



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 355 882**

② Número de solicitud: 200900866

⑤ Int. Cl.:

A61K 31/277 (2006.01)

A61K 31/554 (2006.01)

A61K 31/4422 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **24.03.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.04.2011

⑰ Solicitante/s:
Institut Català d'Oncologia (Titular al 50 %)
Avda. Gran Via Hospitalet, 199
08907 L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, ES
Fundació Privada Institut d'Investigació
Biomèdica de Bellvitge (IDIBELL) (Titular al 50 %)

⑱ Inventor/es: **Gros Vidal, Alena;**
Cascallo Piqueras, Manel María y
Alemany Bonastre, Ramón

⑳ Agente: **Zea Checa, Bernabé**

⑳ Título: **Combinación de adenovirus oncolítico y un bloqueador de canal de calcio y su uso para el tratamiento del cáncer.**

㉑ Resumen:

Combinación de un adenovirus oncolítico y un bloqueador de canal de calcio y su uso para el tratamiento del cáncer. Combinación que comprende dos componentes: (a) el primer componente es una composición farmacéutica que comprende un bloqueador de canal de calcio junto con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables; y (b) el segundo componente es una composición farmacéutica que comprende un adenovirus oncolítico junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, así como su uso para administración separada o secuencial para el tratamiento del cáncer.

También comprende el uso del bloqueador de canal de calcio en la combinación como potenciador de la actividad oncolítica del adenovirus.

ES 2 355 882 A1

DESCRIPCIÓN

Combinación de un adenovirus oncolítico y un bloqueador de canal de calcio y su uso para el tratamiento del cáncer.

La presente invención está relacionada con la biología del cáncer. En particular, la presente invención se refiere a una combinación de un adenovirus oncolítico y un bloqueador de canal de calcio, la cual es efectiva en el tratamiento del cáncer.

Estado de la técnica

Los adenovirus oncolíticos representan una alternativa prometedora para el tratamiento del cáncer. Cuando se administra un adenovirus oncolítico, éste se replica de manera selectiva en las células tumorales. La posterior lisis de las células infectadas provoca la liberación de la progenie viral al medio extracelular y la progenie viral liberada se disemina lateralmente hacia células vecinas tumorales no infectadas. Como consecuencia de este mecanismo, se produce un efecto amplificador (multiplicativo) de la dosis viral inicial.

Sin embargo se han detectado ciertas limitaciones que repercuten negativamente en la diseminación del adenovirus lo cual, a su vez, afecta de manera negativa a la eficacia oncolítica de estos adenovirus.

En particular, cuando el adenovirus se administra por vía sistémica, el adenovirus se elimina rápidamente del torrente sanguíneo, lo que reduce la cantidad de virus disponible para la infección del tumor. Además, una vez han difundido al interior de la masa tumoral, los adenovirus oncolíticos deben hacer frente a las barreras físicas impuestas por el estroma tumoral (zona del tumor carente de células tumorales) y a la activación del sistema inmune (que provoca la destrucción de partículas víricas).

Adicionalmente, la diseminación intratumoral del adenovirus está seriamente limitada por la velocidad de liberación del virus al medio extracelular. La liberación del virus al medio extracelular no se inicia hasta las etapas más tardías del ciclo viral, cuando la expresión de la proteína ADP (en inglés “*adenovirus death protein*”) se acumula en una cantidad suficiente como para promover la liberación de la progenie del interior de la célula hospedadora. A pesar de que el mecanismo de lisis celular y liberación de partículas víricas no se conoce con exactitud, distintas hipótesis sugieren que la proteína ADP funciona modificando los depósitos intracelulares de calcio (cfr. Tollefson A. E. *et al.*, “The E3-11,6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants”, *Virology*. 1996; vol. 220(1), pp. 152-62; Doronin K. *et al.*, “Overexpression of the ADP (E3-11,6K) protein increases cell lysis and spread of adenovirus”, *Virology* 2003; vol. 305(2), pp. 378-87). Cada vez se dispone de más evidencias que sugieren que muchos virus inducen la muerte de la célula infectada y la liberación de su progenie mediante la alteración de la concentración intracelular de calcio (Ruiz M. C. *et al.*, “Role of Ca²⁺ in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections”, *Cell calcium*, 2000, vol. 28(3), pp. 137-49).

Con el fin de mejorar la diseminación de los adenovirus oncolíticos se han diseñado distintas estrategias. En este sentido, se ha propuesto la expresión de transgenes tales como proteasas (cfr. Ganesh S. *et al.*, “Intratatumoral coadministration of hyaluronidase enzyme and oncolytic adenoviruses enhances virus potency in metastatic tumor models”, *Clin. Cancer Res.*, 2008, vol. 14(12), pp. 3933-3941), que provocan la disrupción del tejido conectivo, o proteínas fusogénicas. Sin embargo, la inserción de transgenes en el marco del genoma adenoviral está limitada por el tamaño (tanto del genoma adenoviral como del transgén), y requiere la compatibilidad de la expresión de dicho transgén en el ciclo replicativo del adenovirus. Como alternativa se ha descrito la inclusión de mutaciones puntuales específicas o deleciones parciales en el gen E1B/19K (7), la sobre-expresión de la proteína ADP a través de deleciones parciales o completas de la unidad transcripcional E3 del adenovirus (cfr. Toth K. *et al.*, “An oncolytic adenovirus vector combining enhanced cell-to-cell spreading, mediated by the ADP cytolytic protein, with selective replication in cancer cells with deregulated wnt signaling”, *Cancer research*, 2004, vol. 64(10), pp. 3638-3644), o la mutación truncante de la región C-terminal de la proteína viral i-leader.

Si bien las estrategias indicadas más arriba incrementan la diseminación célula-célula *in vitro*, y mejoran el potencial terapéutico de los adenovirus oncolíticos *in vivo*, requieren la manipulación del genoma adenovírico. Además algunas de las modificaciones conllevan efectos potencialmente indeseables en la actividad oncolítica del adenovirus como, por ejemplo, la reducción de la producción viral (observada en los mutantes E1B/19K en algunos tipos celulares) o la pérdida de una o más funciones inmunomoduladoras (en los mutantes de la región E3).

Otro de los problemas asociados con las terapias actuales para el tratamiento del cáncer es la aparición de resistencia de las células tumorales a la quimio- y radioterapia. En este sentido, la solicitud PCT WO2007/103825 indica que la combinación de la quimio- y radioterapia con la terapia basada en el uso de adenovirus oncolíticos puede mejorar la eficacia del tratamiento. Así, en este documento se propone un método para el tratamiento del cáncer en base a la combinación de un primer agente que modula el ciclo celular y un segundo agente que es un agente anticancerígeno.

A pesar de los esfuerzos realizados hasta la fecha, existe todavía la necesidad de encontrar nuevas aproximaciones terapéuticas con una eficacia mejorada en el tratamiento del cáncer.

Explicación de la invención

Los investigadores de la presente invención han descubierto que los bloqueadores de canales de calcio (también conocidos como “antagonistas del calcio”), mejoran la diseminación intratumoral de los adenovirus oncolíticos. Los resultados obtenidos demuestran que estos compuestos (y, en particular el verapamilo) incrementan la citotoxicidad del adenovirus oncolítico *in vitro* e incrementa la actividad antitumoral del mismo en dos modelos xenógrafos distintos de tumores humanos *in vivo*. Ventajosamente, estas mejoras en la citotoxicidad (análisis *in vitro*) y actividad tumoral (análisis *in vivo*) no afectan negativamente a la selectividad del adenovirus por la célula tumoral ni a la síntesis de proteínas de fase temprana y tardía.

Así, en un primer aspecto la presente invención se refiere a una combinación que comprende dos componentes: (a) el primer componente comprende un bloqueador de canal de calcio junto con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables; y (b) el segundo componente comprende un adenovirus oncolítico junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en forma de composiciones inyectables, ya sea como soluciones líquidas o, en el caso de los bloqueadores de canal de calcio, suspensiones. También se pueden administrar formas sólidas del bloqueador de canal de calcio para solución o suspensión, en líquido antes de la inyección. Estas preparaciones también se pueden emulsionar. Una composición típica para este propósito comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y similares. Ejemplos de disolventes son el propilenglicol, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables tales como el etiloleato. Portadores acuosos incluyen el agua, soluciones acuosas/alcohólicas, soluciones salinas, vehículos parenterales tales como el cloruro de sodio o dextrosa de Ringer. Vehículos intravenosos incluyen reconstituyentes (“*replenishers*”) de fluidos y nutrientes. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes o gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con parámetros bien conocidos para el experto en la materia.

La combinación de la presente invención se proporciona en forma de dos componentes, en la cual el componente (a) (que incluye el bloqueador de canal de calcio) y el componente (b) (que incluye el adenovirus oncolítico) se envasan separadamente. Por ejemplo, una primera forma de dosis unitaria (p.e. un primer sobre) puede contener el adenovirus oncolítico (en forma líquida) y una segunda forma de dosis unitaria, (p.e., un segundo sobre) puede contener el bloqueador de canal de calcio (ya sea en forma líquida, en suspensión, emulsión o en forma sólida).

En una realización del primer aspecto de la invención, el componente (a) se administra una vez al día.

En otra realización del primer aspecto de la invención, el componente (a) se administra posteriormente a la administración del componente (b).

En todavía otra realización del primer aspecto de la invención, se administra en primer lugar una única dosis del componente (b) y posteriormente se administra una o varias dosis del componente (a) con el fin de prolongar la actividad potenciada del adenovirus oncolítico hasta conseguir el efecto terapéutico deseado (la erradicación del tumor).

En todavía aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, tanto el componente (a) como el componente (b) se administran por vía sistémica.

En aún otra realización preferida del primer aspecto de la invención, el componente (a) se administra por vía oral y el componente (b) se administra por vía intratumoral.

Los bloqueadores de canales del calcio son una clase de compuestos empleados para tratar la hipertensión arterial, la angina de pecho y las arritmias cardíacas. La característica farmacológica común para todos estos compuestos es la inhibición de la entrada de calcio a través de los canales pasivos “lentos” (*passive “slow” channels*). Existen principalmente tres subgrupos: (a) derivados de las dihidropiridinas: azelnidipina, amlodipina, felodipina, isradipina, lacidipina, lercanidipina, nicardipina, nifedipina, nilvadipina, nimodipina, nisoldipina, nitrendipina, manidipina, mebudipina, pranidipina, clevidipina; (b) derivados de la papaverina o fenilalquilamina: verapamilo; y (c) derivados de las benzodiazepinas: diltiazem. Preferiblemente, el bloqueador de canal de calcio se selecciona del grupo formado por verapamilo, amlodipino y diltiazem. Más preferiblemente, el bloqueador de canal de calcio es verapamilo.

El adenovirus oncolítico que se puede usar de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede ser cualquiera de los conocidos en el estado de la técnica. Ejemplos ilustrativos no limitativos incluyen el adenovirus humano de tipo 5 (de aquí en adelante también referido como “Ad5”) y los adenovirus descritos en las solicitudes de patente PCT WO2003080083 y WO2007088229.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, el adenovirus contiene una secuencia de DNA humano aislando a un promotor que confiere expresión selectiva a un gen adenoviral. La producción del mismo se describe en la solicitud WO2007088229.

ES 2 355 882 A1

Los resultados mostrados más abajo demuestran que la combinación de un adenovirus oncolítico con un bloqueador de canal de calcio como el verapamilo incrementa de forma sustancial la liberación del adenovirus de la célula infectada, sin afectar negativamente a la producción total de virus. Este bloqueador de canales de calcio es capaz de mejorar la cinética de liberación en diversos tipos celulares, incluyendo melanoma, adenocarcinomas de pulmón y páncreas, y fibroblastos asociados a tumor llevando, en todos los casos, a una diseminación célula-célula y a una citotoxicidad incrementadas. El tipo de cáncer a ser tratado determina el diseño específico del adenovirus oncolítico a ser usado. Como es bien conocido en el estado de la técnica, se puede conseguir que un adenovirus oncolítico se dirija de manera específica a un tipo de cáncer concreto realizando modificaciones en su genoma.

Los investigadores de la presente invención han descubierto que los bloqueadores de canales de calcio desencadenan en la célula hospedadora un mecanismo que es independiente tanto de la inducción de apoptosis como de la expresión de la proteína ADP (tal y como se ilustra en la Fig. 2B el verapamilo no induce apoptosis (en base al marcador PARP)). Adicionalmente, se ha descubierto que la liberación de partículas víricas se inicia mucho antes administrando un bloqueador de canal de calcio. Consecuentemente estos bloqueadores de canales de calcio desencadenan un mecanismo aún desconocido, mediante el cual se promueve la liberación del adenovirus de las células infectadas en una fase más temprana.

