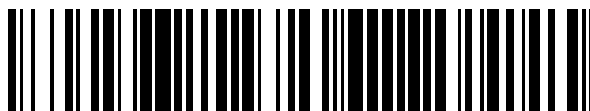


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 597**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2006.01)

A61K 31/4188 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08867912 .1**

96 Fecha de presentación: **23.12.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2227240**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.09.2010**

54 Título: **TERAPIA PARA EL CANCER CON PARVOVIRUS Y COMBINACIÓN CON QUIMIOTERAPIA.**

30 Prioridad:
28.12.2007 EP 07025216

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
18.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
18.11.2011

73 Titular/es:
**DKFZ DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
STIFTUNG DES OFFENTLICHEN RECHTS IM NEUENHEIMER
FELD 280
69120 HEIDELBERG, DE y
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG**

72 Inventor/es:
**ROMMELAERE, Jean; RAYKOV, Zahari;
SCHLEHOFER, Jörg; KIPRIJANOVA, Irina;
HEIMBERGER, Tanja; ANGELOVA, Assia;
GELETNEKY, Karsten y APRAHAMIAN, Marc**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 368 597 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

Terapia para el cáncer con parvovirus y combinación con quimioterapia

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende (a) un parvovirus y (b) un agente quimioterapéutico y al uso de dicha composición para el tratamiento del cáncer, por ejemplo un tumor cerebral o cáncer de páncreas.

El adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) es una de las neoplasias malignas gastrointestinales más letales. El ACDP es la cuarta causa más frecuente de muertes relacionadas con cáncer en Norteamérica, la sexta en Europa y la quinta en el Reino Unido. [1, 2] La enfermedad es muy resistente a los tratamientos disponibles en la actualidad. La resección quirúrgica proporciona la mejor posibilidad de supervivencia a largo plazo, pero únicamente es viable en una minoría de pacientes y no está exenta de riesgo. [3] En la enfermedad avanzada, cuando la cirugía no es una opción, la quimioterapia entra en juego usando, en concreto, gemcitabina o 5-FU (5-fluorouracilo), aunque los efectos todavía son modestos y siempre se acompañan de una toxicidad general alta. [4] La gemcitabina ha sido aprobada por la FDA como terapia de primera línea para pacientes con cáncer de páncreas metastásico o localmente avanzado. Este fármaco es un análogo de la desoxicitidina dependiente del ciclo celular de la clase de los antimetabolitos que es transportado al interior de las células por transportadores nucleosídicos equilibradores humanos (hENT) y se fosforila en su forma trifosfato activa por acción de la desoxicitidina quinasa (dCK). Un motivo de preocupación importante con la terapia de gemcitabina reside en el desarrollo de resistencia a este quimioterapéutico. Esta resistencia se puede deber a la menor importación/fosforilación del fármaco y/o a la mayor exportación desde la célula a través de los miembros de la familia de transportadores ABC, MDR y MRP1/2, lo que tiene como resultado la depleción del conjunto intracelular de gemcitabina activada. [5] Se están explorando combinaciones de gemcitabina con otros regímenes terapéuticos para mejorar el efecto anticanceroso erradicando las variantes resistentes o para permitir la reducción de las dosis de quimioterapia y su toxicidad consiguiente.

La terapia del cáncer usando virus o derivados de vectores armados que matan específicamente las células transformadas neoplásicamente (oncolisis) es un nuevo enfoque al tratamiento de esta enfermedad mortal. [6] Algunos parvovirus autónomos pertenecen a la categoría de los denominados virus oncolíticos. [7] algunos parvovirus son partículas pequeñas (25-30 nm) sin cubierta que contienen un genoma de ADN monocatenario de 5,1 kb desde el que se expresan dos proteínas no estructurales (NS1, NS2) y dos de la cápsida (VP1, VP2). [8] El parvovirus H-1PV tiene la única ventaja de desencadenar un proceso de muerte distinto, al menos en tumores cerebrales y en algunos otros tumores, a saber, la recolocación citosólica y la activación de las proteasas lisosómicas (catepsinas). [12] Varios miembros del género parvovirus (H-1PV, MVM, Lull), cuyos huéspedes naturales son los roedores, están actualmente siendo considerados para aplicaciones en terapia génica del cáncer debido a su fracaso para transformar las células huésped, la capacidad de producir infección asintomática de seres humanos y la habilidad para propagarse preferentemente (oncotropismo) y matar (oncolisis) células transformadas neoplásicamente. [9,10,24] Se ha demostrado que los virus MVMp y H-1PV ejercen actividades oncosupresoras *in vivo*, es decir son capaces de inhibir la formación de tumores espontáneos química o víricamente inducidos en animales de laboratorio. Los vectores basados en un casete de expresión de parvovirus conservan las características oncotrópicas de los virus silvestres. [11] A pesar de los impresionantes resultados conseguidos, la eficacia anticancerosa de los candidatos de parvovirus más prometedores para las aplicaciones clínicas en humanos (incluido el H-1PV) tienen que mejorarse, por ejemplo en lo que respecta a la prolongación del ciclo de vida tras el diagnóstico.

Además, se sabe que los vectores de parvoviridae se pueden emplear como vehículo con el fin de introducir un ácido nucleico supresor tumoral, es decir un gen supresor tumoral, en un paciente que sufre cáncer [25].

Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un medio para una terapia mejor a base de parvovirus.

De acuerdo con la invención, esto se consigue mediante las materias objeto definidas en las reivindicaciones. La presente invención se basa en los hallazgos del solicitante de que, mediante el tratamiento combinado con un parvovirus y un agente quimioterapéutico como gemcitabina (siendo el quimioterapéutico más potente para el cáncer de páncreas y otros tipos de cáncer hasta la fecha, pero todavía tiene un perfil de toxicidad elevada), la toxicidad de este fármaco podría reducirse y mejorarse la eficiencia terapéutica. Se implantaron tumores pancreáticos ortotópicamente en ratas de Lewis y se trataron con gemcitabina, H-1PV o ambos, combinados en diferentes regímenes terapéuticos. El tamaño del tumor se monitorizó mediante tomografía computerizada, mientras que las funciones de la médula ósea, el hígado y el riñón se controlaron mediante los niveles de marcadores clínicamente relevantes. Las líneas de células pancreáticas y sus derivados resistentes a gemcitabina se analizaron *in vitro* para determinar la sensibilidad a H-1PV o la correspondiente combinación del fármaco. Se pudo mostrar que la gemcitabina, seguida de la inyección intratumoral de H-1PV, condujo a un retraso del crecimiento tumoral, ausencia de metástasis en la TC y prolongación de la supervivencia de los animales. La detección selectiva toxicológica mostró que el H-1PV no producía ningún daño orgánico adicional tras la combinación con gemcitabina.

En estudios in vitro demostraron que, a pesar del efecto negativo de la gemcitabina sobre la replicación del parvovirus, la combinación sumó de forma sinérgica el efecto de cada tratamiento. Las células resistentes permanecieron sensibles a la muerte por H-1PV y pudieron conservar la expresión viral en presencia de gemcitabina. Se obtuvieron resultados comparables con el tratamiento de gliomas usando una combinación de parvovirus y el fármaco quimioterapéutico temzolomida. Por tanto, los parvovirus tienen un tremendo potencial terapéutico para tratar cánceres como ACDP y gliomas, preferentemente en combinación con quimioterapia en un protocolo de dos etapas.

Descripción breve de las figuras

Figura 1: Sensibilidad de líneas celulares de ACDP a los efectos tóxicos de H-1PV solo o combinado con gemcitabina

(A) Capacidad residual de formación de colonias de las células Panc-1 y BxPC-3 tras la infección por H-1PV a las MOI indicados. Las colonias se contaron tras tinción con cristal violeta y la supervivencia se presenta como el porcentaje de células tratadas de forma simulada.

(B) Muerte de las células mencionadas anteriormente tratadas con concentraciones crecientes de gemcitabina, seguido 24 horas más tarde de infección por H-1PV a una MOI de 10 ufc/célula. La supervivencia celular se midió mediante ensayos MTT realizados 72 horas después de la infección en comparación con cultivos tratados de forma simulada (100 %) y se expresó de forma inversa como muerte celular.

Se indican los valores medios y las barras de SD de 3 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado.

Figura 2: Caracterización de líneas celulares resistentes a gemcitabina y su sensibilidad al H-1PV

A, Expresión de marcadores de resistencia a fármacos en células Panc-1 y BxPC-3 parentales (-) y resistentes a gemcitabina (^R), medida mediante RT-PCR. Los niveles de transcripción de β-actina sirvieron como referencia.

B, Micrografías de células Panc-1 y BxPC-3 resistentes a gemcitabina (^R), infectadas (H-1PV) o no (simulado) con H-1PV a una MOI = 10 UR/célula (aumento 40x).

C, Sensibilidad de las células Panc-1 (parte superior) y BxPC-3 (parte inferior) resistentes a gemcitabina (^R) y parentales a H-1PV frente al tratamiento con gemcitabina. Las células se sembraron a una densidad de 2 x 10³ células/pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron con H-1PV (10 UR/célula, columnas de H-1PV) o con gemcitabina (40 ng/ml), columnas de gemcitabina. Se realizaron ensayos de citotoxicidad MTT 144 horas después del tratamiento. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con un asterisco (* para P < 0,05, y ** para P < 0,005).

D, Transducción de EGFP por un H-1PV recombinante en células Panc-1 y Panc-1^R. Los cultivos se trataron (parte inferior) o no (parte superior) con gemcitabina (40 ng/ml) y se infectaron de forma concomitante con el vector vital (5 UR/célula). Las células que expresaban el gen transducido se detectaron mediante microscopia de fluorescencia a las 48 horas de la infección. Se muestran los campos representativos.

Figura 3: Efecto del H-1PV en un modelo de rata de formación de ACDP

Las ratas (n 26) recibieron una inyección intrapancreática de una suspensión celular derivada de tumores HA-RPC subcutáneos y las neoplasias en desarrollo se trataron 2 semanas después mediante inoculación intratumoral de 1 x 10⁹ UR de H-1PV (n= 16) o tratados de forma simulada (n= 10).

A, Crecimiento de tumores tratados con H-1PV frente a simulado. Los volúmenes de los tumores se midieron como una función del tiempo mediante TCm y se presentan como las medias con barras de SD.

B, Supervivencia de animales tratados con H-1PV frente a simulado. Diez ratas de cada grupo se monitorizaron durante 120 días, tiempo tras el cual se detuvo el experimento.

