



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 768**

51 Int. Cl.:
A61K 35/76 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02701122 .0**
96 Fecha de presentación : **19.02.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1361884**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.11.2003**

54 Título: **Sensibilización de células neoplásicas resistentes a agentes quimioterapéuticos con reovirus.**

30 Prioridad: **20.02.2001 US 270363 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2011

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

72 Inventor/es: **Coffey, Matthew, C. y**
Thompson, Bradley, G.

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 367 768 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

Sensibilización de células neoplásicas resistentes a agentes quimioterapéuticos con reovirus

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención hace referencia a un método para aumentar la sensibilidad de las células neoplásicas a agentes quimioterapéuticos usando reovirus, y a un método para tratar trastornos proliferativos con reovirus y agentes quimioterapéuticos.

REFERENCIAS

- Patente de Estados Unidos N° 6.136.307.
- Documento WO 94/18992, publicado el 1 de septiembre de 1994.
- 10 Documento WO 94/25627, publicado el 10 de noviembre de 1994.
- Documento WO 99/18799, publicado el 22 de abril de 1999.
- Andreansky. S.A., et al., "The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors", *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93(21)**: 11313-11318 (1996).
- 15 Bar-Eli, N., et al., "preferential cytotoxic effect of Newcastle disease virus on lymphoma cells", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **122**: 409-415 (1996).
- Bergmann, M., et al., "A genetically engineered influenza A virus with ras-dependent oncolytic properties", *Cancer Res.* **61**: 8188-8193 (2001).
- Bischoff JR. et al., "An Adenovirus Mutant that Replicates Selectively in p53-Deficient Human Tumor", *Science* **274(5286)**: 373-6 (1996).
- 20 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).
- Borst et al., "A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins", *J. Natl. Cancer Inst.* **92(16)**: 1295-1302 (2000).
- 25 Chandron y Nibert, "Protease cleavage of reovirus capsid protein mu1 and mu1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subvirion particle", *J. of Virology* **72(1)**: 467-75 (1998).
- Chang et al., *J. Virol.* **69**: 6605-6608 (1995).
- Chang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:4825-4829 (1992).
- Chang et al., *Virol.* **194**: 537-547 (1993).
- Coffey, M.C., et al., "Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway", *Science* **282**: 1332-1334 (1998).
- 30 DeVita, Jr., "The relationship between tumor mass and resistance to chemotherapy. Implications for surgical adjuvant treatment of cancer", *Cancer* **51**: 1209-1220 (1983).
- Duncan et al., "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein", *Virology* **182(2)**: 810-9 (1991).
- 35 Farassati, F., et al., "Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1", *Nat. Cell Biol.* **3(8)**: 745-750 (2001).
- Fields, B.N. et al., *Fundamental Virology*, 3ª Edición, Lippincott-Raven (1996).
- Fueyo, J., et al., "A Mutant Oncolytic Adenovirus Targeting the Rb Pathway Produces Anti-Glioma Effect *in Vivo*", *Oncogene* **19(1)**: 2-12 (2000).
- 40 Grant et al., "Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs", *Cancer Res.* **54**: 357-361 (1994).
- Heise, C. et al., "Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents", *J. Clin. Invest.* **105(7)**: 847-51 (2000).
- Kawagishi-Kobayashi, M. et al., *Mot. Cell. Biol.* **17**: 4146-4158 (1997).
- Mah et al., "The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virion-anchoring function", *Virology* **179(1)**: 95-103 (1990).
- 45 Nemunaitis, J., *Invest. New Drugs* **17**: 375-386 (1999).
- Pastan y Gottesman, "Multidrug resistance", *Annu. Rev. Med.* **42**: 277-286 (1991).

Reichard, K.W., et al., "Newcastle Disease Virus Selectively Kills Human Tumor Cells", *J. of Surgical Research* **52**: 448-453 (1992).

Romano et al., *Mol. Cell. Bio.* **18(12)**: 7304-7316 (1998).

Sharp et al., *Virology* **250**: 302-315 (1998).

5 Smith, R.E., et al., "Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3", *Virology*, **39**: 791-800 (1969).

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).

10 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).

Turner y Duncan, "Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma1: evidence for a conformation-dependent receptor binding domain", *Virology* **186(1)**: 219-27 (1992).

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).

15 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 INVENCIÓN

20 El cáncer es una de las causas principales de muerte. Aunque ha sido el centro de la investigación médica durante un largo periodo de tiempo, las terapias principales contra el cáncer hasta la fecha siguen siendo la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Cada una de estas terapias está sometida a limitaciones que aún no han sido superadas, por lo que continúa la búsqueda de mejores terapias.

25 Un problema significativo de la quimioterapia es que los tumores pueden desarrollar resistencia a los fármacos. Por ejemplo, un fármaco puede ser muy eficaz cuando se introduce por primera vez en el paciente, eliminando las células tumorales y reduciendo el tamaño del tumor de modo que el paciente vaya en remisión. Sin embargo, el tumor puede volver a crecer después de un periodo de tiempo, y esta vez el mismo fármaco ya no es eficaz para eliminar las células tumorales que han vuelto a crecer. Se cree que este fenómeno de resistencia progresiva al fármaco se debe a una pequeña población de células resistentes al fármaco del tumor que sobrevive al tratamiento inicial con el fármaco mientras que se elimina la mayoría del tumor. Estas células resistentes vuelven a crecer posteriormente para formar un tumor que consta esencialmente sólo de células resistentes al fármaco.

