



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 203**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/07** (2006.01)

**A01N 1/02** (2006.01)

**A61L 2/00** (2006.01)

**A61K 35/12** (2006.01)

**A61K 39/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01931242 .0**

96 Fecha de presentación : **01.05.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1278823**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.01.2003**

54

Título: **Eliminación de células neoplásicas de composiciones celulares mixtas usando virus.**

30

Prioridad: **03.05.2000 US 201990 P**  
**19.05.2000 US 205389 P**  
**13.02.2001 US 268054 P**  
**16.03.2001 US 276782 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**18.10.2011**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**18.10.2011**

73

Titular/es: **ONCOLYTICS BIOTECH Inc.**  
**Suite 210 1167 Kensington Crescent N. W**  
**Calgary, AB T2N 1X7, CA**

72

Inventor/es: **Morris, Donald;**  
**Thompson, Bradley, G. y**  
**Coffey, Matthew, C.**

74

Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 366 203 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Eliminación de células neoplásicas de composiciones celulares mixtas usando virus

**CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 La presente invención se refiere a un método para eliminar de forma selectiva células neoplásicas activadas por ras de una composición celular mixta fuera de un organismo vivo usando un virus que infecta y elimina selectivamente las células neoplásicas.

**REFERENCIAS**

- U.S. Patent No. 6,136,307.
- WO 94/18992, published September 1, 1994.
- 10 WO 94/25627, published November 10, 1994.
- WO 99/08692, published February 25, 1999.
- Bar-Eli, N., et al., "preferential cytotoxic effect of Newcastle disease virus on lymphoma cells", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122: 409-415 (1996).
- Bensingler, W.I., "Should we purge?", *Bone Marrow Transplant.* 21:113-115 (1998).
- 15 Bischoff JR. et al., "An Adenovirus Mutant that Replicates Selectively in p53-Deficient Human Tumor", *Science* 274(5286):373-6 (1996).
- Blagoslelonny, M.V., et al., "in vitro Evaluation of a p53-Expressing Adenovirus as an Anti-Cancer Drug", *Int. J. Cancer* 67(3):386-392 (1996).
- Bos, J.L., "Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review", *Canc. Res.* 49(17): 4682-4689 (1989).
- 20 Brooks et al., eds. "Jawetz, Melnick & Adelberg's Med. Microbiology". (1998).
- Chang et al., *PNAS* 89:4825-4829 (1992).
- Chang, H.W. et al., *Virology* 194:537-547 (1993).
- Chang et al., *J. Virol.* 69:6605-6608 (1995).
- Coffey, M.C., et al., "Reovirus Therapy of Tumors with Activated Ras Pathway", *Science* 282:1332-1334 (1998).
- 25 Duggan, P.R., et al., "Predictive factors for long-term engraftment of autologous blood stem cells", *Bone Marrow Transplantation* 26(12): 1299-1304 (2000).
- Fueyo, J., et al., "A Mutant Oncolytic Adenovirus Targeting the Rb Pathway Produces Anti-Glioma Effect in Vivo", *Oncogene* 19(1):2-12 (2000).
- 30 Gao, J., B. Tombal and J.T. Isaacs, "Rapid in situ hybridization technique for detecting malignant mouse cell contamination in human xenograft tissue from nude mice and in vitro cultures from such xenografts", *Prostate* 39(1): 67-70 (1999).
- Haig, D.M., et al., *Immunology* 17:4146-4158 (1997).
- He, B., et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 843-848 (1997).
- Kawagishi-Kobayashi, M., et al., *Mol. Cell. Biology* 17:4146-4158 (1997).
- 35 Nemunaitis, J., *Invest. New Drugs* 17:375-386 (1999).
- Nielsen LL., et al., "P53 Tumor Suppressor Gene Therapy for Cancer", *Cancer Gene Ther.* 5(1):52-63 (1998).
- Nieto, Y. et al., "Autologous stem-cell transplantation for solid tumors in adults", *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 13(5):939-968 (1999).

- Norman, K., et al., "Reovirus as a novel oncolytic agent", *J. Clin. Invest.* 105 (8): 1035-1038 (2000).
- Reichard, K.W., et al., "Newcastle Disease Virus Selectively Kills Human Tumor Cells", *J. of Surgical Research* 52:448-453 (1992).
- 5 Stojdl, D.F., et al., "Exploiting Tumor-Specific Defects in the Interferon Pathway with a Previously Unknown Oncolytic Virus", *Nat. Med* 6(7):821-825 (2000).
- Romano et al., *Mol. and Cell. Bio.* 18:7304-7316 (1998).
- Sharp et al., *Virology* 250:301-315 (1998).
- Spyridonidis, A. et al., "Minimal residual disease in autologous hematopoietic harvests from breast cancer patients", *Annals of Onc.* 9:821-826 (1998).
- 10 Steele, T.A., "Recent Developments in the Virus Therapy of Cancer", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 223:118-127 (2000).
- Stewart, D.A., et al., "Superior autologous blood stem cell mobilization from dose-intensive cyclophosphamide, etoposide, cisplatin plus G-CSF than from less intensive chemotherapy regimens", *Bone Marrow Transplant.* 23(2): 111-117 (1999).
- 15 Strong, J.E., et al., "The Molecular Basis of Viral Oncolysis: Usurpation of the Ras Signaling Pathway by Reovirus", *EMBO J.* 17:3351-3362 (1998).
- Strong, J.E., et al., "Minimal Residual Disease in Autologous Hematopoietic Harvests from Breast Cancer Patients", *Annals of Onc.* 9:821-826 (1998).
- Strong, J.E., et al., "Evidence that the Epidermal Growth Factor Receptor on Host Cells Confers Reovirus Infection Efficiency", *Virology* 197(1):405-411 (1993).
- 20 Strong, J.E., et al., "The v-erbV oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection", *J. Virol.* 70:612-616 (1996).
- Wiman KG, "New p53-Based Anti-Cancer Therapeutic Strategies", *Med Oncol.* 15(4):222-8 (1998).
- Winter, J.N., "High-dose therapy with stem-cell transplantation in the malignant lymphomas", *Onc. (Huntingt)* 13(12):1635-1645 (1999).
- 25 Yoon, S.S., et al., "An Oncolytic Herpes Simplex Virus Type I Selectively Destroys Diffuse Liver Metastases from Colon Carcinoma", *FASEB J.* 14:301-311(2000).
- Zorn, U. et al., "Induction of Cytokines and Cytotoxicity against Tumor Cells by Newcastle Disease Virus", *Cancer Biotherapy* 9(3):22-235 (1994).

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 30 La proliferación celular está regulada tanto por señales promotoras del crecimiento como por señales limitantes del crecimiento. Estos dos tipos de señales para cada célula normalmente encontrarían un equilibrio de un modo que refleja la necesidad del cuerpo para la célula particular. Si una célula no logra responder a las señales limitantes del crecimiento o responde excesivamente a las señales promotoras del crecimiento, proliferará de una forma anormalmente rápida (mencionadas como células neoplásicas) y finalmente puede desarrollarse en cáncer, un neoplasma maligno.
- 35
- La quimioterapia, un método actual para tratar el cáncer, está basada en líneas generales en la propiedad de rápida proliferación de las células cancerosas. Como las células cancerosas proliferan rápidamente, son más sensibles a fármacos que inhiben la proliferación celular. En teoría, eligiendo cuidadosamente la dosificación de los fármacos quimioterapéuticos, se puede inhibir la proliferación de las células cancerosas sin dañar gravemente las células normales. Sin embargo, algunas células normales, tales como las células madre hematopoyéticas, también proliferan rápidamente. Por lo tanto, cualquier dosificación que sea dañina para las células cancerosas a menudo también daña a las células madre hematopoyéticas. Por otro lado, si la dosificación no es suficientemente alta para eliminar las células cancerosas, existe el riesgo de que el cáncer reaparezca después de que se termine la quimioterapia.
- 40
- 45 Como es difícil encontrar una dosificación que elimine selectivamente las células cancerosas, la quimioterapia de elevada dosis seguida de trasplante de células madre progenitoras hematopoyéticas autólogas ha logrado una aplicación extensiva como enfoque terapéutico en muchos cánceres (por ejemplo, véase Winter, 1999; Nieto y Shpall, 1999). En este enfoque, una parte de las células madre hematopoyéticas se retira de un paciente con cáncer, y el paciente después se trata con quimioterapia de elevada dosis que es letal para las células de rápida proliferación, tales como células cancerosas y células madre hematopoyéticas. Posteriormente, el paciente recibe el
- 50

transplante de células madre hematopoyéticas autólogas, que se han retirado previamente del mismo paciente, para regenerar el sistema hematopoyético.

5 Un grave inconveniente de esta terapia es que cuando las células madre progenitoras hematopoyéticas se retiran de los pacientes, a menudo están contaminadas con células cancerosas. Esto es especialmente un problema cuando el paciente tiene un cáncer de origen hematopoyético, pero pacientes con un tumor sólido también pueden sufrir contaminación de las células madre hematopoyéticas, particularmente si el tumor sólido ha metastatizado. Como resultado, cuando las células retiradas se transplantan de nuevo para restablecer el sistema hematopoyético, algunas células cancerosas también puede colocarse de nuevo en el paciente con cáncer donde pueden proliferar de nuevo para contribuir a la recurrencia del cáncer. Por lo tanto es deseable purgar los autoinjertos antes del transplante.

10 Se han empleado varios métodos para purgar los autoinjertos (Spyridonidis et al., 1998; Bensinger 1998). El autoinjerto puede tratarse con quimioterapia para eliminar las células neoplásicas contaminantes *in vitro*. Sin embargo, como se ha analizado anteriormente, es difícil encontrar una dosificación para el fármaco quimioterapéutico que elimine selectivamente las células neoplásicas o células cancerosas pero deje las células madre hematopoyéticas normales intactas. Los autoinjertos también pueden tratarse con una toxina conjugada con anticuerpos que reconocen un antígeno que es específico para las células neoplásicas, pero dicho antígeno específico de tumor no siempre existe. También es posible separar las células madre de las otras células con base a un marcador de superficie específico de células madre (CD34) usando citometría de flujo, columnas de afinidad o perlas magnéticas. Sin embargo, seleccionando solamente ciertas células hematopoyéticas, por ejemplo, las células CD34<sup>+</sup>, también se eliminan otras células hematopoyéticas tales como células T, células B, monocitos y células natural killer, y puede retardarse la recuperación inmune (Bensinger, 1998). Este método también provoca la pérdida de aproximadamente la mitad de las células CD34<sup>+</sup> y la retención de algunas células cancerosas contaminantes (Spyridonidis et al., 1998).

25 Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de un método altamente selectivo con un rendimiento razonable para purgar los autoinjertos que pueden contener células neoplásicas.

#### SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se define en y por las reivindicaciones adjuntas.

30 La presente invención se refiere a un método para eliminar selectivamente células neoplásicas activadas por ras de una composición celular mixta, por ejemplo, un autoinjerto, usando un virus que muestra eliminación selectiva de células neoplásicas.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para eliminar selectivamente células neoplásicas activadas por ras de una composición celular mixta que se sospecha que contiene células neoplásicas como se define en la reivindicación 1.

35 En una realización de la invención, el método comprende adicionalmente la etapa de congelar y almacenar la composición celular tratada con virus en una solución que contiene DMSO. El DMSO se usa de forma rutinaria para congelar y almacenar células animales pero puede desnaturalizar los virus. Por lo tanto, el tratamiento con DMSO elimina los virus infecciosos de la composición celular conservando al mismo tiempo la actividad de la composición en estado congelado durante un periodo prolongado de tiempo.