C, Distribución de la expresión de H-1PV en ratas portadoras de tumor. Dos ratas del grupo tratado con H-1PV se sacrificaron los días 2, 10 y 20 tras la infección y sus órganos se procesaron para la detección mediante RT-PCR de transcritos virales. Los productos de la PCR correspondientes al ADN viral y al ARN precursor (ADN/ARN) y al ARNm se muestran para el intestino (Int), los parches de Peyer (Pey), el hígado (Hig), el bazo (Baz), los ganglios linfáticos (GL), el páncreas (Pan) y el tumor(Tu).

D, Detección inmunohistoquímica de la proteína NS1 del H-1PV (felchas) en tumores pancreáticos infectados. Se sacrificó a tras ratas portadoras de ACDP 3 horas, 3 días y 7 días después de la inoculación

intratumoral. La inmunohistoquímica se realizó con secciones de tumor embebidas en parafina (aumento 20x).

E, Características del modelo de tumor en rata: sensibilidad a la infección por H-1PV e histología.

5 (a) Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos y se trataron con concentraciones crecientes de gemcitabina (4-4000 ng/ml), seguido, 24 horas después, de infección por H-1PV (10 UR/célula). La supervivencia celular se midió mediante ensayos MTT realizados 72 horas después de la infección en comparación con cultivos tratados de forma simulada (100 %) y se expresó de forma inversa como la tasa de muerte celular.

10 (b) Las secciones de tumor embebidas en parafina de páncreas de ratas normales y de tumor pancreático se sometieron a tinción con hematoxilina-eosina; PN- páncreas normales, ACDP- carcinoma ductal pancreático.

Figura 4: Imagen de TCm de tumores pancreáticos ortotópicos

A, Imágenes TC abdominales de una rata en un estadio inicial (2 semanas) tras el inicio del tumor, que muestra un tumor de unos 5 mm de diámetro (línea discontinua) en la cola del páncreas.

15 **B,** Evolución del ACDP en ausencia de viroterapia, con una gran masa de tumor primario (líneas discontinuas) y metástasis en los ganglios linfáticos y el hígado (flechas) a las 8 semanas del inicio.

C, Regresión del tumor primario y ausencia de metástasis en una rata tratada con H-1PV y examinada 2 y 8 semanas después del inicio. Se seleccionaron imágenes de TCm sagitales, axiales y coronales para ilustrar la localización de los tumores primarios y las metástasis.

20 Figura 5: Supervivencia de los animales portadores de tumor tras el tratamiento combinado con gemcitabina y parvovirus

25 **A,** Las ratas portadoras de tumores intrapancreáticos se dividieron en cuatro grupos (n= 11) y fueron tratadas con PBS (control), gemcitabina sola (gemcitabina), gemcitabina y virus de forma simultánea (H-1Parvovirus y gemcitabina) o gemcitabina primero y H-1PV 14 días después (gemcitabina antes del H-1Parvovirus). La supervivencia de los animales se monitorizó en un periodo de 100 días y se presenta en forma de curvas de Kaplan-Meyer, con la mediana de la supervivencia y los valores P indicados a continuación.

B, Los ratones atímicos con tumores BxPC-3 subcutáneos se dividieron en cuatro grupos (n= 5) y fueron tratados 21 después del inicio del tumor con PBS (control), gemcitabina sola (gemcitabina), virus solo (3×10^8 UR) (H-1 Parvovirus) o gemcitabina primero y H-1PV 7 días después (gemcitabina antes del H-1Parvovirus).

30 Figura 6: Evaluación toxicológica de la combinación gemcitabina y H-1PV

35 Se obtuvo sangre de 3 ratas portadoras de ACDP cada una de los grupos control, gemcitabina y gemcitabina antes de H-1PV (véase la Fig. 4A) 2 semanas después del último tratamiento terapéutico. Las muestras se analizaron para determinar: (A) recuentos de glóbulos rojos (RBC), plaquetas y glóbulos blancos (WBC) y parámetros relacionados; (B) marcadores en hígado (aspartato aminotransferasa [ASAT], alanina aminotransferasa [ALAT]) y en riñón (creatinina). Los datos mostrados son las medias con barras de SD.

Figura 7: Astrocitos tras tratamiento durante 6 días

Se muestra el porcentaje de los astrocitos humanos supervivientes (%) 6 días después del tratamiento con H-1PV (virus), tratamiento combinado con H-1PV y TMZ (V + TMZ), y tratamiento con sólo TMZ (TMZ).

Figura 8: Células RG2 tras tratamiento durante 3 días y 6 días, respectivamente

40 Se muestra el porcentaje de células RG2 supervivientes [%] 3 días (A) y 6 días (B) después del tratamiento con H-1PV (virus), tratamiento combinado con H-1PV y TMZ (V + TMZ), y tratamiento con sólo TMZ (TMZ).

Figura 9: Células U87MG tras tratamiento durante 3 días y 6 días, respectivamente

Se muestra el porcentaje de células U87MG supervivientes [%] 3 días (A) y 6 días (B) después del tratamiento con H-1PV (virus), tratamiento combinado con H-1PV y TMZ (V + TMZ), y tratamiento con sólo TMZ (TMZ).

45 Figura 10: Células U373MG tras tratamiento durante 3 días y 6 días, respectivamente

Se muestra el porcentaje de células U373MG supervivientes [%] 3 días (A) y 6 días (B) después del tratamiento con H-1PV (virus), tratamiento combinado con H-1PV y TMZ (V + TMZ), y tratamiento con sólo TMZ (TMZ).

Figura 11: Células U343MG tras tratamiento durante 3 días y 6 días, respectivamente

Se muestra el porcentaje de células U343MG supervivientes [%] 3 días (A) y 6 días (B) después del tratamiento con H-1PV (virus), tratamiento combinado con H-1PV y TMZ (V + TMZ), y tratamiento con sólo TMZ (TMZ).

Figura 12: Células A172 tras tratamiento durante 3 días y 6 días, respectivamente

- 5 Se muestra el porcentaje de células A172 supervivientes [%] 3 días (A) y 6 días (B) después del tratamiento con H-1PV (virus), tratamiento combinado con H-1PV y TMZ (V + TMZ), y tratamiento con sólo TMZ (TMZ).

Figura 13: Sensibilidad de líneas celulares de ACDP a los efectos tóxicos de H-1PV solo o combinado con gemcitabina

- 10 Las células Colo357, T3M-4, SU86.86, MiaPaCa-2, Panc-1 y BxPC-3 se cultivaron a una densidad de 2×10^3 células por pocillos en placas de 96 pocillos y se trataron con gemcitabina (0,4-4000 ng/ml), seguido, 24 horas después, de infección por H-1PV (1, 10 o 100 UR/célula). La supervivencia se midió mediante ensayos MTT realizados 72 horas después de la infección en comparación con cultivos tratados de forma simulada (100 %) y se expresó de forma inversa como la tasa de muerte celular. Los datos se presenten en forma de las medias de 3 experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

15 Figura 14: Actividad de catepsina B en líneas células de ACDP tratadas

Células Panc-1, BxPC-3 y Capan-1 se trataron con H-1PV (10 UR/célula) y gemcitabina (4 ng/ml), sola o en combinación, y se procesaron para determinar las actividades de catepsina B citosólica y lisosómica. Se dan las proporciones citosólicas frente a lisosómicas y representan los valores medios con las barras de SD de 3 experimentos independientes.

20 Figura 15: Sensibilidad de células Colo357 y T3M-4 resistentes a gemcitabina a la muerte inducida por H-1PV

- 25 Las células seleccionadas según la resistencia a gemcitabina tras la repetición de la exposición al fármaco se trataron 24 horas después de sembrar con gemcitabina (1 ng/ml) o H-1PV (10 UR/célula). Para evaluar la supervivencia se realizaron ensayos MTT 144 horas después del tratamiento. Los datos se expresan en forma de porcentajes de muerte celular en comparación con los controles tratados de forma simulada y representan los valores medios con barras de SD de 3 experimentos independientes realizados por duplicado.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene un parvovirus y un agente quimioterapéutico que es gemcitabina o temozolodina, preferentemente (a) un parvovirus y (b) el agente quimioterapéutico como entidades separadas, por ejemplo en contenedores distintos.

- 30 Preferentemente, en dicha composición farmacéutica el parvovirus y el agente quimioterapéutico están presentes en una dosis eficaz y combinados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Con "farmacéuticamente aceptable" se quiere decir que abarca cualquier vehículo, que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos y que no es tóxico para el paciente al que se le administra. Ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles etc. Dichos vehículos se pueden formular mediante procedimientos convencionales y se pueden administrar al sujeto a una dosis eficaz.

- 35 Una "dosis eficaz" hace referencia a cantidades de los ingredientes activos que son suficientes para afectar a la evolución y gravedad de la enfermedad, que conduce a la reducción o remisión de dicha patología. Una "dosis eficaz" útil para tratar y/o prevenir enfermedades o trastornos se puede determinar usando procedimientos conocidos para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Fingl y col., The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman and Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., New York, pp. 1-46 ((1975)).

Vehículos farmacéuticamente compatibles adicionales pueden incluir geles, materiales de matriz bioabsorbible, elementos de implantación que contienen el agente terapéutico o cualquier otro vehículo, medios o materiales de liberación o dispensación adecuados.

- 45 La administración de los compuestos se pueden efectuar por diferentes modos, por ejemplo mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. Por supuesto, la vía de administración depende de la clase de terapia y la clase de compuestos contenidos en la composición farmacéutica. Una vía de administración preferida es la administración intravenosa. El régimen de dosificación del agente parvoterapéutico y el agente quimioterapéutico se puede determinar fácilmente con la experiencia de la técnica, por el médico encargado de la atención en base a los datos del paciente y otros factores clínicos, incluidos, por ejemplo, el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el sexo, el parvovirus concreto, la célula, el agente quimioterapéutico etc., que se va a administrar, el momento y la vía de administración, el tipo y las

características del tumor, el estado de salud general del paciente y otras terapias farmacológicas a las que el paciente está siendo sometido.

5 Si el o los agentes parvoterapéuticos de la combinación de agentes de acuerdo con la invención comprenden partículas de virus infecciosas con la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, el tratamiento de puede realizar, o al menos iniciar, mediante inyección intravenosa del agente terapéutico viral, por ejemplo el virus H1. Una vía de administración preferida es la administración intratumoral.

10 Dado que el tratamiento intravenoso a largo plazo es susceptible de ser ineficiente como resultado de la formación de anticuerpos neutralizantes al agente terapéutico viral, se pueden adoptar diferentes modos de administración tras una administración viral inicial en régimen intravenoso, o dichas técnicas de administración diferentes, por ejemplo administración del virus intracraneal o intratumoral, se pueden usar, como alternativa, mediante el curso completo del tratamiento parvoviral.