30 Inicialmente se propuso como solución el tratamiento con una combinación de fármacos, dada la baja probabilidad de que se dieran espontáneamente mutaciones que condujeran a dos o más vías de resistencia a fármacos diferentes en la misma célula (DeVita, Jr., 1983). Sin embargo, se ha descubierto que las células que son resistentes a un fármaco a menudo son resistentes a múltiples fármacos, incluyendo fármacos estructuralmente no relacionados que son capaces de eliminar células tumorales por diferentes vías. Por lo tanto, una terapia de combinación de fármacos no resuelve el problema.

35 Aunque los mecanismos no están completamente claros, el mecanismo mejor documentado y clínicamente relevante de la resistencia a múltiples fármacos de las células tumorales está correlacionado con la expresión de la glicoproteína P, el producto del gen MDR1. La glicoproteína P es una bomba de flujo de amplia especificidad localizada en la membrana celular, y funciona disminuyendo la acumulación intracelular de muchos fármacos citotóxicos lipófilos, incluyendo algunos agentes antineoplásicos ampliamente usados tales como antraciclinas, alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, actinomicina D y taxol, volviendo de este modo a las células resistentes a estos fármacos (Pastan et al., 1991).

40 Además de MDR1, se ha descubierto otro transportador de fármacos pleiotrópico (Grant et al., 1994). Esta proteína, denominada proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos (MRP), ha demostrado conferir un patrón de resistencia a fármacos citotóxicos, particularmente fármacos quimioterapéuticos, similar al transportador de la glicoproteína P codificado por el gen MDR1. Posteriormente, se ha descubierto una cantidad creciente de proteínas relacionadas con MRP (Borst et al., 2000). Cada una puede tener una especificidad de fármaco diferente, pero las funciones fisiológicas no son completamente conocidas.

50 Por lo tanto, las causas de la resistencia a fármacos no están completamente comprendidas y sigue existiendo la necesidad de métodos para superar la resistencia a fármacos para tratar los tumores de forma más eficaz.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

55 La presente invención se refiere a un método para sensibilizar células resistentes a fármacos a agentes quimioterapéuticos mediante el uso de reovirus. Los reovirus se han descubierto recientemente como un agente antineoplásico selectivo que elimina células neoplásicas ras-activadas pero no células normales, debido a la replicación selectiva del reovirus en células con una vía ras activada (patente de Estados Unidos N° 6.136.307; Coffey et al., 1998; Strong et al., 1998). Inesperadamente, se descubrió posteriormente en la presente invención que los reovirus aumentaban también la sensibilidad de las células a agentes quimioterapéuticos. Así, un tumor que era refractario al cisplatino se trató con una combinación de cisplatino y reovirus, y los resultados indicaron que la combinación era más eficaz que el reovirus solo. Como el cisplatino no tenía efecto sobre el tumor cuando se administraba en ausencia de reovirus, el efecto de la combinación no era simplemente un resultado aditivo o

sinérgico de los efectos individuales. En su lugar, el reovirus sensibilizaba el tumor a un agente quimioterapéutico al que el tumor era normalmente refractario.

En consecuencia, puede utilizarse, un aspecto de la presente invención para sensibilizar una célula neoplásica, que consta de

- 5 (a) administrar a dicha célula una cantidad eficaz de reovirus; y
 (b) administrar a dicha célula una cantidad eficaz del agente quimioterapéutico.

10 La célula es preferiblemente una célula neoplásica ras-activada. Más preferiblemente, el reovirus se administra en condiciones que provocan la infección de la célula neoplásica por el reovirus. La célula puede ser susceptible al agente quimioterapéutico en ausencia de reovirus, pero preferiblemente debe ser refractaria al agente quimioterapéutico.

Para sensibilizar la célula, el reovirus debe administrarse preferiblemente antes de la administración del agente quimioterapéutico. Como alternativa, en otra realización preferida, el reovirus y el agente quimioterapéutico pueden administrarse de forma concomitante. Tanto el reovirus como el agente quimioterapéutico pueden administrarse individualmente en una única dosis o en dosis múltiples.

15 La célula neoplásica debería estar localizada preferiblemente localizada en un mamífero, particularmente un perro, gato, oveja, cabra, vaca, caballo, cerdo, ser humano o primates no humanos. La célula debería estar mucho más preferiblemente localizada en un ser humano.

20 La presente invención puede usarse para sensibilizar células a cualquier agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos preferidos incluyen 5-fluorouracilo, mitomicina C, metotrexato, hidroxurea, ciclofosfamida, dacarbazina, mitoxantrona, antraciclinas (por ejemplo, epirrubicina y doxorubicina), carboplatino, cisplatino, taxol, taxotere, tamoxifeno, anti-estrógenos, e interferones. Más preferiblemente, el agente quimioterapéutico es un platino o taxol. El agente quimioterapéutico más preferido es cisplatino.

25 El reovirus puede ser cualquier reovirus, incluyendo reovirus de mamíferos y aves. Preferiblemente, el reovirus debe ser un virus de mamíferos, particularmente un reovirus de seres humanos. El reovirus de seres humanos deberían ser preferiblemente un reovirus de serotipo 3 y mucho más preferiblemente una cepa Dearing del reovirus de serotipo 3.

