapii, jak i w połączeniu z innymi lekami. Wirusy onkolityczne mają unikalne zdolności do synergicznych interakcji przeciwnowotworowych z inhibitorami punktów kontrolnych, chemioterapią, radioterapią. Terapia łączona wirusów onkolitycznych z inhibitorami punktów kontrolnych jest obiecującą strategią przyszłych terapii przeciwnowotworowych. Jednak leczenie zaawansowanych postaci nowotworów, w tym efektywne stymulowanie immunologicznej odpowiedzi przeciwnowotworowej celem eradykacji komórek nowotworowych jest ciągłym wyzwaniem. Pomimo obecnych postępów w badaniach, monoterapia z użyciem wirusów onkolitycznych wykazuje ograniczoną skuteczność w leczeniu zaawansowanych guzów litych.

Dlatego też prowadzone są intensywne prace celem ulepszenia właściwości przeciwnowotworowych wektorów przez ich genetyczne modyfikowanie, celem zwiększenia ich immunogenności, właściwości onkolitycznych, czy immunostymulacyjnych. Co więcej terapie łączone są obecnie szeroko testowanym schematem w leczeniu nowotworów.

Odkrycie inhibitorów punktów kontrolnych limfocytów T i wirusoterapii onkolitycznej zmieniło paradygmat leczenia onkologicznego niektórych typów nowotworów i pokazało wzorzec przejścia od terapii konwencjonalnych do immunoonkologii. Wirusy onkolityczne mogą indukować odporność przeciwnowotworową i prowadzić do infiltracji limfocytów naciekających na guz. Z kolei blokada punktów kontrolnych może zapobiegać hamowaniu aktywności limfocytów T. Dlatego połączenie tych środków wydaje się być skutecznym schematem leczenia w walce z immunogennymi typami nowotworów, takimi jak czerniak.

- VI. Kuryk, L.;** Rodella, G.; Staniszevska, M.; Pancer, K.W.; Wieczorek, M.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; Garofalo, M. Novel Insights Into Mesothelioma Therapy: Emerging Avenues and Future Prospects. *Frontiers in oncology* **2022**, 12, 916839, doi:10.3389/fonc.2022.916839. IF₂₀₂₂=4,7, MEiN₂₀₂₂=100 [A7]

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji pracy przeglądowej, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu. Autor korespondencyjny.

Realizując konsekwentnie oraz wielowątkowo badania nad cyklem powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt. „Zastosowanie adenowirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej” dokonano również analizy obecnego stanu wiedzy w zakresie obecnych jak i nowych obiecujących terapii w leczeniu międzybłoniaka z wykorzystaniem wirusów onkolitycznych.

Międzybłoniak złośliwy to rzadki i agresywny nowotwór, który rozwija się w cienkiej warstwie otaczającej mezotelium i jest spowodowany głównie narażeniem na działanie azbestu. Pomimo poprawy rokowania pacjentów leczonych za pomocą konwencjonalnych metod, takich jak chirurgia, chemioterapia, radioterapia, immunoterapia, niestety nadal nie ma skutecznych metod leczenia zaawansowanej choroby.

Pomimo ogromnych wysiłków na rzecz lepszego zrozumienia i leczenia międzybłoniaka, praktyka kliniczna nie zmieniła się radykalnie w ostatnich dziesięcioleciach. Aby przyspieszyć rozwój nowych opcji leczenia, należy przeprowadzić racjonalne i dobrze zaprojektowane badania oraz zbadać spersonalizowane podejście.

W ostatnich latach poszukiwano nowych i efektywniejszych metod terapeutycznych leczenia międzybłoniaka. Lepsze zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw dynamicznej interakcji guza z układem odpornościowym pacjenta doprowadziło do opracowania obiecujących schematów leczenia z zastosowaniem immunoterapii (przeciwciała anty PD-1 plus przeciwciała anty CTLA-4).

Inhibitory immunologicznych punktów kontroli, adenowirusy onkolityczne i ich kombinacja stanowią obiecującą strategię, którą można wykorzystać do synergistycznego przezwyciężenia immunosupresji w mikrośrodku guza międzybłoniaka. Niniejszy przegląd stanowi syntetyczny przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat nowych opcji terapeutycznych międzybłoniaka, ze szczególnym uwzględnieniem wyników badań klinicznych.

Badania z użyciem inhibitorów punktów kontroli wykazały imponujące odpowiedzi kliniczne u pacjentów z nowotworami litymi, w tym międzybłoniaka. Jednak ich wpływ na długość przeżycia pacjentów z międzybłoniakiem jest niestety niewielki. Dlatego też duże nadzieje podkładane są w innowacyjnych terapiach, takich jak np. wirusoterapia onkolityczna

w połączeniu z inhibitorami punktów kontroli, które mogą zapewnić efektywne leczenia zaawansowanych nowotworów międzybłoniaka.

2. Prace dotyczące realizacji osiągnięcia drugiego: Ocena bezpieczeństwa stosowania adenowirusów onkolitycznych – badania przedkliniczne in vivo (Publikacje: A1, A2, A5, A9 - prace oryginalne)

- VII. Kuryk, L.;** Vassilev, L.; Ranki, T.; Hemminki, A.; Karioja-Kallio, A.; Levalampi, O.; Vuolanto, A.; Cerullo, V.; Pesonen, S. Toxicological and bio-distribution profile of a GM-CSF-expressing, double-targeted, chimeric oncolytic adenovirus ONCOS-102 - Support for clinical studies on advanced cancer treatment. *PloS one* **2017**, *12*, e0182715, doi:10.1371/journal.pone.0182715. **IF₂₀₁₇=2,766, MEiN₂₀₁₇=40 [A2]**

Terapia z zastosowaniem chimerycznego adenowirusa onkolitycznego ONCOS-102 jest bezpieczna i dobrze tolerowana - profil toksykologiczny i biodystrybucyjny na modelu chomika syryjskiego (badania GLP)

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w przygotowaniu przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynowanie prac, analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu, korespondencja z redakcją. Autor korespondencyjny.

Głównym celem badań przedklinicznych poza określeniem efektywności, jest ocena bezpieczeństwa i stworzenie solidnych podstaw naukowych przed przejściem do fazy opracowania klinicznego. Celem badań nad bezpieczeństwem jest określenie działań niepożądanych dotyczących głównych funkcji fizjologicznych przy podawaniu dawek testowanego preparatu w zakresie stężenia leczniczego i wyższych.

Celem pracy naukowej w warunkach GLP było przeprowadzenie przedklinicznych badań w zakresie oceny toksyczności i biodystrybucji wymaganych do zatwierdzenia przez organ regulacyjny w Finlandii (Finnish Medicines Agency, FIMEA) wniosku o przeprowadzenie badań klinicznych fazy I z terapeutycznym ONCOS-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) w leczeniu zaawansowanych nowotworów (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01598129, ONCOS-102 for Therapy of Advanced Cancers, Finlandia).

Badania zostały zaprojektowane celem oceny toksyczności oraz profilu biodystrybucji wirusa w terapii z ONCOS-102 na modelu chomika syryjskiego. Badanie przeprowadzono na 300 chomikach podzielonych na dziewięć grup: trzy grupy biodystrybucyjne i sześć grup do analizy toksyczności (**Tabela 1, Publikacja A2**). Wirus ONCOS-102 był podawany przez iniekcje dosercowe, dootrzewnowe lub podskórne w dawkach od $4,5 \times 10^{10}$ do $4,5 \times 10^{12}$ cząstek

wirusa/kg (co odpowiadało od 10x do 1000x dawki klinicznej). Dodatkowo jedna grupa badana, otrzymywała dootrzewnowo dwa razy w tygodniu cyklofosamid. Zwierzęta kontrolne otrzymywały roztwór NaCl w takich samych ilościach i z zastosowaniem identycznych dróg podania jak to miało miejsce w grupach badanych otrzymujących ONCOS-102.

Nie odnotowano skutków ubocznych wielokrotnego podawania ONCOS-102, mających wpływ na masę ciała (**Ryc. 1-2, Publikacja A2**), spożycie pokarmu (**Ryc. 3, Publikacja A2**), parametry hematologiczne (**Tabela S3, Publikacja A2**) i chemii klinicznej (**Tabela S4, Publikacja A2**), w trakcie 6-miesięcznego okresu podawania. Nie zaobserwowano zmian histopatologicznych świadczących o toksyczności wirusa ONCOS-102 (**Ryc. S6-S7, Publikacja A2**). Wirus nie akumulował się w badanych tkankach (**Ryc. S4-S5, Ryc. 4-6, Publikacja A2**). U wszystkich zwierząt wykryto powstanie przeciwciał neutralizujących wirusa ONCOS-102 (**Ryc. S1-S3, Publikacja A2**), co świadczy o jego immunogenności.

Uzyskane wyniki wskazują, że w powyższych warunkach badania wielokrotne podawanie wirusa onkolitycznego ONCOS-102 chomikom syryjskim, było dobrze tolerowane, bez istotnych objawów wskazujących na działanie toksyczne.

Wirus został zatwierdzony do testowania w badaniach klinicznych fazy I. Badania kliniczne prowadzono w latach 2012-2013 w Finlandii na populacji 12 pacjentów onkologicznych w zaawansowanej fazie choroby (ONCOS-102 for Therapy of Advanced Cancers, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01598129).

Na podstawie badań klinicznych z ONCOS-102, wykazano, że jego zastosowanie jest bezpieczne i dobrze tolerowane w testowanych dawkach. Nie określono toksyczności ograniczającej dawkę (DLT) ani maksymalnej tolerowanej dawki (MTD) dla ONCOS-102. U czterech z dziesięciu (40%) pacjentów podlegających ocenie zaobserwowano stabilizację choroby na podstawie badania PET/TK po 3 miesiącach od podania wirusa, a mediana przeżycia całkowitego wyniosła 9,3 miesiąca. Zaobserwowano nacieki limfocytów naciekających na guz po zastosowaniu leczenia u 11 z 12 pacjentów. Co ważne, leczenie wywołało infiltrację komórek T CD8⁺ do guzów i zwiększenie ekspresji PD-L1, co podkreśla potencjał ONCOS-102 jako czynnika immuno-uwrażliwiającego w terapiach skojarzonych z inhibitorami punktów kontrolnych [10,14,36].

- I. Kuryk, L.;** Haavisto, E.; Garofalo, M.; Capasso, C.; Hirvinen, M.; Pesonen, S.; Ranki, T.; Vassilev, L.; Cerullo, V. Synergistic anti-tumor efficacy of immunogenic adenovirus ONCOS-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) and standard of care chemotherapy in preclinical mesothelioma model. *International journal of cancer* **2016**, 139, 1883-1893, doi:10.1002/ijc.30228. **IF₂₀₁₆=6,513, MEiN₂₀₁₆=40 [A1]**

Terapia skojarzona z udziałem wirusa onkolitycznego ONCOS-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) w połączeniu ze standardową chemioterapią w leczeniu międzybłoniaka jest dobrze tolerowana – badania przedkliniczne *in vivo*

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, udział w realizacji badań (badania *in vitro* oraz *in vivo*), analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu.

Głównym celem badań była ocena właściwości przeciwnowotworowych nowej terapii składającej się z wirusa onkolitycznego AdV5/3-D24-GM-CSF (ONCOS-102) w połączeniu z chemioterapeutykami pierwszego rzutu (pemetreksed + cisplatyna oraz pemetreksed + karboplatyna) w badaniach *in vitro* na liniach międzybłoniaka oraz na modelu ksenoprzeszczepu międzybłoniaka H226 (BALB/c nu) *in vivo* (**Tabela 1, Publikacja A1**).

W ramach badań dokonaliśmy oceny bezpieczeństwa terapii, celem kompleksowego przetestowania badanej terapii eksperymentalnej zarówno pod względem efektywności jak i pod względem jej bezpieczeństwa w warunkach *in vivo*.

Wszystkie zwierzęta obserwowano codziennie pod kątem objawów klinicznych, zachorowalności lub śmiertelności podczas aklimatyzacji oraz w czasie dwumiesięcznej terapii. Myszy były leczone wirusem ONCOS-102 od 1×10^8 do 2×10^8 cząstek wirusa/dawkę podawanym bezpośrednio do guza. Chemioterapeutyki: pemetreksed (6,7 mg/kg - 10 mg/kg), cisplatyna (1,5 mg/kg), karboplatyna (5,4 – 8 mg/kg) były podawane dootrzewnowo. Na podstawie trzech doświadczeń przeprowadzonych na zwierzętach nie zaobserwowano spadku masy ciała (**Ryc. S1-S3, Publikacja A1**), objawów klinicznych, zachorowań czy zmian patologicznych. Terapia była dobrze tolerowana i nie stwierdzono skutków ubocznych w badaniach przeprowadzonych *in vivo* na modelu ksenoprzeszczepu międzybłoniaka H226 (BALB/c nu).

Wyniki badań zostały wykorzystane do oceny bezpieczeństwa i tolerancji testowanych terapeutów, a następnie do rozpoczęcia badań klinicznych w Hiszpanii oraz Francji w latach 2016-2020 (A Randomised Phase II Open-label Study With a Phase Ib Safety lead-in Cohort of ONCOS-102, an Immune-priming GM-CSF Coding Oncolytic Adenovirus, and Pemetrexed/Cisplatin in Patients With Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02879669).

- II. Kuryk, L.; Moller, A.W.; Jaderberg, M.** Combination of immunogenic oncolytic adenovirus ONCOS-102 with anti-PD-1 pembrolizumab exhibits synergistic antitumor effect in humanized A2058 melanoma huNOG mouse model. *Oncoimmunology* **2019**, 8, e1532763, doi:10.1080/2162402X.2018.1532763. **IF₂₀₁₉=5,869, MEiN₂₀₁₉=140 [A5]**

Terapia skojarzona z udziałem wirusa onkolitycznego ONCOS-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) w połączeniu z inhibitorami punktów kontroli w leczeniu czerniaka jest dobrze tolerowana – badania przedkliniczne *in vivo*

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, nadzór nad realizacją badań, analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu, korespondencja z redakcją. Autor korespondencyjny.

Celem kolejnych prac doświadczalnych było zbadanie profilu bezpieczeństwa badanego wirusa onkolitycznego ONCOS-102 w terapii skojarzonej z przeciwciałami anty PD-1 (nowa terapia eksperymentalna) na mysim modelu ludzkiego ksenoprzeszczepu czerniaka A2058 na myszach humanizowanych (huNOG CD34+).

Wszystkie zwierzęta obserwowano pod kątem objawów klinicznych, zachorowalności lub śmiertelności podczas aklimatyzacji oraz w czasie trwania terapii. Myszy były leczone wirusem ONCOS-102 w dawce 5×10^6 cząstek wirusa/dawa podawanym doustnie. Anty PD-1 był podawany dożylnie w dawkach od 200 do 400 μg /dawka (**Tabela 2, Publikacja A5**). Analogicznie do opublikowanych wyników w *International Journal of Cancer*, *PLOS one* (**Publikacja A1, A2**) nie zaobserwowano spadku masy ciała (**Ryc. S4, Publikacja A5**), objawów klinicznych, zachorowań czy zmian patologicznych. Terapia była dobrze tolerowana i nie wywołała skutków ubocznych w testowanych dawkach na testowanych myszach huNOG CD34+.