15 Como otra técnica de administración específica, el agente parvoterapéutico (virus, vector y/o agente celular) se puede administrar al paciente a partir de una fuente implantada en el paciente. Por ejemplo, un catéter, por ejemplo de silicona o de otro material biocompatible), se puede conectar a un reservorio subcutáneo pequeño (reservorio de Rickham) instalado en el paciente durante la eliminación del tumor o mediante un procedimiento separado, para permitir inyectar la composición parvoterapéutica localmente varias veces sin intervención quirúrgica adicional. El parvovirus o vectores derivados también se pueden inyectar en el tumor mediante técnicas quirúrgicas estereotácticas o mediante técnicas dirigidas de neuronavegación.

20 La administración de los agentes o composiciones de parvovirus también se puede realizar mediante infusión continua de partículas víricas o fluidos que contienen partículas víricas a través de catéteres implantados a velocidades de flujo bajas usando sistemas de bomba adecuados, por ejemplo bombas de infusión peristáltica o bombas de liberación potenciada por convención (CED).

25 Como otro procedimiento de administración más de la composición parvoterapéutica es un artículo implantado construido y dispuesto para dispensar el agente parvoterapéutico al tejido canceroso deseado. Por ejemplo, se pueden emplear obleas que se han impregnado con la composición parvoterapéutica, por ejemplo el parvovirus H1, en las que la oblea está unida a los bordes de la cavidad de resección al final de la eliminación quirúrgica del tumor. En dicha intervención terapéutica se pueden emplear múltiples obleas. Las células que producen de forma activa el agente parvoterapéutico, por ejemplo el parvovirus H1, o vectores H1, se pueden inyectar en el tumor o en la cavidad tumoral tras la eliminación del tumor.

30 La terapia combinada de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento terapéutico del cáncer, en particular en tumores cerebrales y cáncer pancreático, preferentemente adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP) y puede mejorar significativamente el pronóstico de dichas enfermedades. La infección por parvovirus H1 efectúa la muerte de las células tumorales, pero no daña las células normales y dicha infección puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, uso intracerebral de un parvovirus adecuado, por ejemplo parvovirus H1, o un virus relacionado, o vectores basados en dichos virus, para efectuar la terapia específica de tumor sin efectos secundarios neurológicos adversos o de otro tipo.

35 La presente invención también se refiere al uso de (a) un parvovirus y (b) un agente quimioterapéutico para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer, de modo que (a) y (b) se administran, preferentemente, secuencialmente (o por separado).

40 En una realización preferida de la presente invención, la combinación de agentes se usa en el tratamiento de (a) tumores cerebrales tales como glioma, meduloblastoma y meningioma, o (b) cáncer pancreático. Los gliomas preferidos son glioblastomas humanos malignos.

45 El término "parvovirus", como se usa en el presente documento, comprende derivados del mismo silvestre o de replicación competente modificados. Parvovirus adecuados que se pueden usar para producir activamente dichos parvovirus y que son útiles para terapia se pueden determinar con facilidad dentro de la experiencia en la técnica en base a la divulgación del presente documento, sin necesidad de esfuerzos empíricos.

En otra realización preferida de la presente invención, el parvovirus de la composición incluye parvovirus H1 (H1PV) o un parvovirus relacionado, tal como Lull1, virus diminuto del ratón (MMV), parvovirus del ratón (MPV), virus diminuto de la rata (RMV), parvovirus de la rata (RPV) o virus de la rata (RV).

50 Los pacientes que se pueden tratar con la combinación de agentes de acuerdo con la invención incluyen seres humanos, así como animales no humanos. Ejemplos de estos últimos incluyen, sin limitaciones, animales tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros y gatos.

Los agentes quimioterapéuticos útiles para los fines de la presente invención incluyen compuestos químicos que

son eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral, en concreto gemcitabina o temozolodina. La administración de agentes quimioterapéuticos se puede conseguir de diversas formas (véase anteriormente), incluidas, sistémicamente, las vías parenteral y enteral. Preferentemente, el parvovirus y el agente quimioterapéutico se administran como compuestos separados.

- 5 En otra forma de realización preferida, el parvovirus se administra después del agente quimioterapéutico. El periodo de tiempo preferido entre la administración del agente quimioterapéutico y el parvovirus es de 14 a 35 días.

Agentes quimioterapéuticos adecuados son gemcitabina y temozolodina.

Los ejemplos siguientes explican con detalle la invención.

Ejemplo 1

10 Materiales y procedimientos

(A) Cultivo celular y tratamiento

Las líneas celulares de carcinoma pancreático humano y tumores metastásicos (Colo357, T3M-4 y SU86.86) se obtuvieron de la ATCC (Manassas, VA) y se cultivaron en medios RPMI 1640 (MiaPaCa-2, BxPC-3 y Capan-1) o DMEM (Panc-1) suplementados con 10 % de suero bovino fetal (FCS). Las células resistentes se generaron mediante múltiples pases de células con dosis crecientes de gemcitabina a partir de una concentración de 0,0004 $\mu\text{g/ml}$ durante 2 horas y se amplió a 0,004 $\mu\text{g/ml}$ durante 24 horas.

Las células de riñón de ser humano neonato transformadas con SV40 293T y células NBK (ATCC) se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10 % de FCS. La línea celular cancerosa HA-RPC desarrollada a partir de un adenocarcinoma ductal pancreático inducido químicamente en ratas de Lewis se cultivaron en medio DMEM con 10 % de FCS. [13] Todos los medios de cultivo se suplementaron con penicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y estreptomina (100 U/ml) y las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera del 5 % de CO_2 . Gemcitabina (Gemzar®, adquirida en Lilly, Indianapolis, IN, EE.UU.) se aplicó a las concentraciones indicadas en las leyendas de las figuras.

Para la evaluación de la citotoxicidad, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 2×10^3 células por pocillo y se trataron como se indica en las leyendas de las figuras. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo MTT colorimétrico (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio, según recomienda el fabricante (Sigma, Deisenhofen, Alemania).

(B) Viabilidad celular

Las células sembradas en placas de 96 pocillos y se trataron como se indica en las leyendas de las figuras, se evaluó su viabilidad usando el ensayo MTT colorimétrico (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio). Para el ensayo de clonogenicidad, las células se sembraron a una densidad de 250 (Panc-1) o 800 (BxPC-3 y Capan-1) por placa de 6 cm^2 , se trataron como se ha indicado y se incuban después durante 14 días. Tras la aspiración del medio, las colonias celulares se tiñeron con cristal violeta, se lavaron con agua corriente y se contaron al microscopio. Las fracciones supervivientes (FS) se determinaron con la fórmula: $\text{FS} = \text{número medio de colonias} / [\text{células sembradas en placas} \times (\text{PE}/100)]$, en la que PE es la eficiencia del sembrado en placas de las respectivas células en ausencia de tratamiento.

(C) Microscopia

Los cultivos se examinaron usando un microscopio invertido Leica con un aumento de 40x. La captura de la imagen se realizó usando una cámara Leica DFC350 FX camera (Leica Microsystems, Cambridge) y el software the Leica FireCam para Macintosh. La fluorescencia de EGFP se midió usando un microscopio de fluorescencia Leica DMRBE (Leica, Bensheim, Alemania) y el software de análisis (Olympus, Alemania).

(D) Producción y detección de virus

El virus H-1 silvestre se produjo infectando células NBK, se purificó mediante centrifugación en gradiente de iodixanol y se dializó contra solución de Ringer. El virus recombinante H-1PVEGFP se produjo cotransfiriendo células 293T con el ADN del vector recombinante y un plásmido colaborador que expresa los genes de la cápsida viral en trans. [14] Los títulos de virus se determinaron como se ha descrito anteriormente y se expresaron como unidades formadoras de centro de replicación (ufc). Brevemente, se aplicaron a las células NBK diluciones en serie de virus purificados. A las 48 horas de la infección, los cultivos infectados se transfirieron sobre filtros y los centros de replicación se detectaron mediante hibridación usando una sonda radioactiva específica del ADN del virus. [10]

Para el análisis de la transcripción del virus en los órganos de animales tratados o cultivos de células de ACDP, se extrajo el ARN total de las muestras de los tejidos obtenidos o sedimentos celulares con reactivo Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se sometió a transcripción inversa en ADNC

y se cuantificó usando el protocolo RTPCPR detallado anteriormente. [15] Los transcritos de H-1PV se detectaron en forma de fragmentos de PCR de 512 y de 415 pb, dependiendo de la escisión del intrón pequeño, usando el par de cebadores: 5'-TCAATGCGCTCACCATCTCTG-3' (directo) y 5'-TCGTAGGCTTCGTCGTGTTCT-3' (inverso). Los cebadores específicos para los ARNm de hENT y dCK fueron los siguientes: hENT-5'-AAAGGAGAGGAGCCAAGAGC-3' (directo) y 5'-GGCCAACAGTCAAAGATA-3' (inverso); dCK- 5'-CCCGCATCAAGAAAATCTCC-3' (directo) and 5'-TCCATCCAGTCATGCCAGTC-3' (inverso). Los cebadores usados para detectar la expresión de β -actina humana y los genes de MDR, MRP1 y MRP2 se han descrito anteriormente .[16]