La presente invención también puede usarse para tratar a un sujeto con un trastorno proliferativo, con células neoplásicas refractarias a un agente quimioterapéutico, que consta de:

- 30 (a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de reovirus en condiciones que provocan la infección de las células neoplásicas por el reovirus; y
 (b) administrar una cantidad eficaz del agente quimioterapéutico a dicho sujeto.

35 El reovirus puede administrarse en cualquier momento con respecto al agente quimioterapéutico. Preferiblemente, el reovirus se administra antes de o de forma concomitante con la administración del agente quimioterapéutico. Preferiblemente, el reovirus se administra en dosis múltiples. El agente quimioterapéutico también puede administrarse en dosis múltiples. Se contempla que el reovirus puede administrarse en dosis múltiples antes de cualquier administración del agente quimioterapéutico.

El sujeto debería ser preferiblemente un mamífero, particularmente un perro, gato, oveja, cabra, vaca, caballo, cerdo, ser humano o primates no humanos, y más preferiblemente un ser humano.

40 El trastorno proliferativo puede ser un tumor sólido, particularmente cáncer pulmonar, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer suprarrenal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de mama y cáncer del sistema nervioso central y periférico. Para tratar el tumor sólido, el reovirus puede administrarse, por ejemplo, por inyección en o cerca del tumor sólido o por administración sistémica.

El trastorno proliferativo puede, como alternativa, ser un tumor hematopoyético, particularmente linfomas y leucemias.

45 El trastorno proliferativo puede ser un tumor primario o un tumor metastásico.

La invención también puede usarse para evitar que una neoplasia en un sujeto desarrolle resistencia a fármacos contra un agente quimioterapéutico, que comprende:

- 50 (a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de reovirus en condiciones que provocan la infección de la neoplasia por el reovirus; y
 (b) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico.

55 El reovirus puede administrarse en cualquier momento con respecto al agente quimioterapéutico. Preferiblemente, el reovirus se administra antes de o de forma concurrente con la administración del agente quimioterapéutico. Preferiblemente, el reovirus se administra en dosis múltiples. El agente quimioterapéutico también puede administrarse en dosis múltiples. Se contempla que el reovirus puede administrarse en dosis múltiples antes de cualquier administración del agente quimioterapéutico.

El sujeto debería ser preferiblemente un mamífero, particularmente un perro, gato, oveja, cabra, vaca, caballo, cerdo, ser humano o primates no humanos, y más preferiblemente un ser humano.

Preferiblemente, la administración del reovirus evita que la neoplasia desarrolle resistencia a fármacos contra múltiples fármacos, incluyendo fármacos estructuralmente no relacionados. Por consiguiente, una realización preferida de la presente invención proporciona que se evite que una neoplasia en un sujeto desarrolle resistencia a fármacos contra un agente quimioterapéutico donde se evita también la resistencia a fármacos contra un segundo agente quimioterapéutico, comprendiendo el método:

(a) administrar al sujeto una cantidad eficaz de reovirus en condiciones que provocan la infección del neoplasia por el reovirus; y

(b) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS GRÁFICOS

La Figura 1 muestra los efectos del reovirus y cisplatino sobre el crecimiento tumoral. Se administró a animales con tumores singénicos tratamiento simulado (Serie 1), cisplatino solo (Serie 2), reovirus solo (Serie 3) o la combinación de cisplatino y reovirus (Serie 4). Los resultados indican que los tumores eran refractarios al cisplatino. Sin embargo, en presencia de reovirus, los tumores llegaban a ser sensibles al cisplatino.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para sensibilizar las células resistentes a fármacos a agentes quimioterapéuticos mediante el uso de reovirus. Recientemente se ha descubierto al reovirus como un agente antineoplásico selectivo que elimina las células neoplásicas ras-activadas pero no células normales, debido a la replicación selectiva del reovirus en células con una vía ras activada (patente de Estados Unidos N° 6.136.307; Coffey et al., 1998; Strong et al., 1998). Inesperadamente, se descubrió adicionalmente en la presente invención que el reovirus aumentaba también la sensibilidad de las células a agentes quimioterapéuticos. La presente invención, por tanto, proporciona un método para potenciar tanto la eficacia como la selectividad de la quimioterapia contra el cáncer. También puede usarse para evitar el desarrollo de resistencia progresiva a los fármacos.

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

Definiciones

"Sensibilizar" una célula neoplásica a un agente quimioterapéutico, como se usa en este documento, se refiere al acto de potenciar la sensibilidad de una célula neoplásica a un agente quimioterapéutico.

La "sensibilidad" de una célula neoplásica a un agente quimioterapéutico es la susceptibilidad de la célula neoplásica al efecto inhibitorio del agente quimioterapéutico. Por ejemplo, la sensibilidad de una célula neoplásica a un agente quimioterapéutico está indicada por la reducción en la tasa de crecimiento de la célula en respuesta al agente quimioterapéutico. La sensibilidad también puede demostrarse por una reducción de los síntomas causados por las células neoplásicas.

Una célula neoplásica que es "refractaria" a un agente quimioterapéutico es una célula neoplásica no eliminada o no inhibida en su crecimiento por el agente quimioterapéutico. Para determinar si una célula neoplásica tiene el crecimiento inhibido, puede determinarse la tasa de crecimiento de la célula en presencia o ausencia del agente quimioterapéutico por métodos establecidos en la técnica. La célula neoplásica no tiene el crecimiento inhibido por el agente quimioterapéutico si la tasa de crecimiento no es significativamente diferente con o sin el agente quimioterapéutico.