Pese a que el mecanismo exacto a través del cual los bloqueadores de canales de calcio promueven la liberación celular del adenovirus oncolítico es todavía desconocido, parece que la inhibición del flujo de entrada de calcio es necesaria para inducir el fenotipo observado. Tal y como se ilustra más abajo, en la Fig. 3B, miembros de cada tipo de bloqueadores de canales de calcio (fenilalquilaminas, dihidropiridinas y benzotiazepinas) tienen todos un efecto similar en la liberación del adenovirus, lo que sugiere que la actividad responsable de la liberación/diseminación de las partículas víricas es la actividad bloqueadora de canales de calcio, común a los tres tipos. El efecto observado por la privación de calcio en los adenovirus oncolíticos, de acuerdo con la presente invención, es contrario al efecto que se ha observado con la depleción de calcio en, por ejemplo, coxsackievirus, en donde se produce una disminución de la liberación de la progenie viral y una inhibición de la producción de virus total en las células infectadas con citomegalovirus, el virus del sarampión y el de la viruela (cfr. Ruiz M. C. *et al.*, citado más arriba).

Por otro lado, la solicitud PCT WO2007/10382 describe un método para el tratamiento del cáncer en base a la combinación de un primer agente que modula el ciclo celular y un segundo agente que es un agente anticancerígeno. En la sección de "Ejemplos" se ilustran varias combinaciones de adenovirus oncolíticos con un segundo agente anticancerígeno. En particular se ejemplifican las combinaciones adenovirus Delta-24+CPT-11, adenovirus ICOVIR5+temozolamida y adenovirus ICOVIR5+RAD001. Tanto CPT-11, como la temozolamida y RAD001 son productos ampliamente usados como agentes quimioterapéuticos.

Los agentes quimioterapéuticos tienen la capacidad de destruir las células cancerosas. Habitualmente, los fármacos para el cáncer actúan dañando el ARN o ADN que indica a la célula cómo realizar una copia de sí misma en la división. Si las células cancerosas no pueden dividirse, mueren. Cuanto más rápido se dividan las células cancerosas, habrá más probabilidades de que la quimioterapia destruya las células y el tumor reduzca su tamaño. Adicionalmente, estos fármacos inducen al suicidio celular (muerte celular programada o apoptosis).

El mecanismo de acción de los agentes quimioterapéuticos es, por lo tanto, totalmente diferente al que ejerce un bloqueador de canal de calcio sobre la diseminación del adenovirus ya que, tal y como se ha indicado más arriba, la acción de los bloqueadores de canal de calcio es independiente de la apoptosis celular.

Los investigadores de la presente invención han llevado a cabo un estudio con el fin de comparar la velocidad de diseminación provocada por el verapamilo (como bloqueador ejemplificativo de los bloqueadores de canal de calcio) así como la provocada por otros agentes quimioterapéuticos conocidos como son la temozolamida y RAD001. Para ello, se infectaron células A549 con Ad5 y, a continuación, se administró cada uno de los productos. Como se puede observar en la Fig. 6, la administración de verapamilo consigue aumentar notablemente la diseminación del adenovirus con respecto a los resultados que se obtienen usando temozolamida o RAD001. Es destacable, además, el hecho de que el tamaño de las calvas obtenidas tras la administración de la temozolamida o RAD001 es prácticamente idéntico al tamaño de las calvas sin la adición de ningún compuesto. Por lo tanto, el verapamilo (y por extensión cualquier bloqueador de canal de calcio) incrementa notablemente la diseminación del adenovirus a las células vecinas, lo cual conlleva a un incremento en la actividad antitumoral del adenovirus y, en consecuencia, a una mayor eficacia (ya que la progenie viral infecta más rápidamente a las células tumorales vecinas).

Adicionalmente, el hecho de que se incremente de forma tan notable la diseminación posibilita que usando una misma cantidad de adenovirus el efecto terapéutico (i.e. efecto oncolítico) sea muy superior.

Otro aspecto ventajoso del uso de bloqueadores de canal de calcio es que estos no afectan negativamente a la viabilidad celular cuando se usan a dosis elevadas, lo cual supone un gran avance en el tratamiento del cáncer.

El uso de bloqueadores de canal de calcio como potenciadores del efecto antitumoral de los adenovirus oncolíticos puede beneficiarse de medidas de salvaguarda adicionales que no son posibles con los métodos genéticos descritos anteriormente. Así, por ejemplo, la aparición de toxicidades inesperadas puede ser fácilmente revertida suprimiendo el uso del bloqueador.

Por todo lo comentado más arriba, junto con los resultados mostrados más abajo, se puede concluir que los bloqueadores de canal de calcio constituyen una forma nueva, segura y versátil de incrementar la potencia antitumoral de los adenovirus oncolíticos en el marco de su uso clínico.

5 Adicionalmente, mientras que con los métodos genéticos usados para el incremento de la liberación se puede comprometer alguna de las funciones inmunomoduladoras de la región E3, o incluso reducir la producción viral total (al inducir una muerte celular más temprana), el bloqueador de canal de calcio es capaz de incrementar la diseminación y la citotoxicidad viral sin que se vea modificada la producción viral ni la expresión de proteínas adenovirales.

10 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a la combinación de acuerdo con el primer aspecto de la invención para uso separado o secuencial en el tratamiento del cáncer.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende la combinación definida según el primer aspecto de la invención e instrucciones para su uso.

15 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un bloqueador de canal de calcio para uso como agente potenciador de la actividad antitumoral de un adenovirus oncolítico.

20 El efecto potenciador que ejercen los bloqueadores de canales de calcio sobre los adenovirus se puede determinar mediante cualquiera de los métodos rutinarios bien conocidos por el experto en la materia, comparando la actividad antitumoral en presencia y ausencia del bloqueador de canal de calcio.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

30 Fig. 1 muestra que el verapamilo incrementa la liberación, diseminación y citotoxicidad del Ad5 *in vitro*. (A) Producción viral y cinética de liberación de Ad5 o de Ad5 combinado con verapamilo 40 μM en células A549. El contenido viral de la fracción total (CE) y del sobrenadante (SN) se analizaron en los tiempos indicados. *, significativo ($p=8,1 \times 10^{-5}$ y $p=0,03$ a las 40 h y las 48 h post-infección respectivamente) respecto al SN de Ad5 mediante test de la *t*-Student a dos colas para muestras desapareadas. (-○- = sobrenadante del cultivo infectado con Ad5; -●- = sobrenadante del cultivo infectado con Ad5 y adición de verapamilo; -□- = extracto celular del cultivo infectado con Ad5; -■- = extracto celular del cultivo infectado con Ad5 y adición de verapamilo). (B) Liberación viral al medio de Ad5 solo o en combinación con verapamilo en las células CAF1, SKMeI-28 y NP-9. Se muestra el punto en el cual se observó una diferencia mayor en la liberación viral. *, significativo ($p=0,015$ para CAF1, y $p=0,04$ para NP-9 respecto al SN de Ad5 mediante test de la *t*-Student a dos colas para muestras desapareadas, (barra rayada= sobrenadante del cultivo infectado con Ad5; barra negra lisa= sobrenadante del cultivo infectado con Ad5 y adición de verapamilo). (C) Tamaño de calva de Ad5 solo o en presencia de verapamilo 40 μM en las células A549 a día 7 post-infección. (D) Citotoxicidad comparativa de Ad5 \pm verapamilo en las líneas celulares tumorales SKMeI-28, A549 y NP-9. Se muestran los valores de IC_{50} (TU/célula de Ad5 necesarias para causar una reducción de la viabilidad celular del 50%).(-○- = supervivencia del cultivo infectado con Ad5; -●- = supervivencia del cultivo infectado con Ad5 + verapamilo).

Fig. 2 muestra el efecto del verapamilo en la expresión de proteínas virales, la apoptosis, y dependencia de ADP. (A) La adición de verapamilo no modifica el patrón de expresión de las proteínas tempranas y el de las tardías. Se infectaron células A549 con Ad5 en presencia o ausencia de verapamilo en el medio extracelular y se analizó por Western-blot la expresión de E1A, E3/19K, L4-100K y fibra (gen marcador de la expresión de proteínas tardías) a las 16, 24, 40 y 48 horas post-infección. (B) Niveles de activación de la apoptosis en células A549 infectadas con Ad5 y tratadas o no con verapamilo. Se detectó el truncamiento de PARP por Western-blot de los extractos celulares proteicos a las 40 h post-infección. Como control positivo de inducción de apoptosis se incubaron las mismas células con estauosporina (SSP) a 0,2 μM . (C) Cinética de liberación viral de Ad5 y AdADP⁻ (adenovirus que no expresa ADP) en células A549 en presencia o ausencia de verapamilo en el medio extracelular. A los tiempos indicados se cuantificó el contenido en virus de los sobrenadantes y extractos celulares correspondientes. *, significativo ($p=0,005$ y $p=0,01$ a las 40 y 48 horas post-infección respectivamente) con respecto a la liberación de Ad5, y #, significativo ($p=0,03$, $p=0,003$ y $p=0,02$ a las 48, 64 y 72 horas post-infección respectivamente) con respecto a la liberación de AdADP⁻ por el test *t*-Student a dos colas para muestras desapareadas. (-●- = sobrenadante del cultivo infectado con adenovirus 5; -■- = sobrenadante del cultivo infectado con AdADP⁻; -○- = sobrenadante del cultivo infectado con Ad5 y adición de verapamilo; -□- = sobrenadante del cultivo infectado con AdADP⁻ y adición de verapamilo; ...●... = extracto celular del cultivo infectado con adenovirus 5; ...■... = extracto celular del cultivo infectado con AdADP⁻; ...○... = extracto celular del cultivo infectado con Ad5 y adición de verapamilo; -□- = extracto celular infectado con AdADP⁻ y adición de verapamilo) (D) Comparación del tamaño de las calvas de *rec700* y *dl732* (adenovirus que sobreexpresa la proteína ADP) en presencia o ausencia de verapamilo en células A549 a día 6 post-infección.

Fig. 3 muestra la dependencia del fenotipo de liberación de partículas víricas en base a la actividad bloqueadora de calcio del verapamilo. (A) Tamaño de las calvas generadas en A549 por Ad5 solo, o en presencia de distintos bloqueantes de canales de calcio: verapamilo (v), amlodipino (a) y diltiazem (d). Se muestran fotografías representativas tomadas a día 7 post-infección. (B) Liberación al medio de Ad5 a las 40 horas post-infección en presencia o ausencia de distintos bloqueantes de canales de calcio. *, significativo con respecto a la liberación de Ad5 por el test *t*-Student a dos colas para muestras desapareadas ($p=0,025$, $p=0,023$ y $p=0,003$ para verapamilo, amlodipino y diltiazem, respectivamente). (C) Producción viral total y cinética de liberación al medio de Ad5 en presencia o ausencia del ión calcio en el medio extracelular. (-○- = sobrenadante del cultivo sin calcio infectado con Ad5; -●- = sobrenadante del cultivo con calcio infectado con Ad5; ...○... = extracto celular del cultivo sin calcio infectado con Ad5; ...●... = extracto celular del cultivo con calcio).

Fig. 4. El verapamilo mantiene la selectividad de ICOVIR-5 en un modelo inmunocompetente *in vivo*, (a) Expresión hepática de E1A analizada por inmunohistoquímica de secciones representativas de hígados de ratones tratados durante 5 días con PBS (a) ó con 5×10^{10} partículas virales (vp) de AdwtRGD (en este caso el tratamiento fue de 3 días) (b), de ICOVIR-5 (c) ó de la combinación ICOVIR-5 + administración diaria de 20 mg/kg de verapamilo. En las fotografías se puede apreciar el mareaje específico de E1A como una tinción clara sobre el fondo negro. Tal y como se puede observar este mareaje sólo es visible después de la administración de AdwtRGD y no así cuando se administra ICOVIR-5 o ICOVIR-5+verapamilo. (B). Valores medios de AST (aspartato aminotransferas) y de ALT (alanina aminotransferasa) en plasma después de la administración de los virus indicados. Barra blanca= PBS; barra negra= AdwtRGD; barra punteada= ICOVIR5; barra rayada= ICOVIR5+verapamilo y (C) concentraciones linfocitarias y plaquetarias en sangre periférica a día 5 post-inyección (día 3 post-inyección para el grupo tratado con AdwtRGD) a las dosis indicadas. Se representan los valores de medias obtenidas para 5 animales por grupo \pm SD. *, significativo ($P < 0,05$) con respecto al grupo PBS y #, significativo con respecto al grupo tratado con AdwtRGD por el test *t*-Student a dos colas para muestras desapareadas, (barra blanca= PBS; barra negra= AdwtRGD; barra punteada= ICOVIR5; barra rayada= ICOVIR5 + verapamilo).