(E) Estudios en animales

- 10 (i) *Anestesia* Todos los procedimientos quirúrgicos y de imagen se realizaron con anestesia gaseosa con 3 % de isoflurano (Aerrane®, Baxter, Maurepas, Francia) en oxígeno puro y una inyección intramuscular concomitante de 2-3 mg/lg de xilazina clorhidrato (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Alemania) como analgesia para cirugía.
- 15 (ii) *Modelo de tumor.* Para la implantación de un carcinoma pancreático se usaron ratas macho de Lewis (Janvier, Le Genest Saint Isle, Francia) de un peso de 180-200 g. Se inyectaron $5 \cdot 10^6$ células HA-RPC en el parénquima pancreático. La progresión del tumor se confina a la cola pancreática durante las primeras 3 semanas de la implantación, lo que conduce a la invasión de los ganglios linfáticos durante la 4^a semana. La metástasis hepática aparece a la semana 5-6 y la muerte con metástasis pulmonar se produce en un plazo de 6-9 semanas. [17] Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales (Temperatura 22 ± 2 °C, humedad relativa 55 ± 10 %, ritmo de oscuridad-luz de 12 horas) con acceso sin restricciones a una dieta de pienso equilibrada y agua. Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las directivas francesa y europea para la protección de animales (número 86/609/CEE de 24 de noviembre de 1986). Se aplicó gemcitabina mediante inyección intraperitoneal (100 mg/kg). El H-1PV se inoculó por vía intratumoral (i.t.). Las muestras de sangre se extrajeron de la vena de la cola del animal 2 semanas después del último tratamiento terapéutico. Los marcadores toxicológicos se analizaron en el hospital universitario de Estrasburgo usando análisis clínicos de laboratorio automáticos (dispositivo de multiparámetros bioquímicos ADVIA 160, Siemens, Cergy Pontoise, Francia).
- 20
- 25
- 30 (iii) *Adquisición y reconstrucción de imágenes.* Las imágenes se obtuvieron en un aparato Imtek microCT (microCAT-II, Imtek Inc., Knoxville, TN) usando una tensión de rayos X de 80 kVp y corriente anódica 500 PA. Se usó adquisición encuadrada por respiratorio para evitar los cambios en la posición del órgano abdominal y el consiguiente borrado de la delineación. Los agentes de contraste Fenestra® LC y Fenestra® VC (Alerion Biomedical Inc., San Diego, CA) para el hígado y contraste vascular persistente, respectivamente, se inyectaron de forma concomitante por vía intraperitoneal 9 horas antes de la imagen. Los datos de las imágenes se adquirieron y reconstruyeron usando el software autorizado de Imtek (versión Cobra 4.1-4, Exxim computing corporation, Knoxville, TN). Las imágenes 3Dn se visualizaron usando el software Amira (Amira Advanced Visualization, Data analysis, and Geometry Reconstruction v.3.1, San Diego, CA). Los tumores o metástasis que aparecieron como defectos de color negro dentro del hígado o el lóbulo pancreático contrastado se midieron tridimensionalmente usando el conjunto de datos Amira 3D.
- 35
- 40

(F) Inmunohistoquímica

Las secciones de tumor embebidas en parafina se desparafinaron con xileno y se rehidrataron mediante soluciones de alcohol graduadas. La actividad de la peroxidasa endógena se inactivó con 0,3 % de peróxido de hidrógeno en metanol. Para bloquear la unión inespecífica, los portaobjetos se trataron con suero de conejo normal no inmunitario (Dako, Zurich, Suiza) durante 1 hora. Después de incubar durante la noche (4 °C) con el anticuerpo 3D9 específico de la proteína NS1 del H-1PV (1:50) (amablemente donado por la Dra. Nathalie Salomé, DKFZ, Heidelberg, Alemania), los portaobjetos se lavaron y trataron con anticuerpo secundario marcado de peroxidasa de rábano de conejo anti-ratón (1:200, Sigma), desarrollado usando el sistema Dako Envision+™ (Dako) y se sometió a contraincubación con hematoxilina de Mayer.

50 (G) Análisis estadístico

- (i) *Estudios In vitro.* Las medias y las desviaciones estándar (SD) se calcularon a partir de experimentos *in vitro* realizados por triplicado. Para determinar si H-1PB y la gemcitabina interaccionan de forma sinérgica *in vitro*, los autores realizaron un análisis isoblográfico en base a los datos derivados de ensayos MTT, como ya se ha descrito para otras combinaciones de quimio y viroterapia [22]. El 50 y 75 % de los valores de concentración eficaz (CE) (CE_{50} y CE_{75}) para gemcitabina y H-1PV se determinaron empíricamente en base a un intervalo de concentraciones (0,4 a 4000 ng/ml) y MOI (1,
- 55

10, 100 UR/célula), respectivamente. El isoblograma se creó a partir de los datos obtenidos para la combinación de los dos agentes. Se calcularon los índices de combinación (IC) y de sensibilización (IS) usando las ecuaciones siguientes: $IC = (D_{H1.c}/D_{H1.a}) + (D_{G.c}/D_{G.a}) + (D_{H1.c} * D_{G.c}/D_{H1.a} * D_{G.a})$; $IS_{H-1PV} = D_{H1.a}/D_{H1.c}$; $IS_{gem} = D_{G.a}/D_{G.c}$, en la que $D_{H1.c}$, $D_{H1.a}$, $D_{G.c}$ y $D_{G.a}$ son las dosis $CE_{50/75}$ respectivas de H-1PV o gemcitabina, solos (H1.a, G.a) o en combinación (H1.c, G.c). IC = 1 representa el isoblograma de conservación e indica efectos aditivos. Los valores del IC inferiores a 1 indican un efecto aditivo mayor del esperado (sinergia).

(ii) *Estudios in vivo*: Se calcularon las medias y las desviaciones estándar de los experimentos *in vitro* realizados por triplicado. La diferencia en el volumen del tumor, determinado *in vivo* mediante mediciones del tamaño en TCM, se analizó usando un análisis de la varianza de una sola vía, seguido de una prueba t de Student paramétrica no pareada ya que la prueba de Bartlett indicó homogeneidad de la varianza. Una diferencia entre los valores se consideró significativa cuando $P < 0,05$. Las curvas de supervivencia se generaron usando el procedimiento de Kaplan-Meier y las diferencias entre las curvas se analizaron mediante la prueba del orden logarítmico. Un valor de $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Se usó el software InStat 2.00 Macintosh (GraphPad Software, San Diego, CA).

(H) Fraccionamiento celular y mediciones de la actividad de la proteasa

La actividad de la catepsina B se determinó en fracciones citosólicas y lisosómicas obtenidas de las células Panc-1 and BxPC-3 tratadas con gemcitabina sola (4 ng/ml), H-1PV solo (10 UR/célula) o ambos agentes combinados. Los cultivos se recogieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se sedimentaron mediante centrifugación, se resuspendieron en tampón hipotónico (sacarosa 0,25M, HEPES 50 mM-NaOH [pH 7.4], EDTA 1 Mm) y se homogeneizaron en un homogeneizador celular. Los núcleos y las mitocondrias pesadas se sedimentaron mediante centrifugación a 2500 x g durante 10 minutos a 4 °C. Se guardó un alícuota del sobrenadante (suspensión posnuclear, SPN) y se usó para determinar la latencia de la enzima. La fracción mitocondrial ligera (FML) se obtuvo mediante centrifugación de la SPN a 17000 g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se recuperó como extracto citosólico y el sedimento de la FML se resuspendió en tampón hipotónico. Las fracciones citosólica y FML se añadieron, cada una, a una mezcla de reacción que consiste en ácido morfolinoetanansulfónico (MES) 50 mM (pH 6,0), sacarosa 0,25M, EDTA 1 mM y N-acetil-L-cisteína 2 mM. Tras 10 minutos de incubación se añadió el sustrato Z-Arg-Arg-AMC (Calbiochem) (1 mM) y la emisión se monitorizó durante 1 hora en un luminómetro Fluoroskan & FL (Thermolabsystem) a una longitud de onda de 455 nm tras excitación a 360 nm.

(I) Aislamiento de células Colo357 y T3M-4 resistentes a gemcitabina

Las células Colo357 and T3M-4 resistentes a gemcitabina se aislaron mediante cinco ciclos de selección, implicando cada uno el tratamiento de las células durante 48 horas con una CE_{50} de gemcitabina determinada para la respectiva línea parental (1,2 ng/ml para T3M-4 y 1,5 ng/ml para Colo357). La sensibilidad al fármaco de las células parentales y resistentes se evaluó en ensayos MTT y de supervivencia clonogénicos.

Ejemplo 2

H-1PV, solo y en colaboración con gemcitabina, mata células de cáncer pancreático humano cultivadas que causan una liberación de catepsina B activa en el citoplasma

Seis líneas celulares de ACDP humano, Colo357, T3M-4, SU86.86, MiaPaCa-2, Panc-1 y BxPC-3, se analizaron según su sensibilidad a H-1PV y la toxicidad a gemcitabina (Tabla 1, Fig. 1 y Fig. 13). Se encontró que MiaPaCa-2, SU86.86 y T3M-4 eran hipersensibles a la muerte inducida por el virus, mientras que Colo357, SU86.86 y T3M-4 eran más susceptibles a gemcitabina. Es importante el hecho de que las líneas celulares que mostraban mayor resistencia al tratamiento con gemcitabina (Panc-1, BxPC-3 y MiaPaCa-2) eran sensibles al H-1PV.

Tabla 1. Efectos tóxicos combinados de H-1PV y gemcitabina sobre células de ACDP humano

Línea celular	$CE_{50/75}$	MOI del H-1PV	gemcitabina	(ng/ml)	IC	IS_{H-1PV}	IS_{Gem}
BxPC3	CE_{50} mono,	30		25			
	CE_{50} comb. 1	1	+	20	0,86	30	1,3
	CE_{50} comb. 2	10	+	7,0	0,71	3	3,6

Colo357	CE ₅₀ mono,	35		1,5			
	CE ₅₀ comb. 1	1	+	1,3	0,92	35	1,2
	CE ₅₀ comb. 2	10	+	0,6	0,80	3,5	2,5
MiaPaCa-2*	CE ₇₅ mono,	20 (4)		30 (9)			
	CE ₇₅ comb. 1	1	+	18	0,68	20	1,7
	CE ₇₅ comb. 2	10	+	2,0	0,60	2	15,0
Panc-1	CE ₅₀ mono,	35		400			
	CE ₅₀ comb. 1	1	+	200	0,54	35	2,0
	CE ₅₀ comb. 2	10	+	60	0,48	3,5	6,7
SU86.86*	CE ₇₅ mono,	30 (4)		17 (2,5)			
	CE ₇₅ comb. 1	1	+	8,0	0,52	30	2,1
	CE ₇₅ comb. 2	10	+	1,3	0,44	3	13,1
T3M-4*	CE ₇₅ mono,	45 (10)		2,5 (1,2)			
	CE ₇₅ comb. 1	1	+	2,4	1,00	45	1,0
	CE ₇₅ comb. 2	10	+	1,5	0,96	4,5	1,7
<p>Los cultivos celulares se sembraron en placas de 96 pocillos a 2×10^3 células/pocillo, se trataron con gemcitabina (0,4-4000 ng/ml) y se infectaron 24 horas después con H-1PV a diferentes MOI (1, 10, 100 UR/célula). La citotoxicidad se evaluó usando ensayos MTT 72 horas después de la infección. Los valores de CE₅₀ para los tratamientos sencillos (mono) y combinados (comb) se calcularon a partir de los isobogramas que se crearon usando las mediciones de MTT obtenidas a diferentes MOI ((H-1PV) y concentraciones (gemcitabina). El índice de combinación (IC) y el índice de sensibilización (IS) se determinaron tal como se describe en Materiales y Procedimientos.</p> <p>*Debido a la hipersensibilidad de las líneas celulares indicadas a la muerte por el H-1PV, para los análisis estadísticos se usaron los valores de CE₇₅. Los valores de CE₅₀ para H-1 PV y monoterapia con gemcitabina se indican entre paréntesis.</p>							

5 Como se indica en la Tabla 1, el efecto citotóxico de la terapia combinada fue, en la mayoría de los casos, sinérgico (IC < 1), en concreto en células MiaPaCa-2, Panc-1 y SU86.86. La dosis eficaz de virus podría reducirse en un factor (IS_{H-1PV}) de hasta 35 veces en presencia de dosis variables de gemcitabina de 1,3 ng/ml (Colo357, combinación 1) a 200 ng/ml (Panc-1, combinación 1). Por el contrario, la concentración eficaz del fármaco requerida para inhibir la proliferación celular se redujo por un factor (IS_{Gem}) de hasta 15 veces cuando las células se infectaron con H-1PV (MiaPaCa-2, combinación 2). La capacidad de todas las líneas celulares para formar colonias en un periodo de 2 semanas también fue inhibida de forma eficiente por H1-PV (datos no mostrados).