Un tumor que es "refractario" a un agente quimioterapéutico es un tumor cuya tasa de aumento de tamaño o de peso no cambia en presencia del agente quimioterapéutico. Alternativamente, si el sujeto que alberga el tumor presenta síntomas o indicadores similares del tumor aunque el sujeto reciba el agente quimioterapéutico o no, el tumor es refractario al agente quimioterapéutico. Por ejemplo, habitualmente se usa el recuento de leucocitos como un indicador de leucemia. Si el recuento de leucocitos de un paciente con leucemia no cambia significativamente después de recibir un fármaco quimioterapéutico, la leucemia de este paciente es refractaria al fármaco quimioterapéutico.

Una "célula neoplásica", también conocida como una "célula con un trastorno proliferativo", hace referencia a una célula que prolifera a una tasa anormalmente alta. Un crecimiento nuevo que comprende células neoplásicas es una neoplasia, también conocida como tumor. Una neoplasia es un crecimiento tisular anormal, que generalmente forma una masa definida, que crece por proliferación celular de forma más rápida que el crecimiento tisular normal. Una neoplasia puede mostrar ausencia parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. En este documento, se pretende que una neoplasia abarque tanto tumores hematopoyéticos como tumores sólidos.

Una neoplasia puede ser benigna (tumor benigno) o maligna (tumor maligno o cáncer). Los tumores malignos pueden clasificarse ampliamente en tres tipos principales. Las neoplasias malignas que surgen de estructuras epiteliales se llaman carcinomas, las neoplasias malignas 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 relacionadas con la formación de células sanguíneas) incluyendo componentes del sistema inmune, se llaman leucemias y linfomas. Otras neoplasias incluyen, aunque sin limitación, las neurofibromatosis.

Un "trastorno proliferativo" es una enfermedad o afección causada por células que crecen más rápidamente que las células normales, es decir, células neoplásicas. Los trastornos proliferativos incluyen tumores benignos y tumores malignos. Cuando se clasifican según la estructura del tumor, los trastornos proliferativos incluyen tumores sólidos y tumores hematopoyéticos.

- 5 Las "células neoplásicas ras-activadas" o "células neoplásicas mediadas por ras" se refieren a células que proliferan a una tasa 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 elevada estabilidad del mensaje del gen ras, o cualquier mutación o mecanismo que conduzca a la activación de ras o un factor o factores situados corriente abajo o corriente arriba de ras en la vía ras, aumentando de este modo la actividad de la vía ras.
- 10 Por ejemplo, la activación del receptor de EGF, el receptor de PDGF o sus socios provoca la activación de la vía ras. Las células neoplásicas mediadas por ras incluyen, aunque sin limitación, células cancerosas mediadas por ras, que son células que proliferan de un modo maligno debido a la activación de la vía ras.

"Infección por reovirus" se refiere a la entrada y replicación del reovirus en una célula. Asimismo, "infección de una neoplasia por reovirus" se refiere a la entrada y replicación del reovirus en las células de una neoplasia.

- 15 Un "agente quimioterapéutico" o "fármaco quimioterapéutico" es cualquier compuesto químico usado en el tratamiento de un trastorno proliferativo. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, sin limitación, las siguientes clases de agentes:

- mostazas nitrogenadas, por ejemplo, ciclofosfamida, trofosfamida, ifosfamida y clorambucil;
- nitrosoureas, por ejemplo, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (metil CCNU) y nimustina (ACNU);
- etileniminas y metilmelaminas, por ejemplo, tiotepa;
- análogos de ácido fólico, por ejemplo, metotrexato;
- análogos de pirimidina, por ejemplo, 5-fluorouracilo y citarabina;
- análogos de purina, por ejemplo, mercaptopurina y azatioprina;
- 25 - alcaloides de la vinca, por ejemplo, vinblastina, vincristina y vindesina;
- epipodofilotoxinas, por ejemplo, etopósido y tenipósido;
- antibióticos, por ejemplo, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, bleomicina a2, mitomicina c y mitoxantrona;
- estrógenos, por ejemplo, dietil estilbestrol;
- 30 - análogos de la hormona liberadora de gonadotropina, por ejemplo, leuprolida, buserelina y goserelina;
- antiestrógenos, por ejemplo, tamoxifeno y aminoglutetimida;
- andrógenos, por ejemplo, testolactona y drostanolonpropionato;
- platínatos, por ejemplo, cisplatino y carboplatino; y
- interferones, incluyendo interferón-alfa, beta y gamma.

- 35 Los agentes quimioterapéuticos de la presente invención son preferiblemente compuestos químicos pequeños. Por tanto, el agente quimioterapéutico tiene un peso molecular preferiblemente de menos de aproximadamente 5.000, más preferiblemente de menos de aproximadamente 3.000, aún más preferiblemente de menos de aproximadamente 2.000, y mucho más preferiblemente de menos de aproximadamente 1.000.

- 40 Un "platinato" es un agente quimioterapéutico que contiene platino como átomo central. Los ejemplos de platínatos incluyen cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, ormaplatino, iroplatino, enloplatino, nedaplatino, ZD0473 (cis-aminadicloro(2-metilpiridina)-platino (II)), BBR3464 y similares.