40 En otra realización de la presente invención, el virus se retira de la composición celular tratada con virus sometiendo la mezcla a anticuerpos anti-virus que son específicos para el virus particular, o una combinación de anticuerpos anti-virus y complemento para lisar el virus. Como alternativa o adicionalmente, pueden usarse anticuerpos anti-virus que reconocen una molécula sobre la superficie de la partícula viral para retirar las partículas virales inmovilizando los anticuerpos, aplicando la composición celular a los anticuerpos inmovilizados, y recogiendo la parte de la composición que no se une a los anticuerpos.

45 Asimismo, pueden administrarse anticuerpos específicos contra el virus particular al receptor del transplante para eliminar el virus *in vivo*, o puede darse al receptor un estimulante del sistema inmune para conseguir este propósito.

En otra realización de la presente invención, el virus se retira de la composición celular tratada con virus usando un gradiente que puede separar los virus de las células.

50 En una realización preferida de esta invención, la composición celular mixta comprende células madre hematopoyéticas. Por tanto, las células madre hematopoyéticas pueden purgarse antes del transplante, o cualquier otro uso deseado, para eliminar las células neoplásicas. Las células madre hematopoyéticas pueden recogerse de médula ósea o sangre.

55 La aplicación de esta invención no se limita a la purga de células madre hematopoyéticas. En otra realización de esta invención, el presente método puede aplicarse a cualquier tejido, órgano, una combinación de diferentes tejidos/órganos, o cualquier parte de un tejido o un órgano para eliminar las células neoplásicas. Los tejidos u órganos son preferiblemente útiles en un posterior transplante. Sin embargo, el presente método también es útil para purgar tejidos u órganos para cualquier otro propósito en el que es deseable eliminar las células neoplásicas que están presentes en el tejido u órgano.

En otra realización de la invención, el virus se usa para tratar líneas celulares cultivadas para retirar células que se transforman espontáneamente. Este método también puede usarse para tratar el semen o los óvulos donantes antes de la inseminación artificial u otro procedimiento relacionado con la reproducción.

5 En otro aspecto de esta invención, el virus es un virus competente en la replicación. En oposición a un virus deficiente en la replicación, un virus competente en la replicación puede replicarse en una célula que es susceptible a este virus y a menudo causa que esta célula se lise. El virus competente en la replicación útil en esta invención puede lisar selectivamente células neoplásicas en un fenómeno llamado "oncólisis", pero no lisa células normales.

10 En otra realización de esta invención, el virus es un virus mutado como se define en la reivindicación 1. Cada uno de estos virus en la forma nativa ha desarrollado un mecanismo para inhibir la proteína quinasa de ARN bicatenario (PKR) para facilitar la síntesis de proteínas virales que de lo contrario está inhibida por la PKR. Estos virus, por lo tanto, pueden replicarse en cualquier célula independientemente de la PKR. Cuando estos inhibidores virales de PKR están mutados o modificados, sin embargo, el virus es entonces susceptible a la inhibición por la PKR y no se replica en células normales, que tienen una vía PKR funcional. Estos virus mutados o modificados pueden usarse para eliminar de forma selectiva las células neoplásicas activadas por ras porque estas células neoplásicas activadas por ras son deficientes en la función PKR y por tanto no pueden inhibir la replicación de estos virus.

15 En este documento también se describen composiciones celulares que se han tratado con un virus para eliminar las células neoplásicas y dejar las células no neoplásicas viables. Dichas composiciones pueden usarse para investigación *in vitro*, o en trasplante, inseminación, u otros procedimientos *in vivo*. El trasplante puede ser autólogo, alogénico, o incluso xenogénico. Preferiblemente, el trasplante es autólogo. Más preferiblemente, la composición comprende células madre hematopoyéticas.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### Figura 1

25 Las Figuras 1A-1C muestran la cantidad de células viables en MCF7 (Figura 1A), SKBR3 (Figura 1B) o HTB 132 (Figura 1C) que se infectaron con reovirus vivo, virus muerto o sin virus como se indica. La Figura 1D muestra el porcentaje de células MCF7 que eran viables en diversos momentos puntuales después de la infección con reovirus.

### Figura 2

30 La Figura 2 muestra que se inducía la apoptosis por infección con reovirus en células MCF7, SKBR3 o HTB 132. Las Figuras 2A-2C muestran el porcentaje de ADN que se fragmentaba después de la infección con reovirus. La Figura 2D muestra el porcentaje de tinción con el marcador apoptótico anexina V después de la infección con reovirus. Las Figuras 2E-2G muestran el porcentaje de células AP02.7<sup>+</sup> en cada tipo celular indicado.

### Figura 3

35 La Figura 3A muestra la cantidad de células viables en diversos momentos puntuales después de que las células madre CD34<sup>+</sup> se hayan infectado con reovirus. La Figura 3B muestra el efecto del reovirus sobre cultivo de células madre a largo plazo. Se infectaron células madre con reovirus y se incubaron durante 2, 24, 48 ó 72 horas, respectivamente, después las células se diluyeron y se cultivaron durante 14 días para permitir que se formaran colonias individuales. Después se determinó la cantidad de cada tipo de colonia, granulocitos (G), eritroides (E) o megacariocitos macrófagos eritroides granulocíticos (GEMM), para las células infectadas sin virus (NV) o con virus vivo (LV), respectivamente. Por ejemplo, NV-G significa colonias de granulocitos derivadas de células que se trataron sin virus, y LV-G significa aquellas derivadas de células que se trataron con reovirus vivo.

### Figura 4

40 Las Figuras 4A-4C muestran los efectos purgantes del reovirus sobre mezclas de producto de aféresis con células MCF7, MDA MB 468 o SKBR3, respectivamente.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

45 La presente invención se refiere a un método para eliminar de forma selectiva células neoplásicas activadas por ras de una composición celular mixta, por ejemplo, un autoinjerto, usando un virus (como se define en la reivindicación 1) que muestra eliminación selectiva de células neoplásicas.

Antes de describir la invención en mayor detalle, los términos usados en esta descripción se definen del siguiente modo salvo que se indique otra cosa.

### Definiciones

50 "Virus" se refiere a cualquier virus, esté en forma nativa, atenuado o modificado. Los virus modificados incluyen virus modificados químicamente o virus modificados de forma recombinante. Un virus modificado de forma recombinante puede ser un virus mutado, un virus recombinante o un virus recombinado. Un virus mutado es un virus en el que el genoma viral se ha mutado, concretamente que tiene inserciones, deleciones y/o sustituciones de nucleótidos. Un

5 virus recombinante es un virus que tiene proteínas de la cubierta de diferentes subtipos, habitualmente preparado por co-infección de una célula con más de un subtipo del virus, produciendo virus que están envueltos por proteínas de la cubierta codificadas por diferentes subtipos. Un virus recombinado es un virus de múltiples segmentos en el que los segmentos se han recombinado, habitualmente por co-infección de una célula con más de un subtipo de este virus de modo que los segmentos de diferentes subtipos se mezclan y acoplan en la célula.

10 Las "células neoplásicas", también conocidas como "células con un trastorno proliferativo", se refieren a células que proliferan sin las propiedades normales de inhibición del crecimiento. Un nuevo crecimiento que comprende células neoplásicas es un neoplasma o tumor. Un neoplasma es un crecimiento anormal de tejido, que generalmente forma una masa distinta, que crece por proliferación celular más rápidamente que el crecimiento de tejido normal. Los neoplasmas pueden mostrar ausencia parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con tejido normal. Como se usa en este documento, se pretende que un neoplasma abarque neoplasmas hematopoyéticos así como neoplasmas sólidos.

15 Un neoplasma puede ser benigno (tumor benigno) o maligno (tumor maligno o cáncer). Los tumores malignos pueden clasificarse ampliamente en tres tipos principales. Los neoplasmas malignos que surgen de estructuras epiteliales se llaman carcinomas, los neoplasmas malignos que se originan a partir de tejidos conectivos tales como músculo, cartílago, grasa o hueso se llaman sarcomas y los tumores malignos que afectan a estructuras hematopoyéticas (estructuras que pertenecen a la formación de células sanguíneas) incluyendo componentes del sistema inmune, se llaman leucemias y linfomas. Otros neoplasmas incluyen, aunque sin limitación, neurofibromatosis.

20 Las "células neoplásicas activadas por ras" o las "células neoplásicas mediadas por ras" se refieren a células que proliferan a una velocidad anormalmente alta debido a, al menos en parte, la activación de la vía ras. La vía ras puede activarse mediante mutación estructural del gen ras, un nivel elevado de la expresión del gen ras, una estabilidad elevada del mensaje del gen ras, o cualquier mutación u otro mecanismo que conduzca a la activación de ras o un factor o factores corriente abajo o corriente arriba de ras en la vía ras, aumentando de este modo la actividad de la vía ras. Por ejemplo, la activación del receptor de EGF, el receptor de PDGF o Sos provoca la activación de la vía ras. Las células neoplásicas mediadas por ras incluyen, aunque sin limitación, las células cancerosas medidas por ras, que son células que proliferan de un modo maligno debido a la activación de la vía ras.

25 "Composición celular" significa una composición que comprende células. La composición puede contener materia no celular. Por ejemplo, la sangre completa es una composición celular que contiene plasma, plaquetas, hormonas y otra materia no celular además de células tales como eritrocitos y leucocitos. Una composición celular puede contener células de diversos tipos, origen u organización. Por ejemplo, tejidos y órganos que contienen diferentes tipos celulares dispuestos en estructuras definidas se consideran composiciones celulares.

30 Una "composición celular mixta" es una composición celular que contiene al menos dos tipos de células. Típicamente, la composición celular mixta contiene tanto células normales como células neoplásicas. Es preferible que la mayoría de las células en la composición celular sean células en división, y el virus elimina selectivamente células neoplásicas pero deja otras células en división esencialmente intactas.

35 Una composición celular "que se sospecha que contiene células neoplásicas" es una composición celular que puede contener células neoplásicas. Por ejemplo, cualquier autoinjerto obtenido de un sujeto que alberga un neoplasma puede contener células neoplásicas. Un cultivo celular que ha estado en cultivo durante una cantidad de tiempo considerable puede contener espontáneamente células neoplásicas.

40 "Eliminación sustancial" significa una disminución de al menos aproximadamente el 20% en la viabilidad de las células neoplásicas diana. La viabilidad puede determinarse por un recuento de células viables de las células tratadas, y el grado de disminución puede determinarse comparando la cantidad de células viables en las células tratadas con la existente en las células no tratadas, o comparando el recuento de células viables antes y después del tratamiento con virus. La disminución en la viabilidad es preferiblemente de al menos aproximadamente el 50%, más preferiblemente de al menos aproximadamente el 70%, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente el 80%, y mucho más preferiblemente de al menos aproximadamente el 90%.

45 Las células neoplásicas pueden eliminarse de diversos modos. Por ejemplo, pueden lisarse por un virus que tiene capacidad de infección lítica de células neoplásicas (oncólisis). Las células neoplásicas pueden experimentar apoptosis que se induce directa o indirectamente por el virus. Las células también pueden eliminarse, aunque menos preferiblemente, por el sistema inmune que se ha activado por el virus. Por ejemplo, el virus puede inducir la producción de citoquinas, que activa las células natural killer, que a su vez eliminan de forma selectiva las células neoplásicas (Zorn et al., 1994).

50 Un virus "competente en la replicación" es un virus que es capaz de replicarse en al menos un tipo celular. En oposición a un virus competente en la replicación, un "virus incompetente en la replicación" contiene una mutación en una región de su genoma que es esencial para su replicación, y por tanto no es capaz de replicarse en ninguna célula.

55 "Adenovirus" es un virus ADN bicatenario de aproximadamente 3,6 kilobases. En seres humanos, los adenovirus pueden replicarse y causar enfermedad en los ojos y en el tracto respiratorio, gastrointestinal y urinario. Aproximadamente la tercera parte de los 47 serotipos humanos conocidos es responsable de la mayoría de los casos de enfermedad humana por adenovirus (Brooks et al., 1998).