10 Además, se determinó si la distribución subcelular de la actividad de la catepsina B en líneas derivadas de ACDP también se alteraba tras los tratamientos anteriores. Esto se analizó usando tres líneas celulares de ACDP humanas. Como se muestra en la Fig. 14, la acumulación citosólica de la catepsina B funcional se potenció significativamente con la combinación de H-1PV/gemcitabina, lo que sugiere fuertemente que este mecanismo

podría participar en la toxicidad acumulada observada.

Ejemplo 3

El H-1PV puede matar las células sensibles y resistentes a gemcitabina con una eficiencia similar

5 Dado que el desarrollo de resistencia a gemcitabina es un inconveniente fundamental del tratamiento a largo plazo de los pacientes de ACDP con este fármaco, se analizaron los efectos citopáticos del h-1PV sobre las variantes celulares resistentes a gemcitabina derivados de dos de las líneas mencionadas anteriormente (Panc-1 y BxPC-3) que diferían en cuanto a su sensibilidad natural a la gemcitabina (Tabla 1). Las poblaciones resistentes (^R) se aislaron tratando secuencialmente las células con dosis crecientes del fármaco. Las variantes resistentes eran distinguibles de las respectivas líneas celulares parentales por su crecimiento más lento y cambios fenotípicos estables, tales como mayor expresión de los marcadores de exportación de fármacos MDR y MRP1/2 (Fig. 2A). Como los niveles de los marcadores de importación (hENT) y activación (dCK) permanecieron invariables o se redujeron ligeramente (Fig. 2A), parece que el fenotipo resistente se debía principalmente a una exportación de gemcitabina más intensiva. Las variantes resistentes a fármacos permanecieron sensibles a la infección por H-1PV (Fig. 2B y 2C, columna de H-1PV), mientras resistían una incubación ampliada con gemcitabina (40 ng/ml durante 144 h) que era tóxica para las líneas originales (Fig. 2C, columna de gemcitabina). En células BxPC-3R frente a BxPC-3 incluso se observó un ligero pero significativo incremento de la muerte inducida por H-1PV. Esto sugiere que H-1PV podría usarse como tratamiento de segunda línea del ACDP para sortear la resistencia adquirida a la gemcitabina. Además, se ha descubierto que el fenotipo resistente a gemcitabina correlaciona con la reducción de la interferencia de las dosis del fármaco tóxico con la progresión del ciclo de vida del parvovirus. De hecho, la expresión del marcador proteico IGFP, dirigida por un vector parvovirus recombinante, persistió en células Panc-1R, incluso después de su exposición a una dosis de gemcitabina que abolía la transducción de EGFP en células parentales (Fig. 2D). Por tanto, se puede concluir que las variantes de células tumorales quimiorresistentes siguen siendo dianas de H-1PV incluso en condiciones en las que se continúa la terapia con gemcitabina. La muerte eficiente por el virus se observó de forma similar tras la infección de células Colo357 y T3M-4 resistentes a gemcitabina seleccionadas usando tratamiento a corto plazo con dosis altas de gemcitabina (Fig. 15). De acuerdo con estos datos, las líneas Colo357 y T3M-4 resistentes y parentales tenían una capacidad similar para la replicación del virus (datos no mostrados).

En conjunto, los experimentos *in vitro* sugieren que el H-1PV puede mejorar el efecto terapéutico de la gemcitabina, tanto reforzando la muerte global de las células sensibles al fármaco como erradicando las variantes quimiorresistentes que surgen en estadios tardíos del tratamiento con fármacos.

Ejemplo 4

El H-1PV induce supresión de parcial a completa de los tumores pancreáticos ortotópicos, de modo que prolonga la supervivencia de los animales

35 Para simular la situación clínica más estrechamente se usó un modelo de rata singénea de ACDP implantado ortotópicamente para evaluar la actividad anticancerosa del H-1PV. Dado que la rata es el huésped natural de H-1PV, el sistema también es adecuado para la evaluación toxicológica de este agente oncolítico, otro requisito previo para su aplicación clínica. Las células de ACDP de rata usadas en el modelo (HA-RPC) se analizaron primero *in vitro* para determinar su susceptibilidad a la infección por H-1PV y se probó que tenía el mismo intervalo de sensibilidad al virus y toxicidad a gemcitabina que las células humanas mencionadas anteriormente (Fig. 3E(a)).

40 A continuación, el H-1PV se administró *in vivo* mediante una única inyección intratumoral 2 semanas después de la implantación de las células HARPC en el páncreas. Se determinaron el tamaño del tumor (medido mediante TCm e inspección macroscópica tras la muerte), la supervivencia del animal y la distribución del virus. La viroterapia produjo un retraso en el crecimiento tumoral (Fig. 3A) y como se ilustra en la Fig. 3B, las ratas en el grupo tratado con virus sobrevivieron significativamente más tiempo que los controles tratados de forma simulada, con un 20 % sin enfermedad durante 16 semanas (hasta el final del experimento). Es importante el hecho de que el H-1PV se expresaba de forma selectiva en los tumores, en posición a los tejidos normales. Para confirmar esto, los autores analizaron órganos viscerales para determinar la presencia de transcritos de virus (mediante RT-PCR). Como se muestra en la Fig. 3C, se observó una descarga inicial de expresión del virus poco después de la infección en el tumor y en el tejido pancreático de alrededor. De acuerdo con observaciones previas en otros modelos, el H-1PV también se distribuía a los órganos linfoides [15]. A partir del décimo día, la expresión del virus disminuyó, muy probablemente a causa de la aparición de anticuerpos neutralizantes del virus que redujeron la diseminación del virus [18]. No obstante, persistió en el tumor durante hasta 20 días después de la inoculación. Además, la diseminación intratumoral del virus se pudo confirmar mediante análisis inmunohistoquímico (Fig. 3D).

55 Cabe destacar que, en algunos casos, se observó desaparición completa de los tumores preexistentes en las imágenes de TC, (Fig. 4, compárese A y C). Además de la expansión local del tumor primario, las metástasis linfó y hematogénas que afectan respectivamente a los ganglios linfáticos viscerales de la cavidad abdominal superior y el

hígado desempeñan un papel fundamental en la mortalidad por ACDP. Como cabe esperar, la monitorización de TCm de ratas no infectadas reveló invasión metastásica de los ganglios linfáticos pancreáticos, pilóricos y hepáticos y del hígado (Fig. 4B, flechas). La inoculación del tumor primario con H-1PV en un estadio primario (correspondiente a las imágenes de la Fig. 4A) tuvo como resultado una supresión del 45 % de las metástasis distantes, así como del tumor primario, en una etapa posterior (Fig. 4C). Es interesante el hecho de que la diseminación de la enfermedad metastásica al hígado en este modelo se correlacionó con la expresión tardía del virus en el órgano (Fig. 3C), lo que sugiere que el H-1PV puede controlar de forma activa la invasión tumoral.

Ejemplo 5

El H-1PV suprime los tumores ACDP que escapan al tratamiento con gemcitabina

Se investigó si el H-1PV puede potenciar el efecto terapéutico de la gemcitabina *in vivo*, como se ha observado *in vitro* (Tabla 1, Fig. 13). Para simular una situación clínicamente plausible, primero se trató a las ratas portadoras de ACDP con gemcitabina y, 2 semanas después, el tumor se inoculó intraoperativamente con H-1PV. Como se representa en la Fig. 5A (gemcitabina antes del H-1PV), esto condujo a una supervivencia significativamente prolongada de los animales en comparación con el tratamiento simulado (control) o la monoterapia con el agente quimioterapéutico (gemcitabina). Cuando ambos agentes se aplicaron de forma simultánea (H-1PV and gemcitabina), el H-1PV no mejoró el efecto terapéutico de la gemcitabina. Probablemente esto se deba a la interferencia negativa del fármaco genotóxico con el ciclo de vida del parvovirus (véase también la Fig. 2D).

Con el fin de analizar la eficacia de la gemcitabina y el H-1PV en un modelo *in vivo* diferente usando células humanas, se indujeron tumores BxPC-3 en ratones atímicos y se trataron con un régimen similar al usado en ratas (Fig. 5B). Todos los animales que recibieron terapia tenían una supervivencia prolongada en comparación con los controles. El tratamiento combinado (gemcitabina antes del H-1PV, n = 5) y la monoterapia con H-1PV (n = 5) consiguieron el mayor nivel de protección antitumoral, estando un animal de cada uno de estos grupos libre de tumor hasta 70 días después del comienzo del experimento. En este momento, el 40 % de los animales del grupo de tratamiento combinado seguía vivo, mientras que todos los ratones control tuvieron que ser sacrificados 40 días después de la implantación.

En conjunto, estos datos confirman que la gemcitabina proporciona una protección transitoria contra el ACDP y que la consiguiente administración de H-1PV puede prolongar la supervivencia del animal. Además, la evaluación toxicológica de los regímenes terapéuticos se llevó a cabo en el modelo de rata, lo que indica que los marcadores sanguíneos de la actividad en médula ósea no se vieron afectados (Fig. 6A), aparte de un descenso en los niveles de reticulocitos y monocitos debido al tratamiento con gemcitabina. Los informes clínicos indujeron a los inventores a monitorizar las funciones hepática y renal también (Fig. 6B). En los grupos sin tratar y tratados con gemcitabina los niveles de bilirrubina, ASAT y ALAT estaban elevados, lo que revela un proceso lítico de grado bajo en los hígados de ratas portadoras de ACDP. La parvoviroterapia adicional estableció estos marcadores a niveles dentro del intervalo fisiológico. Los niveles de creatinina permanecieron estables, lo que demuestra un aclaramiento renal no afectado. En conclusión, las anomalías detectadas en los parámetros sanguíneos podrían atribuirse por completo al tratamiento con gemcitabina y no agravaron por la administración posterior de H-1PV.