- 45 "Reovirus" se refiere a cualquier virus clasificado en el género reovirus, sea de origen natural, modificado o recombinante. Los reovirus son virus con un genoma de ARN segmentado bicatenario. Los viriones miden 60-80 nm de diámetro y tienen dos envueltas de cápside concéntricas, cada una de las cuales es icosaédrica. El genoma consta de ARN bicatenario en 10-12 segmentos concretos con un tamaño de genoma total de 16-27 kbp. Los segmentos de ARN individuales varían en tamaño.

Se han recuperado tres tipos distintos pero relacionados de reovirus de muchas especies. Los tres tipos comparten un antígeno de fijación al complemento común.

- 50 El reovirus de seres humanos consta de tres serotipos: tipo 1 (cepa Lang o T1L), tipo 2 (cepa Jones, T2J) y tipo 3 (cepa Dearing o cepa Abney, T3D). Los tres serotipos son fácilmente identificables en base a ensayos de neutralización e inhibición de hemaglutinina (véase, por ejemplo, Fields, B.N. *et al.*, 1996).

El reovirus puede ser de origen natural o puede estar modificado. El reovirus es de origen natural cuando puede aislarse de una fuente de la naturaleza y no se ha modificado de forma intencionada por el ser humano en el

laboratorio. Por ejemplo, el reovirus puede ser de una "fuente de campo", es decir, de un ser humano que se ha infectado con el reovirus.

5 El reovirus puede modificarse pero ser aún capaz de infectar de forma lítica a una célula de mamífero que tenga una vía ras activa. El reovirus puede pretratarse química o bioquímicamente (por ejemplo, por tratamiento con una proteasa, tal como quimotripsina o tripsina) antes de la administración a las células en proliferación. El pretratamiento con una proteasa elimina la cubierta o cápside externa del virus y puede aumentar la infectividad del virus. El reovirus puede estar recubierto por un liposoma o micela (Chandron y Nibert, 1998). Por ejemplo, el virión puede tratarse con quimotripsina en presencia de concentraciones formadoras de micelas de detergentes de sulfato de alquilo para generar una nueva partícula de subvirión infeccioso.

10 El reovirus puede ser un reovirus recombinante (es decir recombinado) de dos o más tipos de reovirus con diferentes fenotipos patogénicos de modo que contenga diferentes determinantes antigénicos, reduciendo o evitando de este modo una respuesta inmune por un mamífero previamente expuesto a un subtipo de reovirus. Dichos viriones recombinantes pueden generarse por co-infección de células de mamífero con diferentes subtipos de reovirus con la recombinación e incorporación resultante de proteínas de recubrimiento de diferente subtipo en las cápsides de virión resultantes.

15 El reovirus puede modificarse por incorporación de proteínas de cubierta mutadas tales como, por ejemplo, $\sigma 1$, en la cápside externa del virión. Las proteínas pueden mutarse por sustitución, inserción o delección. La sustitución incluye la inserción de diferentes aminoácidos en lugar de los aminoácidos nativos. Las inserciones incluyen la inserción de restos aminoácídicos adicionales en la proteína en una o más localizaciones. Las delecciones incluyen delecciones de uno o más restos aminoácídicos en la proteína. Dichas mutaciones pueden generarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio de oligonucleótidos del gen que codifica una de las proteínas de recubrimiento podrá provocar la generación de la proteína de recubrimiento mutante deseada. La expresión de la proteína mutada en células de mamífero infectadas con reovirus *in vitro* tales como células COS1 provocará la incorporación de la proteína mutada en la partícula de virión del reovirus (Turner y Duncan, 1992; Duncan et al., 20 1991; Mah et al., 1990).

25 El reovirus debe ser preferiblemente un reovirus modificado para reducir o eliminar una reacción inmune contra el reovirus. Dichos reovirus modificados se llaman "reovirus inmunoprottegidos". Dichas modificaciones podrían incluir el empaquetado del reovirus en un liposoma, una micela u otro vehículo para ocultar al reovirus del sistema inmune de los mamíferos. Como alternativa, puede eliminarse la cápside externa de la partícula de virión del reovirus, ya que las proteínas presentes en la cápside externa son el determinante principal de las respuestas humorales y celulares del huésped.

30 La "administración de reovirus" a un sujeto se refiere al acto de administrar reovirus a un sujeto de un modo que contacte con las células neoplásicas diana. La vía por la cual se administra el reovirus, así como la formulación, el medio o vehículo, dependerán de la localización así como del tipo de las células diana. Puede emplearse una amplia diversidad de vías de administración, que se analizan con más detalle a continuación.

35 "Tratar un trastorno proliferativo" significa aliviar o eliminar los síntomas de un trastorno proliferativo, o ralentizar el progreso de un trastorno proliferativo.

Un "tumor metastásico" es un tumor que se metastatizado a partir de un tumor localizado en otro sitio del mismo animal.

40 Una "cantidad eficaz" es una cantidad de un agente quimioterapéutico o reovirus que es suficiente para provocar el efecto deseado. Para un agente quimioterapéutico usado para tratar una enfermedad, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para aliviar o eliminar los síntomas de la enfermedad, o ralentizar el progreso de la enfermedad. Para que un reovirus sensibilice un tumor a un agente quimioterapéutico, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para aumentar la sensibilidad del tumor al agente quimioterapéutico.

45 "Resistencia progresiva al fármaco" hace referencia al fenómeno en el que una neoplasia es inicialmente susceptible a un agente quimioterapéutico, pero la eficacia del agente para inhibir el crecimiento neoplásico o reducir los síntomas de la enfermedad disminuye con el tiempo.