Fig. 5 muestra que el verapamilo incrementa la actividad antitumoral de ICOVIR-5 *in vivo*. (A) Se trataron ratones *nude* con tumores xenógrafos de A549 con PBS, PBS combinado con administración diaria de verapamilo (V) a 20 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.), o con una única dosis de 5×10^{10} vp de ICOVIR-5 solo o en combinación con verapamilo. *, significativo ($P < 0,05$) con respecto al grupo PBS; §, significativo con respecto al grupo PBS + V, y #, significativo ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con ICOVIR-5 solo, por el test *t*-Student a dos colas para muestras desapareadas. (-●- = PBS; -■- = PBS+verapamilo; -○- = ICOVIR5; -□- = ICOVIR5+verapamilo). (B) Inmunotinción anti-adenovirus de secciones congeladas de tumores A549 tratados con PBS (a), PBS + verapamilo a 20 mg/kg diario (b), 5×10^{10} vp de ICOVIR-5 (c), y 5×10^{10} vp de ICOVIR-5 + verapamilo a 20 mg/kg diario (d). Se presentan fotografías representativas de muestras obtenidas a día 13 después de la administración de los virus indicados. En las fotografías se puede apreciar el mareaje específico de proteínas adenovirales estructurales (indicativas de replicación viral) como una tinción clara sobre el fondo negro. Tal y como se puede observar este mareaje es visible después de la administración de ICOVIR-5 y se incrementa su extensión después del tratamiento con ICOVIR-5+verapamilo. (C) Se trataron ratones *nude* con tumores xenógrafos de SKMeI-28 con PBS, PBS combinado con administración diaria de verapamilo (V) a 20 mg/kg i.p., o con una única dosis de 5×10^{10} vp de ICOVIR-5 solo o en combinación con verapamilo. *, significativo ($P < 0,05$) con respecto al grupo PBS; §, significativo con respecto al grupo PBS + V, y #, significativo ($P < 0,05$) con respecto al grupo tratado con ICOVIR-5 solo, por el test *t*-Student a dos colas para muestras desapareadas. (-●- = PBS; -■- = PBS+verapamilo; -○- = ICOVIR5; -□- = ICOVIR5+verapamilo). (D) comparación del tamaño de los tumores xenógrafos humanos SKMeI-28 tratados con PBS (a), PBS combinado con administración diaria de verapamilo a 20 mg/kg i.p. (b), con una única dosis de 5×10^{10} vp de ICOVIR-5 solo (c) o en combinación con verapamilo (d) obtenidos a día 52 post-administración del virus.

Fig. 6 muestra el efecto del verapamilo, temozolamida y everolimus (RAD001) en la difusión del Ad5 en células A549, en base al tamaño de las calvas generadas. El verapamilo es el que induce una mayor diseminación del virus.

Ejemplos

55 1. Líneas celulares, virus y reactivos

Se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) las células embrionarias de riñón humano HEK293 (CLR-1573), la línea de adenocarcinoma pulmonar A549 (CCL-185), y la línea celular de melanoma SKMeI-28 (HTB-72). La línea celular tumoral pancreática NP-9, y la línea celular de fibroblastos humanos asociados a carcinoma CAF1 se establecieron siguiendo protocolos bien establecidos (cfr. Gros A *et al.*, "Bioselection of a gain of function mutation that enhances adenovirus 5 release and improves its antitumoral potency", *Cancer Research*. 2008, vol. 68(21), pp. 8928-8937; Villanueva A. *et al.*, "Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells", *Oncogene*, 1998, vol. 17(15), pp. 1969-1978.).

65 Las células se hicieron crecer en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS). La línea celular CAF1 se hizo crecer en DMEM:F12 (1:1) suplementado con 10% FBS y BD™MITO+ serum extender (Becton Dickinson, Erembodegem, Bélgica).

ES 2 355 882 A1

Todas las líneas se cultivaron a 37°C y 5% CO₂. Para obtener una infección mínima del 80%, las células A549, SKMeI-28, NP-9 y CAF1 se infectaron respectivamente con 25, 35, 30 y 45 unidades de transducción por célula (TU/célula).

5 En los experimentos en ausencia de calcio, se utilizó un medio libre de calcio que contenía 200 mg/L MgSO₄, 400 mg/L KCl, 6400 mg/L NaCl, 3700 mg/L NaHCO₃, 141 mg/L NaH₂PO₄ 2H₂O, 4500 mg/L D-glucosa (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO), solución de aminoácidos MEM (Invitrogene, Paisley, UK), solución de vitaminas MEM (Invitrogene, Paisley, UK), solución de aminoácidos no esenciales MEM (Invitrogene, Paisley, UK), L-glutamina (Invitrogene, Paisley, UK) y 5% FBS. Cuando el medio se usó como medio completo, se suplementó con 1,8 mM
10 de CaCl₂. Los fármacos verapamilo, amlodipino y diltiazem se obtuvieron respectivamente de Abbot Laboratories (Abbot Park, IL), Laboratorios Almirall (Barcelona, España) y Pfizer (New York, NY).

El adenovirus tipo 5 humano (Ad5) se obtuvo de ATCC (número UVR-1516).

15 El mutante *dl732* que sobre-expresa ADP (Scaria A. *et al.*, “Fine-mapping of sequences that suppress splicing in the E3 complex transcription unit of adenovirus”, *Virology*, 1994, vol. 205(2), pp. 406-416) y su correspondiente forma salvaje *rec700* (Wold W. S. *et al.*, “Evidence that AGUAUAUGA and CCAAGAUGA initiate translation in the same mRNA región E3 of adenovirus”, *Virology*, 1986, vol. 148(1), pp. 168-180) fueron cedidas por el Dr. William S. M. Wold (St. Louis University, USA).

20 El adenovirus mutante defectivo en la expresión de ADP (AdADP⁻) se construyó insertando una timina en la posición 7 de la secuencia codificante para ADP del plásmido pAd5CAU (Gros A. *et al.*, “Bioselection of a gain of function mutation that enhances adenovirus 5 release and improves its antitumoral potency”, *Cancer Research*, 2008, pp. 68(21), pp. 8928-8937). Dicha inserción elimina la expresión de ADP al generar un codón de STOP en la
25 posición 3 de la secuencia aminoacídica de la proteína. La posterior digestión del plásmido resultante de la inserción (pAdADP⁻) con *PacI* (New England Biolab, Beverly, MA (USA)) se usó posteriormente para transfectar células 293.

El adenovirus de replicación condicional ICOVIR-5 (Ad-DM-E2F-K-Δ24-RGD) y el control de virus nativo con igual modificación de tropismo (AdwtRGD) han sido descritos previamente (Cascalló M. *et al.*, “Systemic toxicity-
30 efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway”, *Mol. Ther.*, 2007, vol. 15(9), pp. 1607-1615).

Todos los virus se propagaron en células A549 y el número de unidades de transducción (TU) de cada extracto se cuantificó mediante un método basado en tinción anti-hexon usando células 293 (Majem M. *et al.*, “Control of
35 E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD”, *Cancer Gene Therapy*, 2006, vol. 13(7), pp. 696-705).

2. Producción viral y cinética de liberación

40 Se realizaron experimentos preliminares destinados a evaluar el efecto de dosis crecientes de verapamilo en la liberación de Ad5 y su viabilidad celular. Para llevar a cabo los experimentos de producción viral y liberación de adenovirus, en cada tipo celular, se escogió la concentración de verapamilo que resultó en la menor toxicidad y el mayor incremento en la liberación viral (40 μM de verapamilo para A549, NP-9 y CAF1, y 25 μM para las células
45 SKMeI-28).

Los cultivos de A549, SKMeI-28, NP-9 y CAF1 se infectaron para conseguir un mínimo de 80% de infección (véase sección anterior). Dos horas post-infección los cultivos se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) y se incubaron con medio fresco o medio que contenía verapamilo. Se recogieron, por triplicado, sobrenadantes y
50 suspensiones células-medio a diferentes tiempos post-infección (a las 16, 24, 40, 48, 64 y 96 horas post-infección) y se cuantificó la cantidad de virus en cada muestra por el método basado en tinción anti-hexon usando células 293 (Majem M. *et al.*, citado más arriba).

55 3. Ensayo de formación de calvas

Se infectaron con diluciones seriadas de Ad5, *rec700* o *dl732* monocapas de células A549. Cuatro horas post-infección se aspiró el medio, y los cultivos se lavaron con PBS dos veces. Posteriormente se añadió una solución 1:1 de DMEM+10%FBS: 1% agarosa y, una vez solidificada ésta, se adicionó medio fresco o suplementado con
60 verapamilo 35 μM. El ensayo se tiñó el día 6-7 por incubación con 0,5 mg/ml de bromuro de tiazol Azul tetrazolio (MTT) por un período de 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Se tomaron fotografías representativas de las calvas.

En el ensayo llevado a cabo para determinar el efecto del verapamilo, temozolamida y everolimus (estos dos últimos usados en la solicitud PCT WO 2007/103825) en la velocidad de diseminación de Ad5, se usó el mismo protocolo
65 pero a las siguientes concentraciones: verapamilo 30 μM, everolimus 10 nM, temozolamida 10 μM, dichas concentraciones siendo las necesarias para ajustar el valor de IC10 (de manera que el cultivo retiene el 90% de viabilidad a lo largo del ensayo).

ES 2 355 882 A1

4. Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Se sembraron 20.000 (SKMeI-28), 30.000 (A549) ó 10.000 (NP-9) células en medio DMEM+5%FBS en ausencia o presencia de verapamilo a 20 μ M (SKMeI-28) o 35 μ M (A549 y NP-9), y se infectaron con diluciones 1/5 seriadas a partir de 150 (SkMeI-28), 85 (A549) y 260 (NP-9) TU/célula, respectivamente. Al día 6 post-infección, las monocapas se lavaron con PBS, se tiñeron usando el ensayo del ácido bicinconínico (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) y se determinó la absorbancia a 540 nm con el fin de determinar la cantidad de proteína total. Se calculó el valor IC₅₀, definido como el número de TU/célula necesario para inducir una inhibición del 50% en el crecimiento versus el control, a partir de las curvas dosis-respuesta por regresión estándar no lineal usando una ecuación de Hill adaptada (GraFit; Erithacus Software, Horley UK).

5. Análisis por Western-blot

Se infectaron monocapas de células A549 (1,5x10⁶ células) en las condiciones indicadas en el punto (2) anterior, de manera que se provocara un 80% de infección. Dos horas post-infección, los cultivos se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con medio fresco DMEM + 5% FBS o suplementado con verapamilo a 40 μ M. En los tiempos de 16, 24, 40 y 48 horas después de la infección, las células control o infectadas con Ad5 se tripsinizaron y, a continuación, se lavaron con PBS obteniéndose, finalmente, lisados celulares usando el tampón Iso-Hi-pH (0,14 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl [pH 8.5] y 0,5% Nonidet P-40). Se separaron electroforéticamente muestras proteicas (20 μ g/carril) en geles SDS-PAGE al 10%, y las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell, Dassel, Germany). Después de su bloqueo con leche no grasa al 5% en 0,05% Tween 20, 0,9% NaCl y 50 mM Tris (pH 7,5), la membrana se incubó con anticuerpo primario anti-Ad2 E1A (clon 13S-5, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), anti-E3/19K (Tw1.3 (Cox J. H. *et al.*, "Retention of adenovirus E19 glycoprotein in the endoplasmic reticulum is essential to its ability to block antigen presentation", *The Journal of experimental medicine*, 1991, vol. 174(6), pp. 1629-1637) cedido gentilmente por el Dr. Yewdell, (NIAID/NIH, USA), anti-L4/100K (clon 7/199 cedido gentilmente por el Dr. W.C. Russel, St. Andrews University, St. Andrews, UK), anti-Adenovirus Fiber A-4 mAb (clon 4D2 Fitzgerald Industries International Inc, Concord, MA) o con anticuerpo anti-human PARP (Poly-(ADP ribose) Polymerase) (clon #551024, Becton Dickinson).

6. Ensayos de toxicidad *in vivo* en ratones inmunocompetentes

Todos los estudios en animales de experimentación se realizaron en las instalaciones del Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, IDIBELL, en Barcelona (unidad AAALAC 1155) y los protocolos se aprobaron por el Comité de Experimentación Animal del IDIBELL.

A ratones inmunocompetentes BalbC machos (Charles River) de 6 semanas de edad se les inyectó intravenosamente, por la vena de la cola, PBS, 5x10¹⁰ vp (partículas físicas) de AdwtRGD (n= 5 animales/grupo), 5x10¹⁰ vp ó 1x10¹¹ vp de ICOVIR-5 (n= 10 animales/grupo) en un volumen final de 200 μ l. A partir del día 1 post-inyección, un subgrupo de los animales tratados con 5x10¹⁰ vp ó 1x10¹¹ vp de ICOVIR-5 (n= 5 animales/grupo) recibieron una dosis diaria de verapamilo 20 mg/mL por vía intraperitoneal. Se monitorizó el peso corporal de los ratones y los animales fueron observados diariamente controlando la presencia de signos de morbilidad. El día 5 post-administración (día 3 para el grupo tratado con AdwtRGD) los animales se sacrificaron y se obtuvo sangre por punción intracardíaca. Se realizó un estudio bioquímico completo de las muestras sanguíneas en el Servicio de Bioquímica Clínica de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Los hígados murinos también se recogieron y fijaron en formol (para su inclusión en parafina y posterior tinción por eosina/hematoxilina) o se congelaron inmiscuidos en un medio específico para congelación de tejidos OCT (Sakura Finetek) para realizar tinciones por inmunofluorescencia anti-E1A sobre hígado congelado tal y como ha sido descrito por Majem y colaboradores (Majem *et al.*, "Control of E1A under an E2F-1 promoter insulated with the myotonic dystrophy locus insulator reduces the toxicity of oncolytic adenovirus Ad-Delta24RGD", *Cancer Gene Therapy*, 2006, vol. 13(7), pp. 696-705).