Wyniki badań zostały wykorzystane do oceny profilu bezpieczeństwa testowanych terapeutów, oraz do rozpoczęcia badań klinicznych w USA w latach 2016-2020 (A Pilot Study of Sequential ONCOS-102, an Engineered Oncolytic Adenovirus Expressing GM-CSF, and Pembrolizumab in Patients With Advanced or Unresectable Melanoma Progressing After Programmed Cell Death Protein 1 (PD1) Blockade, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT030036769).

- IV. Kuryk, L.; Møller, A.-S.W.** Next generation of oncolytic viruses with the double transgenes PADI1 and TIMP-2 exhibit anti-tumor activity against melanoma in nude mouse and humanized NOG mouse models. *Molecular Therapy - Oncolytics* **2023**, doi:10.1016/j.omto.2023.01.002. **IF₂₀₂₃=5,7, MEiN₂₀₂₃=100 [A9]**

Terapia z zastosowaniem wektora onkolitycznego nowej generacji, uzbrojonego w transgeny: PADI1 oraz TIMP-2 jest bezpieczna w leczeniu czerniaka – badania przedkliniczne *in vivo*

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, nadzór nad realizacją badań, analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu, korespondencja z redakcją. Autor korespondencyjny.

W ramach zaprojektowanych badań postanowiono kontynuować prace badawcze nad oceną bezpieczeństwa terapii z użyciem wektorów nowej generacji. W tym celu na podstawie wyników badań z użyciem wcześniej opracowanych i przetestowanych wektorów onkolitycznych (**Publikacja A1, A2, A5**), postanowiono dokonać oceny bezpieczeństwa i tolerancji testowanych terapii na mysim modelu ludzkiego ksenoprzeszczepu czerniaka A2058 na myszach humanizowanych (huNOG CD34+).

Analogicznie do wcześniejszych badań (**Publikacja A1, A2, A5**), zwierzęta obserwowano pod kątem objawów klinicznych, zachorowalności lub śmiertelności podczas aklimatyzacji oraz w czasie trwania terapii. Myszy były leczone wirusem ONCOS-102 w dawce od 5×10^6 do 1×10^9 cząstek wirusa/dawka podawanym doustnie (**Tabela S4, Ryc. S3, Publikacja A9**). Zgodnie z wcześniejszymi wynikami (**Publikacja A1, A2, A5**) nie zaobserwowano spadku masy ciała (**Ryc. 4, Publikacja A9**), objawów klinicznych (**Tabela S3, Publikacja A9**), zachorowań czy zmian patologicznych po zastosowaniu terapii z onkolitycznymi wirusami nowej generacji. Terapia była dobrze tolerowana i nie wywołała skutków ubocznych w testowanych dawkach na myszach humanizowanych huNOG CD34+.

3. Prace dotyczące realizacji osiągnięcia trzeciego: Opracowanie produkcji oraz przeprowadzenie charakterystyki adenowirusów onkolitycznych (Publikacje: A3, A4 - prace oryginalne)

Trzecim osiągnięciem w ramach cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt. **“Zastosowanie adenowirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej”** było opracowanie produkcji wektorów onkolitycznych w skali laboratoryjnej oraz ich charakterystyki.

- VIII. **Kuryk, L.**; Moller, A.W.; Vuolanto, A.; Pesonen, S.; Garofalo, M.; Cerullo, V.; Jaderberg, M. Optimization of Early Steps in Oncolytic Adenovirus ONCOS-401 Production in T-175 and HYPERFlasks. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20030621. **IF₂₀₁₉=4,556, MEiN₂₀₁₉=100 [A4]**

Optymalizacja produkcji adenowirusa onkolitycznego ONCOS-401 w butelkach T-175 oraz HYPERFlaskach w skali laboratoryjnej

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, udział w realizacji badań (badania *in vitro*), analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu, korespondencja z redakcją. Autor korespondencyjny.

Dużym wyzwaniem dla przemysłu biofarmaceutycznego jest rozwój technologii dla skalowalnej produkcji adenowirusów onkolitycznych na potrzeby badań klinicznych. Na podstawie obiecujących wyników badań przedklinicznych jak i klinicznych [37] postanowiliśmy zoptymalizować proces produkcji wirusa onkolitycznego ONCOS-401 w skali laboratoryjnej oraz ocenić możliwości zwiększenia produkcji z wykorzystaniem butelek T-175 oraz HYPERFlasków.

Optymalizacja procesu namnażania adenowirusów onkolitycznych poprzez ustalenie optymalnych warunków i parametrów replikacji wirusów jest niezbędna, a jej celem jest uzyskanie maksymalnego stężenia cząstek wirusowych. Optymalizacja obejmuje takie parametry jak np.: konfluencja komórek, warunki prowadzenia hodowli komórkowych, dawki infekcyjne MOI (ang. multiplicity of infection), czas zbioru wirusa, metoda zbioru, proces oczyszczania cząstek wirusowych.

Celem prac była optymalizacja procesu produkcji dla wektora onkolitycznego ONCOS-401 w komórkach A549 w skali laboratoryjnej. Zarówno parametry hodowli, jak i metody zbierania komórek zakażonych wirusem zostały zbadane i udoskonalone w ramach przeprowadzonych badań. Proces optymalizacji produkcji został przeprowadzony w butelkach T-175 oraz HYPERFlaskach, które posłużyły jako pomniejszony model dla bioreaktora. Celem minimalizacji ryzyka rekombinacji E1A i generacji wirusów typu dzikiego, w procesie produkcji została wykorzystana linia A549. Zwiększenie skali produkcji oceniono w systemach T-175 oraz HYPERFlask. Porównano pięć metod zbioru komórek zakażonych wirusem ONCOS-401 (**Tabela 2, Publikacja A4**). Zbadano całkowitą liczbę cząstek wirusowych wyprodukowanych w danej partii oraz określono wydajność (zakażne cząstki wirusowe/komórkę; zakażne cząstki wirusowe) (**Tabela 1, Publikacja A4**).

Wykazaliśmy, że najlepsze warunki produkcji dla wirusów ONCOS-401 w obu systemach: butelki T-175 oraz HYPERFlaski były następujące: i) gęstość odpowiednio 15,000 oraz 220,000 komórek A549/cm² (80% konfluencji), ii) dawka infekcyjna MOI wynoszące 30 (30 zakaźnych cząstek wirusa/komórkę), iii) okres inkubacji 66 godzin (**Ryc. 1-2, Publikacja A4**). Optymalną metodą lizy komórek A549 było zastosowanie benzonazy (odpowiednio 10,887 ± 100 i 14,559 ± 802 zakaźnych cząstek wirusa na komórkę odpowiednio dla T-175 oraz HYPERFlaski). W butelkach T-175 oraz HYPERFlaski uzyskano odpowiednio do 2,1 x 10⁹ ± 0,2 oraz 1,75 x 10⁹ ± 0,08 cząstek zakaźnych ONCOS-401 (**Tabela 1, Publikacja A4**).

Nasze badania udoskonaliły proces produkcji wektora onkolitycznego ONCOS-401 i można go będzie zastosować w przypadku namnażania innych wirusów onkolitycznych.

- IX. Kuryk, L.; Moller, A.W.; Jaderberg, M. Quantification and functional evaluation of CD40L production from the adenovirus vector ONCOS-401. *Cancer Gene Ther* 2019, 26, 26-31, doi:10.1038/s41417-018-0038-x. IF₂₀₁₉=4,534, MEiN₂₀₁₉=100 [A3]**

Kwantyfikacja i funkcjonalna ocena produkcji białka kostymulującego CD40L przez rekombinowany wektor adenowirusa onkolitycznego ONCOS-401

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, udział w realizacji badań (badania *in vitro*), analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu, korespondencja z redakcją. Autor korespondencyjny.

Odporność nabyta obejmuje aktywację limfocytów T poprzez prezentację antygenu przez komórki prezentujące antygen (APC) wraz z działaniem cząsteczek kostymulujących i receptorów rozpoznawania patogenów. CD40 jest białkiem występującym na powierzchni komórek prezentujących antygen, niezbędnym do ich aktywacji i dostarczającym sygnał kostymulujący limfocytom T, poprzez interakcje z ligandem CD40L znajdującym się na ich powierzchni. Biorąc pod uwagę ważną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej, cząsteczki CD40/CD40L są wykorzystywane do opracowywania szczepionek przeciwnowotworowych.

Adenowirus onkolityczny ONCOS-401 został uzbrojony w gen kostymulujący CD40L, celem aktywacji komórek prezentujących antygen, w tym indukcji odpowiedzi przeciwnowotworowej [37].

Opracowywanie i walidacja metod analitycznych mają kluczowe znaczenie dla uzyskania wiarygodnych i powtarzalnych danych analitycznych niezbędnych do osiągnięcia kolejnego etapu rozwoju badanych preparatów terapeutycznych. Procesy te mogą być złożone, kosztowne i pracochłonne. Dobre zrozumienie istniejących oczekiwań regulacyjnych w połączeniu z odpowiednimi metodami odzwierciedlającymi mechanizm działania immuno-terapeutyków ma kluczowe znaczenie dla opracowania wydajnych, dokładnych i niezawodnych metod analitycznych.

Celem badań było opracowanie metody przydatnej zarówno do oceny ilościowej jak i funkcjonalnej białka CD40L wytwarzanego przez wirusa ONCOS-401.

Wyniki badań wykazały, że funkcjonalne białko CD40L, zdolne jest do wiązania i aktywacji NF- κ B - zależnej kaskady sygnalizacyjnej prowadzącej do wytwarzania zarodkowej fosfatazy alkalicznej w komórkach HEK-293 BLUE. Ponadto, za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA, oznaczono ilościowe stężenie białka CD40L w hodowli *in vitro* komórek HEK-293 BLUE zakażonych ONCOS-401.

Wykazaliśmy (n=3 eksperymenty), że metoda oparta na zastosowaniu linii komórkowej HEK-293 BLUE jest wiarygodna i może być wykorzystywana do oceny funkcjonalności transgenu CD40L (**Ryc. 1, Publikacja A3**). Odpowiedź komórek HEK-293 BLUE na stymulację z wirusem ONCOS-401 była 8,73–11,8 razy wyższa niż kontrola negatywna, oraz 9,46–10,98 wyższa niż w przypadku wirusa ONCOS-102. Wyniki spełniły kryterium $CV \leq 20\%$ (precyzja wewnątrz i między testami) (**Tabela 1, Publikacja A3**).

Czułość oraz precyzję ELISA oceniano przez dodanie 100 μ l standardu (666,7 pg/ml) do 100 μ l próbki testowej. Stężenie CD40L wyniosło 0,1–0,12 μ g/mL. Precyzja oznaczeń wyniosła 8,9% (**Tabela 1, Publikacja A3**).

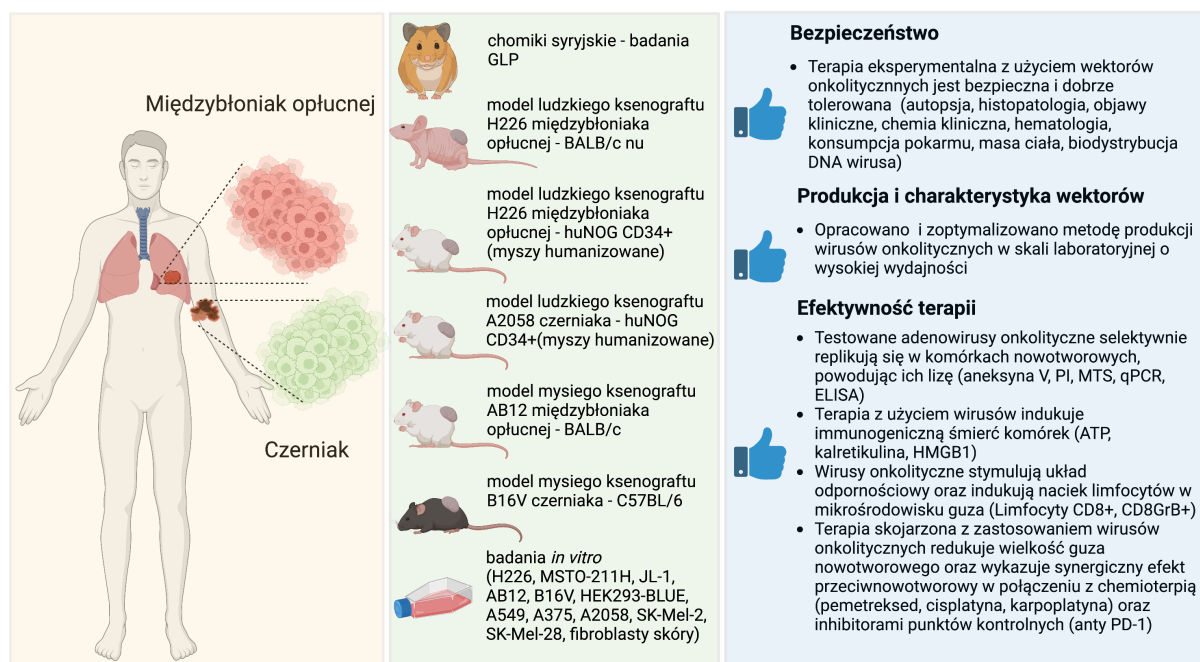
Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych eksperymentów wykazaliśmy, że do oceny funkcjonalności białka CD40L, produkowanego przez rekombinowany wektor ONCOS-401, może być wykorzystana metoda oparta na zastosowaniu genetycznie zmodyfikowanej linii komórek HEK-293 BLUE. ELISA może być użytecznym narzędziem do ilościowego oznaczenia białka CD40L. Przewagą metody HEK-293 BLUE jest możliwość oznaczeń zarówno ilościowych jak i jakościowych, jednakże metoda jest bardziej skomplikowana i złożona niż test ELISA.

E. PODSUMOWANIE.

W ramach cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt. ‘‘Zastosowanie adenowirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej’’ wykazałem, że (Ryc. 3):

- Skonstruowane adenowirusy onkolityczne selektywnie replikują się w komórkach nowotworowych i powodują ich lizę (onkoliza).
- Terapia z zastosowaniem testowanych adenowirusów onkolitycznych indukuje immunogenną śmierć komórek nowotworowych.
- Immunoterapia wirusami onkolitycznymi w połączeniu z chemioterapią oraz inhibitorami punktów kontrolnych prowadzi do synergicznych efektów przeciwnowotworowych.
- Terapia oparta na adenowirusach onkolitycznych (AdV5/3-D24-GM-CSF) prowadzi do abskopalnego efektu przeciwnowotworowego.
- Adenowirusy onkolityczne, opisane w ramach cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych, wykazują unikalne właściwości przeciwnowotworowe modulując mikrośrodowisko guza, poprzez indukcję infiltracji limfocytów naciekających na guz.
- Genetyczna modyfikacja adenowirusów umożliwia uzbrojenie wektorów w geny immunostymulujące, wykazujące właściwości przeciwnowotworowe poprzez aktywację limfocytów cytotoksycznych CD8+.
- Badania pozwoliły na udoskonalenie produkcji wektora onkolitycznego ONCOS-401. Proces ten może być również stosowany do optymalizacji produkcji innych wirusów onkolitycznych.