La expresión "adenovirus mutado" o "adenovirus modificado" significa, como se usa en este documento, que el producto o productos génicos que evitan la activación de PKR están ausentes, inhibidos o mutados de modo que no esté bloqueada la activación de PKR. El adenovirus codifica varios productos génicos que contrarrestan los mecanismos de defensa antivirales del hospedador. El ARN asociado al virus (ARN VA1 o ARN<sub>i</sub> VA) del adenovirus son ARN estructurados pequeños que se acumulan en altas concentraciones en el citoplasma en momento tardío después de la infección con adenovirus. Estos ARN VA1 se unen a motivos de unión de ARN bicatenario (dsARN) de PKR y bloquean la activación dependiente de dsARN de PKR por autofosforilación. Por tanto, la PKR no es capaz de funcionar y el virus puede replicarse dentro de la célula. La super-producción de viriones finalmente conduce a muerte celular. En un adenovirus mutado o modificado, los ARN VA1 preferiblemente no se transcriben. Dicho adenovirus mutado o modificado no sería capaz de replicarse en células normales que no tienen una vía Ras activada; sin embargo, sería capaz de infectar y replicarse en células que tienen una vía Ras activada.

"Virus vaccinia" se refiere al virus del género ortopoxvirus que infecta seres humanos y produce lesiones localizadas (Brooks et al., 1998). El virus vaccinia codifica dos genes que desempeñan una tarea en la regulación negativa de la actividad PKR a través de dos mecanismos completamente diferentes. El gen E3L codifica dos proteínas de 20 y 25 kDa que se expresan pronto en la infección y tienen actividad de unión a dsARN que puede inhibir la actividad PKR. La delección o alteración del gen E3L crea replicación viral permisiva en células que tienen una vía Ras activada. El gen K3L del virus vaccinia codifica pK3, un pseudosustrato de PKR.

La expresión "virus vaccinia mutado" o "virus vaccinia modificado" significa, como se usa en este documento, que el producto o productos génicos que evitan la activación de PKR están ausentes, inhibidos o mutados de modo que la activación de PKR no está bloqueada. Preferiblemente, el gen E3L y/o el gen K3L no se transcriben. Dicho virus vaccinia mutado o modificado no sería capaz de replicarse en células normales que no tienen una vía Ras activada, sin embargo, sería capaz de infectar y replicarse en células que tienen una vía Ras activada.

"Resistencia" de las células a infección vírica significa que la infección de las células con el virus no provoca producción o rendimiento viral significativo.

Un "oncolisado viral" es una composición preparada por tratamiento de las células tumorales con un virus oncolítico *in vitro*, dicha composición se administra posteriormente a un paciente de tumor con el mismo tipo de tumor para inducir inmunidad en el paciente de tumor contra este tumor. Por tanto, los oncolisados virales son esencialmente membranas de células cancerosas modificadas con virus.

Como se usa en este documento, un "receptor de trasplante" es un mamífero que recibe un trasplante de composiciones celulares. Preferiblemente, el receptor es un ser humano, y más preferiblemente el receptor es un ser humano que está recibiendo un trasplante en el tratamiento del cáncer.

#### Método

La presente invención se refiere al uso de a virus (como se define en la reivindicación 1) para eliminar de forma selectiva células neoplásicas activadas por ras de composiciones celulares mixtas que se sospecha que contienen células neoplásicas.

Aunque se usa reovirus como ejemplo a continuación, un especialista en la técnica puede seguir las instrucciones de este documento y aplicar el método para purgar cualquier composición celular mixta usando virus como se define en la reivindicación 1. El uso de reovirus no está de acuerdo con la invención reivindicada.

#### 1. Reovirus

Recientemente se descubrió que el reovirus lisa selectivamente células neoplásicas activadas por ras *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* (Coffey et al., 1998; documento WO 99/08692). Normalmente, las células no son susceptibles a infección con reovirus. Sin embargo, si se activa la vía ras, el reovirus puede replicarse satisfactoriamente en las células y finalmente provoca la lisis de las células hospedadoras. Por ejemplo, cuando se transformaron células NIH 3T3 resistentes a reovirus con Ras activado o Sos, una proteína que activa Ras, se potenció la infección con reovirus (Strong et al., 1998). Asimismo, fibroblastos de ratón que son resistentes a infección con reovirus llegan a ser susceptibles después de transfección con el gen del receptor de EGF o el oncogén v-erbB (Strong et al., 1993; Strong et al., 1996).

Sin limitarse a una teoría, parece que la replicación de reovirus está regulada a nivel traduccional (Strong et al., 1998; Norman et al., 2000). En células NIH 3T3 no transformadas, los transcritos virales tempranos activan la proteína quinasa activada por ARN bicatenario (PKR), que inhibe la traducción, inhibiendo de este modo la replicación viral. Ras activado (o un elemento activado e la vía ras) supuestamente inhibe o revierte la activación de PKR. Por lo tanto, la síntesis de proteínas virales procede, se crean partículas virales, y las células finalmente se lisan.

El oncogén ras es responsable de una gran cantidad de tumores. Las mutaciones activadoras del propio gen ras suceden en aproximadamente el 30% de todos los tumores humanos (Bos, J.L., 1989), principalmente en carcinomas pancreáticos (90%), colorrectales esporádicos (50%) y pulmonares (40%), y leucemia mieloide (30%). La activación de los factores corriente arriba o corriente debajo de ras en la vía ras también está asociada con tumores. Por ejemplo, la sobre-expresión de HER2/Neu/ErbB2 o el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) es habitual en cáncer de mama (25-30%), y la sobre-expresión del receptor del factor de crecimiento derivado

de plaquetas (PDGF) o el receptor de EGF es predominante en gliomas y glioblastomas (40-50%). Se sabe que tanto el receptor de EGF como el receptor de PDGF activan ras después de la unión a su ligando respectivo, y v-erbB codifica un receptor activado de forma constitutiva que carece del dominio extracelular.

5 Primero se determinó la capacidad del reovirus de eliminar las células cancerosas. El reovirus causaba de forma eficaz la oncólisis de tres sistemas modelo de cáncer de mama, MCF7, SKBR3 y HTB 132, por inducción de la apoptosis en las células infectadas (Ejemplo 1). Por tanto, el tratamiento con reovirus provocaba una marcada disminución en la viabilidad de células MCF7, SKBR3 y HTB 132, mientras que los controles tratados sin virus o con virus muerto crecían normalmente (Figuras 1A-1D). La disminución en la viabilidad estaba acompañada por características que están asociadas con la apoptosis, tales como fragmentación del ADN, tinción positiva con anexina V o APO 2.7 (Figuras 2A-2G) y efectos citopáticos, tales como ampollas en la membrana celular, condensación nuclear y condensación de la cromatina, observados al microscopio.

10 Como la infección con reovirus está habitualmente bloqueada a nivel traduccional en células normales pero no en células neoplásicas mediadas por ras, se examinó el grado de síntesis de proteínas en células MCF7 tratadas con reovirus y células madre CD34<sup>+</sup> (Ejemplo 2). De hecho, se sintetizaron proteínas virales en la línea celular cancerosa infectada con reovirus, pero no en células madre CD34<sup>+</sup> que también se trataron con reovirus (datos no mostrados). Este resultado sugiere que será seguro tratar células madre hematopoyéticas con reovirus, ya que no se sintetizaron proteínas reovirales en células madre tratadas con reovirus y la síntesis de las proteínas celulares procedió normalmente. Para confirmar este punto, se determinó la viabilidad de las células CD34<sup>+</sup> tratadas con reovirus en diversos momentos puntuales después del tratamiento con reovirus (Ejemplo 3). Las cantidades de células en poblaciones tratadas con reovirus virus o sin virus fueron similares después de cada momento puntual (Figura 3A), lo que indica que las células CD34<sup>+</sup> no son susceptible a la infección con reovirus.

15 Para que el reovirus sea útil para purgar células madre hematopoyéticas en tratamiento de quimioterapia de elevada dosis, es esencial que el tratamiento con reovirus no altere la capacidad de las células madre de diferenciarse en todos y cada uno de los linajes hematopoyéticos para reconstituir el sistema hematopoyético completo. Por lo tanto, se evaluó el efecto a largo plazo del tratamiento con reovirus (Ejemplo 3). Células CD34<sup>+</sup> tratadas sin virus o con virus vivo no mostraron esencialmente ninguna diferencia en su capacidad para diferenciarse en granulocitos, eritroides, o megacariocitos macrófagos eritroides granulocíticos incluso después de 72 horas del tratamiento con reovirus (Figura 3B). La proporción entre estos tres linajes también permaneció igual después de este tratamiento prolongado. Por consiguiente, el tratamiento con reovirus no eliminó las células CD34<sup>+</sup> ni cambió el potencial de las mismas de reconstituir el sistema hematopoyético.

20 Además, el reovirus es capaz de purgar una composición celular mixta, como se demuestra por la eliminación selectiva de células MCF7, SKBR3 o HTB 132 en una mezcla de células cancerosas y producto de aféresis que contenía células madre CD34<sup>+</sup> (Ejemplo 4). Midiendo CD34 y la citoqueratina, un marcador específico para células epiteliales tales como MCF7, SKBR3 o HTB 132, se mostró que el reovirus eliminaba esencialmente las células cancerosas de la composición celular mixta (Figuras 4A-4C) dejando al mismo tiempo las células madre intactas. Por lo tanto, el tratamiento con reovirus es un método eficaz para purgar las células neoplásicas de composiciones de células madre hematopoyéticas.

25 Por consiguiente, los autoinjertos que contienen células madre se tratan con reovirus antes del trasplante para retirar las células neoplásicas activadas por ras contaminantes o espontáneas. Esto aumenta la eficacia del tratamiento de quimioterapia de elevada dosis/trasplante de células madre hematopoyéticas autólogas. Será de interés particular el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, linfoma no Hodgkin, leucemia mielogénica aguda, cánceres de células germinales (testiculares), tumores cerebrales, y tumores de mama, ya que la quimioterapia de elevada dosis y el trasplante de células madre autólogas se han realizado de forma eficaz en pacientes con estos tumores. Sin embargo, se contempla que el presente método será útil en otros cánceres también para retirar cualquier célula neoplásica mediada por ras, ya que la activación de la vía ras puede suceder en cualquier tipo celular o tisular.

30 Las células madre progenitoras hematopoyéticas pueden obtenerse de la médula ósea del paciente antes del tratamiento. Como alternativa, en un paciente con cáncer que ha estado recibiendo quimioterapia tradicional no de elevada dosis, típicamente aparecen muchas células madre en la sangre periférica con o sin sensibilización con factor estimulador de colonias. Por lo tanto, la célula madre progenitora hematopoyética puede obtenerse de la sangre como producto de aféresis, que puede almacenarse durante un largo tiempo antes de transplantarse. La presente invención puede aplicarse a autoinjertos que contienen células madre que se recogen de cualquier fuente tisular, incluyendo médula ósea y sangre.

35 Además de las células madre hematopoyéticas, la presente invención puede aplicarse ampliamente para retirar células neoplásicas activadas por ras de muchas otras composiciones celulares. Por ejemplo, la invención puede usarse como práctica rutinaria para "limpiar" (eliminar células neoplásicas activadas por ras de) cualquier trasplante tisular u orgánico. Será de particular interés el uso de los métodos reivindicados para limpiar sangre completa o cualquier parte de la misma para una posterior transfusión. Asimismo, el trasplante tisular u orgánico ha llegado a ser cada vez más habitual, y será beneficioso que pueda tratarse el trasplante para retirar las células neoplásicas activadas por ras antes del trasplante. El hígado, el riñón, el corazón, la córnea, un injerto cutáneo, las células de los islotes pancreáticos, la médula ósea o cualquier parte de los mismos son sólo unos pocos ejemplos de los tejidos u órganos a los que puede aplicarse esta invención.