Métodos

50 Los reovirus son un agente terapéutico eficaz contra neoplasias activadas por ras porque se replican selectivamente en células con una vía ras activada (patente de Estados Unidos N° 6.136.307). La vía ras no está activada en células normales, por lo tanto el reovirus elimina las células neoplásicas con una alta selectividad. Sin limitarse a una teoría, se cree que la transcripción de los genes virales en células normales está correlacionada con la fosforilación de una proteína celular de aproximadamente 65 kDa, que se ha determinado que es la proteína quinasa activada por ARN bicatenario (PKR), que no se ha observado en células activadas por ras. La fosforilación de PKR conduce a la inhibición de la traducción, por lo tanto no puede completarse la replicación viral. Sin embargo en células activadas por ras, ras o sus factores corriente abajo bloquean la fosforilación de PKR, permitiendo de este modo que proceda la traducción y replicación viral.

60 En la presente invención, se trataron tumores con una combinación de reovirus y agentes quimioterapéuticos. Inesperadamente, se descubrió que el reovirus era capaz de sensibilizar células neoplásicas a agentes quimioterapéuticos, mientras que los agentes quimioterapéuticos no tenían efectos sobre las células cuando se administraban solos. Como se muestra en la Figura 1, los tumores derivados de C3H10T1/2 eran refractarios al cisplatino. Estos tumores crecían de forma agresiva en presencia de cisplatino a una tasa de crecimiento que era esencialmente igual que la de tumores no tratados. Por el contrario, los tumores tratados con reovirus y con cisplatino dejaban de crecer casi por completo. El efecto inhibitor de la combinación (reovirus más cisplatino) era

mucho mayor que el reovirus solo, lo que indica que el cisplatino contribuía a eliminar las células tumorales. Por lo tanto, aunque las células son refractarias al cisplatino, el tratamiento con reovirus aumentaba la sensibilidad de las células tumorales al fármaco.

5 Sin limitarse a una teoría, se cree que el reovirus sensibiliza las células tumorales a agentes quimioterapéuticos potenciando la acumulación de los agentes en las células tumorales, o induciendo la apoptosis. Se sabe que el reovirus inhibe la síntesis de proteínas de la célula huésped en favor de la traducción de sus propias proteínas. Por lo tanto, la infección con reovirus puede inhibir la síntesis de proteínas transportadoras de fármacos, tales como MDR1 o las MRP, y posibilita que los fármacos se acumulen en la célula. Como las proteínas transportadoras de fármacos son responsables de transportar diversos fármacos fuera de la célula, incluyendo fármacos estructuralmente no relacionados, la inhibición de la síntesis de dichas proteínas transportadoras conduciría a la sensibilización de la célula a una diversidad de fármacos. Como alternativa, se sabe que los reovirus inducen la apoptosis de las células infectadas, que puede volver a las células más susceptibles a un estrés adicional.

10 La presente invención, por tanto, proporciona un método valioso para aumentar tanto la eficacia como la selectividad de la quimioterapia. La selectividad ha sido un problema principal de la quimioterapia, porque los agentes quimioterapéuticos generalmente inhiben el crecimiento tanto de las células normales como de las células neoplásicas. Los agentes quimioterapéuticos presentan selectividad limitada pero, como las células neoplásicas crecen más rápido que la mayoría de las células normales, se inhibe su crecimiento en un grado mayor. No obstante, las células normales de crecimiento rápido, tales como las células de médula ósea, tienden a dañarse gravemente por los fármacos quimioterapéuticos, con los consiguientes efectos secundarios significativos. En contraste, los reovirus son altamente selectivos para las células neoplásicas y sensibilizan las células neoplásicas solamente. Por tanto, los reovirus potencian la acumulación de los fármacos quimioterapéuticos solamente en las células neoplásicas, aumentando de este modo tanto la eficacia como la selectividad de los agentes quimioterapéuticos.

15 En la presente invención, es preferible que el reovirus aumente la sensibilidad de células o animales al fármaco en al menos aproximadamente el 20% en comparación con el efecto del fármaco en ausencia de reovirus. El aumento en la sensibilidad es más preferiblemente de al menos aproximadamente el 40%, aún más preferiblemente de al menos aproximadamente el 70%, e incluso más preferiblemente de al menos aproximadamente el 100%. En la realización más preferida, como en el Ejemplo 1, el reovirus es útil para sensibilizar una célula que es refractaria al fármaco en ausencia de reovirus, y el efecto de sensibilización no puede expresarse numéricamente.

20 La sensibilidad de una célula a un fármaco puede observarse o medirse de acuerdo con métodos establecidos en la técnica, que pueden variar con la naturaleza de la enfermedad. Por ejemplo, la sensibilidad de una célula neoplásica a un fármaco puede determinarse por el tamaño del tumor o la tasa de crecimiento de la célula neoplásica (en este caso, véase el Ejemplo 1). La sensibilidad también puede observarse en forma de una reducción de los síntomas o indicadores relacionados con la enfermedad, tales como el recuento de células sanguíneas en pacientes con leucemia o la función hepática en pacientes con tumores hepáticos.