Schematyczne podsumowanie wyników zamieszczono na **Ryc. 3**.



Ryc. 3. Schematyczne podsumowanie wyników badań w ramach cyklu powiązanych tematycznie artykułów naukowych pt. ‘Zastosowanie adenowirusów onkolitycznych w terapii przeciwnowotworowej’. Wirusy onkolityczne są obiecującą oraz bezpieczną metodą leczenia nowotworów. Wykazano korelację między efektywnością kliniczną (redukcja wielkości guza nowotworowego) a liczbą limfocytów cytotoksycznych CD8+GrB+ naciekających na guz. Grafikę wykonano przy użyciu oprogramowania z licencją Biorender.

F. NAJWIĘKSZE OSIĄGNIĘCIA W RAMACH CYKLU POWIĄZANYCH TEMATYCZNIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH ZNACZNY WKŁAD W ROZWÓJ DYSCYPLINY NAUKI O ZDROWIU.

- Wykonane badania dotyczą zagadnień związanych z walką z chorobami nowotworowymi, a więc stanowią istotny wkład dla rozwoju nauk o zdrowiu obejmujących zagadnienia terapii chorób onkologicznych. Wiadomo, że nowotwory stanowią istotny problem zarówno zdrowotny jak i ‘ekonomiczny’, a więc uzyskane wyniki wnoszą znaczący wkład w rozwój nowoczesnych procedur terapeutycznych.
- Opracowano unikalne wektory onkolityczne następnej generacji (AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L, AdV5/3-D24-PADI1, AdV5/3-D24-TIMP2, AdV5/3-D24-PADI1-TIMP2).
- Opracowano innowacyjne metody leczenia międzybłoniaka i czerniaka z zastosowaniem adenowirusów onkolitycznych w połączeniu z chemioterapią oraz inhibitorami punktów kontrolnych, które mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu innych guzów litych.

- Obiecujące wyniki badań przedklinicznych były podstawą do rozpoczęcia badań klinicznych fazy I w leczeniu i) międzybłoniaka (A Randomised Phase II Open-label Study With a Phase Ib Safety lead-in Cohort of ONCOS-102, an Immune-priming GM-CSF Coding Oncolytic Adenovirus, and Pemetrexed/Cisplatin in Patients With Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02879669, badania prowadzone były we Francji oraz w Hiszpanii), oraz ii) czerniaka (A Pilot Study of Sequential ONCOS-102, an Engineered Oncolytic Adenovirus Expressing GM-CSF, and Pembrolizumab in Patients With Advanced or Unresectable Melanoma Progressing After Programmed Cell Death Protein 1 (PD1) Blockade, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT030036769).
- Przeprowadzone badania wykazały, że terapia wirusami onkolitycznymi jest dobrze tolerowana i bezpieczna (badania GLP). Na podstawie badań przedklinicznych wirus ONCOS-102 został zatwierdzony do testowania w badaniach klinicznych fazy I. Badania kliniczne prowadzono w latach 2012-2013 w Finlandii na populacji 12 pacjentów onkologicznych w zaawansowanej fazie choroby (ONCOS-102 for Therapy of Advanced Cancers, ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01598129).
- Opracowano metody analityczne do oceny funkcjonalności oraz oznaczeń ilościowych białka CD40L produkowanego przez rekombinowany wektor ONCOS-401.
- Innowacyjne terapie przeciwnowotworowe z użyciem wirusa ONCOS-102 w połączeniu z chemioterapią (Combining adenovirus and chemotherapeutic agents for treating cancer) oraz inhibitorami punktów kontrolnych (Combining adenovirus and checkpoint inhibitor for treating cancer) zostały opatentowane i są prawne chronione w UE, USA, Chinach (EP3402889, 201780006703.7, FI127460B; WO2018046803, 16330274).

5. WYKAZ POZOSTAŁYCH, OPUBLIKOWANYCH ARTYKUŁÓW W CZASOPISMACH NAUKOWYCH – POZOSTAŁE ISTOTNE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE STANOWIĄCE ZNACZĄCY WKŁAD W ROZWÓJ DYSCYPLINY NAUKI O ZDROWIU (SPOZA CYKLU PRAC, O KTÓRYM MOWA W PUNKCIE 4).

Oprócz cyku dziewięciu prac prezentowanego w punkcie 4, brałem udział w międzynarodowych badaniach realizowanych w wielośrodkowych jednostkach naukowych mających na celu i) charakterystykę genotypową i molekularną szczepów wirusa polio oraz enterowirusów wyizolowanych z próbek materiału środowiskowego, ii) opracowanie

innowacyjnych rozwiązań w immunoterapii nowotworów, iii) badania nad enkapsulacją wektorów onkolitycznych z użyciem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, iv) badania nad lekami przeciwgrzybicznymi w leczeniu pacjentów z infekcją o etiologii *Candida spp.* Prace naukowe prowadzone były we współpracy z wiodącymi ośrodkami naukowymi głównie w Niemczech (Robert Koch Institute), Finlandii (University of Helsinki), Włoszech (University of Padova, University of Milan), Hiszpanii (Bellvitge Biomedical Research Institute – IDIBELL, Catala Institute of Oncology), Austrii (Medical University of Graz), Polsce (Politechnika Warszawska). Ich efektem są liczne prace naukowe opublikowane w międzynarodowych czasopismach (łącznie 40 artykułów naukowych, w tym 9 publikacji stanowiących cykl), a także liczne wystąpienia na konferencjach naukowych (28 opublikowanych streszczeń konferencyjnych w międzynarodowych czasopismach naukowych).

Okres pomiędzy uzyskaniem stopnia doktora a przygotowaniem autoreferatu pracy habilitacyjnej

1. *Shoushtari, A.N.; Olszanski, A.J.; Nyakas, M.; Hornyak, T.J.; Wolchok, J.D.; Levitsky, V.; **Kuryk, L.**; Hansen, T.B.; Jaderberg, M. Pilot Study of ONCOS-102 and Pembrolizumab: Remodeling of the Tumor Microenvironment and Clinical Outcomes in Anti-PD-1-Resistant Advanced Melanoma. *Clin Cancer Res* **2023**, 29, 100-109, doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-2046. **IF₂₀₂₃=13,801**
2. *Baran, J.; Sobiepanek, A.; Mazurkiewicz-Pisarek, A.; Rogalska, M.; Gryciuk, A.; **Kuryk, L.**; Abraham, S.N.; Staniszevska, M. Mast Cells as a Target—A Comprehensive Review of Recent Therapeutic Approaches. *Cells* **2023**, 12, doi:10.3390/cells12081187. **IF₂₀₂₃=7,666**
3. *Gryciuk, A.; Rogalska, M.; Baran, J.; **Kuryk, L.**; Staniszevska, M. Oncolytic Adenoviruses Armed with Co-Stimulatory Molecules for Cancer Treatment. *Cancers* **2023**, 15, doi:10.3390/cancers15071947. **IF₂₀₂₃=7,575**
4. *Baran, J.; Rogalska, M.; **Kuryk, L.**; Staniszevska, M. Practical applications of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in immunotherapy preclinical research. *Journal of Current Science and Technology* **2022**, 12, 592-604. **IF₂₀₂₂=0**
5. *Sobiepanek, A.; **Kuryk, L.**; Garofalo, M.; Kumar, S.; Baran, J.; Musolf, P.; Siebenhaar, F.; Fluhr, J.W.; Kobiela, T.; Plasenzotti, R.; et al. The Multifaceted Roles of Mast Cells in Immune Homeostasis, Infections and Cancers. *Int J Mol Sci* **2022**, 23, doi:10.3390/ijms23042249. **IF₂₀₂₂=6,208**
6. *Staniszevska, M.; Zdrojewski, T.; Gizinska, M.; Rogalska, M.; **Kuryk, L.**; Kowalkowska, A.; Lukowska-Chojnacka, E. Tetrazole derivatives bearing benzodiazepine moiety-synthesis and action mode against virulence of *Candida albicans*. *Eur J Med Chem* **2022**, 230, 114060, doi:10.1016/j.ejmech.2021.114060. **IF₂₀₂₂=7,088**

7. *Staniszewska, M.; **Kuryk, L.**; Gryciuk, A.; Kawalec, J.; Rogalska, M.; Baran, J.; Kowalkowska, A. The Antifungal Action Mode of N-Phenacyldibromobenzimidazoles. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26185463. **IF₂₀₂₁=4,927**
8. *Staniszewska, M.; **Kuryk, L.**; Gryciuk, A.; Kawalec, J.; Rogalska, M.; Baran, J.; Lukowska-Chojnacka, E.; Kowalkowska, A. In Vitro Anti-Candida Activity and Action Mode of Benzoxazole Derivatives. *Molecules* **2021**, *26*, doi:10.3390/molecules26165008. **IF₂₀₂₁=4,927**
9. *Garofalo, M.; Bellato, F.; Magliocca, S.; Malfanti, A.; **Kuryk, L.**; Rinner, B.; Negro, S.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; Mastrotto, F. Polymer Coated Oncolytic Adenovirus to Selectively Target Hepatocellular Carcinoma Cells. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, doi:10.3390/pharmaceutics13070949. **IF₂₀₂₁=6,525**
10. *Garofalo, M.; Bertinato, L.; Staniszewska, M.; Wieczorek, M.; Salmaso, S.; Schrom, S.; Rinner, B.; Pancer, K.W.; **Kuryk, L.** Combination Therapy of Novel Oncolytic Adenovirus with Anti-PD1 Resulted in Enhanced Anti-Cancer Effect in Syngeneic Immunocompetent Melanoma Mouse Model. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, doi:10.3390/pharmaceutics13040547. **IF₂₀₂₁=6,525**
11. *Garofalo, M.; Villa, A.; Brunialti, E.; Crescenti, D.; Dell'Omo, G.; **Kuryk, L.**; Vingiani, A.; Mazzaferro, V.; Ciana, P. Cancer-derived EVs show tropism for tissues at early stage of neoplastic transformation. *Nanotheranostics* **2021**, *1-7*, doi:10.7150/ntno.47226. **IF₂₀₂₁=0**
12. *Gizinska, M.; Staniszewska, A.; Kazek, M.; Koronkiewicz, M.; **Kuryk, L.**; Milner-Krawczyk, M.; Baran, J.; Borowiecki, P.; Staniszewska, M. Antifungal polybrominated proxyphylline derivative induces *Candida albicans* calcineurin stress response in *Galleria mellonella*. *Bioorg Med Chem Lett* **2020**, *30*, 127545, doi:10.1016/j.bmcl.2020.127545. **IF₂₀₂₀=2,823**
13. *Garofalo, M.; Staniszewska, M.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; Pancer, K.W.; Wieczorek, M.; **Kuryk, L.** Prospects of Replication-Deficient Adenovirus Based Vaccine Development against SARS-CoV-2. *Vaccines (Basel)* **2020**, *8*, doi:10.3390/vaccines8020293. **IF₂₀₂₀=4,422**
14. *Staniszewska, M.; Sobiepanek, A.; Gizinska, M.; Pena-Cabrera, E.; Arroyo-Cordoba, I.J.; Kazek, M.; **Kuryk, L.**; Wieczorek, M.; Koronkiewicz, M.; Kobiela, T.; et al. Sulfone derivatives enter the cytoplasm of *Candida albicans* sessile cells. *Eur J Med Chem* **2020**, *191*, 112139, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112139. **IF₂₀₂₀=6,514**
15. *Vitale, A.; Capasso, C.; Leggiero, E.; Garofalo, M.; **Kuryk, L.**; Hirvinen, M.; D'Alessio, F.; Perrotta, C.; Verdesca, F.; Ranieri, A.; et al. Application of array-comparative genomic hybridization analysis in immune-virotherapy approach. *Biochimica Clinica* **2020**, *44*, 61-67, doi:10.19186/BC 2019.053. **IF₂₀₂₀=0**
16. ***Kuryk, L.**; Møller, A.S.W. Chimeric Oncolytic Ad5/3 Virus Replicates and Lyses Ovarian Cancer Cells through Desmoglein-2 Cell Entry Receptor. *Journal of Medical Virology* **2020**, doi:10.1002/jmv.25677. **IF₂₀₂₀=2,327**
17. ***Kuryk, L.**; Moller, A.W.; Jaderberg, M. Abscopal effect when combining oncolytic adenovirus and checkpoint inhibitor in a humanized NOG mouse model of melanoma. *J Med Virol* **2019**, doi:10.1002/jmv.25501. **IF₂₀₁₉=2,021**
18. *Garofalo, M.; Villa, A.; Rizzi, N.; **Kuryk, L.**; Rinner, B.; Cerullo, V.; Yliperttula, M.; Mazzaferro, V.; Ciana, P. Extracellular vesicles enhance the targeted delivery of immunogenic oncolytic adenovirus and paclitaxel in immunocompetent mice. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2019**, *294*, 165-175, doi:10.1016/j.jconrel.2018.12.022. **IF₂₀₁₉=7,727**

19. *Garofalo, M.; Villa, A.; Crescenti, A.; Marzagalli, M.; **Kuryk, L.**; Limonta, P.; Mazzaferro, V.; Ciana, P. Heterologous and cross-species tropism of cancer derived extracellular vesicles. *Theranostics* **2019**, doi:10.7150/thno.34824. **IF₂₀₁₉=8,579**
20. ***Kuryk, L.**; Moller, A.S.W.; Garofalo, M.; Cerullo, V.; Pesonen, S.; Alemany, R.; Jaderberg, M. Antitumor-specific T-cell responses induced by oncolytic adenovirus ONCOS-102 (AdV5/3-D24-GM-CSF) in peritoneal mesothelioma mouse model. *Journal of Medical Virology* **2018**, 90, 1669-1673, doi:10.1002/jmv.25229. **IF₂₀₁₈=2,049**
21. *Garofalo, M.; Villa, A.; Rizzi, N.; **Kuryk, L.**; Mazzaferro, V.; Ciana, P. Systemic Administration and Targeted Delivery of Immunogenic Oncolytic Adenovirus Encapsulated in Extracellular Vesicles for Cancer Therapies. *Viruses-Basel* **2018**, 10, 9, doi:10.3390/v10100558. **IF₂₀₁₈=3,811**
22. *Garofalo, M.; Saari, H.; Somersalo, P.; Crescenti, D.; **Kuryk, L.**; Aksela, L.; Capasso, C.; Madetoja, M.; Koskinen, K.; Oksanen, T.; et al. Antitumor effect of oncolytic virus and paclitaxel encapsulated in extracellular vesicles for lung cancer treatment. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2018**, 283, 223-234, doi:10.1016/j.jconrel.2018.05.015. **IF₂₀₁₈=7,901**
23. *Lipiec, A.; **Kuryk, L.** Onkolityczne wektory wirusowe w immunoterapii nowotworów. *Immunoterapia PZWL* **2018**. **IF₂₀₁₈=0**
24. *Capasso, C.; Magarkar, A.; Cervera-Carascon, V.; Fusciello, M.; Feolaf, S.; Muller, M.; Garofalo, M.; **Kuryk, L.**; Tahtinen, S.; Pastore, L.; et al. A novel in silico framework to improve MHC-I epitopes and break the tolerance to melanoma. *Oncoimmunology* **2017**, 6, 14, doi:10.1080/2162402x.2017.1319028. **IF₂₀₁₇=7,901**