40 El tejido u órgano puede ser autólogo, alogénico o xenogénico. El tejido u órgano también puede obtenerse de un animal transgénico, puede ser un tejido/organo que se desarrolla *in vitro* a partir de células madre, o puede expandirse *ex vivo*. El tejido u órgano a tratar puede ser de origen embrionario o adulto. Por ejemplo, pueden



tratarse células neuronales embrionarias antes de transplantarse en un paciente de Alzheimer. Asimismo, la invención puede usarse para tratar semen u óvulos donantes *ex vivo*.

5 La aplicación de la presente invención no está limitada a los trasplantes. En su lugar, puede "limpiarse" cualquier composición celular para cualquier propósito. Por tanto, todos los ejemplos descritos anteriormente son aplicables incluso si el tejido u órgano no está pretendido para su trasplante.

Las líneas celulares también pueden tratarse de forma rutinaria para protegerlas contra las células neoplásicas activadas por ras espontáneas o contaminantes. De nuevo, cualquier línea celular será un buen candidato para este método excepto, por supuesto, una línea celular transformada mediante activación de la vía ras.

10 Recientemente, muchos laboratorios han estado intentando establecer xenoinjertos transplantables en serie de tejido canceroso de próstata humana inoculado en ratones inmunocomprometidos. Sin embargo, a menudo sucede contaminación con células cancerosas de ratón durante este pase en serie de los xenoinjertos y estas células finalmente pueden hacer crecer en exceso las células cancerosas de próstata humana (Gao et al., 1999). La presente invención será una solución simple a este problema si el cáncer contaminante está mediado por ras y el xenoinjerto no.

15 La presente invención es distinta de un método para preparar oncolisados virales. Las células tumorales a menudo son malos inductores de respuestas inmunes y por tanto pueden escapar al ataque del sistema inmune. Los oncolisados virales, esencialmente membranas de células tumorales modificadas con virus, se usan en un enfoque para potenciar la inmunogenicidad de las células tumorales. Para preparar oncolisados virales, se retiran las células tumorales de un sujeto que alberga el tumor, y se infectan con un virus que lisa las células tumorales. La sustancia resultante después se administra a un sujeto que alberga el tumor, y a menudo se induce inmunidad contra las células tumorales no infectadas. El mecanismo por el cual la infección con virus de las células tumorales induce inmunidad contra células tumorales no infectadas es desconocido, pero puede estar implicada la xenogenización viral de las células tumorales (Steele, 2000).

25 Los oncolisados de melanoma, carcinoma vulvar y carcinoma de ovario infectado con virus de la influenza, así como oncolisados de carcinoma de colon infectado con el virus de la enfermedad de Newcastle y oncolisados de virus vaccinia se han usado todos contra diversos tumores. Por ejemplo, un paciente con melanoma recibió oncolisados después de la escisión quirúrgica del tumor. El oncolisado viral se administró semanalmente hasta la semana 4, cada 2 semanas hasta la semana 52, cada 3 semanas hasta la semana 120, y cada 6 semanas hasta la semana 160. En otro caso clínico, el programa de administración de oncolisado NDV autólogo contra el cáncer colorrectal se inició 2 semanas después de la cirugía y se repitió 5 veces a intervalos de 2 semanas, seguido de un refuerzo 3 meses después (Nemunaitis, 1999). Los estudios mostraron una respuesta clínica en algunos pacientes o generación de inmunidad activa contra antígenos tumorales (Steele, 2000).

35 La presente invención es distinta de oncolisados virales porque no se refiere a células tumorales modificadas con virus. En contraste a los oncolisados virales, las células neoplásicas lisadas pueden eliminarse, y preferiblemente se eliminan, de la composición celular tratada con virus sin afectar la eficacia de la presente invención. Además, los oncolisados virales se preparan usando principalmente células tumorales, mientras que la composición celular mixta en la presente invención preferiblemente contiene menos del 60% de células neoplásicas, más preferiblemente menos del 40%, aún más preferiblemente menos del 20%, y mucho más preferiblemente menos del 10% de células neoplásicas.

40 2. Otros virus que eliminan selectivamente células neoplásicas activadas por ras

Normalmente, cuando el virus entra en una célula, se activa la quinasa de ARN bicatenario (PKR) y bloquea la síntesis de proteínas, y el virus no puede replicarse en esta célula. Algunos virus han desarrollado un sistema para inhibir la PKR y facilitar la síntesis de proteínas virales así como la replicación viral. Por ejemplo, el adenovirus produce una gran cantidad de un ARN pequeño, ARN VA1. El ARN VA1 tiene estructuras secundarias extensivas y se une a la PKR en competición con el ARN bicatenario (dsARN) que normalmente activa la PKR. Como se requiere una longitud mínima del dsARN para activar la PKR, el ARN VA1 no activa la PKR. En su lugar, secuestra la PKR en virtud de su gran cantidad. Por consiguiente, la síntesis de proteínas no se bloquea y el adenovirus puede replicarse en la célula.

50 El virus vaccinia codifica dos productos génicos, K3L y E3L, que regulan negativamente la PKR con diferentes mecanismos. El producto génico K3L tiene homología limitada con la región N-terminal de eIF-2 $\alpha$ , el sustrato natural de PKR, y puede actuar como pseudosustrato para PKR. El producto génico E3L es una proteína de unión dsARN y aparentemente funciona secuestrando los dsARN activadores.

55 Como se ha analizado anteriormente, las células neoplásicas activadas por ras no se someten a inhibición de la síntesis proteica por PKR, porque ras inactiva PKR. Estas células, por lo tanto, son susceptibles a infección vírica incluso si el virus no tiene un sistema inhibitorio de PKR.

Por consiguiente, si los inhibidores de PKR en adenovirus o virus vaccinia se mutan para que ya no bloqueen la función PKR, los virus resultantes no infectan células normales debido a la inhibición de la síntesis de proteínas por PKR, pero se replican en células neoplásicas activadas por ras que carecen de actividades PKR.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para retirar células neoplásicas activadas por ras de una composición celular mixta usando adenovirus o virus vaccinia como se define en la reivindicación 1. El virus modificado o mutado se replica selectivamente en células neoplásicas activadas por ras mientras que las células normales son resistentes. El adenovirus se muta en la región VA1, y el virus vaccinia se muta en la región K3L y/o E3L.

Los virus pueden modificarse o mutarse de acuerdo con la relación estructura-función conocida de los inhibidores virales de PKR. Por ejemplo, como la región amino terminal de la proteína E3 interacciona con el dominio de la región carboxi-terminal de PKR, la delección o mutación puntual de este dominio evita la función anti-PKR (Chang et al., 1992, 1993, 1995; Sharp et al., 1998; Romano et al., 1998). El gen K3L del virus vaccinia codifica pK3, un pseudosustrato de PKR. Esta es una mutación de pérdida de función en K3L. Truncando o reemplazando mutaciones puntuales en la parte C-terminal de la proteína K3L, homóloga a los restos 79 a 83 en eIF-2 $\alpha$  elimina la actividad inhibidora de PKR (Kawagishi-Kobayashi et al., 1997).

### 3. Eliminación de los virus después del tratamiento con virus

Aunque el virus usado en la presente invención no se replica en células normales, puede desearse eliminar el virus antes de usar la composición celular tratada con virus.

Por consiguiente, en otra realización de esta invención, las composiciones celulares que se han tratado con un virus se congelan en una solución que contiene DMSO y se descongelan antes del trasplante. Aunque se usa DMSO de forma rutinaria para congelar y almacenar células animales, desnatura los virus, eliminando de este modo el virus infeccioso de la preparación de células madre. Esto reduce el riesgo de que el virus pueda causar infecciones indeseadas cuando se introduce en el receptor de trasplante mediante trasplante de células madre.

En otra realización, las composiciones celulares tratadas con virus se tratan con anticuerpos específicos contra el virus particular o una combinación de los anticuerpos específicos y complementos para inactivar o lisar el virus. Como alternativa o adicionalmente, pueden usarse anticuerpos específicos que reconocen una molécula sobre la superficie del virus particular para eliminar las partículas virales de la composición celular tratada con virus. Por tanto, los anticuerpos se inmovilizan en una columna, perlas o cualquier otro material o dispositivo conocido en la técnica, se aplica la composición celular a los anticuerpos inmovilizados, y la parte de la composición que no se une a los anticuerpos se recoge de acuerdo con un procedimiento adecuado para el método de inmovilización particular.

Otro método que puede usarse para eliminar el virus de una mezcla tratada con virus es someter la mezcla a un gradiente que separa las células del virus, y recoger la capa que contiene solamente las células.

En otra realización, al receptor de trasplante se le dan tratamientos para estimular el sistema inmune para reducir el riesgo de infección vírica. Este tratamiento puede realizarse antes de, de forma contemporánea con, o después del trasplante, pero se realiza preferiblemente antes del trasplante. Como tratamiento alternativo o junto con el estimulante del sistema inmune, al receptor se le pueden dar anticuerpos específicos contra el virus particular para reducir el riesgo de infección vírica.

### Composición

En este documento también se describe una composición que se prepara sometiendo una composición celular mixta a tratamiento con virus donde el virus provoca la muerte sustancial de las células neoplásicas contenidas en esta composición celular. Esta composición no es un oncolisado viral. Un oncolisado viral es la composición resultante de la oncólisis de células tumorales por un virus, que contiene como componente activo membranas de células tumorales modificadas con virus. En la presente invención, en contraste, los componentes activos en una composición celular tratada con virus son las células o neoplásicas supervivientes.

### Kit

Todos los virus analizados anteriormente pueden usarse para purgar composiciones celulares mixtas que pueden contener células neoplásicas. Si se desea, puede determinarse primero qué virus puede/n usarse para purgar la composición celular particular. Por ejemplo, cuando la composición celular mixta comprende células madre hematopoyéticas obtenidas de un paciente con cáncer, puede recogerse por anticipado una biopsia del cáncer y ensayarse con diferentes virus para determinar qué virus puede eliminar de forma eficaz las células cancerosas. El virus después puede usarse para purgar las células madre hematopoyéticas.

Como alternativa, la composición celular mixta puede tratarse con un cóctel de virus sin determinar primero la eficacia de cada virus.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar esta invención y no deben entenderse de ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención.

### **EJEMPLOS**

En los siguientes ejemplos, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Las abreviaturas no definidas tienen sus significados generalmente aceptados.

	°C	=	grado Celsius
	h	=	hora
	min	=	minuto
5	μM	=	micromolar
	mM	=	milimolar
	M	=	molar
	ml	=	mililitro
	μl	=	microlitro
10	mg	=	miligramo
	μg	=	microgramo
	PAGE	=	electroforesis en gel de poliacrilamida
	rpm	=	revoluciones por minuto
	FBS	=	suero bovino fetal
15	DTT	=	ditiotreitól
	SDS	=	dodecil sulfato sódico
	PBS	=	solución salina tamponada con fosfato
	DMEM	=	medio de Eagle modificado por Dulbecco
	α-MEM	=	medio de Eagle modificado α
20	β-ME	=	β-mercaptoetanol
	MOI	=	multiplicidad de infección
	PFU	=	unidades formadoras de placas
	PKR	=	proteína quinasa activada por ARN bicatenario
	EGF	=	factor de crecimiento epidérmico
25	PDGF	=	factor de crecimiento derivado de plaquetas
	DMSO	=	dimetilsulfóxido
	CPE	=	efecto citopático
	GCSF	=	factor estimulador de colonias de granulocitos

**Ejemplo 1 (referencia) El reovirus inducía oncólisis y apoptosis en células de cáncer de mama**

30 Para determinar el efector de reovirus sobre la viabilidad de células neoplásicas, primero se usaron tres sistemas modelo de cáncer de mama, MCF7 (ATCC número HTB-22), SKBR3 (ATCC número HTB-30) y MDA MB 468 (ATCC número HTB 132). Se cultivaron las células de cada línea celular hasta una confluencia del 50-60% y se infectaron con reovirus de serotipo 3, la cepa Dearing, a una multiplicidad de infección de 40. El reovirus se obtuvo y se mantuvo como se describe en la patente de Estados Unidos N° 6.136.307. Las células infectadas y no infectadas  
 35 con reovirus se recogieron a las 0, 24, 43 y 72 horas después de la infección y se determinó la viabilidad.