7. Ensayos de eficacia antitumoral *in vivo*

Se establecieron tumores xenógrafos subcutáneos de células A549 ó SKMeI-28 por inoculación de 1x10⁷ células en los flancos de ratones Balb/C nu/nu (Harian) de 6 semanas. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 100 mm³, se randomizaron los animales y se trataron con PBS o con 5x10¹⁰ vp de ICOVIR-5 (n= 24 animales/grupo) en un volumen final de 0,2 mL. A partir del día 1 post-inyección, un subgrupo de los animales tratados con PBS o de los tratados con 5x10¹⁰ vp de ICOVIR-5 (n= 12 animales/grupo) recibieron una dosis diaria de verapamilo 20 mg/ml vía intraperitoneal hasta el día final del experimento (día 52 para tumores SkMeI-28 y día 37 para tumores A549). El tamaño tumoral y el peso corporal de los ratones se monitorizó en intervalos de 3-4 días. Para el cálculo del volumen de los tumores y el porcentaje de crecimiento se usó la metodología descrita por Cascalló y colaboradores (Cascalló M. *et al.*, "Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway", *Mol. Ther.*, 2007, vol. 15(9), pp. 1607-1615). Muestras tumorales de cada grupo (2 tumores/grupo) se fijaron en formol y se congelaron en OCT para su posterior análisis de replicación viral mediante inmunotinción anti-adenovirus a día 13 o día 18 post-administración para los tumores A549 y SKMeI-28 respectivamente, tal y como ha sido descrito previamente por Gros y colaboradores (Gros A. *et al.*, "Bioselection of a gain of function mutation that

enhances adenovirus 5 release and improves its antitumoral potency”, *Cancer Research*, 2008, vol. 68(21), pp. 8928-8937.).

5 8. Análisis estadístico

Los datos de los experimentos *in vitro* se testaron por significancia estadística mediante el test t-Student. Este mismo test se utilizó para la comparación de la progresión tumoral en ratón entre los distintos grupos de tratamiento. Los valores p corresponden a análisis con 2 colas.

10

9. Resultados

A) El verapamilo incrementa la liberación viral y la citotoxicidad del adenovirus tipo 5 *in vitro*

15

Con el objetivo de evaluar si el agente bloqueador de canales de calcio verapamilo era capaz de incrementar la liberación de Ad5, se determinó el efecto del verapamilo en la liberación y producción de Ad5 en la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humana A549. Tal y como muestra la Fig. 1A, pese a que el rendimiento viral total fue el mismo (es decir, se produjo la misma cantidad de partículas víricas), tanto en ausencia como en presencia de verapamilo 40 μM , se produjo un incremento de 30 veces en la liberación de virus al medio extracelular a las 40 h post-infección cuando se combinó con verapamilo. Este fenotipo se confirmó en una variedad de tipos celulares. Así, la adición de verapamilo resultó también en una liberación más rápida de Ad5 en fibroblastos humanos asociados a carcinoma (CAF1), en la línea celular de melanoma SKMeI-28 y en la línea tumoral pancreática NP-9 (Fig. 1B).

20

25

La liberación temprana en estas condiciones mejoró la diseminación célula-célula, tal y como se demuestra por el tamaño de las calvas en un ensayo de formación de calvas en A549. En presencia de verapamilo, las calvas generadas por Ad5 aparecieron antes y fueron mayores que las calvas control (Fig. 1C). Adicionalmente, la adición de verapamilo confirió una mayor citotoxicidad al Ad5, de forma que la cantidad de Ad5 necesaria para reducir la viabilidad celular en un 50% (valor IC_{50}) resultó ser 4 veces, 3 veces y hasta 100 veces menor en las células SKMeI-28, NP-9 y A549 respectivamente (Fig. 1D). Los resultados de IC_{50} obtenidos para cada una de las líneas tumorales ensayadas se resumen en la siguiente tabla (Tabla 1):

30

TABLA 1

35

	SkMeI-28	A549	NP-9
IC_{50} Ad5	0,64	0,07	1,51
IC_{50} Ad5+verapamilo	0,22	0,0008	0,36

40

45

En conclusión, con los resultados obtenidos se confirma que la adición de un bloqueante de canales de calcio provoca la liberación temprana de partículas adenovíricas, dichas partículas, además, siendo liberadas más rápidamente. Esto provoca que la diseminación célula-célula sea mayor. La consecuencia es que con la misma cantidad de virus se consigue un mayor efecto terapéutico. Todo esto provoca un aumento de la citotoxicidad del adenovirus, siendo necesaria una menor cantidad del mismo para conseguir el efecto terapéutico (i.e., actividad oncolítica) deseado.

50

B) Efecto del verapamilo en la expresión de proteínas virales y en apoptosis

Con el objetivo de estudiar los efectos del verapamilo en el patrón de expresión proteico del Ad5, se analizó la expresión de proteínas tempranas (*early*) y tardías (*late*) en presencia y ausencia de verapamilo. Tal y como ilustra la Fig. 2A, no se aprecian diferencias en el patrón de expresión de las proteínas E1 A, E3/19K ni en las proteínas tardías L4-100K y fibra cuando se combinó la infección con la incubación con verapamilo, lo que demuestra que el verapamilo no tiene ningún efecto en la expresión de proteínas del adenovirus.

55

60

La importancia otorgada al calcio intracelular en la regulación de la apoptosis, junto con el hecho de que la activación de la apoptosis sea capaz de conferir fenotipo de calva grande al Ad5 de forma análoga a la observación hecha en presencia de verapamilo, llevó a los investigadores de la presente invención a estudiar el estado de activación de la apoptosis en presencia de este bloqueante de calcio. Tal y como demuestra la Fig. 2B, el nivel de truncación de PARP (considerado un indicador de activación de apoptosis: si existe apoptosis se detecta la forma PARP truncada) a lo largo de la infección de las células A549 con Ad5 solo o en combinación con verapamilo 40 μM fue muy similar. Esto demuestra que el verapamilo no induce apoptosis y consecuentemente el fenotipo de calva grande de Ad5 en presencia de verapamilo no está mediado por el mecanismo.

65

C) *La liberación de partículas víricas por acción del verapamilo es independiente de la acción de la proteína ADP*

A pesar que el mecanismo exacto que desencadena la liberación del adenovirus es desconocido, la proteína viral ADP desarrolla un papel relevante en este proceso, ya que los virus mutantes en ADP muestran un defecto en la liberación viral, sin que ello afecte a la producción viral total. Además, también se ha descrito que la sobre-expresión de ADP es capaz de mejorar la diseminación del adenovirus y conferirle mayor citotoxicidad.

Para evaluar la dependencia de ADP, en presencia de verapamilo, del fenotipo del Ad5, los investigadores de la presente invención analizaron la liberación viral de AdADP⁻, virus defectivo en la expresión de ADP, solo o en combinación con verapamilo 40 μ M, en células A549. Tal y como muestra la Fig. 2C, AdADP⁻ presentó una liberación disminuida en comparación con Ad5, tal y como ya había sido descrito (Tollefson A. E. *et al.*, "The E3-11.6-kDa adenovirus death protein (ADP) is required for efficient cell death: characterization of cells infected with adp mutants", *Virology*, 1996, vol. 220(1), pp. 152-162). Cabe destacar que la incubación de las células A549 infectadas con AdADP⁻ con verapamilo 40 μ M resultó en un incremento de la liberación del mutante defectivo. Así, pese a que el incremento de la liberación de AdADP⁻ estaba retrasado en comparación con el observado con Ad5 + verapamilo (64 h. post-infección para AdADP⁻, frente a 40 h post-infección para Ad5), la presencia del bloqueador de calcio incrementó la liberación de los dos virus en el mismo grado (aproximadamente 30 veces) (Fig. 2C). Este hecho demuestra no sólo que el fenotipo inducido por verapamilo no requiere de la proteína ADP, sino que el verapamilo induce una nueva ruta que redundante en una mayor liberación del adenovirus. Puesto que el efecto del verapamilo en la liberación viral es independiente de ADP, combinamos la incubación de verapamilo con el virus dl732, otro mutante adenoviral que presenta liberación incrementada por sobre-expresión de ADP, con la finalidad de evaluar si se podía incrementar todavía más su fenotipo de liberación mejorada. La adición de verapamilo al ensayo de formación de calvas de dl32 en células A549 resultó en la generación de calvas de dimensiones todavía mayores a las del virus solo (Fig. 2D), lo que demuestra que los efectos de la sobre-expresión de ADP y verapamilo en la liberación del adenovirus son independientes.

D) *Dependencia de la actividad del verapamilo para conseguir la liberación temprana de Ad5*

Con el objetivo de estudiar si la actividad bloqueadora de canales de calcio del verapamilo es la causante de la liberación temprana de virus en las células infectadas, se ensayó la liberación del Ad5 en presencia de un miembro de la familia de las dihidropiridinas (amlodipino) y de un miembro de la familia de las benzotiazepinas (diltiazem). De forma análoga a lo observado con verapamilo, el Ad5 presentó un tamaño de calva mayor que el control, y una liberación al sobrenadante incrementada a las 40 horas post-infección cuando se combinó tanto con amlodipino como con diltiazem en las células A549 (Fig. 3A y 3B). Este resultado sugiere que es la actividad bloqueadora de calcio, común en los tres fármacos, la responsable de la inducción de liberación temprana en el Ad5. Los experimentos de análisis de la liberación y producción total realizados en un medio en ausencia de calcio aportaron evidencias adicionales de la dependencia de la actividad bloqueadora de calcio en este fenotipo. La deprivación extracelular de calcio también mejoró la liberación del Ad5 sin afectación de la producción total de virus (Fig. 3C), sugiriendo nuevamente que es la función sobre los canales de calcio la responsable del incremento en la liberación del adenovirus.

E) *El verapamilo incrementa la citotoxicidad del adenovirus oncolítico ICOVIR-5 in vitro y mantiene su selectividad in vivo*

Los investigadores de la presente invención habían descrito previamente que el adenovirus oncolítico ICOVIR-5 (As-DM-E2F-K- Δ 24RGD) presentaba un perfil de toxicidad seguro (después de la administración por vía sistémica) debido al control de la expresión del gen E1A- Δ 24 por parte del promotor E2F (Cascalló M. *et al.*, "Systemic toxicity-efficacy profile of ICOVIR-5, a potent and selective oncolytic adenovirus based on the pRB pathway", *Mol. Ther.*, 2007, vol. 15(9), pp. 1607-1615). La combinación de ICOVIR-5 y verapamilo incrementó su citotoxicidad en las líneas A549 y NP-9 *in vitro*. El valor IC₅₀ (TU/células necesarias para causar una pérdida del 50% de la viabilidad del cultivo) de ICOVIR-5 en A549 y NP-9 es de 0,69 y 4,96 respectivamente, mientras que la presencia de verapamilo los redujo a 0,067 y 3,2.

Una vez confirmado el efecto del incremento de citotoxicidad del verapamilo sobre ICOVIR-5, se pasaron a establecer los efectos que tiene el verapamilo en la selectividad de ICOVIR-5. Para ello se usó un modelo de ratón inmunocompetente (según sección (6) anterior) *in vivo* después de la administración endovenosa del virus y la inyección intraperitoneal del fármaco. Se evaluó la toxicidad después de una dosis única intravenosa de 5x10¹⁰ vp ó de 1x10¹¹ vp de ICOVIR-5 solo o en combinación con dosis diarias de verapamilo a 20 mg/kg en un ratón Balb/C inmunocompetente en comparación con la toxicidad obtenida después de una inyección sistémica única de 5x10¹⁰ vp de AdwtRGD (como control de virus no selectivo). Los parámetros que se monitorizaron incluyeron la pérdida de peso corporal de los animales, los niveles de enzimas hepáticas (AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanina aminotransferasa), así como el perfil hematológico a día 5 después de la administración del virus (día 3 después de la administración para el grupo inyectado con AdwtRGD). Los ratones tratados con 5x10¹⁰ vp ó de 1x10¹¹ vp de ICOVIR-5 en combinación con verapamilo diario mostraron una variación de peso corporal similar a la obtenida con los grupos tratados con ICOVIR-5 solo tal y como se ilustra en la Tabla 2:

TABLA 2

Tratamiento	Dosis (vp/ratón)	% variación de peso corporal ^{a,b}
PBS	-	6,7 ± 3,7
AdwtRGD	5x10 ¹⁰ vp	-7,1 ± 3,0 ^c
ICOVIR-5	5x10 ¹⁰ vp	7,8 ± 2,3
	1x10 ¹¹ vp	-0,15 ± 2,55
ICOVIR-5 + V	5x10 ¹⁰ vp	6,46 ± 3,04
	1x10 ¹¹ vp	-0,02 ± 4,02

^a Expresado como media ± SD

^b Determinados a día 5 post-administración del virus.

^c Determinado a día 3 post-administración del virus..

Abreviaciones: V indica administración diaria intraperitoneal de verapamilo a 20 mg/kg.