Ejemplo 6

La infección por H1-PV puede mejorar el efecto terapéutico de la temozolomida sobre las células de glioblastoma *in vitro*

Inicialmente, las tasas de supervivencia de las líneas celulares usadas en el estudio se determinaron usando ensayos MTT con el fin de comprobar si estas líneas celulares son sensibles a la infección por H-1PV y al tratamiento con temozolomida (TMZ). Además, se determinaron las tasas de supervivencia tras el tratamiento combinado con H-1PV y TMZ. Las células se infectaron con una MOI de 5 UFP/célula y se trataron con TMZ 25 μ M suponiendo que estas concentraciones muestran efectos claros, pero no tienen como resultado una lisis completa de las células. Los gráficos de las Figuras 7-11 representan los resultados tras 3 y 6 días, respectivamente. Tras 3 días de tratamiento ya se pueden observar efectos distintos. Tras 6 días, los experimentos se terminaron ya que las células control ya eran confluentes. Además, tras 6 días no se pudieron llevar a cabo análisis adicionales debido a la tasa tan baja de supervivencia (en función de la línea celular concreta).

Como control, astrocitos humanos se (a) infectaron con H-1PV, (b) trataron con TMZ o (c) sometieron a tratamiento combinado. Como se muestra en la Fig. 8, ninguno de estos tratamientos muestra ningún efecto sobre los astrocitos.

Como se muestra en la Fig. 8, las células RG2 son muy sensibles a la infección por H1-PV, 3 días después de la infección aproximadamente el 90 % de las células ya se han lisado. El mismo resultado se obtiene con el tratamiento combinado (H-1PV + TMZ). Tras 6 días, todas las células han muerto. Además, los resultados muestran que las células no son sensibles al tratamiento con TMZ.

Como se muestra en la Fig. 9, 3 días después de la infección por H-1PV, sólo alrededor del 10 % de las células U87MG se han lisado, tras el tratamiento con TMZ solo, alrededor del 20 % de las células había muerto. El tratamiento combinado (H1-PV + TMZ) mostró un efecto citolítico más fuerte, aproximadamente el 40 % de las células murió. No obstante, 6 días después del tratamiento este efecto ya no estaba presente y la tasa de supervivencia de las células sometidas al tratamiento combinado se asemejó a la tasa de supervivencia de las células tratadas sólo con TMZ (TMZ). Como se muestra en la Fig.10, el tratamiento con TMZ no mostró efectos citotóxicos sobre las células U373 (6 días después del tratamiento). Tras la infección con H-1PV, aproximadamente el 60 % de las células se había lisado tras 6 días. El mismo resultado se obtuvo con el tratamiento combinado (H-1PV + TMZ).

5
10
15
La Fig. 11 muestra los resultados obtenidos con células U343 que son muy sensibles al tratamiento con TMZ. Tras 6 días, más del 80 % de las células han muerto. 3 días tras el tratamiento, la combinación de H-1PV y TMZ mostró un efecto citopático más fuerte en comparación con los tratamientos sencillos. No obstante, tras 6 días, este efecto es menos pronunciado y el porcentaje de células supervivientes tras el tratamiento combinado se acerca al porcentaje de células supervivientes tras el tratamiento con TMZ solo. Como se muestra en la Fig.12, el tratamiento combinado con H-1PV y TMZ proporciona un efecto citopático potenciado en comparación con los tratamientos con H-1PV solo y con TMZ solo, respectivamente.

20
25
En resumen, podría demostrarse que las líneas celulares establecidas de glioblastoma humano y animal (ratas), así como las líneas celulares a corto plazo derivadas de glioblastomas humanos, son muy sensibles a la muerte celular mediada por virus. Este resultado podría confirmarse en el presente estudio usando una línea celular establecida de rata, TG2, y varias líneas celulares de glioblastoma humano, U87MG, U373MG, U343MG y A172 (obtenible en Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg, Alemania) que están infectadas líticamente con H-1PV. Una dosis baja de 5 partículas infecciosas por célula fue suficiente para obtener un claro efecto citopático tras 72 horas. Además, se pudo demostrar que los astrocitos humanos infectados por H-1PV no se lisaban. El tratamiento con astrocitos normales, las células RG2 y las células U373 con temozolomida (TMZ) 25 µM no tuvo como resultado la muerte celular. Las células eran resistentes incluso si se administraban dosis mucho mayores.

30
Otras líneas celulares humanas eran sensibles al tratamiento con TMZ. El tratamiento combinado con H-1PV y TMZ mostró que el efecto oncolítico del virus no se veía alterado por el tratamiento con TMZ. Por otro lado, el virus no tenía ningún efecto de inhibición sobre el tratamiento con TMZ. Puede esperarse que, de un modo similar a los resultados comunicados para el tratamiento combinado del cáncer pancreático con H-1PV and gemcitabina, no sólo se pueden conseguir efectos aditivos sino también sinérgicos, *in vivo* con el tratamiento combinado con H-1PV y TMZ.

Lista de referencias

1. Jemal A, Thomas A, Murray T, et al. Cancer statistics, 2002. *Cancer J Clin* 2002;52:23-47.

2. Pisani P, Parkin DM, Bray FI, et al. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;83:18-29.

3. Finlayson E, Birkmeyer JD. Effects of hospital volume on life expectancy after selected cancer operations in older adults: a decision analysis. *J Am Coll Surg* 2003;196:410-17.

4. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997;15:2403-13.

5. Giovannetti E, Mey V, Nannizzi. S, et al. Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1387-95.

6. Hecht JR, Bedford R, Abbruzzese JL, et al. A phase I/II trial of intratumoral endoscopic ultrasound injection of ONYX-015 with intravenous gemcitabine in unresectable pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:555-61.

7. Rommelaere J, Cornelis J. Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods* 1991;33:233-51.

8. Cotmore SF, Tattersall P. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* 1987;33: 91-174.

9. Haag A, Menten P, Van Damme J, et al. Highly efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by means of autonomous parvovirus vectors; generation of antitumor responses in recipient mice. *Hum Gene Ther* 2000;11:597-609.

10. Russell SJ, Brandenburger A, Flemming CL, et al. Transformation-dependent expression of interleukin genes delivered by a recombinant parvovirus. *J Virol* 1992;66:2821-8.

11. Olijslagers S, Dege AY, Dinsart C, et al. Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther* 2001;8:958-65.

12. Di Piazza M, Mader C, Geletneky K, et al. Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *J virol* 2007;81:4186-98.

5 13. Evrard S, Keller P, Hajri A, et al. Experimental pancreatic cancer in the rat treated by photodynamic therapy. *Br J Surg* 1994;81:1185-89.

14. Wrzesinski C, Tesfay L, Salomé N, et al. Chimeric and pseudotyped parvoviruses minimize the contamination of recombinant stocks with replication-competent viruses and identify a DNA sequence that restricts parvovirus H-1 in mouse cells. *J Virol* 2003;77:3851-8.

10 15. Giese NA, Raykov Z, DeMartino L, et al. Suppression of metastatic hemangiosarcoma by a parvovirus MVMp vector transducing the IP-10 chemokine into immunocompetent mice. *Cancer Gene Ther* 2002;9:432-42.

16. Schaarschmidt T, Merkord J, Adam U, et al. Expression of multidrug resistance proteins in rat and human chronic pancreatitis. *Pancreas* 2004;28:45-52.

15 17. Mutter D, Hajri A, Tasseti V, et al. Increased tumor growth and spread after laparoscopy vs laparotomy: influence of tumor manipulation in a rat model. *Surg Endosc* 1999;13:365-70.

18. Raykov Z, Balboni G, Aprahamian M, et al. Carrier cell-mediated delivery of oncolytic parvoviruses for targeting metastases. *Int J Cancer* 2004;109:742-9.

19. Harrop R, Carroll MW. Viral vectors for cancer immunotherapy. *Front Biosci* 2006;11:804-17.

20 20. Raykov Z, Grekova S, Galabov AS, et al. Combined oncolytic and vaccination activities of parvovirus H-1 in a metastatic tumor model. *Oncol Rep* 2007;17:1493-9.

21. Plate JM, Plate AE, Shott S, et al. Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Immunol Immunother* 2005;54:915-25.

22. Nowak AK, Robinson BW, Lake RA. Gemcitabine exerts a selective effect on the humoral immune response: implications for combination chemo-immunotherapy. *Cancer Res* 2002;62:2353-8.

25 23. Bennett JJ, Adusumilli P, Petrowsky H, et al. Up-regulation of GADD34 mediates the synergistic anticancer activity of mitomycin C and a gamma134.5 deleted oncolytic herpes virus (G207). *FASEB J* 2004;18:1001-3.

24. Documento US 2004/220124 A1

25. Documento US 2001/044420 A1

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts

<120> Procedimiento para terapia cancerosa con un parvovirus combinado con quimioterapia

<130> K 3313EP

<140> EP07025216.8

<141> 2007-12-28

35 <160> 6

<170> PatentIn versión 3,3

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador
<400> 1
tcaatgcgct caccatctct g 21
<210> 2
5 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
10 <400> 2
tcgtaggctt cgtcgtgttc t 21
<210> 3
<211> 20
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 3
aaaggagagg agccaagagc 20
20 <210> 4
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> Cebador
<400> 4
ggccaacca gtcaaagata 20
<210> 5
<211> 20
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 5
35 cccgcatcaa gaaatctcc 20
<210> 6

ES 2 368 597 T3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Cebador

<400> 6

tccatccagt catgccagtc 20

REVINDICACIONES

- 1.- Una composición farmacéutica que contiene un virus del género parvovirus y un agente quimioterapéutico, en la que el agente quimioterapéutico es gemcitabina o temozolodina.
- 5 2.- La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que contiene (a) el parvovirus y (b) el agente quimioterapéutico como entidades separadas.
- 3.- La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicho parvovirus es H1 (H1PV) o un parvovirus relacionado de roedores, en la que dicho parvovirus relacionado de roedores es Lulll, virus diminuto del ratón (MMV), parvovirus del ratón (MPV), virus diminuto de la rata (RMV), parvovirus de la rata (RPV) o virus de la rata (RV).
- 10 4.- La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para uso en un procedimiento de tratamiento del cáncer.
- 5.- La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicho cáncer es un tumor cerebral o cáncer pancreático.
- 15 6.- La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho cáncer pancreático es adenocarcinoma ductal pancreático (ACDP).
- 7.- La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicho tumor cerebral es un glioma, meduloblastoma o meningioma.
- 8.- La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicho glioma es un glioblastoma humano maligno.
- 20 9.- La composición farmacéutica para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en la que dicho parvovirus se administra mediante administración intratumoral.