Los resultados se muestran en las Figuras 1A-1D. El recuento de células viables en células MCF7 (Figura 1 A), SKBR3 (Figura 1B) o MDA MB 468 (Figura 1C) infectadas con reovirus disminuyeron significativamente después de la infección, mientras que las células infectadas con virus muerto o sin virus proliferaron como se esperaba. El tratamiento con reovirus causó que la viabilidad de MCF7 (Figura 1D) y SKBR3 disminuyera del 93% al 16% en 72 horas después de la infección. En células MDA MB 468, las cantidades de células intactas tratadas con virus disminuyeron hasta el 12,7%, 8,8% y 3,6% de los recuentos celulares originales, respectivamente, a las 24, 48 y 72 horas después de la infección. Por tanto, el reovirus causó oncólisis de forma eficaz en los tres tipos de células cancerosas.

Las células murieron por apoptosis. Pudieron observarse los marcadores apoptóticos típicos tales como CPE, anexina-V y fragmentación del ADN en un transcurso de tiempo paralelo a la disminución de la viabilidad. Las Figuras 2A-2G muestran el porcentaje de fragmentación del ADN (2A-2C), la tinción con anexina V (2D) o células APO2.7<sup>+</sup> (2E-2G) en diversos momentos puntuales después de la infección con reovirus. Las células tratadas con reovirus mostraron todos los signos de la apoptosis a un nivel drástico en comparación con los controles sin virus o con virus muerto, lo que demuestra que el reovirus inducía la apoptosis en estas tres líneas celulares. Pareció que la apoptosis en los controles también aumentaba lentamente con el tiempo, probablemente porque las células empezaban a morir cuando habían crecido de forma demasiado densa.

### **Ejemplo 2 (referencia) El reovirus inhibía selectivamente la síntesis de proteínas en células cancerosas pero no células madre CD34<sup>+</sup>**

Para demostrar adicionalmente la infección vírica selectiva de las células cancerosas, se emprendió el marcaje con <sup>35</sup>S/SDS/PAGE de las proteínas virales. La síntesis de proteínas virales fue evidente después de 1-2 días en células MCF7 infectas con reovirus, mientras que la síntesis de proteínas celulares disminuyó al mismo tiempo, lo que indica que el reovirus había tomado posesión de la maquinaria celular. A los 4 días después de la infección, ya no se pudo detectar síntesis de proteínas, lo que sugiere que todas las células se habían eliminado. En los experimentos de control donde las células se infectaron con reovirus muerto o sin virus, no hubo síntesis de proteínas virales, mientras que la síntesis de proteínas celulares estaba al nivel normal. En contraste, el marcaje con <sup>35</sup>S de células madre CD34<sup>+</sup> en presencia o ausencia de reovirus mostró ausencia de síntesis de proteínas virales hasta 72 horas después de la adición de virus. Por lo tanto, el reovirus infecta selectivamente células MCF7 pero no células madre CD34<sup>+</sup>.

### **Ejemplo 3 (referencia) El tratamiento con reovirus no inhibía la proliferación celular ni alteraba el potencial de diferenciación de células CD34<sup>+</sup>**

Coherente con los resultados de síntesis de proteínas, el recuento de células viables indicó que el tratamiento con reovirus no disminuía la cantidad de células viables en células CD34<sup>+</sup> (Figura 3A) en comparación con el control sin virus.

Aunque la cantidad de células CD34<sup>+</sup> no estaba afectada por la infección con reovirus, quedó la cuestión de si el reovirus cambiaba el potencial de las células madre CD34<sup>+</sup> de diferenciarse en todos los linajes hematopoyéticos en la proporción apropiada. Si éste era el caso, las células madre tratadas con reovirus no serían un buen candidato para la reconstitución del sistema hematopoyético completo. Para investigar esta posibilidad, se incubaron células CD34<sup>+</sup> con reovirus durante 2, 24, 48 ó 72 horas, respectivamente. El reovirus después se retiró y las células se diluyeron y cultivaron en medio fresco durante 14 días para permitir que se formaran colonias. Cada colonia se examinó para determinar si pertenecía al linaje de granulocitos, eritroides, o megacariocitos macrófagos eritroides granulocíticos. Como se muestra en la Figura 3B, las células madre tratadas con virus vivo (LV) producían cantiles similares de granulocitos (G), eritrocitos (E) o megacariocitos macrófagos eritroides granulocíticos (GEMM) que el control sin virus (NV). Por lo tanto, el tratamiento con reovirus no cambiaba el potencial de diferenciación de las células CD34<sup>+</sup>.

### **Ejemplo 4 (referencia) El reovirus eliminaba selectivamente las células cancerosas de una composición celular mixta**

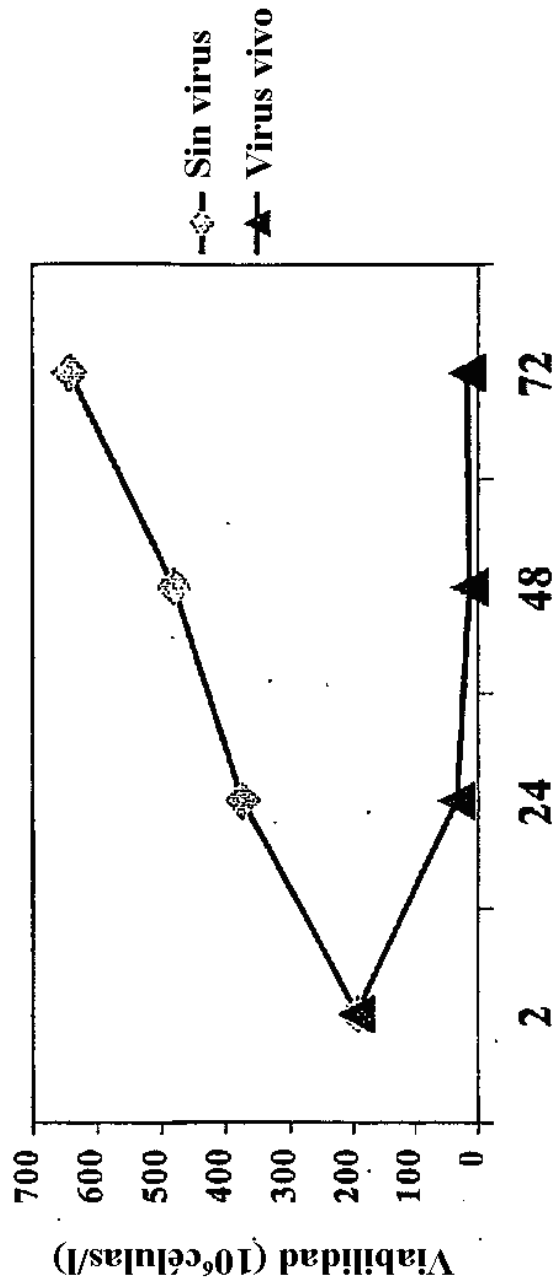
Se mezclaron células neoplásicas con producto de aféresis y se sometieron a infección con reovirus para investigar si el reovirus puede eliminar selectivamente las células neoplásicas de la composición celular mixta. El producto de aféresis se preparó de acuerdo con un procedimiento descrito previamente (Stewart et al., 1999; Duggan et al., 2000). Cuando las mezclas de producto de aféresis (90%) y MCF7 (10%) se trataron con reovirus y se ensayaron diariamente para el recuento celular y la viabilidad, hubo una reducción de factor 100 en las cantidades de células MCF7 citoqueratina-positivas mientras que las células madre CD34<sup>+</sup> permanecían intactas y viables. Las Figuras 4A-4C muestran el efecto purgante del reovirus para mezclas de producto de aféresis con células MCF7, SKBR3 o MDA MB 468. Estos resultados demuestran que el reovirus puede eliminar selectivamente las células neoplásicas en una mezcla celular y dejar las células madre intactas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para eliminar selectivamente las células neoplásicas activadas por ras de una composición celular mixta, en el que dicha composición está localizada fuera de un organismo vivo, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 (a)poner en contacto la composición celular mixta que comprende las células neoplásicas activadas por ras con un virus seleccionado entre el grupo compuesto por adenovirus mutado en el gen VA1 y virus vaccinia mutado en el gen K3L y/o el gen E3L en condiciones que provocan la muerte sustancial de las células neoplásicas activadas por ras para eliminar selectivamente las células neoplásicas activadas por ras de la composición; y
- (b)recoger la composición tratada.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la composición celular mixta comprende células madre hematopoyéticas.
3. El método de la reivindicación 2, en el que las células madre hematopoyéticas se han recogido de la médula ósea.
4. El método de la reivindicación 2, en el que las células madre hematopoyéticas se han recogido de la sangre.
- 15 5. El método de la reivindicación 1, en el que la composición celular comprende un tejido, un órgano o cualquier parte de un tejido o un órgano.
6. El método de la reivindicación 5, en el que el tejido u órgano se selecciona entre el grupo compuesto por el hígado, el corazón, la córnea, la piel, el pulmón, células de los islotes pancreáticos, y sangre completa.
7. El método de la reivindicación 5, en el que el tejido, órgano o parte del tejido u órgano es útil para trasplante.
- 20 8. El método de la reivindicación 1, en el que la composición celular comprende células cultivadas, semen u óvulos.
9. El método de la reivindicación 1, en el que el virus es un virus competente en la replicación.
10. El método de la reivindicación 1, en el que el virus está mutado o modificado de tal modo que el virus no produce un producto génico que inhibe la quinasa de ARN bicatenario (PKR).
- 25 11. El método de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la etapa de eliminar el virus de la composición celular tratada con virus.
12. El método de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente la etapa de almacenar la composición celular tratada con virus.
13. El método de la reivindicación 12, en el que la composición celular se almacena en una solución que contiene DMSO.
- 30