La inmunotinción anti-E1A de las secciones de hígado congeladas correspondientes a ratones tratados con 5x10¹⁰ vp de ICOVIR-5 solo o en combinación con verapamilo mostró en ambos casos una restricción efectiva en la expresión de E1A a día 5 post-inyección (Fig. 4A). Además, los niveles de AST y ALT de los animales inyectados con ICOVIR-5 no se vieron afectados por el tratamiento concomitante diario con verapamilo (Fig. 4B). La administración combinada de verapamilo con 5x10¹⁰ vp ó 1x10¹¹ vp de ICOVIR-5 tampoco modificó el recuento de plaquetas y linfocitos cuando se comparó con el obtenido con ICOVIR-5 solo. Esto contrasta con las reducciones obtenidas en el grupo de animales tratados con AdwtRGD (Fig. 4C).

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la administración diaria de verapamilo no incrementa la toxicidad de ICOVIR-5 con independencia de la dosis de virus administrada. Adicionalmente, se puede concluir que el verapamilo mantiene la selectividad asociada con la presencia del promotor E2F para el gen E1A en ICOVIR-5.

F) El verapamilo mejora la eficacia antitumoral de ICOVIR-5 *in vivo*

Una vez demostrado que la combinación de verapamilo y ICOVIR-5 incrementa la citotoxicidad *in vitro*, y mantiene la seguridad después de la administración sistémica del virus, el siguiente paso fue determinar si la combinación también ofrece una ventaja en términos de eficacia antitumoral en comparación con la administración de ICOVIR-5 solo. Para este objetivo se administró una inyección única de 5x10¹⁰ vp de ICOVIR-5 por vía sistémica en ratones *nude* (Harlan) con tumores xenógrafos subcutáneos de adenocarcinoma de pulmón A549 y de melanoma SKMeI-28. A partir del día 1 post-inyección, la mitad de los ratones de los grupos tratados con PBS y ICOVIR-5 fueron pautados para inyección intraperitoneal diaria de verapamilo a 20 mg/kg (n=12 tumores/grupo), y se controló el crecimiento tumoral y el peso corporal de los animales de forma periódica para evaluar la actividad antitumoral. Tal y como se muestra en la Fig. 5A, la combinación de ICOVIR-5 con verapamilo fue más eficiente en el control del crecimiento de los tumores A549 subcutáneos *in vivo*. Esta mejora del efecto antitumoral correlaciona con una presencia más difusa del virus en la masa tumoral, tal y como se aprecia en la inmunotinción anti-adenovirus de secciones tumorales obtenidas a día 13 post-inyección (Fig. 5B), lo que sugiere que la diseminación intratumoral de ICOVIR-5 mejora en presencia del bloqueador de canales de calcio. Igualmente, frente al discreto efecto sobre el crecimiento antitumoral obtenido al tratar los tumores xenógrafos subcutáneos de SKMeI-28 con ICOVIR-5, la combinación de ICOVIR-5 y verapamilo mostró un marcado control del crecimiento tumoral en este modelo (reducción de 6 veces en el crecimiento con respecto al grupo PBS) (Fig. 5C y 5D). El efecto antitumoral mejorado de la combinación de ICOVIR-5 y verapamilo en dos modelos tumorales xenógrafos distintos confirma los beneficios del uso de este fármaco para incrementar el potencial terapéutico de los adenovirus oncolíticos.

ES 2 355 882 A1

REIVINDICACIONES

1. Combinación que comprende dos componentes:

5 (a) el primer componente comprende un bloqueador de canal de calcio junto con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables; y

10 (b) el segundo componente comprende un adenovirus oncolítico junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

2. Combinación según la reivindicación 1, en donde el componente (a) se administra una vez al día.

15 3. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el componente (a) se administra posteriormente a la administración del componente (b).

4. Combinación según la reivindicación 3, en donde se administra en primer lugar una única dosis del componente (b) y posteriormente se administra una o varias dosis del componente (a).

20 5. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde tanto el componente (a) como el componente (b) se administran por vía sistémica.

25 6. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el componente (a) se administra por vía oral y el componente (b) se administra por vía intratumoral.

7. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el bloqueador de canal de calcio se selecciona del grupo formado por verapamilo, amlodipino y diltiazem.

30 8. Combinación según la reivindicación 7, donde el bloqueador del canal de calcio es el verapamilo.

9. Combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el adenovirus contiene una secuencia de DNA humano aislando a un promotor que confiere expresión selectiva a un gen adenoviral.

35 10. Kit que comprende la combinación definida en cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y instrucciones para su uso.

40 11. Combinación según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para uso separado o secuencial en el tratamiento del cáncer.

45 12. Bloqueador de canal de calcio para uso como agente potenciador de la actividad antitumoral de un adenovirus oncolítico.

45

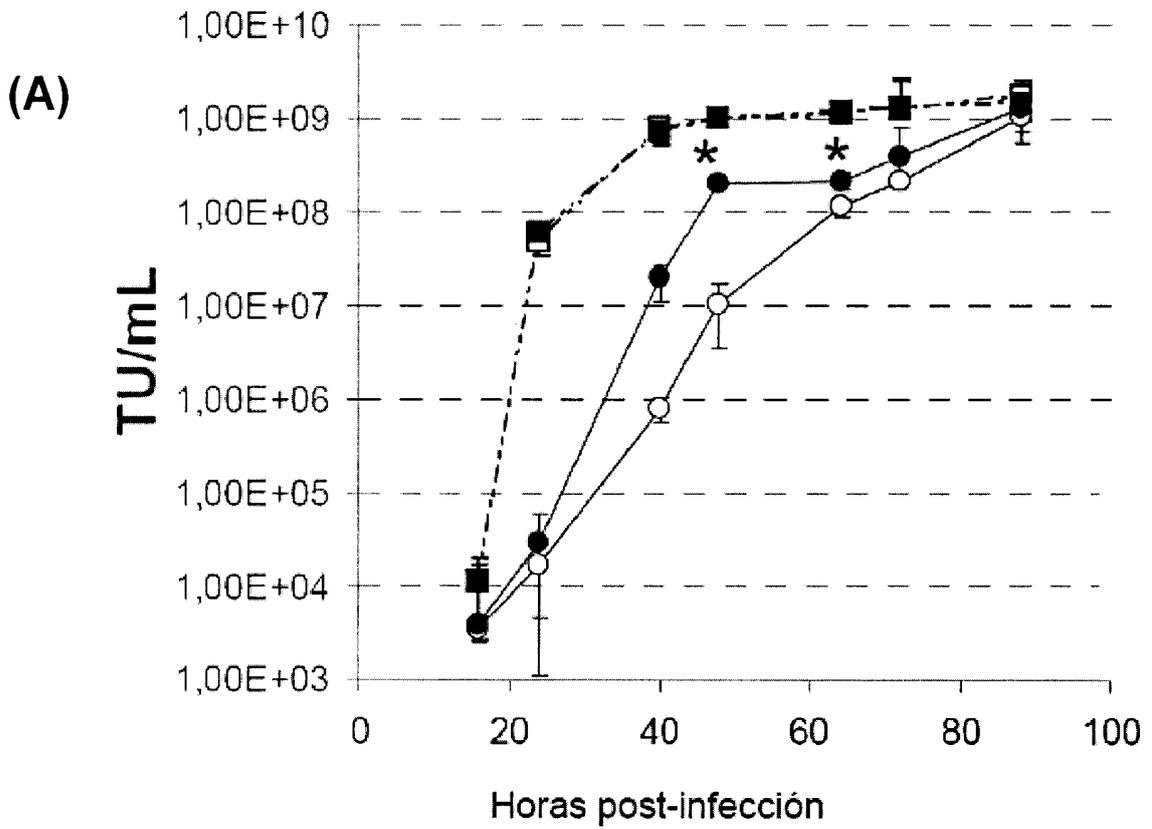
50

55

60

65

FIG. 1



(B)

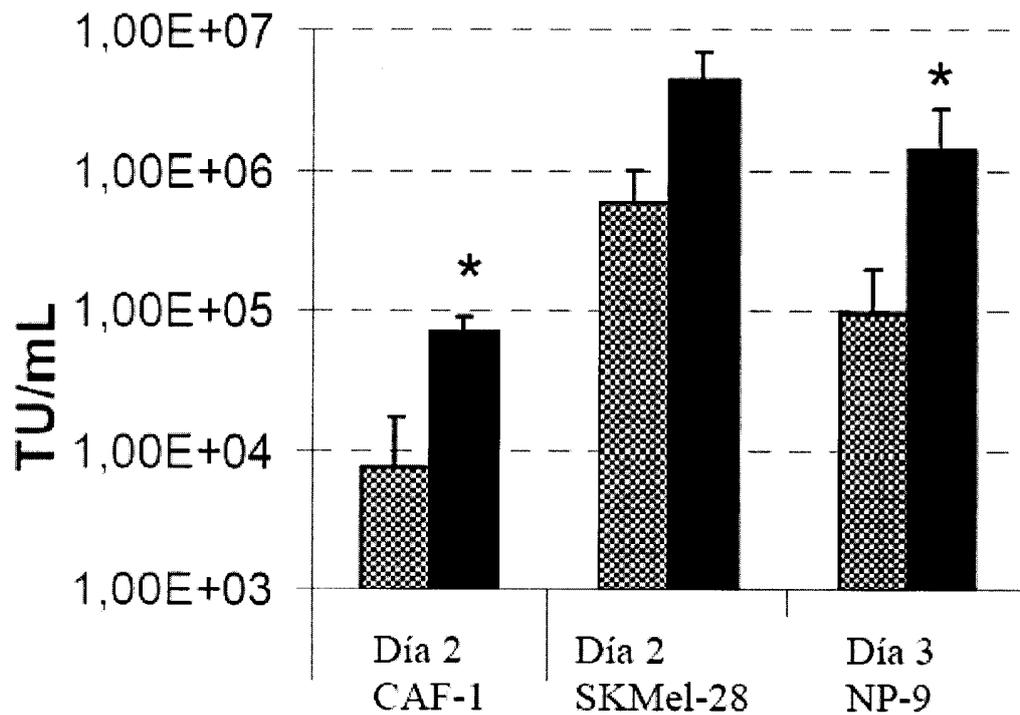
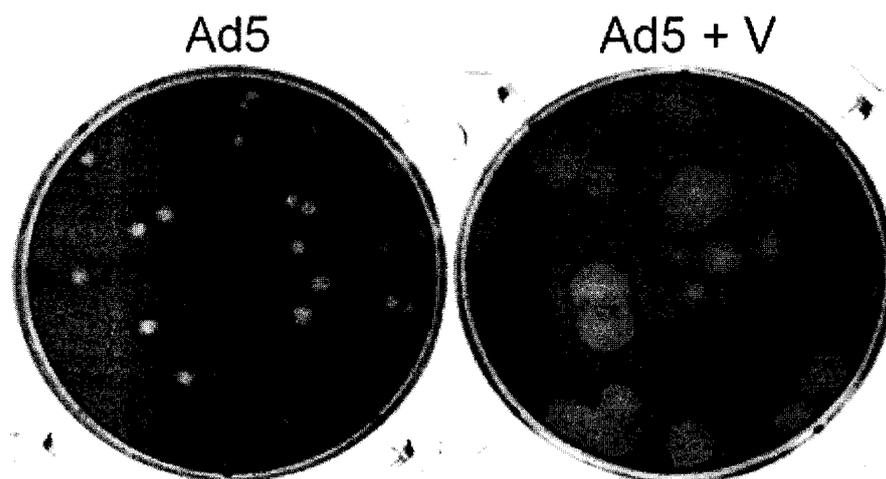


FIG. 1 (Continuación)

(C)



(D)

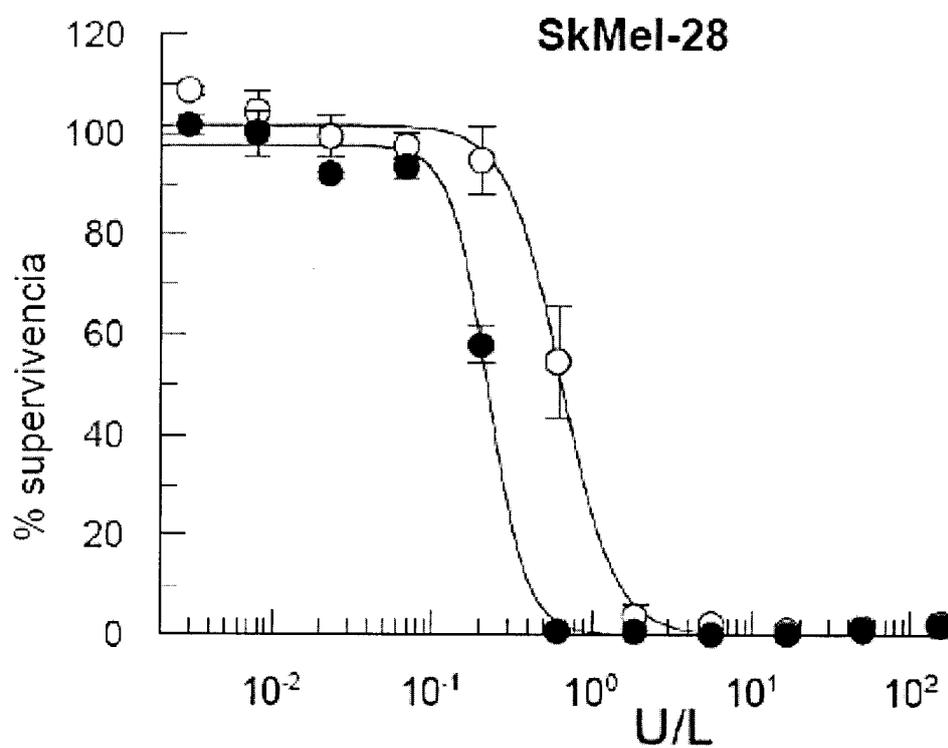


FIG. 1 (Continuación)