25 La presente invención puede usarse para aumentar la sensibilidad de las células neoplásicas a cualquier agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos preferidos incluyen 5-fluorouracilo, mitomicina C, metotrexato, hidroxurea, ciclofosfamida, dacarbazina, mitoxantrona, antraciclinas (por ejemplo, epirrubina y doxorubicina), carboplatino, cisplatino, taxol, taxotere, tamoxifeno, anti-estrógenos, e interferones. Aunque siguen desarrollándose nuevos agentes quimioterapéuticos, se espera que también exista resistencia a los nuevos fármacos del mismo modo que se produce resistencia a los agentes conocidos. Por consiguiente, se espera que los reovirus sensibilicen las células neoplásicas a los nuevos agentes quimioterapéuticos, o eviten que la neoplasia desarrolle resistencia a los nuevos agentes. Un especialista en la técnica será capaz de determinar si el presente método se podrá aplicar a los nuevos agentes de acuerdo con los métodos descritos en este documento.

30 Los reovirus se administran de un modo que los ponga en contacto con las células neoplásicas diana. La vía por la cual ha que administrarse el reovirus, así como la formulación, el medio o vehículo, dependerán de la localización así como del tipo de células diana. Puede emplearse una amplia diversidad de vías de administración. Por ejemplo, para una neoplasia sólida accesible, el reovirus puede administrarse por inyección directamente en la neoplasia. En neoplasias hematopoyéticas, por ejemplo, el reovirus puede administrarse por vía intravenosa o intravascular. Para neoplasias que no son fácilmente accesibles dentro del cuerpo, tales como metástasis, el reovirus se administra de tal modo que pueda transportarse sistémicamente a través del cuerpo del mamífero y alcanzar de este modo la neoplasia (por ejemplo, por vía intravenosa o intramuscular). Como alternativa, los reovirus pueden administrarse directamente a una única neoplasia sólida, desde donde después se transporta por vía sistémica a través del cuerpo hasta las metástasis. Los reovirus también pueden administrarse por vía subcutánea, intraperitoneal, intratecal (por ejemplo, para tumores cerebrales), tópica (por ejemplo, para melanoma), oral (por ejemplo, para neoplasias orales o esofágicas), rectal (por ejemplo, para neoplasia colorrectal), vaginal (por ejemplo, para neoplasia cervical o vaginal), nasal o por inhalación (por ejemplo, para neoplasias pulmonares).

35 El reovirus o el agente quimioterapéutico puede administrarse en una única dosis, o en dosis múltiples (es decir, más de una dosis). Las dosis múltiples pueden administrarse de forma concomitante en diferentes sitios o por diferentes vías, o de forma consecutiva (por ejemplo, durante un periodo de días o semanas). El reovirus se administra preferiblemente antes de o de forma concomitante con la administración del agente quimioterapéutico.

40 El reovirus se formula preferiblemente en forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosificación de aproximadamente 10^2 pfu a aproximadamente 10^{13} pfu de reovirus. La expresión "formas de dosificación unitaria" hace referencia a unidades físicamente distintas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de reovirus calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

Se contempla que la presente invención pueda combinarse con otras terapias contra los tumores tales como radioterapia o cirugía.

5 Además, la presente invención proporciona un método para evitar que una neoplasia desarrolle resistencia a fármacos. La resistencia progresiva a los fármacos se desarrolla tratando una neoplasia con un fármaco que elimina las células sensibles al fármaco dentro de la neoplasia, seleccionando de este modo las células resistentes al fármaco. Después de la expansión de las células resistentes al fármaco, la neoplasia manifiesta el fenotipo de resistencia al fármaco. Por consiguiente, el reovirus puede usarse para sensibilizar la neoplasia al inicio del curso de quimioterapia de modo que se eliminen o inhiban todas las células, incluyendo las células resistentes al fármaco. Por lo tanto, la neoplasia tratada de este modo no tendría oportunidad de desarrollar resistencia al fármaco.

10 Una célula que es resistente a un fármaco a menudo es resistente a otro fármaco debido al fenómeno de resistencia a múltiples fármacos. Por lo tanto, el reovirus se administra preferiblemente a neoplasias que no se han tratado con ningún agente quimioterapéutico, para evitar el desarrollo de resistencia a fármacos. No obstante, una vez se ha desarrollado la resistencia a fármacos, el reovirus aún puede usarse para sensibilizar las células resistentes a fármacos y aumentar la eficacia y selectividad de la quimioterapia, así como para eliminar directamente las células neoplásicas por oncólisis.

15 Como se ha indicado anteriormente, creemos que el reovirus sensibiliza las células neoplásicas a agentes quimioterapéuticos inhibiendo la síntesis proteica de la célula huésped o induciendo la apoptosis.

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

20 EJEMPLOS

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

	°C	=	grado Celsius
25	h	=	hora
	min	=	minuto
	μM	=	micromolar
	mM	=	milimolar
	M	=	molar
30	ml	=	mililitro
	μl	=	microlitro
	mg	=	miligramo
	μg	=	microgramo
	PAGE	=	electroforesis en gel de poliacrilamida
35	rpm	=	revoluciones por minuto
	FBS	=	suero bovino fetal
	DTT	=	ditiotreitól
	SDS	=	dodecil sulfato sódico
	PBS	=	solución salina tamponada con fosfato
40	DMEM	=	medio de Eagle modificado por Dulbecco
	α-MEM	=	medio de Eagle modificado α
	β-ME	=	β-mercaptoetanol
	MOI	=	multiplicidad de infección
	PFU o pfu	=	unidades formadoras de placas
45	PKR	=	proteína quinasa activada por ARN bicatenario
	EGF	=	factor de crecimiento epidérmico