FIGURA 1A

### Viabilidad - MCF7



Horas después de la infección con virus

FIGURA 1B

Viabilidad - SKBR3

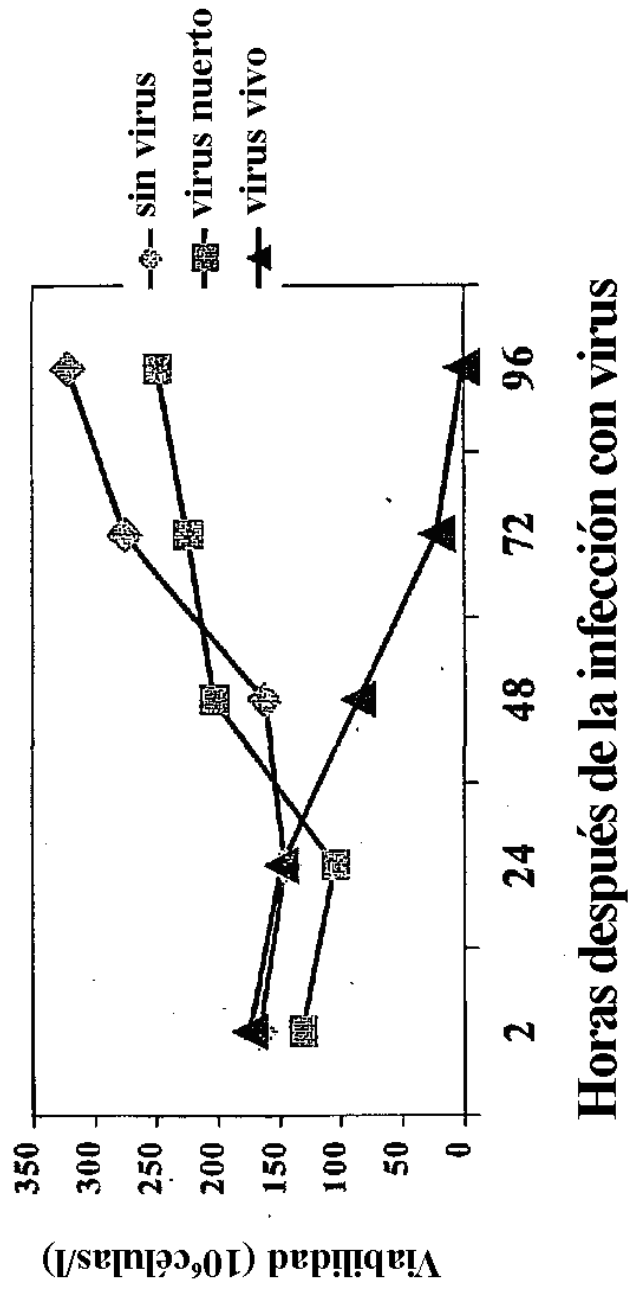


FIGURA 1C

### Viabilidad - HTB 132

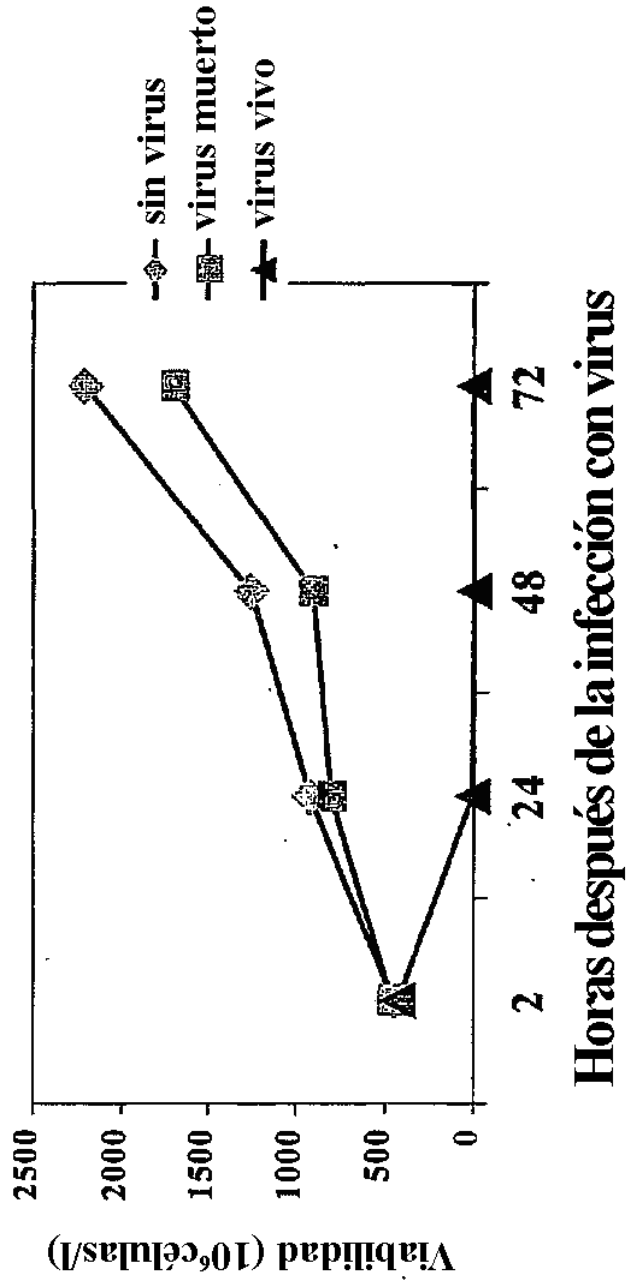
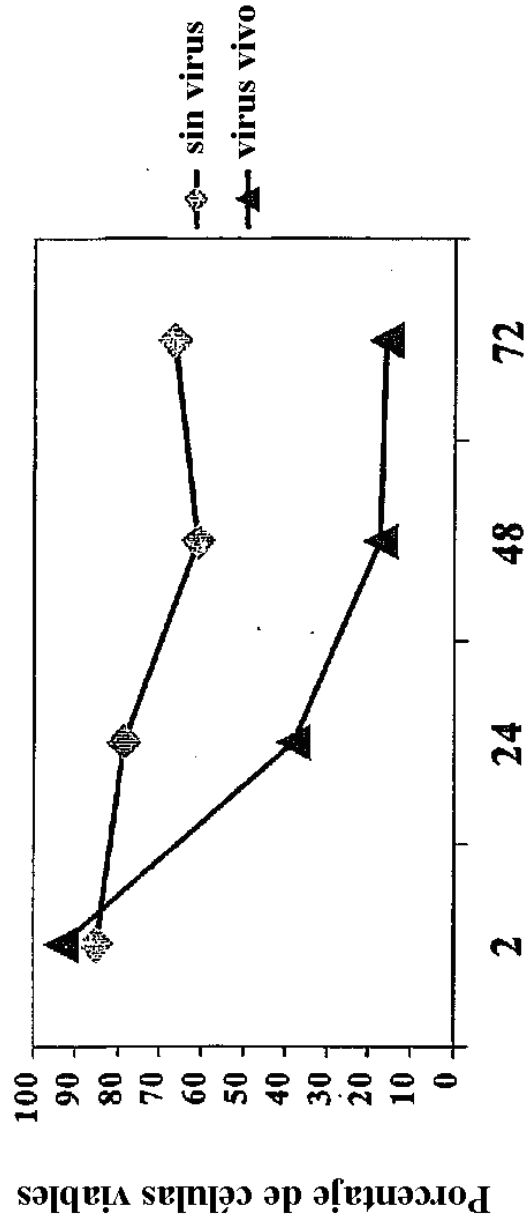




FIGURA 1D

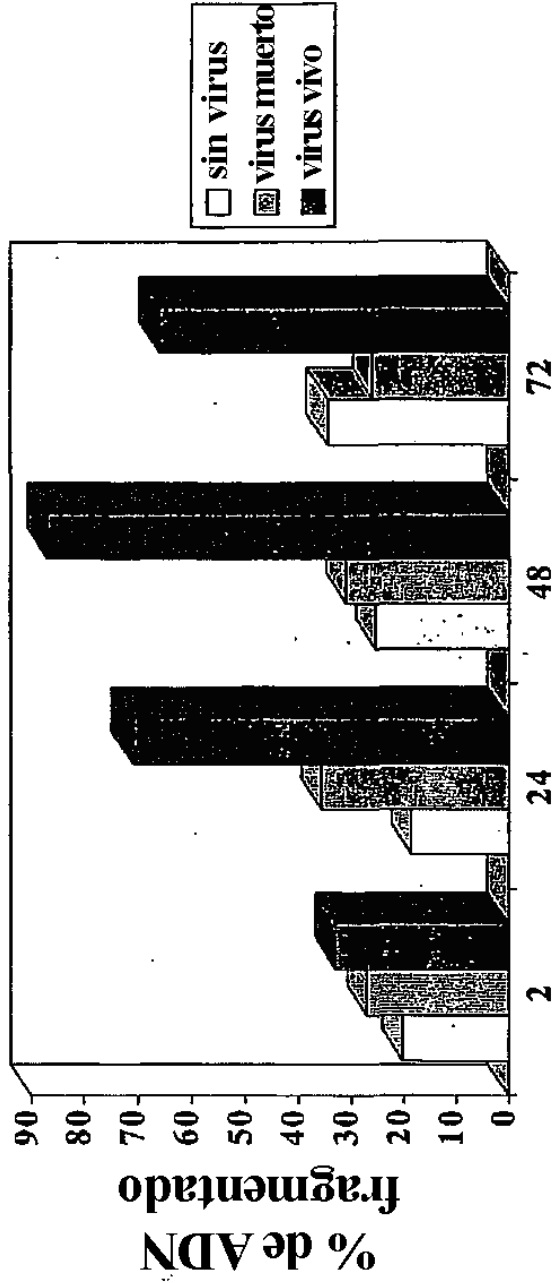
Efecto de reovirus sobre la viabilidad de MCF7