(D) (Continuación)

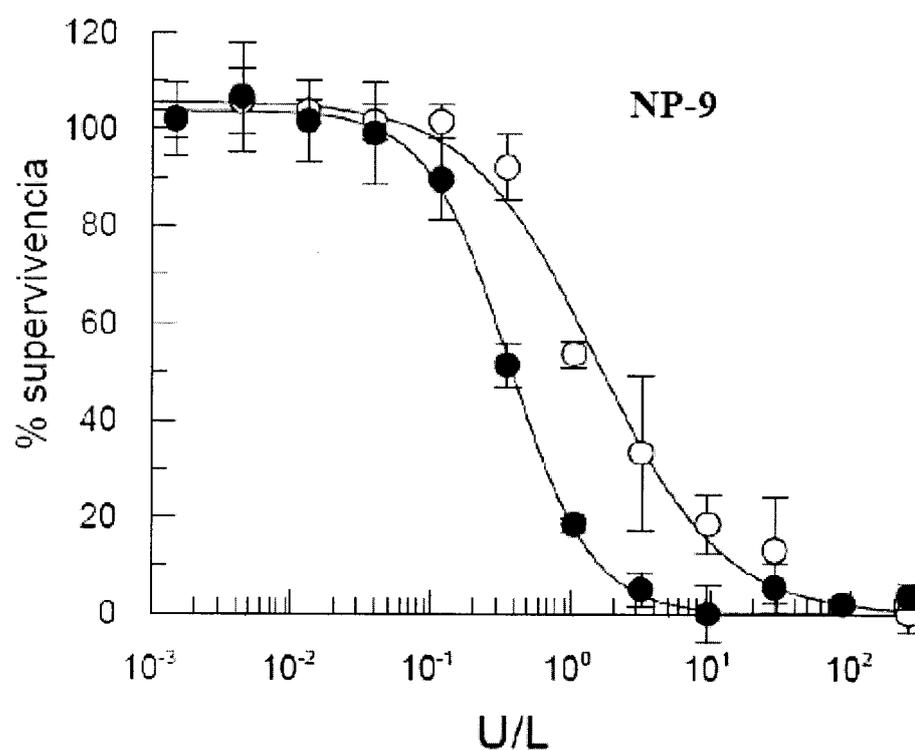
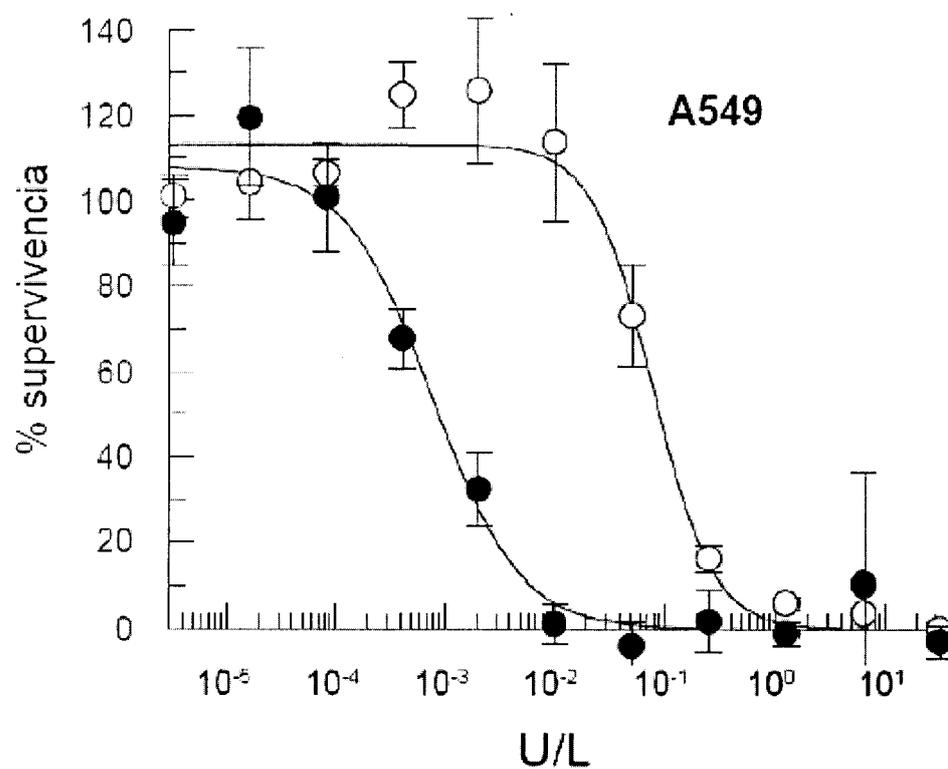
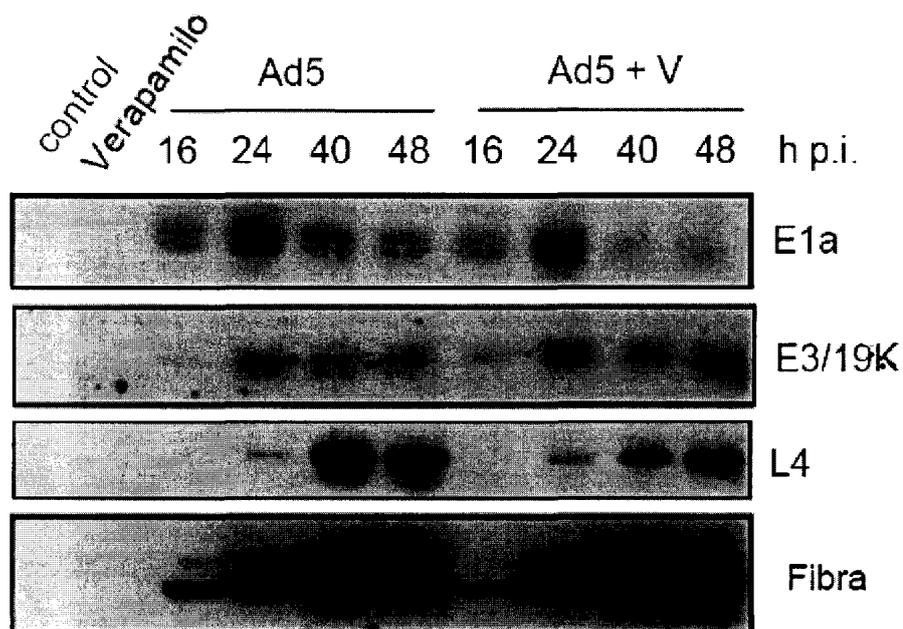


FIG. 2

(A)



(B)

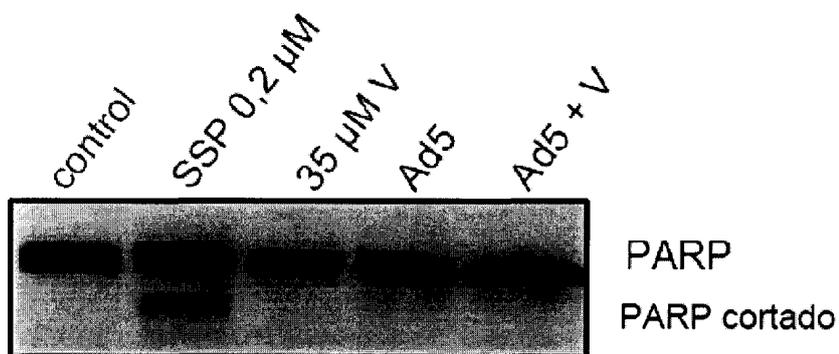


FIG. 2 (Continuación)

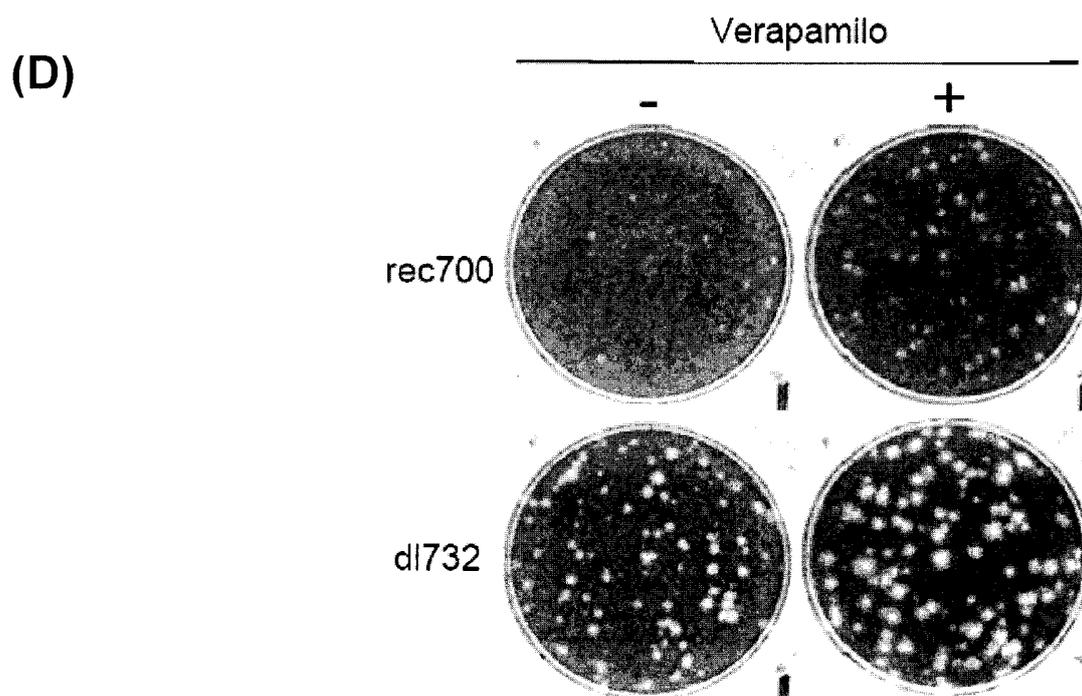
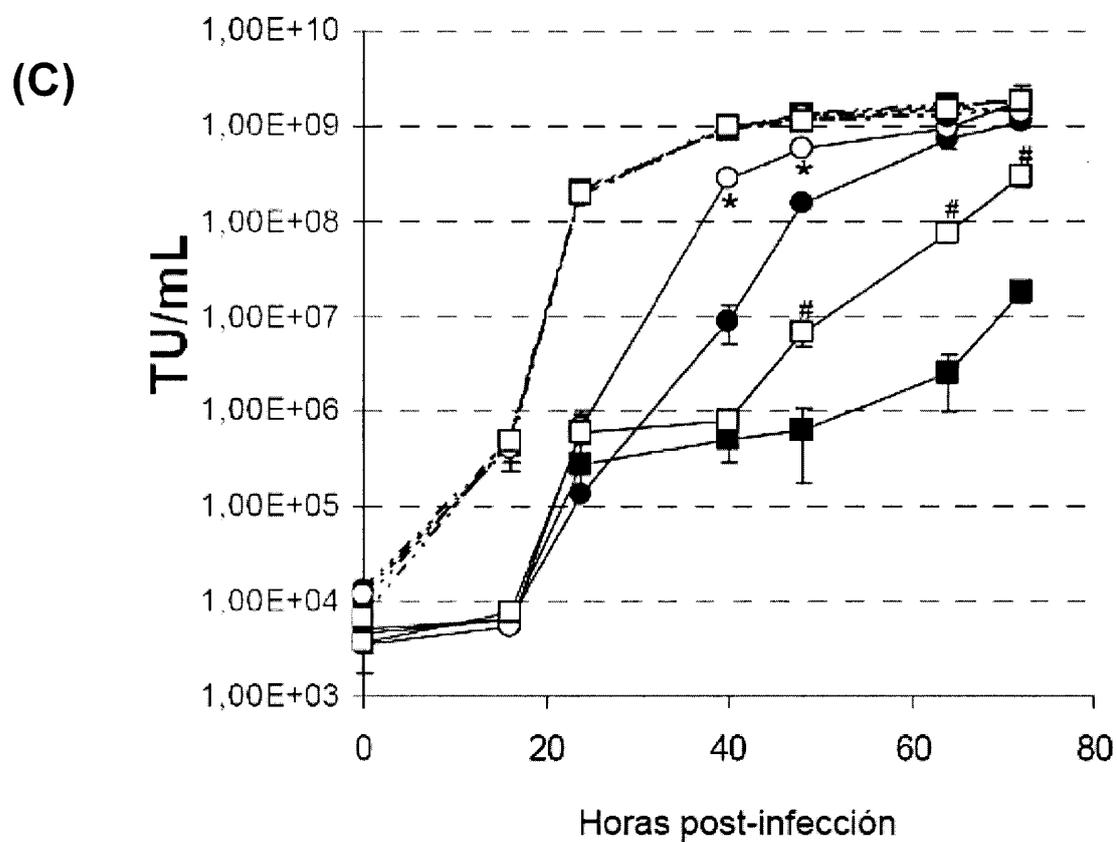
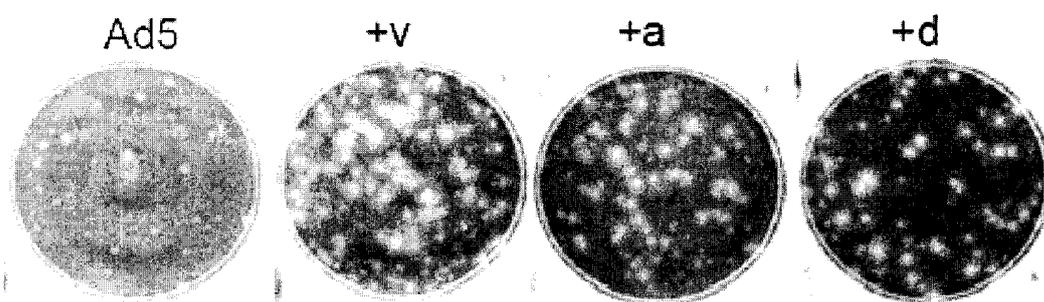