Okres przed uzyskaniem stopnia doktora:

25. *Hirvinen, M.; Capasso, C.; Guse, K.; Garofalo, M.; Vitale, A.; Ahonen, M.; **Kuryk, L.**; Vaha-Koskela, M.; Hemminki, A.; Fortino, V.; et al. Expression of DAI by an oncolytic vaccinia virus boosts the immunogenicity of the virus and enhances antitumor immunity. *Molecular Therapy-Oncolytics* **2016**, 3, 9, doi:10.1038/mto.2016.2. **IF₂₀₁₆=1,259**
26. *Garofalo, M.; Iovine, B.; **Kuryk, L.**; Capasso, C.; Hirvinen, M.; Vitale, A.; Yliperttula, M.; Bevilacqua, M.A.; Cerullo, V. Oncolytic Adenovirus Loaded with L-carnosine as Novel Strategy to Enhance the Antitumor Activity. *Molecular Cancer Therapeutics* **2016**, 15, 651-660, doi:10.1158/1535-7163.Mct-15-0559. **IF₂₀₁₆=5,764**
27. *Capasso, C.; Hirvinen, M.; Garofalo, M.; Romaniuk, D.; **Kuryk, L.**; Sarvela, T.; Vitale, A.; Antopolsky, M.; Magarkar, A.; Viitala, T.; et al. Oncolytic adenoviruses coated with MHC-I tumor epitopes increase the antitumor immunity and efficacy against melanoma. *Oncoimmunology* **2016**, 5, 11, doi:10.1080/2162402x.2015.1105429. **IF₂₀₁₆=7,719**
28. *Wieczorek, M.; Ciacka, A.; Witek, A.; **Kuryk, L.**; Zuk-Wasek, A. Environmental Surveillance of Non-polio Enteroviruses in Poland, 2011. *Food and Environmental Virology* **2015**, 7, 224-231, doi:10.1007/s12560-015-9195-3. **IF₂₀₁₅=2,338**
29. ***Kuryk, L.**; Wieczorek, M.; Diedrich, S.; Bottcher, S.; Witek, A.; Litwinska, B. Genetic analysis of poliovirus strains isolated from sewage in Poland. *Journal of Medical Virology* **2014**, 86, 1243-1248, doi:10.1002/jmv.23803. **IF₂₀₁₄=2,347**
30. *Hendrickx, R.; Stichling, N.; Koelen, J.; **Kuryk, L.**; Lipiec, A.; Greber, U.F. Innate Immunity to Adenovirus. *Hum. Gene Ther.* **2014**, 25, 265-284, doi:10.1089/hum.2014.001. **IF₂₀₁₄=3,755**

31.	*Wieczorek, M.; Kuryk, L. ; Witek, A.; Diuwe, A.; Litwinska, B. The Detection of Enteroviruses in Sewage Using Caco-2 Cells. <i>Polish Journal of Microbiology</i> 2013 , 62, 97-100. IF ₂₀₁₃ = 0,871
32.	* Kuryk, L. ; Wieczorek, M.; Litwinska, B. Polio - a mysterious virus. <i>Postępy Mikrobiologii</i> 2013 , 52, 143-152. IF ₂₀₁₃ = 0,271
*Wykaz opublikowanych artykułów naukowych niewymienionych w pkt 4 (32/41 publikacji nie zostało ujętych w wykazie w pkt 4).	
Łączny współczynnik oddziaływania IF₂₀₁₃₋₂₀₂₃ wszystkich 32/41 artykułów naukowych: 135,9 (średnia wartość IF przypadająca na jedną publikację: 4,24).	
Łączny współczynnik oddziaływania IF₂₀₁₃₋₂₀₂₃ wszystkich 41 artykułów naukowych: 181,08 (średnia wartość IF przypadająca na jedną publikację: 4,41).	
Autor korespondencyjny w 5/32 publikacjach naukowych (24 publikacji oryginalnych, 8 publikacji przeglądowych).	
Pierwszy autor w 4/32 publikacjach, ostatni autor w 3/32 artykułach naukowych.	

A. OMÓWIENIE WYBRANYCH ISTOTNYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH ZNACZĄCY WKŁAD W ROZWÓJ DYSCYPLINY NAUKI O ZDROWIU (SPOZA CYKLU PRAC, O KTÓRYM MOWA W PUNKCIE 4) ZGODNIE Z WYMAGANIAMI USTAWY.

Kuryk, L.; Wieczorek, M.; Diedrich, S.; Bottcher, S.; Witek, A.; Litwinska, B. Genetic analysis of poliovirus strains isolated from sewage in Poland. *Journal of Medical Virology* **2014**, 86, 1243-1248, doi:10.1002/jmv.23803. IF₂₀₁₄=**2,347**, pierwszy autor

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w pracach badawczych, analizie wyników (analizy genetyczne, filogenetyczne), przygotowanie manuskryptu.

Charakterystyka genotypowa i molekularna szczepów wirusa polio wyizolowanych z próbek materiału środowiskowego (analizy genetyczne i filogenetyczne)

Moja pierwsza publikacja zawiera wyniki prac nad charakterystyką genotypową i molekularną szczepów wirusa polio wyizolowanych z próbek materiału środowiskowego w Polsce w 2011 roku. Badania te zostały przeprowadzone podczas mojego trzymiesięcznego pobytu w Instytucie Roberta Kocha w Berlinie w ramach stypendium Leonardo da Vinci. Analizy genetyczne i filogenetyczne skupiły się na identyfikacji rewertantów i rekombinantów w puli wirusów krążących w populacji polskiej. Analizie poddano trzy regiony genomu izolatów środowiskowych. Wszystkie przebadane szczepy zostały zidentyfikowane jako wirusy szczepionkowe na podstawie sekwencji nukleotydowej kodującej białko VP1. Na podstawie analiz sekwencji 3D wykazano obecność 10 rekombinantów. Wyniki badań wykazały brak krążenia w Polsce szczepu typu dzikiego oraz wirusów polio o zwiększonej neurowirulencji

wywodzących się ze szczepów szczepionkowych (VDPV). Były to pierwsze badania nadzoru środowiskowego wykrywającego wirusy polio w Polsce.

Kuryk, L.; Moller, A.S.W.; Garofalo, M.; Cerullo, V.; Pesonen, S.; Alemany, R.; Jaderberg, M. Antitumor-specific T-cell responses induced by oncolytic adenovirus ONCOS-102 (AdV5/3-D24-GM-CSF) in peritoneal mesothelioma mouse model. *J Med Virol* **2018**, *90*, 1669-1673, doi:10.1002/jmv.25229. **IF₂₀₁₈=2,049**, pierwszy autor + autor korespondencyjny

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, udział w realizacji badań (badania *in vivo*), analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu. Autor korespondencyjny.

Oznaczanie systemowej odpowiedzi przeciwnowotworowej specyficznej dla mezoteliny (IFN gamma ELISPOT, badania ex vivo)

Immunoterapia z wykorzystaniem adenowirusów onkolitycznych aktywuje wrodzony układ odpornościowy oraz indukuje adaptacyjne odpowiedzi immunologiczne swoiste dla nowotworu. Wirusy onkolityczne nie tylko niszczą komórki nowotworowe poprzez bezpośrednią lizę, ale także generują przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną, pozwalając na długotrwałą kontrolę choroby nowotworowej oraz redukcję wielkości guza. Ich działanie terapeutyczne można dodatkowo wzmocnić przez uzbrojenie adenowirusa onkolitycznego w transgeny kostymulujące i/lub jednoczesne podawanie z innymi terapiami przeciwnowotworowymi. Badania w ramach tej pracy zostały zrealizowane podczas mojego dwumiesięcznego pobytu badawczego w Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL) w Barcelonie, Hiszpanii. W ramach przeprowadzonych badań na zwierzętach (bagg albino BALB/c, z guzami nowotworowymi międzybłoniaka AB12, pozytywnych dla mezoteliny) oceniłem zdolność terapii z onkolitycznym adenowirusem ONCOS-102 do indukowania limfocytów cytotoksycznych T specyficznych dla mezoteliny. Na podstawie analiz IFN gamma ELISPOT wykazano, że terapia z wirusem ONCOS-102 na myszach BALB/c z międzybłoniakiem indukuje odpowiedzi komórkowe, tj. limfocyty T rozpoznające antygeny mezoteliny. Badania potwierdziły efektywność immunoterapii z wirusami onkolitycznymi w leczeniu guzów litych oraz wykazały, iż metoda ELISPOT może być wykorzystana do oceny indukcji odpowiedzi komórkowych *in vivo*.

Kuryk, L.; Moller, A.W.; Jaderberg, M. Abscopal effect when combining oncolytic adenovirus and checkpoint inhibitor in a humanized NOG mouse model of melanoma. *J Med Virol* **2019**, doi:10.1002/jmv.25501. IF₂₀₁₉=**2,021**, pierwszy autor + autor korespondencyjny

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu. Autor korespondencyjny.

Ocena efektu abскопального w terapii międzybłoniaka z użyciem wirusa onkolitycznego ONCOS-102 (badania in vivo)

Celem badań była ocena efektywności terapii ze szczególnym uwzględnieniem abскопального efektu przeciwnowotworowego terapii z ONCOS-102 na mysim modelu ludzkiego ksenoprzeszczepu czerniaka A2058 na myszach humanizowanych. Czerniak jest nowotworem immunogennym, a immunoterapia z wirusami onkolitycznymi jest częścią obecnej praktyki klinicznej. Prace były realizowane podczas mojej kilkuletniej pracy w firmie biotechnologicznej Targovax w Finlandii oraz w NIZP PZH – PIB. Efektywność terapii skojarzonej, wirusa ONCOS-102 z inhibitorem punktów kontrolnych, pembrolizumabem oceniano na quasi-ludzkim modelu myszy humanizowanych huNOG CD34+. Wykazano, że terapia skojarzona, wywołała abскопalny efekt przeciwnowotworowy w nieleczonych zmianach nowotworowych (redukcja wielkości guza w porównaniu z kontrolą oraz leczonymi zmianami nowotworowymi). W ramach badań opracowano model ludzkiego czerniaka na myszach humanizowanych huNOG CD34+.

Kuryk, L.; Møller, A.S.W. Chimeric Oncolytic Ad5/3 Virus Replicates and Lyses Ovarian Cancer Cells through Desmoglein-2 Cell Entry Receptor. *J Med Virol* **2020**, doi:10.1002/jmv.25677. IF₂₀₂₀=**2,327**, pierwszy autor + autor korespondencyjny

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu. Autor korespondencyjny.

Ocena tropizmu wirusów onkolitycznych na przykładzie modelu raka jajników (badania in vitro, badania kliniczne)

Pomimo nowych terapii, szacuje się, że ok 230 tysięcy kobiet żyjących z rakiem jajnika ma 5-letnie przeżycie na poziomie ok 50%. Na podstawie badań klinicznych fazy I, wykazano, iż wielokrotne podawanie wirusa ONCOS-102 pacjentce z rakiem jajnika opornym na

chemioterapię wywołało przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną, w postaci odpowiedzi komórkowej - limfocytów CD8⁺ swoistej względem komórek nowotworowych, z całkowitym przeżyciem sięgającym 40 miesięcy [10,14]. Prace badawcze były realizowane podczas mojej kilkuletniej pracy w firmie biotechnologicznej Targovax w Finlandii oraz w NIZP PZH – PIB. W ramach prac zbadano tropizm komórkowy wektora ONCOS-102 na czterech liniach komórkowych raka jajnika. Dokonano oceny ekspresji receptorów: DSG2, CD46 oraz CAR na powierzchni komórek nowotworowych wykorzystywanych przez adenowirus w procesie internalizacji. Ekspresja receptora DSG2 była prawie zerowa w komórkach A2780, natomiast ponad 90% komórek OAW42, OVCAR3 i OV-90 wykazało ekspresję tego białka na swojej powierzchni. Po 96 godzinach od zakażenia wirusem ONCOS-102 zaobserwowano znaczącą aktywność onkolityczną ($\geq 50\%$) w komórkach OAW42, OVCAR3 i OV-90, ale minimalną aktywność w komórkach A2780, co sugeruje, że DSG2 jest dominującym receptorem dla ONCOS-102. Ponadto retrospektywne analizy I fazy badania klinicznego pacjentów leczonych ONCOS-102 wykazały korelację między liczbą cząstek wirusa obecnych we krwi (cząstki wirusa/mL) a poziomem ekspresji RNA transkryptu DSG2 (log2). Dane te sygnalizują ważną rolę ekspresji receptora DSG2 na komórkach nowotworowych w terapii z użyciem wirusów onkolitycznych o zmodyfikowanym tropizmie.

Garofalo, M.; Bertinato, L.; Staniszevska, M.; Wieczorek, M.; Salmaso, S.; Schrom, S.; Rinner, B.; Pancer, K.W.; **Kuryk, L.** Combination Therapy of Novel Oncolytic Adenovirus with Anti-PD1 Resulted in Enhanced Anti-Cancer Effect in Syngeneic Immunocompetent Melanoma Mouse Model. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, doi:10.3390/pharmaceutics13040547. **IF₂₀₂₁=6,510**, autor korespondencyjny + ostatni autor

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań, przygotowanie przeglądu aktualnego piśmiennictwa zgodnie z metodyką przeglądu zakresu literatury, koordynacja realizacji badań, udział w realizacji badań (badania *in vitro* oraz *in vivo*), analiza, wizualizacja i interpretacja wyników, analizy statystyczne, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu. Autor korespondencyjny.

Ocena efektu przeciwnowotworowego wirusa onkolitycznego Adv5/3-D24-ICOSL-CD40L w terapii skojarzonej z anty PD-1 w leczeniu czerniaka (badania in vitro oraz in vivo)

Czerniak złośliwy jest agresywną postacią nowotworu skóry, który ma niski pięcioletni wskaźnik przeżycia u pacjentów z zaawansowaną chorobą. Immunoterapia stanowi obiecujące podejście w poprawie wskaźników przeżywalności wśród pacjentów w zaawansowanym stadium. W ramach badań naukowych opracowano unikalny wektor onkolityczny Adv5/3-

D24-ICOSL-CD40L uzbrojony w dwie cząsteczki kostymulujące (ICOSL, CD40L), celem zwiększenia skuteczności klinicznej poprzez modulację immunologicznych odpowiedzi przeciwnowotworowych. Wykazano, że sklonowany wektor jest stabilny genetycznie i jest pozbawiony mutacji genetycznych zmieniających ramkę odczytu i sekwencję białka (sekwencjonowanie genomu, enzymy restrykcyjne). Następnie w ramach badań przedklinicznych *in vitro* oraz *in vivo* zbadano skuteczność przeciwnowotworową samego wirusa oraz terapii skojarzonej z inhibitorem anty PD-1 na ludzkich liniach komórkowych czerniaka, tj. MUG Mel-1 i MUG Mel-2, oraz na immunokompetentnym modelu ksenotransplantu czerniaka B16V C57BL/6. Zarówno monoterapia, jak i terapia łączona wykazały silny efekt przeciwnowotworowy i immunogenną śmierć komórek w warunkach *in vitro*. Terapia z AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L w połączeniu z anty PD-1 była najefektywniejszą metodą redukcji wielkości guza nowotworowego oraz skutkowała 100% przeżywalnością. Podsumowując, nowy wektor onkolityczny AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L, lub w połączeniu z lekami przeciwnowotworowymi, takimi jak inhibitory punktów kontrolnych, może otworzyć nowe perspektywy terapeutyczne w leczeniu czerniaka.