- PDGF = factor de crecimiento derivado de plaquetas
- DMSO = dimetilsulfóxido
- MDR = resistencia a múltiples fármacos
- MRP = proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos
- 5 HSV = virus del herpes simple

EJEMPLO 1 Sensibilización de células tumorales refractarias a cisplatino por reovirus

10 A ratones C3H (Charles River) se les implantó por vía subcutánea $1,0 \times 10^6$ PFU de células C3H transformadas por ras (un presente de D. Edwards, Universidad de Calgary) y se dejó que desarrollaran tumores. La cepa Dearing de reovirus del serotipo 3 usada en estos estudios se propagó en cultivos de suspensión células L y se purificó de acuerdo con Smith (Smith *et al.*, 1969), con la excepción de que se omitió el β -mercaptoetanol (β -ME) del tampón de extracción. La proporción partícula/PFU para reovirus purificado fue típicamente 100/1.

Los ratones que albergaban tumores se trataron con 4 regímenes diferentes que se describen a continuación:

15

Nº serie	Reovirus	Fármaco
1	control	control
2	control	cisplatino
3	reovirus	control
4	reovirus	cisplatino

20

25 En los animales que recibieron reovirus (Series 3-4), se inyectaron por vía intravenosa 5×10^8 PFU de reovirus (en 20 μ l de solución salina) a través de la vena de la cola de los animales en los días 0, 6, 12, y 18. A los animales que no recibieron reovirus (Series 1-2) se les inyectó 20 μ l de solución salina en una forma similar y en el mismo periodo de tiempo. El cisplatino se inyectó en la vena de la cola en los días 10, 16 y 22 a una dosis de 2,5 mg por kilogramo de peso corporal. Los tumores se midieron diariamente desde el día 0 para evaluar la tasa de crecimiento de los tumores.

30 Los tumores eran refractarios al cisplatino. Como se muestra en la Figura 1, los tumores tratados con cisplatino solo (Serie 2) progresaron de forma casi indistinguible de los tumores de control (Serie 1), lo que indica que el cisplatino esencialmente no tenía efectos inhibidores sobre la tasa de crecimiento de los tumores. En contraste, la combinación de cisplatino y reovirus (Serie 4) redujo significativamente el crecimiento tumoral. El nivel de inhibición por la combinación fue mucho más profundo que con el reovirus solo (Serie 3). Por lo tanto, el cisplatino contribuyó a la supresión tumoral cuando se usó junto con el reovirus.

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de una cantidad eficaz de un reovirus y una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico para la preparación de una composición farmacéutica para sensibilizar una célula neoplásica refractaria a dicho agente quimioterapéutico.
- 10 2. El uso de una cantidad eficaz de un reovirus y una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico para la preparación de una composición farmacéutica para tratar a un sujeto portador de un trastorno proliferativo, donde dicho sujeto tiene células neoplásicas que son refractarias a dicho agente quimioterapéutico, por lo cual la composición farmacéutica tiene que administrarse en condiciones que provoquen la infección de las células neoplásicas por el reovirus.
- 15 3. El uso de la reivindicación 2, en el que el trastorno proliferativo es un tumor sólido, un tumor hematopoyético o un tumor metastásico.
4. El uso de la reivindicación 3, en el que el tumor sólido se selecciona entre el grupo compuesto por cáncer pulmonar, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer suprarrenal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de mama y cáncer del sistema nervioso central y periférico.
- 20 5. El uso de la reivindicación 3 ó 4, en el que el reovirus tiene que administrarse en o cerca del tumor sólido.
6. El uso de la reivindicación 2, en el que el reovirus tiene que administrarse por vía sistémica.
- 25 7. El uso de la reivindicación 3, en el que el tumor hematopoyético se selecciona del grupo compuesto por linfomas y leucemias.
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el reovirus tiene que administrarse antes de la administración del agente quimioterapéutico o de forma concurrente con el agente quimioterapéutico.
- 30 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la célula neoplásica está localizada en un mamífero, o el sujeto es un mamífero.
- 35 10. El uso de la reivindicación 9, en el que el mamífero se selecciona entre el grupo compuesto por perros, gatos, ovejas, cabras, vacas, caballos, cerdos, seres humanos y primates no humanos.
- 40 11. El uso de cualquiera de una de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el agente quimioterapéutico se selecciona entre el grupo compuesto por 5-fluorouracilo, mitomicina C, metotrexato, hidroxiurea, ciclofosfamida, dacarbazina, mitoxantrona, antraciclinas, carboplatino, cisplatino, taxol, taxotere, tamoxifeno, anti-estrógenos, e interferones.
- 45 12. El uso de la reivindicación 11, en el que el agente quimioterapéutico es cisplatino.
13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el reovirus es un reovirus de mamíferos.
- 50 14. El uso de la reivindicación 13, en el que el reovirus de mamíferos es un reovirus humano.
15. El uso de la reivindicación 14, en el que el reovirus de seres humanos es un reovirus de serotipo 3.
16. El uso de la reivindicación 15, en el que el reovirus de serotipo 3 es un reovirus de la cepa Dearing.

17. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el reovirus es un reovirus recombinante.

18. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que el reovirus tiene que administrarse en dosis múltiples.

5

19. El uso de la reivindicación 18, en el que el reovirus tiene que administrarse en múltiples dosis antes de la administración del agente quimioterapéutico.

Figura 1. Efectos de Reovirus y Cisplatino sobre el Crecimiento Tumoral