FIG. 3

(A)



(B)

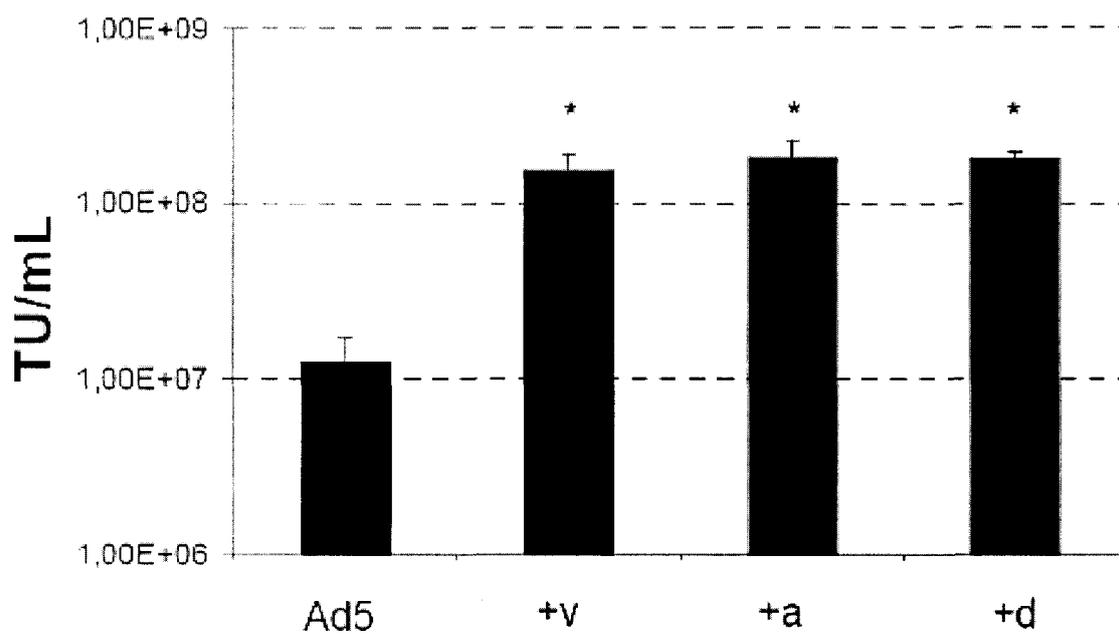


FIG. 3 (Continuación)

(C)

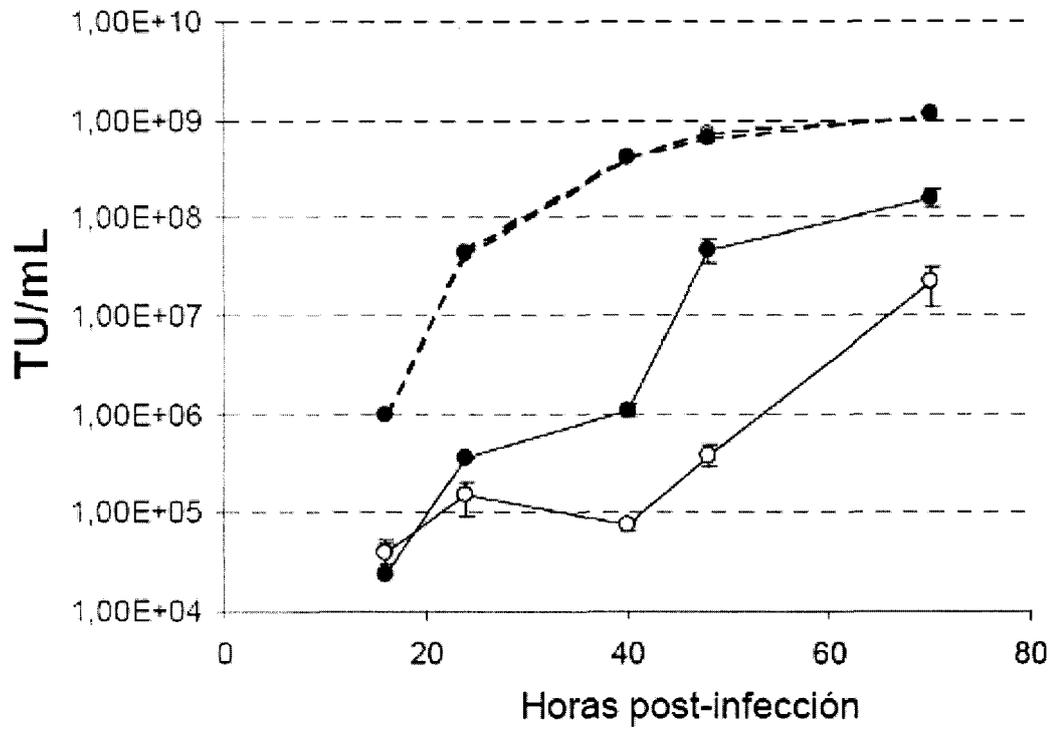


FIG. 4

(A)

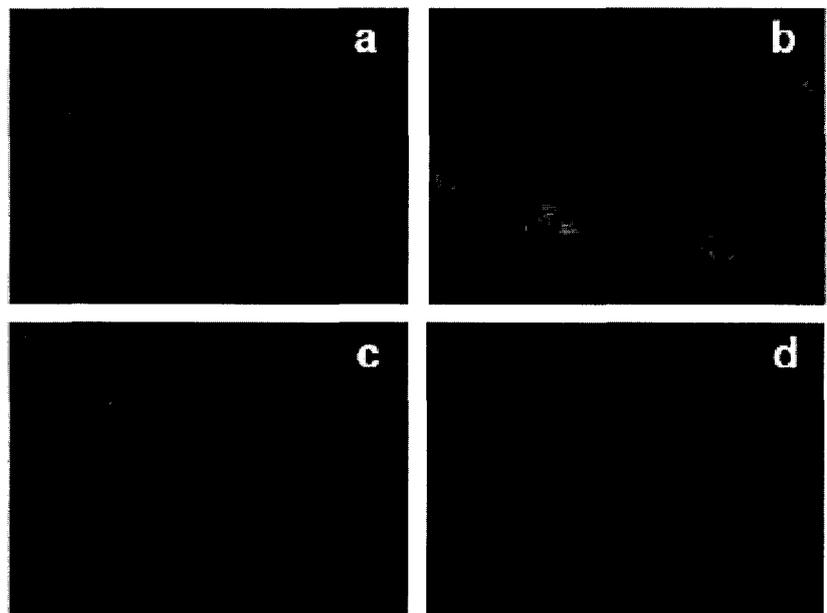


FIG. 4 (Continuación)

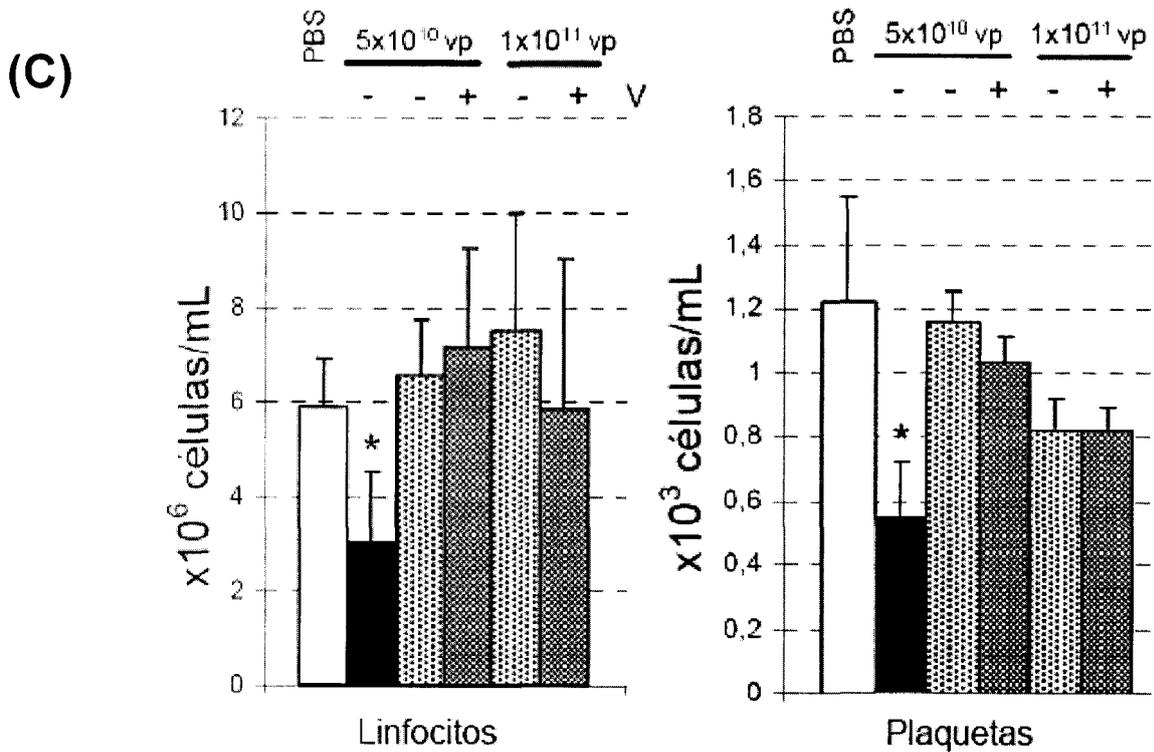
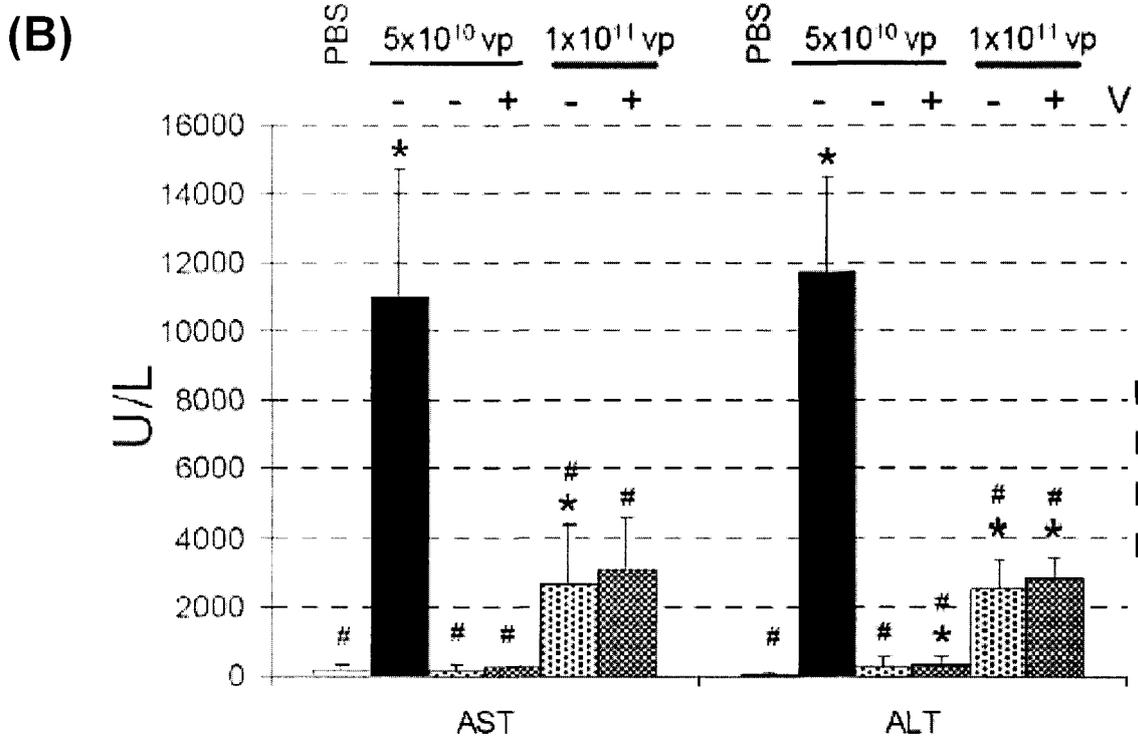
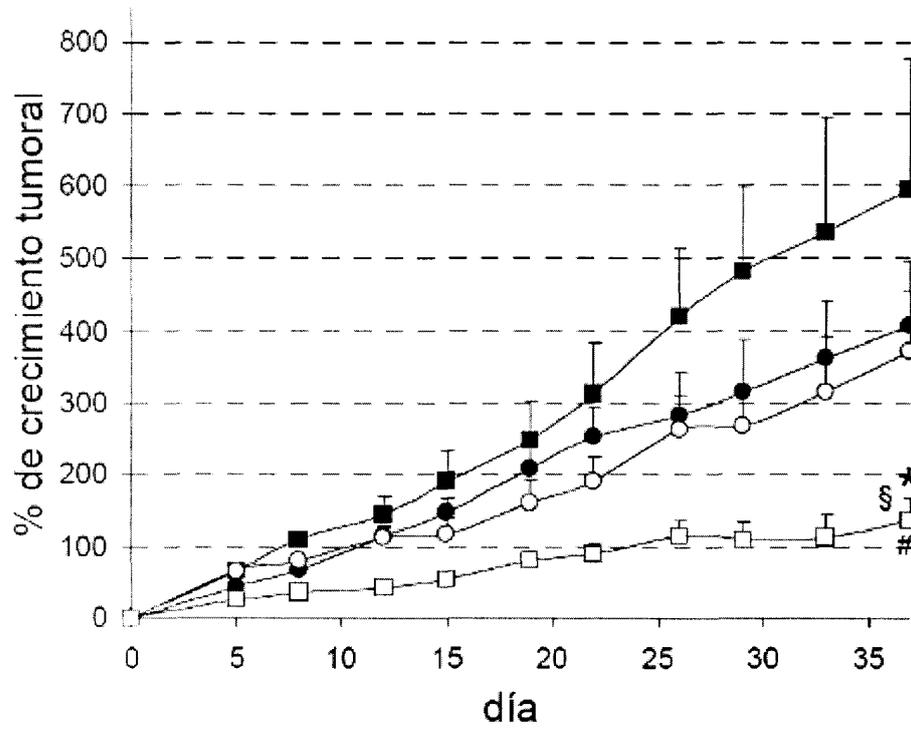