Shoushtari, A.N.; Olszanski, A.J.; Nyakas, M.; Hornyak, T.J.; Wolchok, J.D.; Levitsky, V.; **Kuryk, L.**; Hansen, T.B.; Jaderberg, M. Pilot Study of ONCOS-102 and Pembrolizumab: Remodeling of the Tumor Microenvironment and Clinical Outcomes in Anti-PD-1-Resistant Advanced Melanoma. *Clin Cancer Res* **2023**, *29*, 100-109, doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-2046. IF₂₀₂₃=**11,5**, współautor

Moim wkładem w powstanie tej pracy był udział w opracowaniu koncepcji i metodyki badań (administracja), zbieranie danych, selekcja metod badawczych, przygotowanie manuskryptu, korekty manuskryptu.

Ocena efektu przeciwnowotworowego wirusa onkolitycznego ONCOS-102 w terapii skojarzonej z anty PD-1 w leczeniu czerniaka (badania kliniczne)

Kolejna praca naukowa została opublikowana na podstawie wyników badań klinicznych w leczeniu czerniaka w terapii z ONCOS-102 w połączeniu z anty PD-1. Badania były prowadzone w Stanch Zjednoczonych w trakcie mojej kilkuletniej pracy w firmie biotechnologicznej Targovax w Finlandii.

Celem badań była ocena bezpieczeństwa terapii jak również ocena jej efektywności. Posadowiono hipotezę badającą, że doguzowe podanie wirusa onkolitycznego ONCOS-102 będzie w stanie przezwyciężyć oporność na leczenie z inhibitorami anty PD-1/PD-L1 poprzez indukcję infiltracji limfocytów naciekających na guz oraz stanu prozapalnego w

mikrośrodowisku zmian nowotworowych. Pacjenci z zaawansowanym czerniakiem postępującym po wcześniejszej terapii z blokadą PD-1 otrzymywali ONCOS-102 do guza jako szczepienie pierwotne 3 dawkami (3×10^{11} cząstek wirusa) w tygodniu 1 (grupa 1) lub jako 4 dawki pierwotne oraz 8 dawek przypominających co 3 tygodnie (grupa 2). Od trzeciego tygodnia wszyscy pacjenci otrzymywali pembrolizumab co 3 tygodnie (≤ 8 dawek). Pierwszorzędnym punktem końcowym była ocena bezpieczeństwa. Zbadano również odsetek obiektywnych odpowiedzi (ORR), przeżycie wolne od progresji choroby i aktywację immunologiczną w pobranych biopsjach. Terapia eksperymentalna na grupie 21 pacjentów (grupa 1, n = 9; grupa 2, n = 12) leczonych z ONCOS-102 plus pembrolizumab była dobrze tolerowana: większość zdarzeń niepożądanych (AE) miała nasilenie łagodne/umiarkowane. Najczęstszymi zdarzeniami niepożądanymi związanymi z ONCOS-102 były gorączka (43%), dreszcze (43%) i nudności (28%). Nie stwierdzono działań toksycznych ograniczających dawkę. ORR wyniósł 35% (ocena odpowiedzi w guzach litych (RECIST) 1,1, irRECIST). Zmniejszenie rozmiaru ≥ 1 zmiany nieleczonej zaobserwowano u 53% pacjentów, co wskazywało na działanie ogólnoustrojowe (efekt abskopalny). Leczone zmiany nowotworowe wykazały trwałą ekspresję genów związanych z odpornością i naciek limfocytów T, co korelowało z korzyścią kliniczną. Terapia z wirusem ONCOS-102 w połączeniu z pembrolizumabem była dobrze tolerowana i prowadziła do uzyskania obiektywnych odpowiedzi (35%) u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem opornym na anty PD-1. ONCOS-102 promował infiltrację limfocytów T, szczególnie cytotoksycznych limfocytów T CD8+, która utrzymywała się w dziewiątym tygodniu, zapewniając korzyści kliniczne. Obiecujące wyniki badań klinicznych stanowią potwierdzenie skuteczności terapii z zastosowaniem wirusów onkolitycznych w leczeniu czerniaka.

Staniszewska, M.; Sobiepanek, A.; Gizinska, M.; Pena-Cabrera, E.; Arroyo-Cordoba, I.J.; Kaze, M.; **Kuryk, L.**; Wieczorek, M.; Koronkiewicz, M.; Kobiela, T.; et al. Sulfone derivatives enter the cytoplasm of *Candida albicans* sessile cells. *Eur J Med Chem* **2020**, *191*, 112139, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112139. IF₂₀₂₀=6,514

Moim wkładem w powstanie tej pracy było zbieranie danych, selekcja metod badawczych, przygotowanie manuskryptu.

Pochodne sulfonowe wnikają do cytoplazmy biofilmu Candida albicans

Na podstawie naszych wcześniejszych badań wykazano, że pochodne sulfonowe wykazują mniejsze ryzyko rozwoju oporności szczepów *Candida* spp. Celem opisanych prac badawczych była weryfikacja aktywności przeciwgrzybiczej nowo zsyntetyzowanych pochodnych: bromodichlorometylo-4-hydrazynylo-3-nitrofenylosulfonu (S1),

difluorodimetylo-4-hydrazynylo-3-nitrofenylosulfonu (S2) i chlorodifluorodimetylo-4-hydrazynylo-3-nitrofenylosulfonu (S3). Mechanizm działania, dzięki któremu sulfony wnikały do cytoplazmy, nie został jeszcze do końca wyjaśniony. Opisane badanie miały na celu poznanie mechanizmu działania testowanych związków, dlatego też aby dokonać analizy procesu wnikania do wnętrza komórki nowych sulfonów, połączyliśmy ich grupę hydrazynową z znacznikiem fluorescencyjnym - BODIPY. Takie podejście pozwoliło na monitorowanie internalizacji związku w warunkach *in vitro*. Badania wykazały, że nowe pochodne sulfonowe selektywnie uszkodzają błonę i ścianę komórkową *Candida spp.*, co zmniejsza prawdopodobieństwo pojawienia się oporności. Sulfony są obiecującą alternatywą nie tylko w leczeniu planktonowego *C. albicans*, ale także komórek osadzonych w biofilmie. Monitorując markery AO/PI/HO342 oceniano występowanie przypadkowej śmierci komórki (ACD), apoptozy (jądra sierpowate), a także hamowania adhezji *Candida* do nabłonka (100%-redukcja przyczepności do nabłonka). Wykazano, że badane związki S1-S3 wnikają do wnętrza cytoplazmy bez wywołania lizy komórek. Dzięki metodzie QCM-D do wykrywania *in situ* w czasie rzeczywistym zmian lepkości komórek, dowiedziono interakcji biofilmu *C. albicans* z testowanymi sulfonami. Podsumowując przeprowadzone badanie wykazują się nowatorskim podejściem, w których wykazano, że S1 jest silnym środkiem grzybobójczym przeciwko *C. albicans* i może być stosowany w leczeniu inwazyjnej kandydozy w monoterapii lub w połączeniu z innymi środkami przeciwgrzybiczymi.

B. PODSUMOWANIE NAJWIĘKSZYCH OSIĄGNIĘĆ STANOWIĄCYCH ZNACZNY WKŁAD W ROZWÓJ DYSCYPLINY NAUKI O ZDROWIU (SPOZA CYKLU PRAC, O KTÓRYM MOWA W PUNKCIE 4).

- Wykazano brak krążenia w Polsce szczepu typu dzikiego oraz wirusów polio o zwiększonej neurowirulencji wywodzących się ze szczepów szczepionkowych (VDPV). Były to pierwsze badania nadzoru środowiskowego wykrywającego wirusy polio w Polsce.
- Na podstawie analiz IFN gamma ELISPOT wykazano, że terapia z wirusem ONCOS-102 na myszach BALB/c z międzybłoniakiem indukuje odpowiedź komórkową, tj. limfocyty T rozpoznające antygeny mezoteliny. Badania potwierdziły efektywność immunoterapii wirusami onkolitycznymi w leczeniu guzów litych oraz wykazały, iż metoda ELISPOT może być wykorzystana do oceny indukcji odpowiedzi komórkowych *ex vivo*.

- Wykazano, że terapia skojarzona (wirus onkolityczny w połączeniu z anty PD-1), wywołała abskopalny efekt przeciwnowotworowy w nieleczonych zmianach czerniaka (badania *in vivo*). W ramach badań opracowano model ludzkiego czerniaka na myszach humanizowanych huNOG CD34+.
- Dowiedziono, że DSG2 jest dominującym receptorem dla ONCOS-102. Ponadto retrospektywne analizy I fazy badania klinicznego pacjentów leczonych ONCOS-102 wykazały korelację między liczbą cząstek wirusa obecnych we krwi (cząstki wirusa/mL) a poziomem ekspresji RNA transkryptu DSG2 (log2). Dane te sygnalizują ważną rolę ekspresji receptora DSG2 na komórkach nowotworowych w terapii z użyciem wirusów onkolitycznych o zmodyfikowanym tropizmie.
- Wykazano, że wektor onkolityczny AdV5/3-D24-ICOSL-CD40L, lub w połączeniu z lekami przeciwnowotworowymi, takimi jak inhibitory punktów kontrolnych, może otworzyć nowe perspektywy terapeutyczne w leczeniu czerniaka.
- Dowiedziono, że terapia eksperymentalna na grupie 21 pacjentów leczonych z ONCOS-102 oraz anty PD-1 była dobrze tolerowana i prowadziła do uzyskania obiektywnych odpowiedzi (35%) u pacjentów z zaawansowanym czerniakiem opornym na anty PD-1. ONCOS-102 promował infiltrację limfocytów T, szczególnie cytotoksycznych limfocytów T CD8+, która utrzymywała się w dziewiątym tygodniu, zapewniając korzyści kliniczne. Obiecujące wyniki badań klinicznych stanowią potwierdzenie skuteczności terapii z zastosowaniem wirusów onkolitycznych w leczeniu czerniaka.
- Wykazano, że wirusy onkolityczne mogą być selektywnie dostarczane do komórek nowotworowych przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (wyizolowane z komórek nowotworowych). Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą być wykorzystywane jako nośniki leków.
- Dowiedziono, że nowe syntetyczne pochodne sulfonowe, tetrazolowe, proksyfilinowe wykazują działanie przeciwgrzybicze wobec modelowego eukaryota - *C. albicans*.

**6. WYKAZ OPUBLIKOWANYCH I RECENZOWANYCH STRESZCZEŃ
KONFERENCYJNYCH W CZASOPISMACH NAUKOWYCH –
POZOSTAŁE ISTOTNE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWE STANOWIĄCE
ZNACZNY WKŁAD W ROZWÓJ DYSCYPLINY NAUKI O ZDROWIU.**

1. Capasso, C.; Garofalo, M.; Hirvinen, M.; Romanyuk, D.; **Kuryk, L.**; Antopolsky, M.; Vitala, T.; Urtti, A.; Cerullo, V. Oncolytic adenovirus loaded with MHC-I restricted peptide as platform for oncolytic vaccine. *Hum. Gene Ther.* **2014**, *25*, A29-A30. **IF₂₀₁₃=3,755**
2. **Kuryk, L.**; Vuolanto, A.; Pesonen, S.; Hirvinen, M.; and Garofalo, M.; Capasso, C.; Romanyuk, D.a.; Cerullo, V. Enhanced Generation and Characterisation of a CD40L-Expressing Oncolytic Adenovirus for Cancer Treatment of Human Patients. *Molecular Therapy* **2014**, *22*, S86. **IF₂₀₁₄=6,227**
3. Romaniuk, D.; Glio, F.B.; Hirvinen, M.; Capasso, C.; Garofalo, M.; **Kuryk, L.**; Greco, D.; Cerullo, V. Oncolytic Vaccines. *Molecular Therapy* **2014**, *22*, S254-S254. **IF₂₀₁₄=6,227**
4. Capasso, C.; Hirvinen, M.; Garofalo, M.; Romaniuk, D.; **Kuryk, L.**; Sarvela, T.; Vitale, A.; Antopolsky, M.; Magarkar, A.; Viitala, T.; et al. New oncolytic vaccine platform enhance anti-tumor immunity in humanized mice with human melanomas. *Hum. Gene Ther.* **2015**, *26*, A53-A53. **IF₂₀₁₅=4,062**
5. Capasso, C.; Hirvinen, M.; Garofalo, M.; Romaniuk, D.; **Kuryk, L.**; Sarvela, T.; Vitale, A.; Antopolsky, M.; Magarkar, A.; Viitala, T.; et al. Development of oncolytic vaccine for cancer treatment. *Hum. Gene Ther.* **2015**, *26*, A19-A19. **IF₂₀₁₅=4,062**
6. Capasso, C.; Hirvinen, M.; Garofalo, M.; Romaniuk, D.; **Kuryk, L.**; Sarvela, T.; Vitale, A.; Antopolsky, M.; Magarkar, A.; Viitala, T.; et al. Oncolytic adenoviruses coated with MHC-I tumor epitopes for a new oncolytic vaccine platform. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **2015**, *3*, P333, doi:10.1186/2051-1426-3-s2-p333. **IF₂₀₁₅=3,712**
7. Capasso, C.; Hirvinen, M.; Garofalo, M.; Romaniuk, D.a.; **Kuryk, L.**; Sarvela, T.; Vitale, A.; Antopolsky, M.a.; Magarkar, A.; Viitala, T.; et al. New oncolytic vaccine platform enhance anti-tumor immunity in humanized mice with human melanomas. *Hum. Gene Ther.* **2015**, *26*, A53. **IF₂₀₁₅=4,062**
8. Capasso, C.; Hirvinen, M.; Garofalo, M.a.; Romaniuk, D.; **Kuryk, L.**; Sarvela, T.; Vitale, A.; and Viitala, T.; Antopolsky, M.; Urtti, A.; et al. Evaluation of the Efficacy of a New Oncolytic Vaccine Platform in Humanized Mice. *Molecular Therapy* **2015**, *23*, S86-S87, doi: {10.1016/S1525-0016(16)33825-4}. **IF₂₀₁₅=6,938**
9. Carrascon, V.C.; Capasso, C.; Magarkar, A.; Garofalo, M.; Hirvinen, M.; **Kuryk, L.**; Sarvela, T.; Bunker, A.; Urtti, A.; Cerullo, V. An in silico tool designed to improve the immunogenicity of MHC-I peptides for cancer immunotherapy using oncolytic adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* **2015**, *26*, A57-A58. **IF₂₀₁₅=4,062**
10. Garofalo, M.; Iovine, B.; **Kuryk, L.**; Capasso; Cristian; Hirvinen, M.; Vitale, A.; Bevilacqua, M.; Assunta; Cerullo, V. Oncolytic Adenoviruses Loaded With Active Drugs as a Novel Drug Delivery System for Cancer Therapy. *Molecular Therapy* **2015**, *23*, S247, doi: {10.1016/S1525-0016(16)34231-9}. **IF₂₀₁₅=6,938**
11. Hirvinen, M.; Capasso, C.; Guse, K.; Garofalo; Mariangela; Vitale, A.; Ahonen, M.; **Kuryk, L.**; Vaha-Koskela, M.; Hemminki, A.; et al. Boosting the Immunogenicity of