Fig. 1

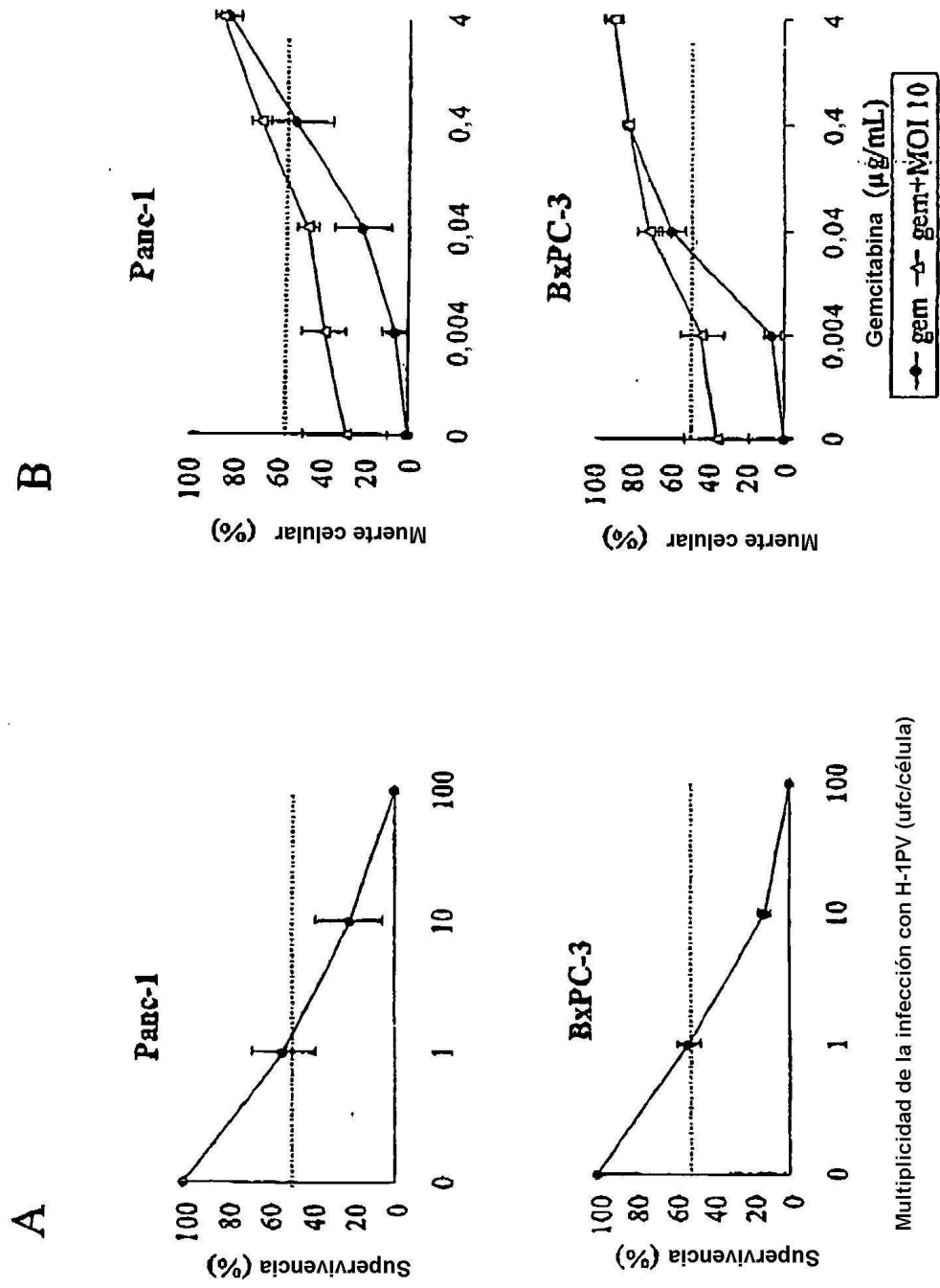
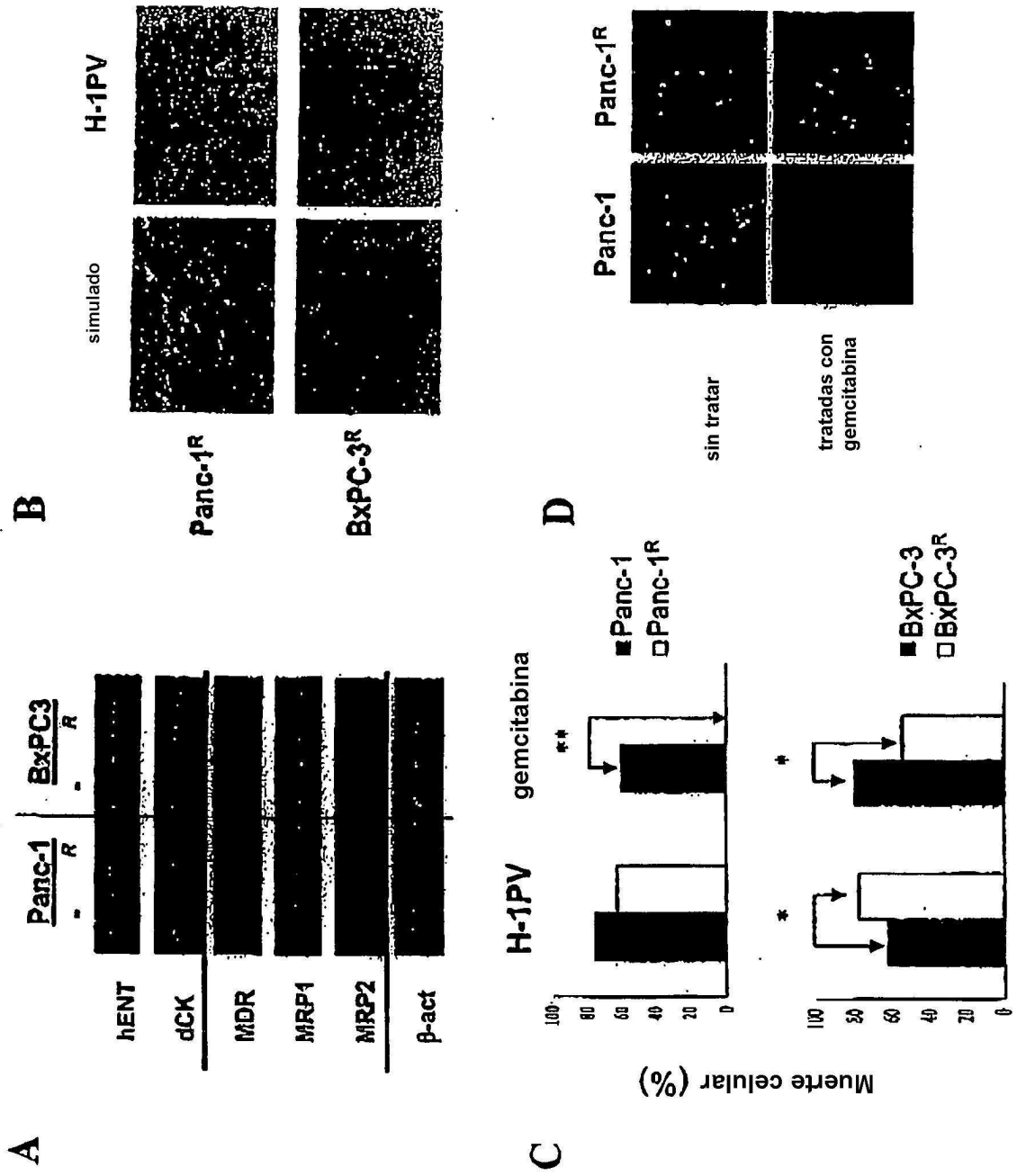
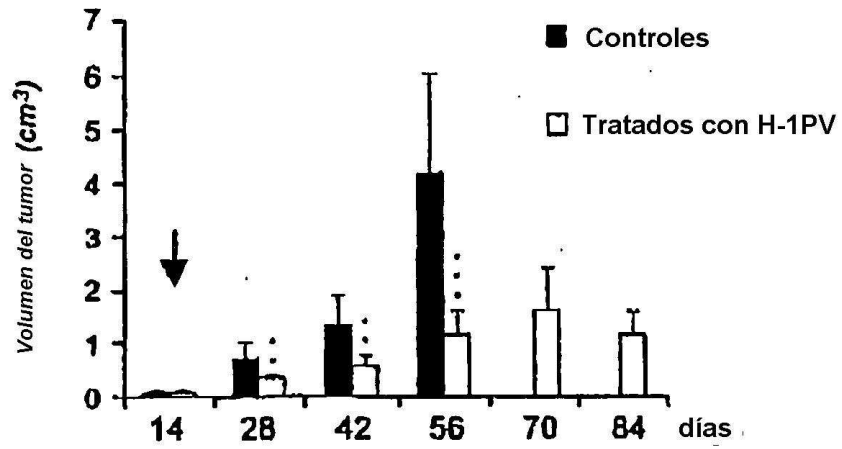