FIG. 5

(A)



(B)

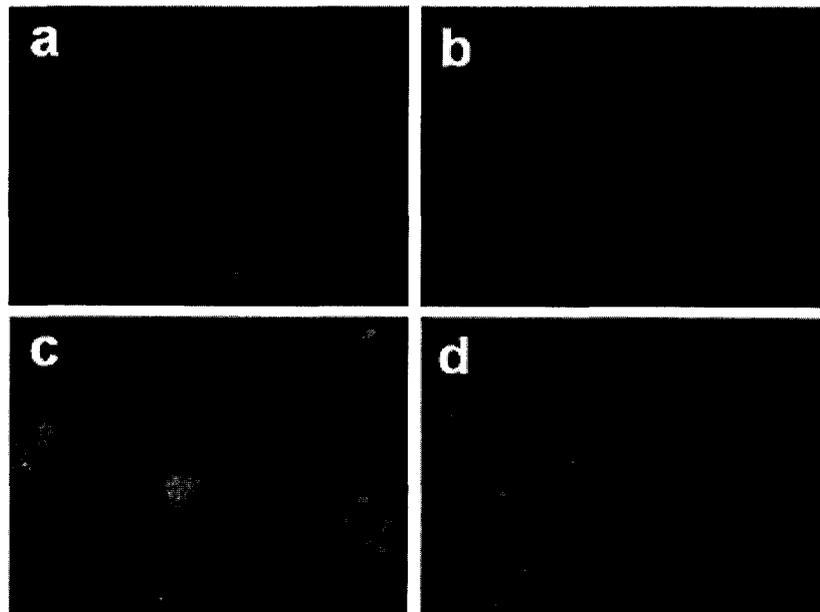


FIG. 5 (Continuación)

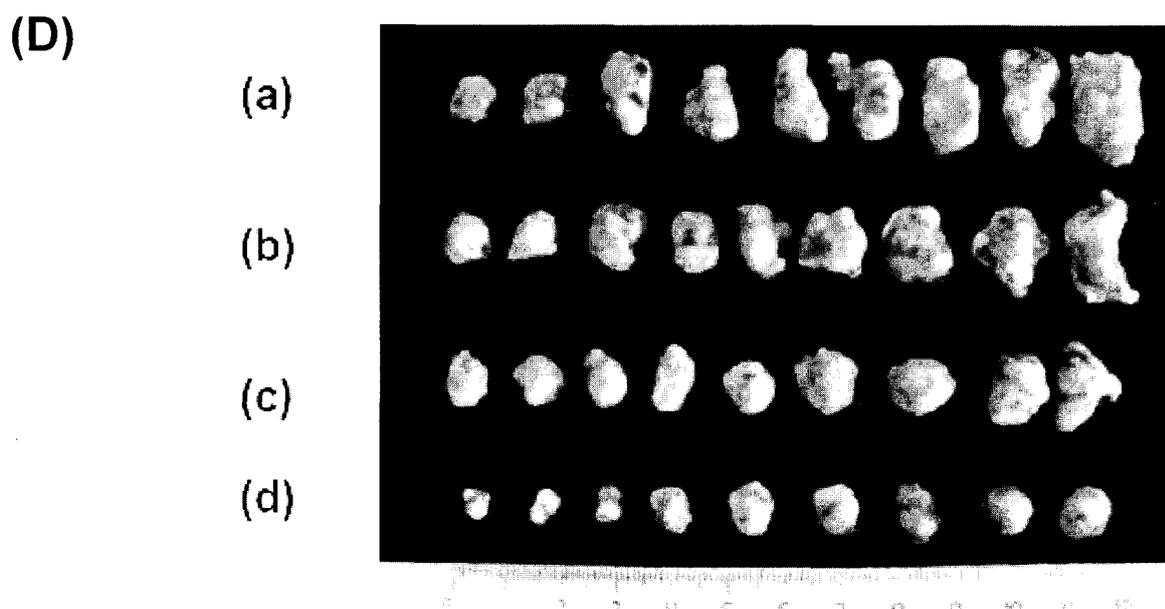
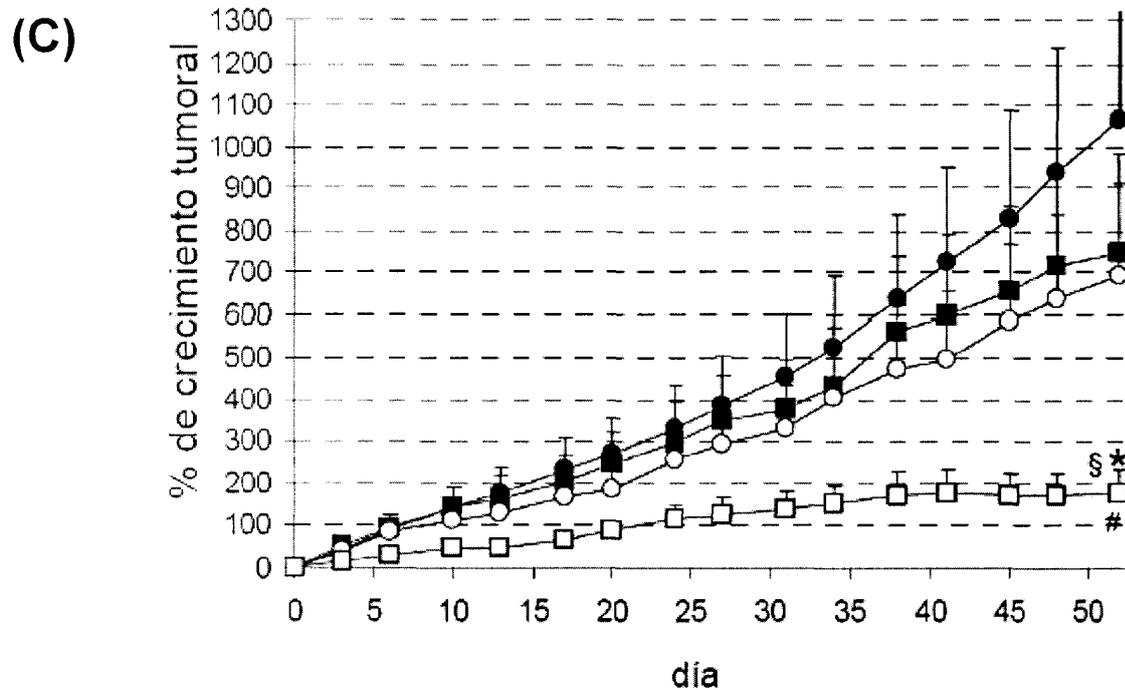
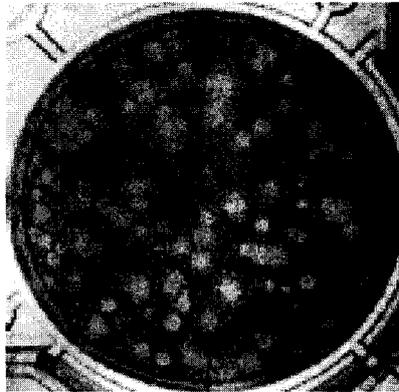
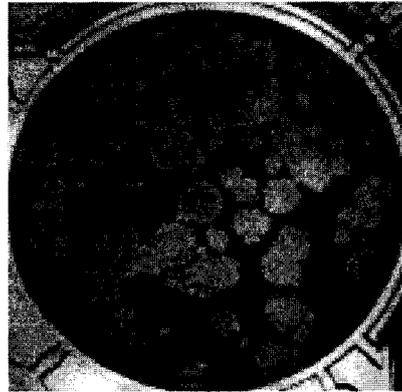


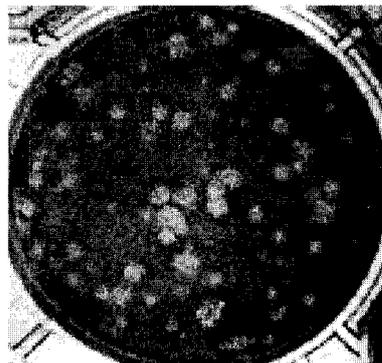
FIG. 6



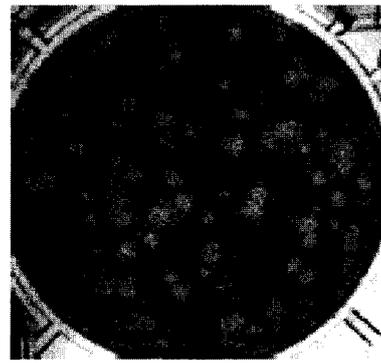
Virus



Virus+verapamilo



Virus+RAD001



Virus+temozolamida



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200900866

②② Fecha de presentación de la solicitud: 24.03.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2007103825 A2 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 13.09.2007, páginas 27,28, líneas 22-30; página 31, línea 19 – página 34, línea 7.	1-12
A	WO 2007088229 A1 (INSTITUT CATALA D'ONCOLOGIA) 09.08.2007, reivindicaciones.	1-12
A	BELLAMY, W.T.: "P-glycoproteins and multidrug resistance". Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1996, vol. 36, página 161-183, página 162, tabla 2, página 172, tabla 4, página 173.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.03.2011

Examinador
H. Aylagas Cancio

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K31/277 (2006.01)

A61K31/554 (2006.01)

A61K31/4422 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2007103825 A2	13.09.2007
D02	WO 2007088229 A1	09.08.2007
D03	BELLAMY, W.T.: "P-glycoproteins and multidrug resistance". Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1996, vol. 36, página 161-183.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud se refiere a una combinación que comprende dos componentes, el primero un bloqueador de los canales de calcio y el segundo un adenovirus oncolítico. El primer componente se selecciona entre verapamilo, amlodipino y diltiazem. Y específicamente se cita el verapamilo. Se utiliza en el tratamiento del cáncer y la administración puede variar administrando el primer componente antes o después del adenovirus oncolítico.

El documento D1 se refiere a una combinación para tratamiento del cáncer que comprende adenovirus oncolítico junto con otros agentes anticancerígenos. El adenovirus oncolítico se puede administrar por diferentes vías (ver página 27, líneas 20-32) y por inyección intratumoral (ver página 28, líneas 22.-30). La administración del adenovirus oncolítico puede preceder o seguir al agente anticancerígeno. Entre todos los ejemplos de principios activos que se citan se incluye el verapamilo (ver página 33, línea 8).

El documento D2 se refiere a la utilización de adenovirus oncolíticos en el tratamiento del cáncer.

El documento D3 se refiere a la utilización de agentes que revierten la resistencia a las drogas utilizadas en la quimioterapia del cáncer ya que se limita su efectividad (ver página 162), la mayoría de los estudios clínicos han utilizado el verapamilo o la ciclosporina A como quimiomoduladores (ver páginas 172, 173, tabla 4).

Por lo tanto a la vista de los documentos citados, la materia correspondiente a las reivindicaciones 1-12 carece de novedad y de actividad inventiva de acuerdo con los artículos 6.1 y 8.1 de la L.P