- an Oncolytic Vaccinia Virus By Expression of DAI Can Enhance Anti-Tumor Immunity in Humanized Mice. *Molecular Therapy* **2015**, 23, S31, doi:{10.1016/S1525-0016(16)33676-0}. **IF₂₀₁₅=6,938**
12. Hirvinen, M.; Capasso, C.; Guse, K.; Garofalo, M.; Vitale, A.; Ahonen, M.; **Kuryk, L.**; Vaha-Koskela, M.; Hemminki, A.; Fortino, V.; et al. A self-amplifying immunobooster for cancer therapy: oncolytic vaccinia virus expressing DAI. *Hum. Gene Ther.* **2015**, 26, A32-A32. **IF₂₀₁₅=4,062**
13. **Kuryk, L.**; Vassilev, L.; Ranki, T.; Karioja-Kallio; Aila; Levalampi, O.; Vuolanto, A.; Cerullo, V.a.; Pesonen, S. Toxicity and Bio-Distribution of a GM-CSF-Expressing, Chimeric Oncolytic Adenovirus ONCOS-102. *Molecular Therapy* **2015**, 23, S264-S265, doi:{10.1016/S1525-0016(16)34274-5}. **IF₂₀₁₅=6,938**
14. Capasso, C.; Cardella, D.; Muller, M.; Garofalo; Mariangela; **Kuryk, L.**; Peltonen, K.; Cerullo, V. Oncolytic Vaccines in Combination with PD-L1 Blockade for the Treatment of Melanoma. *Molecular Therapy* **2016**, 24, S161-S162, doi:{10.1016/S1525-0016(16)33217-8}. **IF₂₀₁₆=6,688**
15. Capasso, C.; Magarkar, A.; Carrascon, V.C.; Muller, M.; Garofalo, M.; **Kuryk, L.**; Fusciello, M.; Ylosmaki, E.; Bunker, A.; Cerullo, V. Enhanced anti-cancer vaccines with a new epitope improvement system. *Annals of Oncology* **2016**, 27, 1. **IF₂₀₁₆=11,855**
16. **Kuryk, L.**; Haavisto, E.; Garofalo, M.; Capasso, C.; Hirvinen, M.; Pesonen, S.; Ranki, T.; Vassilev, L.; Cerullo, V. 661. Synergistic Anti-Tumor Efficacy of Immunogenic Adenovirus ONCOS-102 and Standard of Care Chemotherapy in Preclinical Mesothelioma Model. *Molecular Therapy* **2016**, 24, S262, doi:10.1016/s1525-0016(16)33469-4. **IF₂₀₁₆=6,688**
17. Aix, S.P.; Viteri, S.; Bosch-Borrera, J.; **Kuryk, L.**; Hakonen, T.; Vetrhus, S.; Jaderberg, M.; Paz-Ares, L. ONCOS-102 and pemetrexed/cisplatin in patients with unresectable malignant pleural mesothelioma. *Annals of Oncology* **2017**, 28, 1. **IF₂₀₁₇=13,926**
18. Ponce Aix, S.; Viteri, S.; Bosch-Borrera, J.; **Kuryk, L.**; Hakonen, T.; Vetrhus, S.; Jäderberg, M.; Paz-Ares, L. ONCOS-102 and pemetrexed/cisplatin in patients with unresectable malignant pleural mesothelioma. *Annals of Oncology* **2017**, 28, doi:10.1093/annonc/mdx389.012. **IF₂₀₁₇=13,926**
19. **Kuryk, L.**; Moller, A.-S.W.; Jaderberg, M. The Combinatory Treatment of the Oncolytic Adenovirus ONCOS-102 with Anti PD-1 (Keytruda (R)) Show Synergistic Anti-Tumor Effect in Humanized A2058 Melanoma huNOG Mouse Model. *Molecular Therapy* **2018**, 26, 200-201. **IF₂₀₁₆=6,688**
20. **Kuryk, L.**; Moller, A.S.; Jaderberg, M. Combinatory therapy of the oncolytic adenovirus ONCOS-102 and checkpoint inhibitor resulted in abscopal anti-tumor effect in a humanized NOG mouse model of melanoma. *Hum. Gene Ther.* **2019**, 30, A53-A53. **IF₂₀₁₆=4,187**
21. Palmer, D.; Moller, A.S.; Greenhalf, B.; Ma, Y.T.; Valle, J.W.; Gjertsen, T.J.; **Kuryk, L.** Multiple KRAS mutations detected by cancer related DNA in patients with resected pancreas adenocarcinoma during treatment with TG01/GM-CSF and gemcitabine (CT TG01-01). *Annals of Oncology* **2019**, 30, 2. **IF₂₀₁₉=17,274**
22. Shoushtari, A.; Olszanski, A.; Hornyak, T.; Wolchok, J.; Vetrhus, S.; Handeland, K.R.; **Kuryk, L.**; Jaderberg, M. A pilot study of engineered adenovirus ONCOS-102 in combination with pembrolizumab in checkpoint inhibitor refractory advanced or unresectable melanoma. *Journal for Immunotherapy of Cancer* **2019**, 7, 2. **IF₂₀₁₉=4,110**

23. **Kuryk, L.**; Moller, A.-S. Abstract 4562: Next generation Oncos oncolytic adenovirus with novel anti-cancer double-transgenes shows synergistic anticancer effect in melanoma mouse model. *Cancer Research* **2020**, *80*, 4562-4562, doi:10.1158/1538-7445.Am2020-4562. **IF₂₀₂₀=12,531**
24. **Kuryk, L.**; Moller, A.S. Oncolytic Adenovirus Ad5/3-D24-GM-CSF Infects, Replicates and Lyses Ovarian Cancer Cells Through Desmoglein-2 Cell Entry Receptor. *Molecular Therapy* **2020**, *28*, 504-504. **IF₂₀₂₀=11,454**
25. **Kuryk, L.**; Moller, A.S. Next Generation ONCOS Double Transgene Oncolytic Adenovirus Exhibits Enhanced Anticancer Effect in Melanoma. *Molecular Therapy* **2020**, *28*, 162-162. **IF₂₀₂₀=11,454**
26. Jaderberg, M.; Paz-Ares, L.; Cedres, S.; Ricordel, C.; Isambert, N.; Aix, S.P.; Levitsky, V.; **Kuryk, L.**; Moller, A.-S.; Vetrhus, S. 462 A randomised open-label phase I/II study adding ONCOS-102 to pemetrexed/cisplatin in patients with unresectable malignant pleural mesothelioma – 24 month survival data. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **2021**, *9*, A491-A491, doi:10.1136/jitc-2021-SITC2021.462. **IF₂₀₂₁=4,912**
27. **Kuryk, L.**; Moller, A.-S.; Kumar, S.; Shoushtari, A.; Ares, L.P.; Jaderberg, M.; Wiklund, E.D.; Levitsky, V. 368 Consistent pattern of immune activation induced by oncolytic adenovirus ONCOS-102 across diverse types of solid tumors. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **2021**, *9*, A396-A396, doi:10.1136/jitc-2021-SITC2021.368. **IF₂₀₂₁=4,912**
28. Shoushtari, A.N.; Olszanski, A.J.; Nyakas, M.; Hornyak, T.J.; Wolchok, J.D.; Levitsky, V.; Møller, A.S.; **Kuryk, L.**; Risberg Handeland, K.; Jäderberg, M. 1083P A pilot study of engineered adenovirus ONCOS-102 in combination with pembrolizumab (pembro) in checkpoint inhibitor refractory advanced or unresectable melanoma. *Annals of Oncology* **2021**, *32*, S897-S898, doi:10.1016/j.annonc.2021.08.1468. **IF₂₀₂₁=51,769**

Łączny współczynnik oddziaływania IF₂₀₁₄₋₂₀₂₃ wszystkich 28 streszczeń konferencyjnych: 250,54 (średnia wartość IF przypadająca na jedno streszczenie: 8,94).

Pierwszy autor w 9/28 streszczeń konferencyjnych

7. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI, INSTYTUCJI NAUKOWEJ, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.

Poza miejscem zatrudnienia w NIZP PZH – PIB, Warszawa, habilitant odbył liczne staże zagraniczne, wyjazdy mobilnościowe, czy też pracował w różnych jednostkach naukowych głównie za granicą, w Niemczech (Robert Koch Institute), Finlandii (University of Helsinki; Oncos Therapeutics; Targovax; Valo Therapeutics), Włoszech (University of Padova), Hiszpanii (Bellvitge Biomedical Research Institute – IDIBELL;

Catala Institute of Oncology; Biomedical Research Institute "Alberto Sols" CSIC-UAM; University of the Balearic Islands (UIB)), Szwajcarii (University of Zurich), Polsce (Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii (WIHE)).

- **Valo Therapeutics**, R&D, Helsinki, Finlandia, 2022 – obecnie

- VP Translational and Clinical Science

Publikacje naukowe:

- Gryciuk, A.; Rogalska, M.; Baran, J.; **Kuryk, L.**; Staniszevska, M. Oncolytic Adenoviruses Armed with Co-Stimulatory Molecules for Cancer Treatment. *Cancers* **2023**, 15, doi:10.3390/cancers15071947. **IF₂₀₂₃=5,2**

Badania kliniczne:

- **Badanie kliniczne:** START: Safety and Anti-Tumor Activity of PeptiCRAd-1 in Treatment of Cancer (**NCT05492682**), badania kliniczne, Faza I, badania obecnie prowadzone w Niemczech. Udział: immuno-monitoring – planowanie, zarządzanie i analiza wyników badań.

- **Politechnika Warszawska, CEZAMAT**, 2019 – obecnie

- Współpraca naukowa z dr hab. Moniką Staniszevską (Lider badań nad nowymi lekami przeciwgrzybicznymi w leczeniu *Candida sp.*)

Publikacje naukowe:

- Staniszevska, M.; Zdrojewski, T.; Gizinska, M.; Rogalska, M.; **Kuryk, L.**; Kowalkowska, A.; Lukowska-Chojnacka, E. Tetrazole derivatives bearing benzodiazepine moiety-synthesis and action mode against virulence of *Candida albicans*. *Eur J Med Chem* **2022**, 230, 114060, doi:10.1016/j.ejmech.2021.114060. **IF₂₀₂₂=7,088**
- Staniszevska, M.; **Kuryk, L.**; Gryciuk, A.; Kawalec, J.; Rogalska, M.; Baran, J.; Kowalkowska, A. The Antifungal Action Mode of N-Phenacyldibromobenzimidazoles. *Molecules* **2021**, 26, doi:10.3390/molecules26185463. **IF₂₀₂₁=4,927**
- Staniszevska, M.; **Kuryk, L.**; Gryciuk, A.; Kawalec, J.; Rogalska, M.; Baran, J.; Lukowska-Chojnacka, E.; Kowalkowska, A. In Vitro Anti-Candida Activity and Action Mode of Benzoxazole Derivatives. *Molecules* **2021**, 26, doi:10.3390/molecules26165008. **IF₂₀₂₁=4,927**

- Gizinska, M.; Staniszevska, A.; Kazek, M.; Koronkiewicz, M.; **Kuryk, L.**; Milner-Krawczyk, M.; Baran, J.; Borowiecki, P.; Staniszevska, M. Antifungal polybrominated proxiphylline derivative induces *Candida albicans* calcineurin stress response in *Galleria mellonella*. *Bioorg Med Chem Lett* **2020**, *30*, 127545, doi:10.1016/j.bmcl.2020.127545. **IF₂₀₂₀=2,823**
- Staniszevska, M.; Sobiepanek, A.; Gizinska, M.; Pena-Cabrera, E.; Arroyo-Cordoba, I.J.; Kazek, M.; **Kuryk, L.**; Wieczorek, M.; Koronkiewicz, M.; Kobiela, T.; et al. Sulfone derivatives enter the cytoplasm of *Candida albicans* sessile cells. *Eur J Med Chem* **2020**, *191*, 112139, doi:10.1016/j.ejmech.2020.112139. **IF₂₀₂₀=6,514**

• **Targovax**, R&D, Clinical Science, Helsinki, Finlandia, 2015-2022

- Director, Clinical Science (2017-2022)
- Senior Research Scientist (2016-2017)
- Research Scientist (2015-2016)

Publikacje naukowe:

- Shoushtari, A.N.; Olszanski, A.J.; Nyakas, M.; Hornyak, T.J.; Wolchok, J.D.; Levitsky, V.; **Kuryk, L.**; Hansen, T.B.; Jaderberg, M. Pilot Study of ONCOS-102 and Pembrolizumab: Remodeling of the Tumor Microenvironment and Clinical Outcomes in Anti-PD-1-Resistant Advanced Melanoma. *Clin Cancer Res* **2023**, *29*, 100-109, doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-2046. **IF₂₀₂₃=11,5**
- **Kuryk, L.**; Moller, A.W.; Jaderberg, M. Combination of immunogenic oncolytic adenovirus ONCOS-102 with anti-PD-1 pembrolizumab exhibits synergistic antitumor effect in humanized A2058 melanoma huNOG mouse model. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, e1532763, doi:10.1080/2162402X.2018.1532763. **IF₂₀₁₉=5,869**
- **Kuryk, L.**; Møller, A.S.W. Chimeric Oncolytic Ad5/3 Virus Replicates and Lyses Ovarian Cancer Cells through Desmoglein-2 Cell Entry Receptor. *Journal of Medical Virology* **2020**, doi:10.1002/jmv.25677. **IF₂₀₂₀=2,327**
- **Kuryk, L.**; Moller, A.W.; Jaderberg, M. Abscopal effect when combining oncolytic adenovirus and checkpoint inhibitor in a humanized NOG mouse model of melanoma. *J Med Virol* **2019**, doi:10.1002/jmv.25501. **IF₂₀₁₉=2,021**

Badania kliniczne:

- **Badanie kliniczne:** A Pilot Study of Sequential ONCOS-102, an Engineered Oncolytic Adenovirus Expressing GMCSF, and Pembrolizumab in Patients with Advanced or Unresectable Melanoma Progressing After Programmed Cell Death Protein 1 (PD1) Blockade, (NCT03003676), badania kliniczne, Faza I, badania zakończone, USA. Udział: projektowanie badania klinicznego, immuno-monitoring – planowanie, zarządzanie i analiza wyników badań.
- **Badanie kliniczne:** A Randomised Phase II Open-label Study with a Phase Ib Safety lead-in Cohort of ONCOS-102, an Immune-priming GM-CSF Coding Oncolytic Adenovirus, and Pemetrexed/Cisplatin in Patients with Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma, (NCT02879669), badania kliniczne, Faza I, II, badania zakończone, Hiszpania, Francja. Udział: projektowanie badania klinicznego, immuno-monitoring – planowanie, zarządzanie i analiza wyników badań.
- **Badanie kliniczne:** A Phase 1/2 Study to Investigate the Safety, Biologic and Anti-tumor Activity of ONCOS-102 in Combination with Durvalumab in Subjects with Advanced Peritoneal Malignancies, (NCT02963831), badania kliniczne, Faza I, badania zakończone, USA. Udział: immuno-monitoring – planowanie, zarządzanie.
- **Badanie kliniczne:** A phase I/II, single-arm clinical trial to evaluate the safety and immune activation of the combination of DCVAC/PCa, an active cellular immunotherapy, and ONCOS-102, an immune-priming adenovirus, in men with advanced metastatic castration-resistant prostate cancer, (NCT03514836), badania kliniczne, Faza I, badania zakończone, Czechy. Udział: immuno-monitoring – planowanie, zarządzanie i analiza wyników badań.
- **Badanie kliniczne:** Exploratory Study of TG02-treatment as Monotherapy or in Combination with Pembrolizumab to Assess Safety and Immune Activation in Patients with Locally Recurrent Oncogenic RAS Exon 2 Mutant Rectal Cancer, (NCT02933944), badania kliniczne, Faza I, badania zakończone, Australia, Nowa Zelandia. Udział: projektowanie badania klinicznego, immuno-monitoring – planowanie, zarządzanie i analiza wyników badań.
- **University of Padova, Padova, Włochy, wyjazd badawczy,** 18.01-16.02.2020, 7-14.03.2021; 7-21.07.2021; 20-23.02.2022; 17.04.2022-16.05.2022; 24.06-31.07.2022, 01.09-31.09.2022 (5 miesięcy). Biodystrybucja i bioobrazowanie wektorów wirusowych

na modelach mysich (IVIS, qPCR), badania na zwierzętach (modele czerniaka, międzybłonica opłucnej), izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i ich charakterystyka

Publikacje naukowe powstałe w ramach współpracy:

- Garofalo, M.; Pancer, K.W.; Wieczorek, M.; Staniszevska, M.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; **Kuryk, L.** From Immunosuppression to Immunomodulation - Turning Cold Tumours into Hot. *J Cancer* **2022**, *13*, 2884-2892, doi:10.7150/jca.71992. **IF₂₀₂₂=3,9 [A8]**
- Garofalo, M.; Bellato, F.; Magliocca, S.; Malfanti, A.; **Kuryk, L.**; Rinner, B.; Negro, S.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; Mastrotto, F. Polymer Coated Oncolytic Adenovirus to Selectively Target Hepatocellular Carcinoma Cells. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, doi:10.3390/pharmaceutics13070949. **IF₂₀₂₁=6,51**
- Garofalo, M.; Bertinato, L.; Staniszevska, M.; Wieczorek, M.; Salmaso, S.; Schrom, S.; Rinner, B.; Pancer, K.W.; **Kuryk, L.** Combination Therapy of Novel Oncolytic Adenovirus with Anti-PD1 Resulted in Enhanced Anti-Cancer Effect in Syngeneic Immunocompetent Melanoma Mouse Model. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, doi:10.3390/pharmaceutics13040547. **IF₂₀₂₁=6,51**
- Garofalo, M.; Villa, A.; Brunialti, E.; Crescenti, D.; Dell'Omo, G.; **Kuryk, L.**; Vingiani, A.; Mazzaferro, V.; Ciana, P. Cancer-derived EVs show tropism for tissues at early stage of neoplastic transformation. *Nanotheranostics* **2021**, 1-7, doi:10.7150/ntno.47226. **IF₂₀₂₁=0**
- **Kuryk, L.**; Bertinato, L.; Staniszevska, M.; Pancer, K.; Wieczorek, M.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; Garofalo, M. From Conventional Therapies to Immunotherapy: Melanoma Treatment in Review. *Cancers* **2020**, *12*, doi:10.3390/cancers12103057. **IF₂₀₂₀=6,86 [A6]**
- Garofalo, M.; Staniszevska, M.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; Pancer, K.W.; Wieczorek, M.; **Kuryk, L.** Prospects of Replication-Deficient Adenovirus Based Vaccine Development against SARS-CoV-2. *Vaccines (Basel)* **2020**, *8*, doi:10.3390/vaccines8020293. **IF₂₀₂₀=5,217**
- **Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Barcelona, Hiszpania, wyjazd naukowy, wrzesień – październik 2014 (2 miesiące). Klonowanie wektorów**

onkolitycznych, ocena efektywności terapii z zastosowaniem wirusów onkolitycznych w badaniach na zwierzętach (model międzybłoniaka opłucnej)

Publikacje naukowe powstałe w ramach współpracy:

- Kuryk, L.; Moller, A.S.W.; Garofalo, M.; Cerullo, V.; Pesonen, S.; Alemany, R.; Jaderberg, M. Antitumor-specific T-cell responses induced by oncolytic adenovirus ONCOS-102 (AdV5/3-D24-GM-CSF) in peritoneal mesothelioma mouse model. *Journal of Medical Virology* **2018**, 90, 1669-1673, doi:10.1002/jmv.25229. IF₂₀₁₈=**2,049**

- **University of Zurich, Zurich, Szwajcaria**, 11-22 marca 2013 (2 tygodnie). Wysokowydajne badania przesiewowe w identyfikacji nowych leków w onkologii, hodowle *in vitro*
- **Robert Koch Institute, Berlin, Niemcy**, wyjazd naukowy w ramach grantu **Leonardo da Vinci**, sierpień-październik 2012 (3 miesiące). Sekwencjonowanie izolatów enterowirusów i wirusów polio, analizy filogenetyczne, hodowle *in vitro*

Publikacje naukowe powstałe w ramach współpracy:

- **Kuryk, L.**; Wieczorek, M.; Diedrich, S.; Bottcher, S.; Witek, A.; Litwinska, B. Genetic analysis of poliovirus strains isolated from sewage in Poland. *Journal of Medical Virology* **2014**, 86, 1243-1248, doi:10.1002/jmv.23803. IF₂₀₁₄=**2,347**

- **Oncos Therapeutics, Helsinki, Finlandia, Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Networks (ITN), Komisja Europejska, ADenoViruses as novel clinical treatments (ADVance), Early-Stage Researcher**, 2012-2015 (36 miesięcy). Opracowanie nowych terapii z użyciem wirusów onkolitycznych (badania przedkliniczne *in vitro* oraz *in vivo*)

Publikacje naukowe powstałe w ramach współpracy:

- **Kuryk, L.**; Vassilev, L.; Ranki, T.; Hemminki, A.; Karioja-Kallio, A.; Levalampi, O.; Vuolanto, A.; Cerullo, V.; Pesonen, S. Toxicological and bio-distribution profile of a GM-CSF-expressing, double-targeted, chimeric oncolytic adenovirus ONCOS-102 - Support for clinical studies on advanced cancer treatment. *PloS one* **2017**, 12, e0182715, doi:10.1371/journal.pone.0182715. IF₂₀₁₇=**2,766**

- **Kuryk, L.**; Haavisto, E.; Garofalo, M.; Capasso, C.; Hirvinen, M.; Pesonen, S.; Ranki, T.; Vassilev, L.; Cerullo, V. Synergistic anti-tumor efficacy of immunogenic adenovirus ONCOS-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) and standard of care chemotherapy in preclinical mesothelioma model. *International journal of cancer* **2016**, 139, 1883-1893, doi:10.1002/ijc.30228. **IF₂₀₁₆=6,513**
- Garofalo, M.; Iovine, B.; **Kuryk, L.**; Capasso, C.; Hirvinen, M.; Vitale, A.; Yliperttula, M.; Bevilacqua, M.A.; Cerullo, V. Oncolytic Adenovirus Loaded with L-carnosine as Novel Strategy to Enhance the Antitumor Activity. *Molecular Cancer Therapeutics* **2016**, 15, 651-660, doi:10.1158/1535-7163.Mct-15-0559. **IF₂₀₁₆=5,764**
- Hirvinen, M.; Capasso, C.; Guse, K.; Garofalo, M.; Vitale, A.; Ahonen, M.; **Kuryk, L.**; Vaha-Koskela, M.; Hemminki, A.; Fortino, V.; et al. Expression of DAI by an oncolytic vaccinia virus boosts the immunogenicity of the virus and enhances antitumor immunity. *Molecular Therapy-Oncolytics* **2016**, 3, 9, doi:10.1038/mto.2016.2. **IF₂₀₁₆=0**
- Hendrickx, R.; Stichling, N.; Koelen, J.; **Kuryk, L.**; Lipiec, A.; Greber, U.F. Innate Immunity to Adenovirus. *Hum. Gene Ther.* **2014**, 25, 265-284, doi:10.1089/hum.2014.001. **IF₂₀₁₄=3,755**
- **Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii (WIHE), Warszawa, staż naukowy**, październik – grudzień, 2010 (3 miesiące). Identyfikacja zakażeń bakteryjnych z użyciem technik biologii molekularnej, FISH i mikroskopii fluorescencyjnej
- **Biomedical Research Institute "Alberto Sols" CSIC-UAM, Madryt, Hiszpania, Staż naukowy w ramach program ERASMUS**, sierpień-wrzesień 2010 (3 miesiące). Konstrukcja plazmidów, tworzenie bazy cDNA, transfekcja na liniach nowotworowych, badanie ekspresji, hodowle *in vitro*, cytometria przepływowa, mikroskopia fluorescencyjna, Western blot
- **University of the Balearic Islands (UIB), Palma de Mallorca, Hiszpania, studia w ramach program Erasmus**, luty-lipiec 2010 (6 miesięcy). Kultury *in vitro*

8. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ.

Opieka nad studentami

Promotor pomocniczy (2023/2024) – studia w trakcie realizacji (szkoła doktorska):

1. Opracowanie uniwersalnej i innowacyjnej platformy wektorowej opartej na ludzkim adenowirusie w leczeniu chorób nowotworowych oraz profilaktyce chorób zakaźnych, Szkoła Doktorska Politechniki Warszawskiej, CEZAMAT, Doktorant: Aleksander Gryciuk (Promotor dr hab. Monika Staniszevska) [D5]

Promotor pomocniczy (2022-2023) – prace w trakcie realizacji (studia magisterskie):

2. Next generation cancer immunotherapies based on modern oncolytic viruses, Student: Elisa Baggio, University of Padova, Włochy (Promotor Dr Mariangela Garofalo) [D4]

Promotor pomocniczy (2019-2020, 2020-2021) – prace obronione (studia magisterskie):

3. Dual combinatory immunotherapy for the treatment of melanoma. Authored by Laura Bertinato, M.Sc. in Chemistry and Pharmaceutical Technology, University of Padova, Włochy (Promotor Dr Mariangela Garofalo) [D3]
4. Combining oncolytic viruses with cancer immunotherapy as a tool to improve mesothelioma treatment. Authored by Giulia Rodella, M.Sc. in Chemistry and Pharmaceutical Technology, University of Padova, Włochy (Promotor Dr Mariangela Garofalo) [D2]
5. The emerging role of combination therapies with oncolytic adenoviruses against melanoma. Authored by Anna Miani, M.Sc. in Pharmaceutical Biotechnologies, University of Padova, Włochy (Promotor Dr Mariangela Garofalo) [D1]

9. NAGRODY, WYRÓŻNIENIA, STYPENDIA, GRANTY BADAWCZE, HABILITACJA ZA GRANICĄ, PATENTY.

Nagrody, wyróżnienia, stypendia

- Short Term Scientific Mission (STSM), European Cooperation in Science and Technology (COST), 2022, University of Padova, Włochy
- Stypendium MNiE dla wybitnych młodych naukowców, MNiE, 2020-2023, NIZP PZH - PIB
- Polska Nagroda Inteligentnego Rozwoju, Naukowiec Przyszłości, Centrum Inteligentnego Rozwoju, 2020, NIZP PZH - PIB
- Short Term Scientific Mission (STSM), European Cooperation in Science and Technology (COST), 2020, University of Padova, Włochy
- Nagroda 1 stopnia im. Ludwika Rajchmana, NIZP PZH – PIB, 2017
- Young Scientific Meeting Grant (YSMG) Grant, FEMS, 2014, Primosten, Chorwacja
- MCAA MicroTravel Grant, Marie Curie Alumni Association, 2014
- Stypendium ITN Marie Curie, ADVance, 2012-2015, Komisja Europejska, Oncos Therapeutics, Helsinki, Finlandia
- Stypendium Leonardo da Vinci, 2012, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Robert Koch Institute, Berlin, Niemcy
- Stypendium Erasmus, studia, 2010, Uniwersytet Śląski w Katowicach, University of Balearic Islands, Palma de Mallorca, Hiszpania
- Stypendium Erasmus praktyki 2010, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Biomedical Research Institute "Alberto Sols" CSIC-UAM, Madryt, Hiszpania

Habilitacja:

- Habilitacja uzyskana we Włoszech w ramach Narodowej Habilitacji Naukowej (Abilitazione Scientifica Nazionale), przeprowadzonej przez Włoskie Ministerstwo Edukacji, Uniwersytetów i Badań (Ministry of Education, University and Research (MIUR)), Habilitacja w dyscyplinie Biochemia Kliniczna i Kliniczna Biologia Molekularna (Biochemica Clinica E Biologia Molecolare Clinica), Włochy, 2021 [H1]

Granty badawcze:

1. Projekt krajowy, **SONATA**, NCN, **2022/47/D/NZ7/03212**, Opracowanie nowej immunoterapii przeciwnowotworowej w leczeniu międzybłoniaka z użyciem adenowirusów onkolitycznych uzbrojonych w ligandy ICOS i CD40 w połączeniu z inhibitorami punktów kontrolnych anty-PD-1 i anty-CTLA-4, **Kierownik projektu Łukasz Kuryk**, 2023-2026, do realizacji we współpracy z University of Padova, Włochy; Medical University of Graz, Austria; University of Helsinki, Finlandia; Politechnika Warszawska, Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii (CEZAMAT), IDIBELL, Hiszpania (projekt zakwalifikowany do finansowania w maju 2023) [G5]
2. Projekt międzynarodowy, **European Cooperation in Science and Technology, COST Action CA17140**, Cancer Nanomedicine - from the bench to the bedside, **Komisja Europejska**, Working Group 3: Preclinical studies of nanodrugs, **Łukasz Kuryk – członek zespołu**, 2020-2022, realizowany we współpracy z University of Padova, Włochy (projekt zrealizowany) [G4]
3. Projekt krajowy, **SONATINA**, NCN, **2019/32/C/NZ7/00156**, Opracowanie nowych i efektywniejszych metod leczenia międzybłoniaka opłucnej z użyciem wirusa onkolitycznego kodującego ICOS ligand w połączeniu z inhibitorem punktu kontrolnego anty PD-1, **Kierownik projektu Łukasz Kuryk**, 2019-2022, realizowany we współpracy z University of Padova, Włochy; Medical University of Graz, Austria; University of Helsinki, Finlandia; Politechnika Warszawska, Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii (CEZAMAT), (projekt zrealizowany) [G3]
4. Projekt krajowy, **MINIATURA**, NCN, **2018/02/X/NZ7/00727**, Opracowanie nowych i bardziej efektywnych metod leczenia międzybłoniaka opłucnej z wykorzystaniem wirusów onkolitycznych, **Kierownik projektu Łukasz Kuryk**, 2018-2019, realizowany we współpracy z University of Padova, Włochy (projekt zrealizowany) [G2]
5. Projekt międzynarodowy, **Marie Skłodowska-Curie Innovative Training Networks (ITN)**, **Komisja Europejska**, ADenoViruses as novel clinical treatments (ADVance), **Early-Stage Researcher Łukasz Kuryk** (fellowship holder, Oncos Therapeutics, Helsinki, Finlandia), 2012-2015 (projekt zrealizowany) [G1]