Horas después de la infección con virus

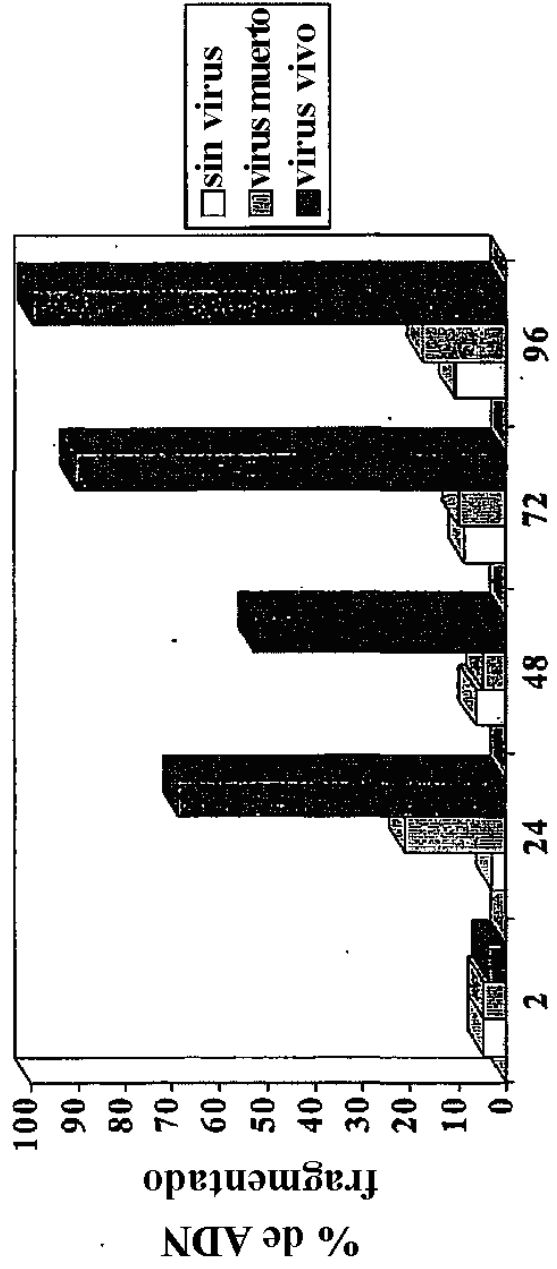
FIGURA 2A

**Fragmentación de ADN por reovirus MCF-7**



**Horas después de la infección con virus**

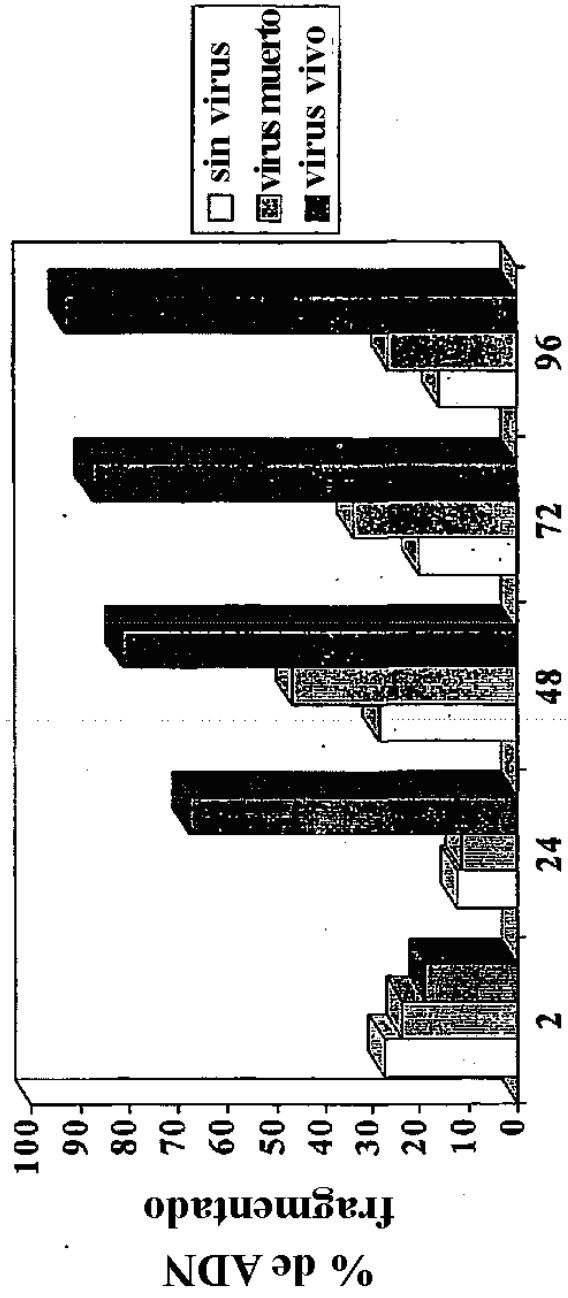
**FIGURA 2B**  
**Fragmentación de ADN por reovirus SKBR3**



**Horas después de la infección con virus**

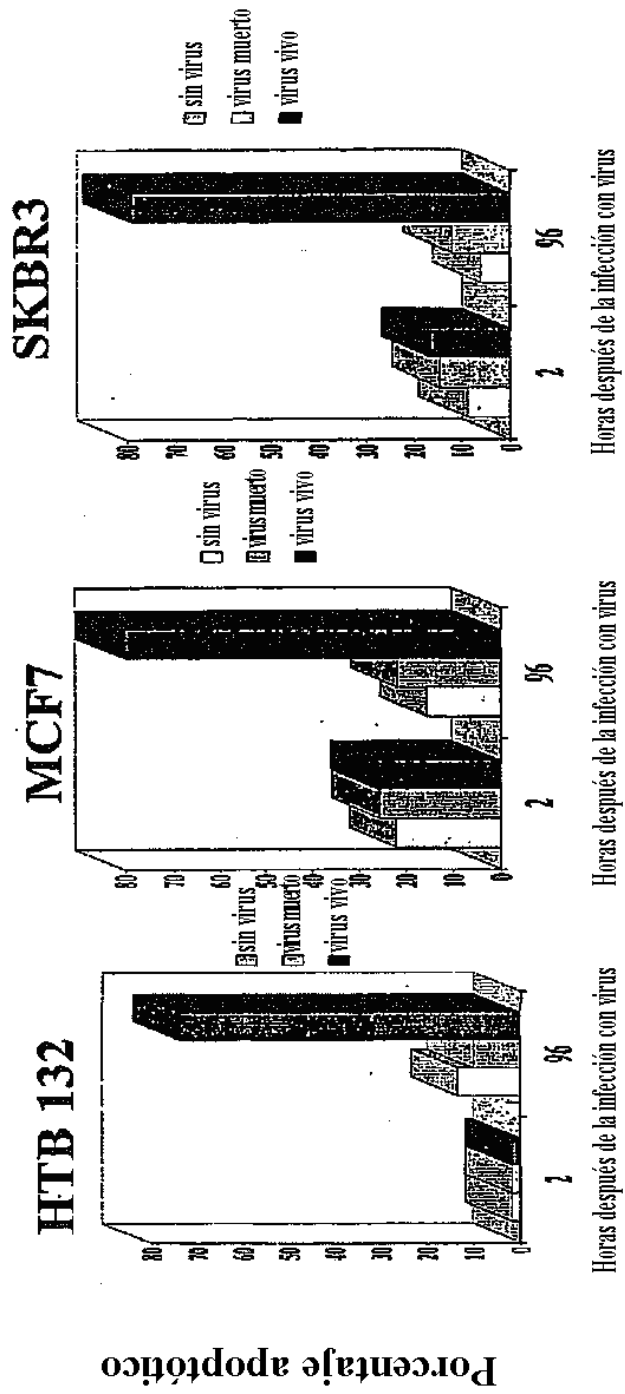
FIGURA 2C

**Fragmentación de ADN por reovirus HTB 132**

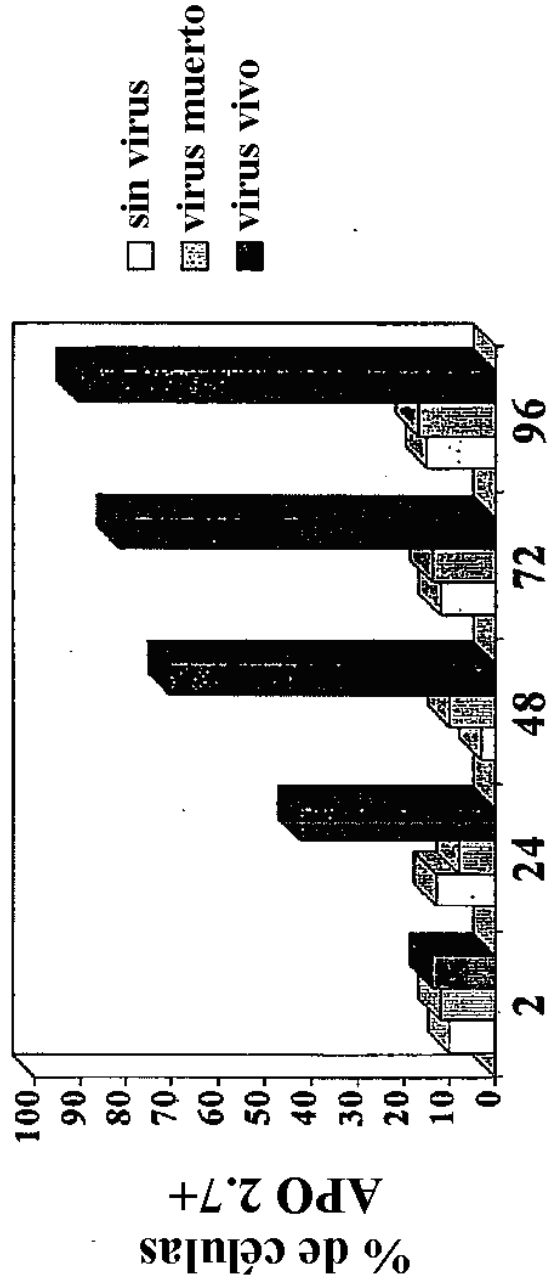


**Horas después de la infección con virus**

**FIGURA 2D**  
**Apoptosis (Anexina V-7AAD)**

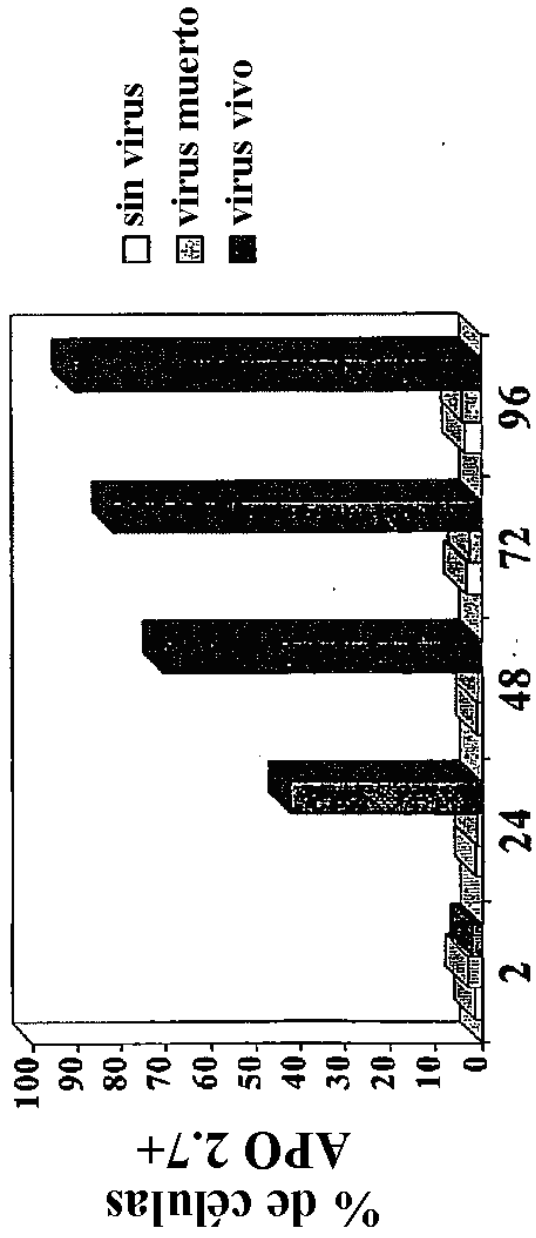


**FIGURA 2E**  
**Apoptosis (APO 2.7) - células MCF7**



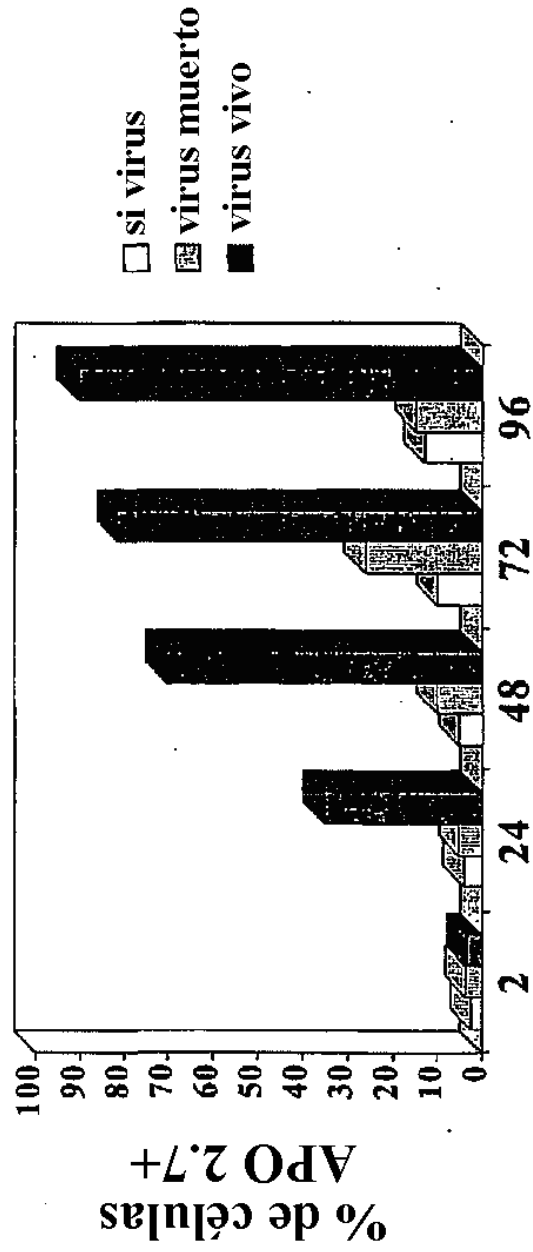
**Horas después de la infección con virus**