Patenty:

1. **Kuryk, L.**, Pesonen, S., Ranki, T., Vassilev, L., Haavsyto, E., Vuolanto, A., Combining adenovirus and chemotherapeutic agents for treating cancer, patent przyznany przez European Patent Office (EP3402889), Chiny (201780006703.7), Finlandię (FI127460B) [PT2]
2. **Kuryk, L.**, Pesonen, S., Vuolanto, A., Ranki, T., Jaderberg, M., Haavisto, E., Combining adenovirus and checkpoint inhibitors for treating cancer (EP3293201-A1; WO2018046803-A1), patent uzyskany w USA (WO2018046803, 16330274) [PT1]

10. PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO NA PODSTAWIE ANALIZY BIBLIOMETRYCZNEJ.

1. Impact Factor.

Impact Factor	
Łączny IF* wszystkich publikacji naukowych (41 publikacji)	IF₂₀₁₃₋₂₀₂₃=181,08 (średnia wartość IF przypadająca na jedną publikację: 4,41).
Łączny IF* artykułów naukowych stanowiących cykl powiązanych tematycznie publikacji (9 publikacji)	IF₂₀₁₆₋₂₀₂₃=45,17 (średnia wartość IF przypadająca na jedną publikację: 5,01).
Autor korespondencyjny w 13/41 publikacjach naukowych (31 publikacji oryginalnych, 10 publikacji przeglądowych)	
Pierwszy autor w 13 publikacjach, ostatni autor w 4 artykułach naukowych	
Łączny IF* wszystkich streszczeń konferencyjnych (28 streszczeń konferencyjnych)	IF₂₀₁₄₋₂₀₂₃=250,54 (średnia wartość IF przypadająca na jedną publikację: 8,94).

*zgodnie z rokiem opublikowania pracy naukowej/streszczenia konferencyjnego.

2. Liczba cytowań publikacji wnioskodawcy, z oddzielnym uwzględnieniem autocytowań.

Baza danych	Liczna cytowań	
	Łączna	Bez autocytowań
Scopus	973	768
Web of Science	919	730

Google Scholar	1249	brak danych
Researchgate	1118	brak danych

3. Indeks Hirscha.

Indeks Hirscha	Baza danych			
	Scopus	Web of Science	Google Scholar	Researchgate
	18	17	18	18

LITERATURA

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **2021**, *71*, 209-249, doi:10.3322/caac.21660.
2. Jemal, A.; Bray, F.; Center, M.M.; Ferlay, J.; Ward, E.; Forman, D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **2011**, *61*, 69-90, doi:10.3322/caac.20107.
3. Jeanbart, L.; Ballester, M.; de Titta, A.; Cortesy, P.; Romero, P.; Hubbell, J.A.; Swartz, M.A. Enhancing efficacy of anticancer vaccines by targeted delivery to tumor-draining lymph nodes. *Cancer immunology research* **2014**, *2*, 436-447, doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0019-T.
4. Kuryk, L.; Vassilev, L.; Ranki, T.; Hemminki, A.; Karioja-Kallio, A.; Levalampi, O.; Vuolanto, A.; Cerullo, V.; Pesonen, S. Toxicological and bio-distribution profile of a GM-CSF-expressing, double-targeted, chimeric oncolytic adenovirus ONCOS-102 - Support for clinical studies on advanced cancer treatment. *PloS one* **2017**, *12*, e0182715, doi:10.1371/journal.pone.0182715.
5. Bae, Y.H.; Park, K. Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2011**, *153*, 198-205, doi:10.1016/j.jconrel.2011.06.001.
6. Devaud, C.; John, L.B.; Westwood, J.A.; Darcy, P.K.; Kershaw, M.H. Immune modulation of the tumor microenvironment for enhancing cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* **2013**, *2*, e25961, doi:10.4161/onci.25961.
7. Marusyk, A.; Polyak, K. Tumor heterogeneity: causes and consequences. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1805*, 105-117, doi:10.1016/j.bbcan.2009.11.002.
8. Groh, V.; Wu, J.; Yee, C.; Spies, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* **2002**, *419*, 734-738, doi:10.1038/nature01112.
9. Palazon, A.; Aragones, J.; Morales-Kastresana, A.; de Landazuri, M.O.; Melero, I. Molecular pathways: hypoxia response in immune cells fighting or promoting cancer. *Clin Cancer Res* **2012**, *18*, 1207-1213, doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1591.
10. Ranki, T.; Pesonen, S.; Hemminki, A.; Partanen, K.; Kairemo, K.; Alanko, T.; Lundin, J.; Linder, N.; Turkki, R.; Ristimäki, A.; et al. Phase I study with ONCOS-102 for the treatment of solid tumors - an evaluation of clinical response and exploratory analyses of immune markers. *J Immunother Cancer* **2016**, *4*, 17, doi:10.1186/s40425-016-0121-5.

11. Shoushtari, A.N.; Olszanski, A.J.; Nyakas, M.; Hornyak, T.J.; Wolchok, J.D.; Levitsky, V.; Kuryk, L.; Hansen, T.B.; Jaderberg, M. Pilot Study of ONCOS-102 and Pembrolizumab: Remodeling of the Tumor Microenvironment and Clinical Outcomes in Anti-PD-1-Resistant Advanced Melanoma. *Clin Cancer Res* **2023**, *29*, 100-109, doi:10.1158/1078-0432.CCR-22-2046.
12. Garofalo, M.; Bertinato, L.; Staniszevska, M.; Wieczorek, M.; Salmaso, S.; Schrom, S.; Rinner, B.; Pancer, K.W.; Kuryk, L. Combination Therapy of Novel Oncolytic Adenovirus with Anti-PD1 Resulted in Enhanced Anti-Cancer Effect in Syngeneic Immunocompetent Melanoma Mouse Model. *Pharmaceutics* **2021**, *13*, doi:10.3390/pharmaceutics13040547.
13. Kuryk, L.; Moller, A.W.; Garofalo, M.; Cerullo, V.; Pesonen, S.; Alemany, R.; Jaderberg, M. Antitumor-specific T-cell responses induced by oncolytic adenovirus ONCOS-102 (AdV5/3-D24-GM-CSF) in peritoneal mesothelioma mouse model. *J Med Virol* **2018**, *90*, 1669-1673, doi:10.1002/jmv.25229.
14. Vassilev, L.; Ranki, T.; Joensuu, T.; Jager, E.; Karch, J.; Wahle, C.; Partanen, K.; Kairemo, K.; Alanko, T.; Turkki, R.; et al. Repeated intratumoral administration of ONCOS-102 leads to systemic antitumor CD8(+) T-cell response and robust cellular and transcriptional immune activation at tumor site in a patient with ovarian cancer. *Oncoimmunology* **2015**, *4*, e1017702, doi:10.1080/2162402X.2015.1017702.
15. Kuryk, L.; Møller, A.-S.W. Next generation of oncolytic viruses with the double transgenes PADI1 and TIMP-2 exhibit anti-tumor activity against melanoma in nude mouse and humanized NOG mouse models. *Molecular Therapy - Oncolytics* **2023**, doi:10.1016/j.omto.2023.01.002.
16. Gryciuk, A.; Rogalska, M.; Baran, J.; Kuryk, L.; Staniszevska, M. Oncolytic Adenoviruses Armed with Co-Stimulatory Molecules for Cancer Treatment. *Cancers* **2023**, *15*, doi:10.3390/cancers15071947.
17. Hu, J.C.; Coffin, R.S.; Davis, C.J.; Graham, N.J.; Groves, N.; Guest, P.J.; Harrington, K.J.; James, N.D.; Love, C.A.; McNeish, I.; et al. A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 6737-6747, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0759.
18. Senzer, N.N.; Kaufman, H.L.; Amatruda, T.; Nemunaitis, M.; Reid, T.; Daniels, G.; Gonzalez, R.; Glaspy, J.; Whitman, E.; Harrington, K.; et al. Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2009**, *27*, 5763-5771, doi:10.1200/JCO.2009.24.3675.
19. Andtbacka, R.H.; Kaufman, H.L.; Collichio, F.; Amatruda, T.; Senzer, N.; Chesney, J.; Delman, K.A.; Spitler, L.E.; Puzanov, I.; Agarwala, S.S.; et al. Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2015**, *33*, 2780-2788, doi:10.1200/JCO.2014.58.3377.
20. Kuryk, L.; Moller, A.S. Next Generation ONCOS Double Transgene Oncolytic Adenovirus Exhibits Enhanced Anticancer Effect in Melanoma. *Molecular Therapy* **2020**, *28*, 162-162.
21. Garofalo, M.; Pancer, K.W.; Wieczorek, M.; Staniszevska, M.; Salmaso, S.; Caliceti, P.; Kuryk, L. From Immunosuppression to Immunomodulation - Turning Cold Tumours into Hot. *J Cancer* **2022**, *13*, 2884-2892, doi:10.7150/jca.71992.
22. Kuryk, L.; Haavisto, E.; Garofalo, M.; Capasso, C.; Hirvinen, M.; Pesonen, S.; Ranki, T.; Vassilev, L.; Cerullo, V. Synergistic anti-tumor efficacy of immunogenic adenovirus

- ONCOS-102 (Ad5/3-D24-GM-CSF) and standard of care chemotherapy in preclinical mesothelioma model. *International journal of cancer* **2016**, *139*, 1883-1893, doi:10.1002/ijc.30228.
23. Siurala, M.; Vaha-Koskela, M.; Havunen, R.; Tahtinen, S.; Bramante, S.; Parviainen, S.; Mathis, J.M.; Kanerva, A.; Hemminki, A. Syngeneic syrian hamster tumors feature tumor-infiltrating lymphocytes allowing adoptive cell therapy enhanced by oncolytic adenovirus in a replication permissive setting. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1136046, doi:10.1080/2162402X.2015.1136046.
 24. Kuryk, L.; Moller, A.W.; Jaderberg, M. Combination of immunogenic oncolytic adenovirus ONCOS-102 with anti-PD-1 pembrolizumab exhibits synergistic antitumor effect in humanized A2058 melanoma huNOG mouse model. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, e1532763, doi:10.1080/2162402X.2018.1532763.
 25. Nguyen, A.; Ho, L.; Wan, Y. Chemotherapy and Oncolytic Virotherapy: Advanced Tactics in the War against Cancer. *Frontiers in oncology* **2014**, *4*, 145, doi:10.3389/fonc.2014.00145.
 26. Hodi, F.S.; O'Day, S.J.; McDermott, D.F.; Weber, R.W.; Sosman, J.A.; Haanen, J.B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J.C.; et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* **2010**, *363*, 711-723, doi:10.1056/NEJMoa1003466.
 27. Topalian, S.L.; Sznol, M.; McDermott, D.F.; Kluger, H.M.; Carvajal, R.D.; Sharfman, W.H.; Brahmer, J.R.; Lawrence, D.P.; Atkins, M.B.; Powderly, J.D.; et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2014**, *32*, 1020-1030, doi:10.1200/JCO.2013.53.0105.
 28. Johnson, D.B.; Peng, C.; Sosman, J.A. Nivolumab in melanoma: latest evidence and clinical potential. *Ther Adv Med Oncol* **2015**, *7*, 97-106, doi:10.1177/1758834014567469.
 29. Rizvi, N.A.; Hellmann, M.D.; Snyder, A.; Kvistborg, P.; Makarov, V.; Havel, J.J.; Lee, W.; Yuan, J.; Wong, P.; Ho, T.S.; et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* **2015**, *348*, 124-128, doi:10.1126/science.aaa1348.
 30. Tumeh, P.C.; Harview, C.L.; Yearley, J.H.; Shintaku, I.P.; Taylor, E.J.; Robert, L.; Chmielowski, B.; Spasic, M.; Henry, G.; Ciobanu, V.; et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **2014**, *515*, 568-571, doi:10.1038/nature13954.
 31. Herbst, R.S.; Soria, J.C.; Kowanetz, M.; Fine, G.D.; Hamid, O.; Gordon, M.S.; Sosman, J.A.; McDermott, D.F.; Powderly, J.D.; Gettinger, S.N.; et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* **2014**, *515*, 563-567, doi:10.1038/nature14011.
 32. Ai, M.; Curran, M.A. Immune checkpoint combinations from mouse to man. *Cancer Immunol Immunother* **2015**, *64*, 885-892, doi:10.1007/s00262-014-1650-8.
 33. Vile, R.G. How to train your oncolytic virus: the immunological sequel. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **2014**, *22*, 1881-1884, doi:10.1038/mt.2014.188.
 34. Zamarin, D.; Holmgaard, R.B.; Subudhi, S.K.; Park, J.S.; Mansour, M.; Palese, P.; Merghoub, T.; Wolchok, J.D.; Allison, J.P. Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Science translational medicine* **2014**, *6*, 226ra232, doi:10.1126/scitranslmed.3008095.
 35. van Kooten, J.P.; Belderbos, R.A.; von der Thusen, J.H.; Aarts, M.J.; Verhoef, C.; Burgers, J.A.; Baas, P.; Aalbers, A.G.J.; Maat, A.; Aerts, J.; et al. Incidence, treatment

- and survival of malignant pleural and peritoneal mesothelioma: a population-based study. *Thorax* **2022**, 77, 1260-1267, doi:10.1136/thoraxjnl-2021-217709.
36. Ranki, T.; Joensuu, T.; Jager, E.; Karbach, J.; Wahle, C.; Kairemo, K.; Alanko, T.; Partanen, K.; Turkki, R.; Linder, N.; et al. Local treatment of a pleural mesothelioma tumor with ONCOS-102 induces a systemic antitumor CD8(+) T-cell response, prominent infiltration of CD8(+) lymphocytes and Th1 type polarization. *Oncoimmunology* **2014**, 3, e958937, doi:10.4161/21624011.2014.958937.
37. Pesonen, S.; Diaconu, I.; Kangasniemi, L.; Ranki, T.; Kanerva, A.; Pesonen, S.K.; Gerdemann, U.; Leen, A.M.; Kairemo, K.; Oksanen, M.; et al. Oncolytic immunotherapy of advanced solid tumors with a CD40L-expressing replicating adenovirus: assessment of safety and immunologic responses in patients. *Cancer Res* **2012**, 72, 1621-1631, doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-3001.

Łukasz Kuryk