**FIGURA 2F**  
**Apoptosis (APO 2.7) - células HTB 132**



**Horas después de la infección con virus**

**FIGURA 2G**  
**Apoptosis (APO 2.7) - células SKBR3**

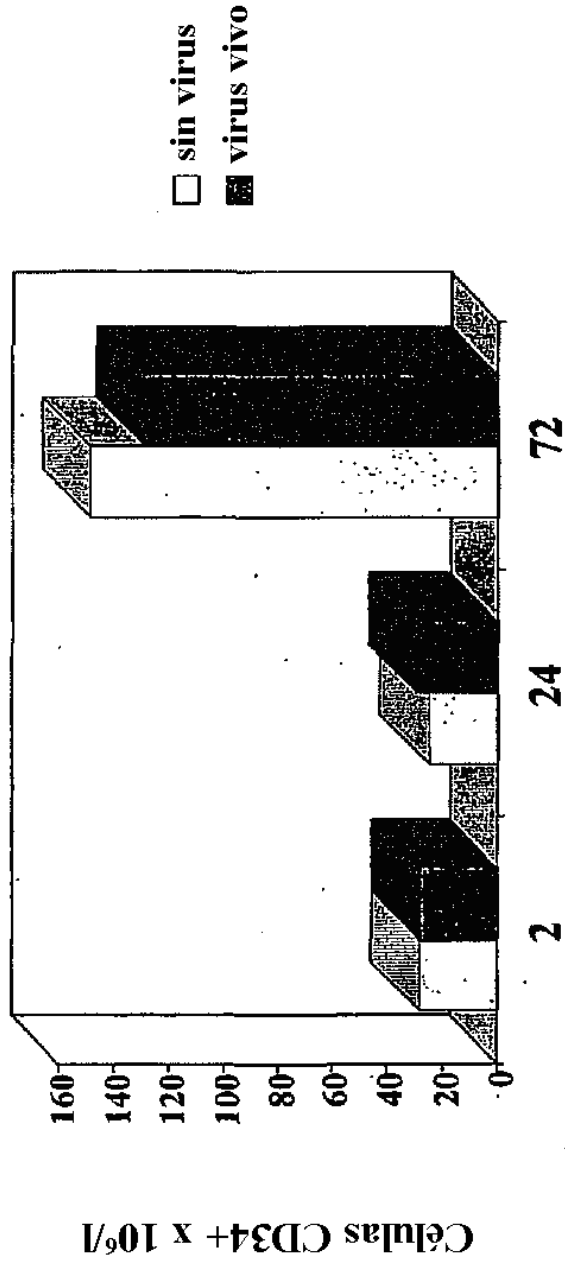


**Horas después de la infección con virus**



FIGURA 3A

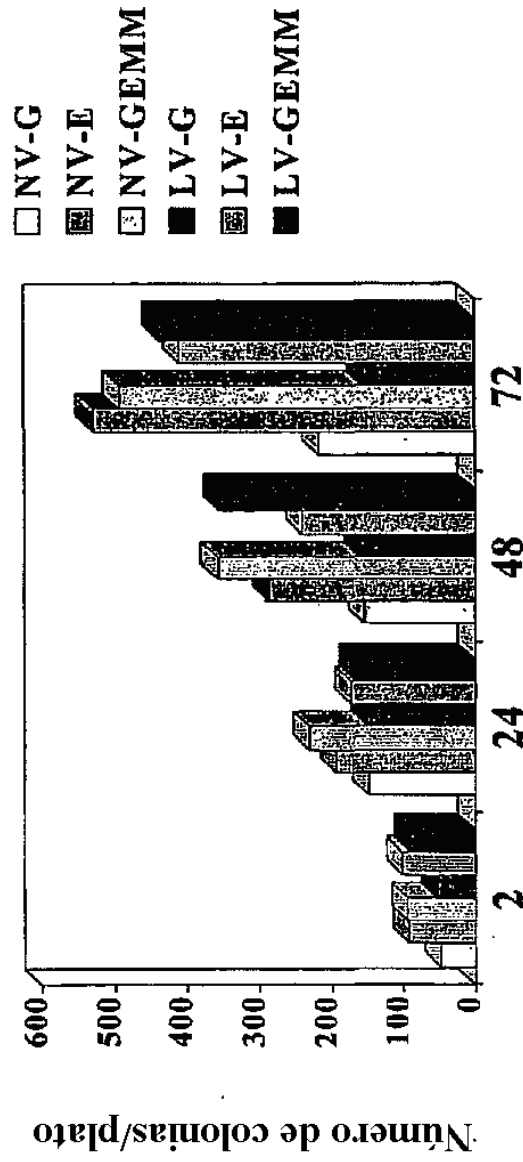
**Efecto de reovirus sobre células sobre células CD34+**



**Horas después de la adición de virus**

FIGURA 3B

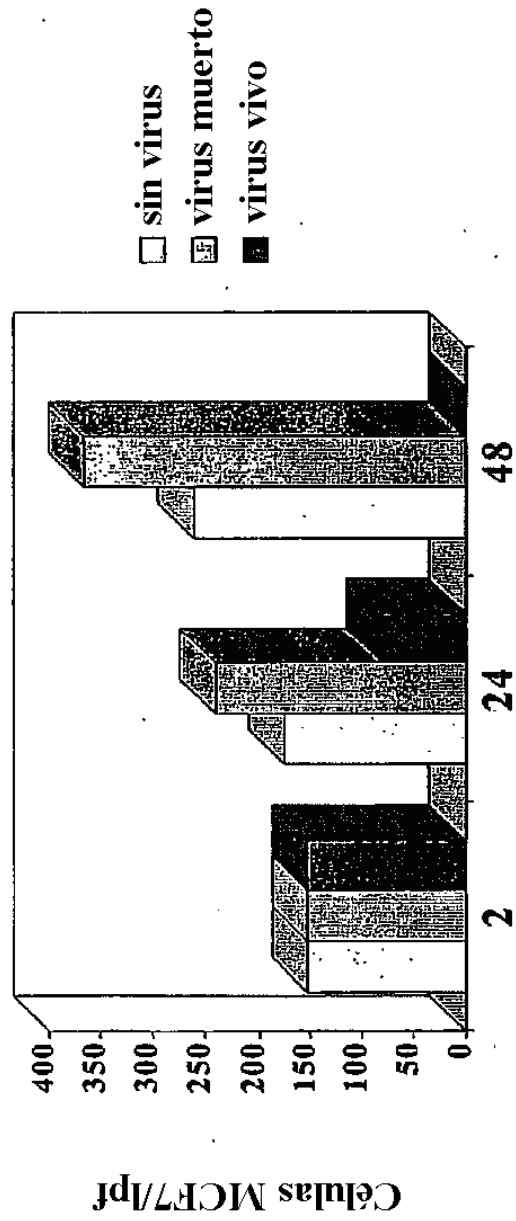
Efecto de reovirus sobre cultivos de células madre a largo plazo



Horas después de la adición de virus

FIGURA 4A

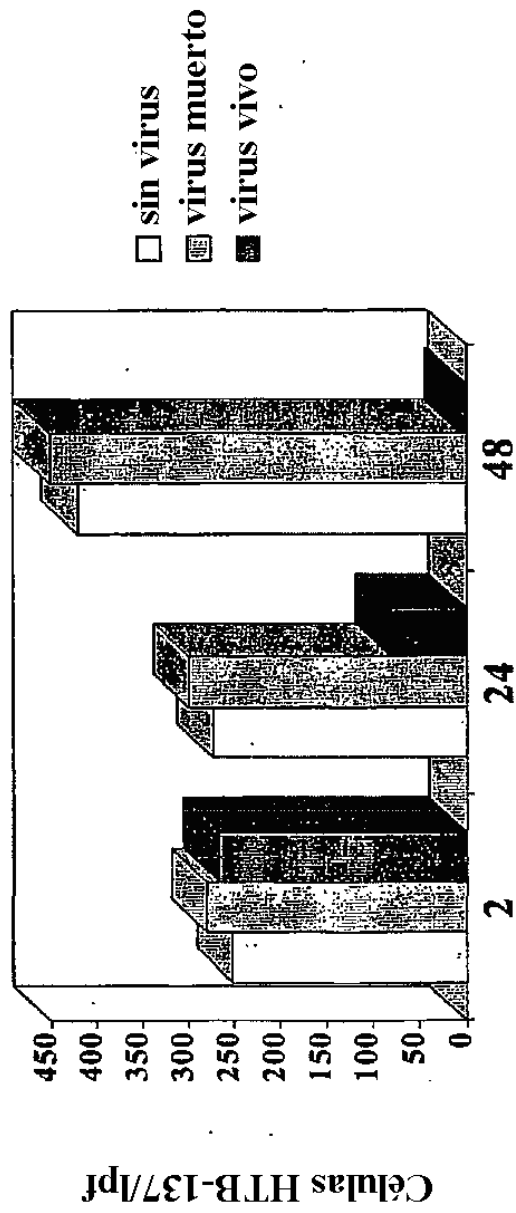
### Producto de aféresis purgante de células MCF-7 contaminantes



Horas después de la infección con virus

FIGURA 4B

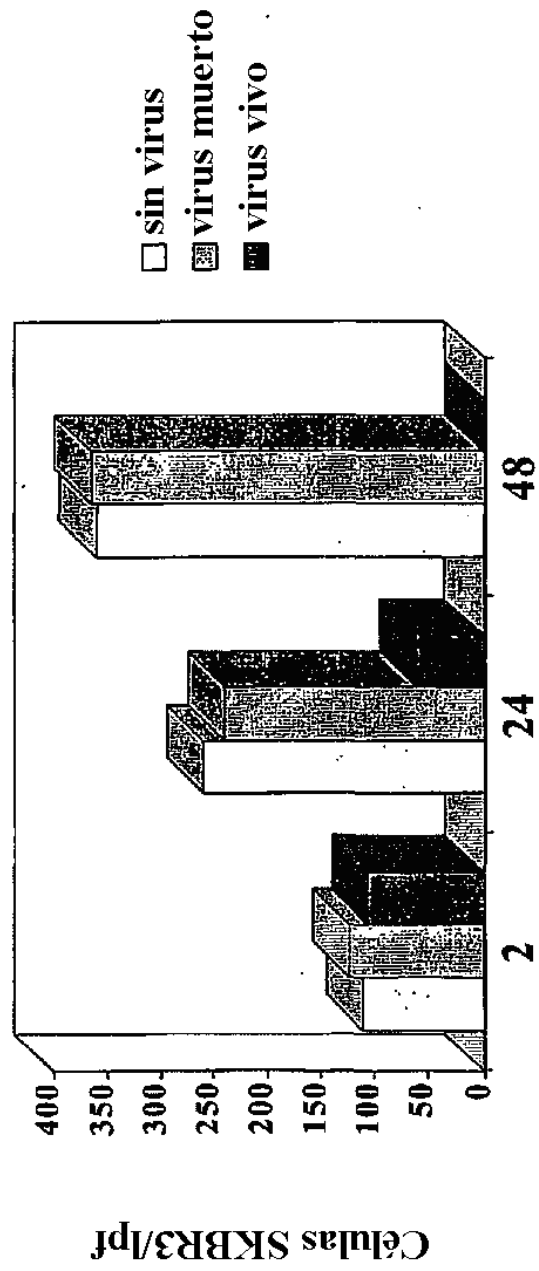
### Producto de aféresis purgante de células HTB-132 contaminantes



Horas después de la infección con virus

FIGURA 4C

### Producto de aféresis purgante de células SKBR3 contaminadas



Horas después de la infección con virus