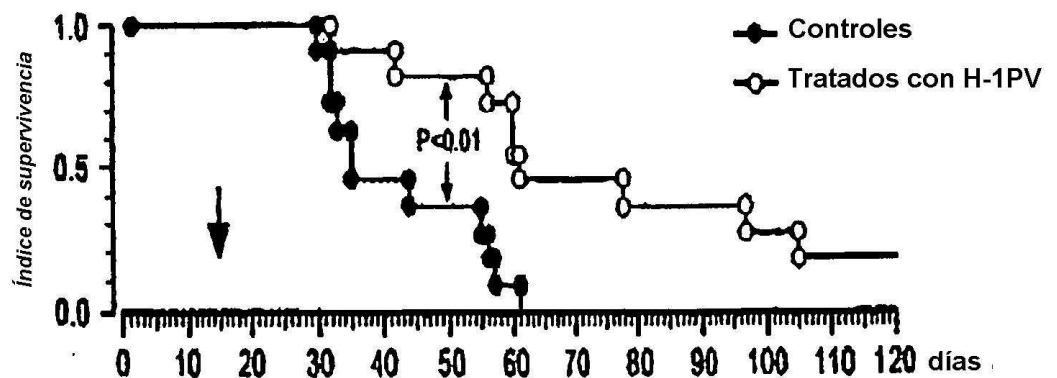
FIG. 2



A



B



Número en riesgo

Control	11	11	11	10	5	4	1	0	0	0	0	0
H1-Parvovirus	11	11	11	11	10	9	6	5	4	4	3	2

Fig. 3

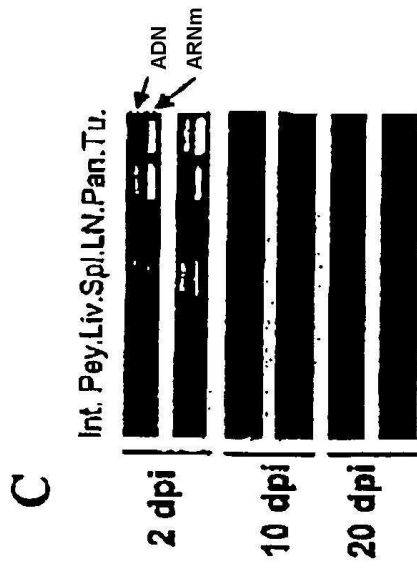
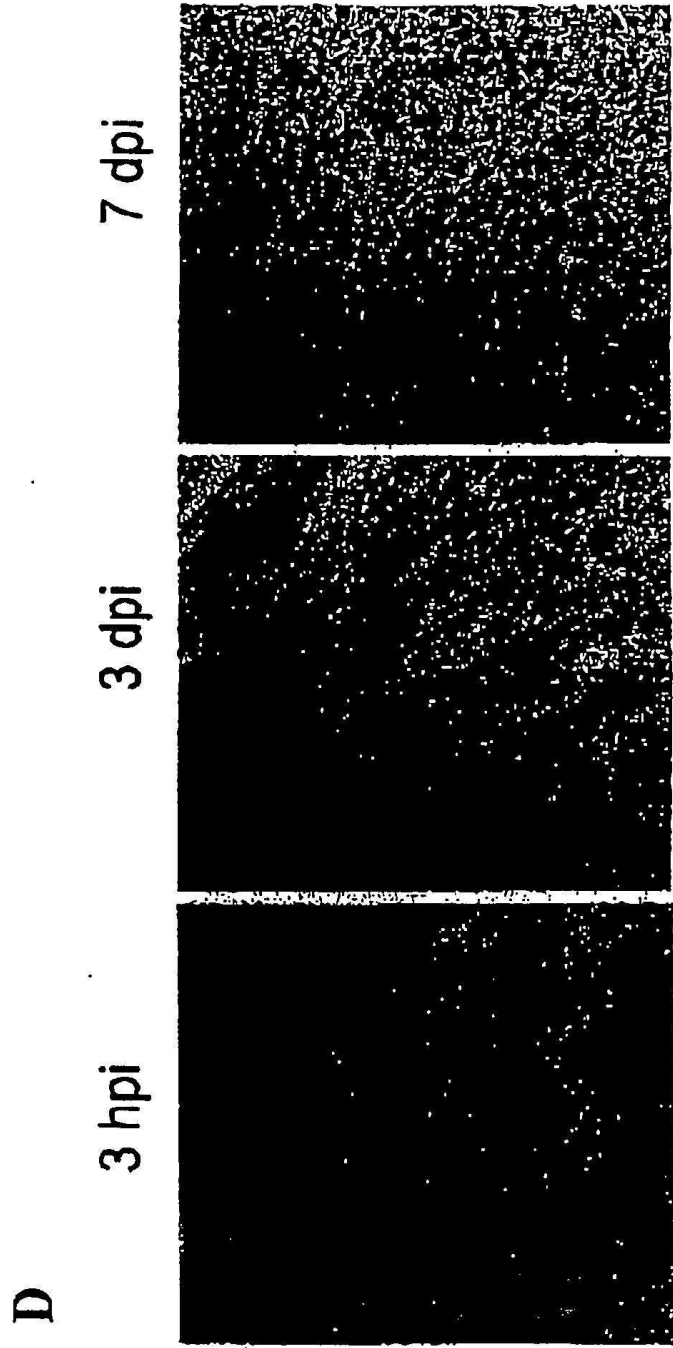
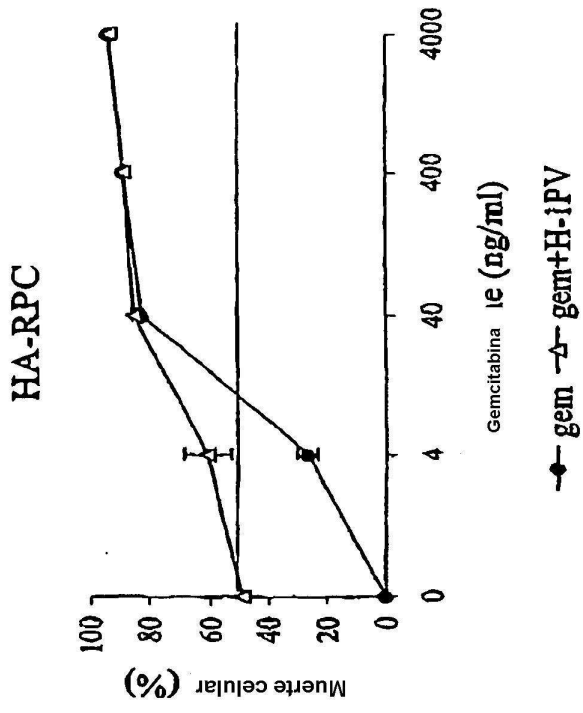


Fig. 3

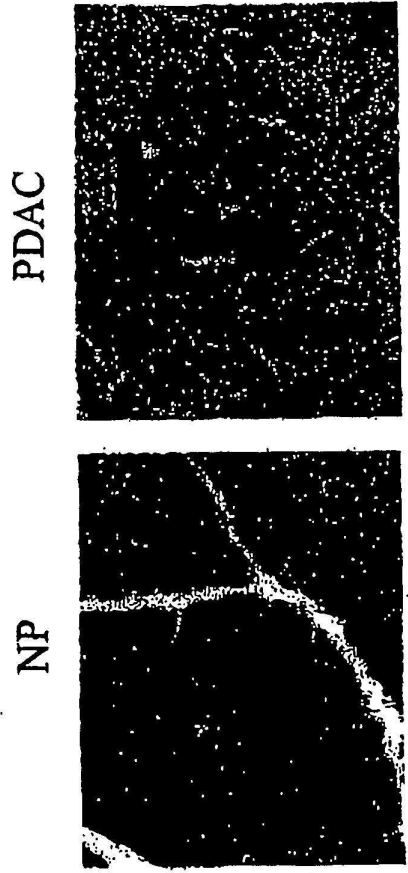


E

Fig. 3
(a)



(b)



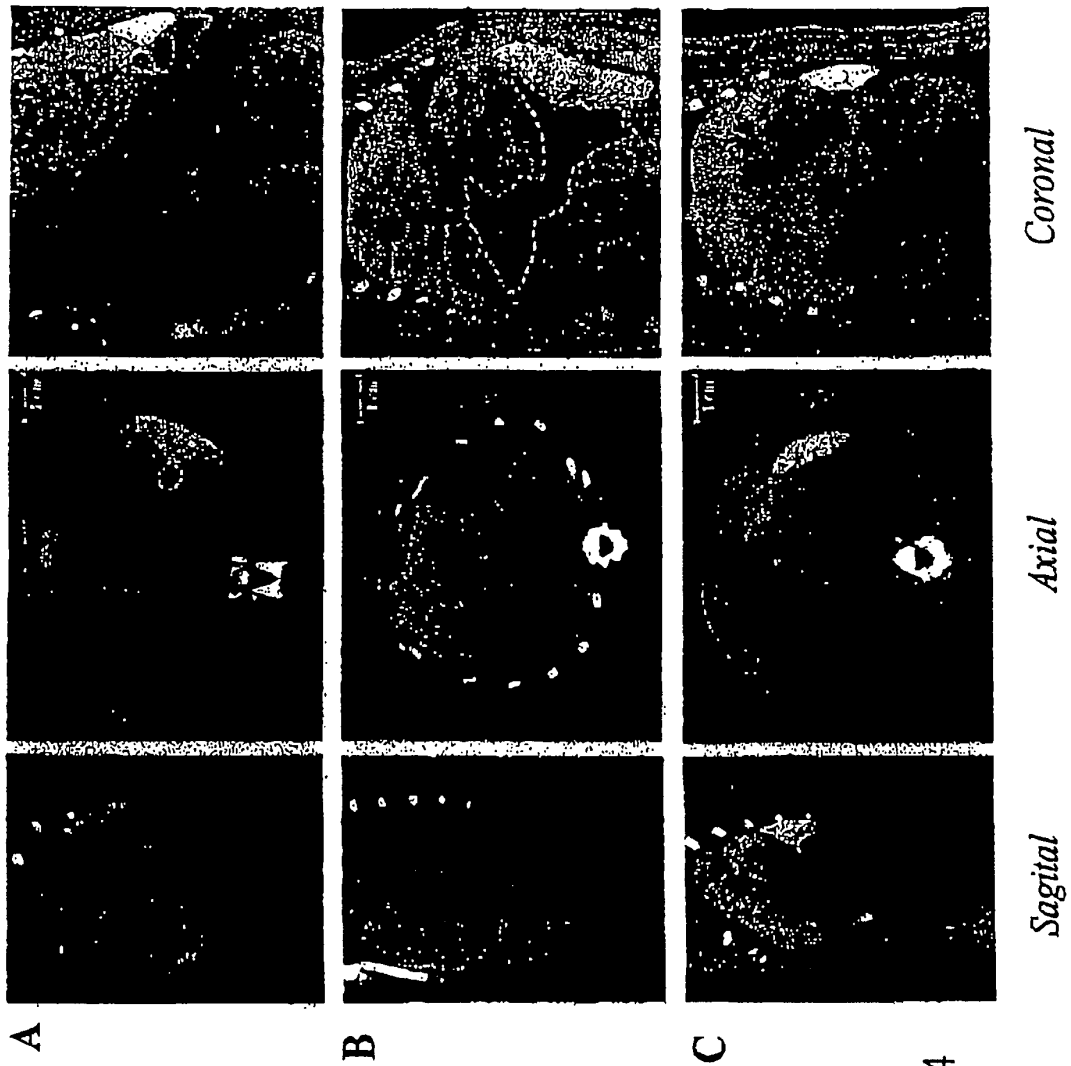
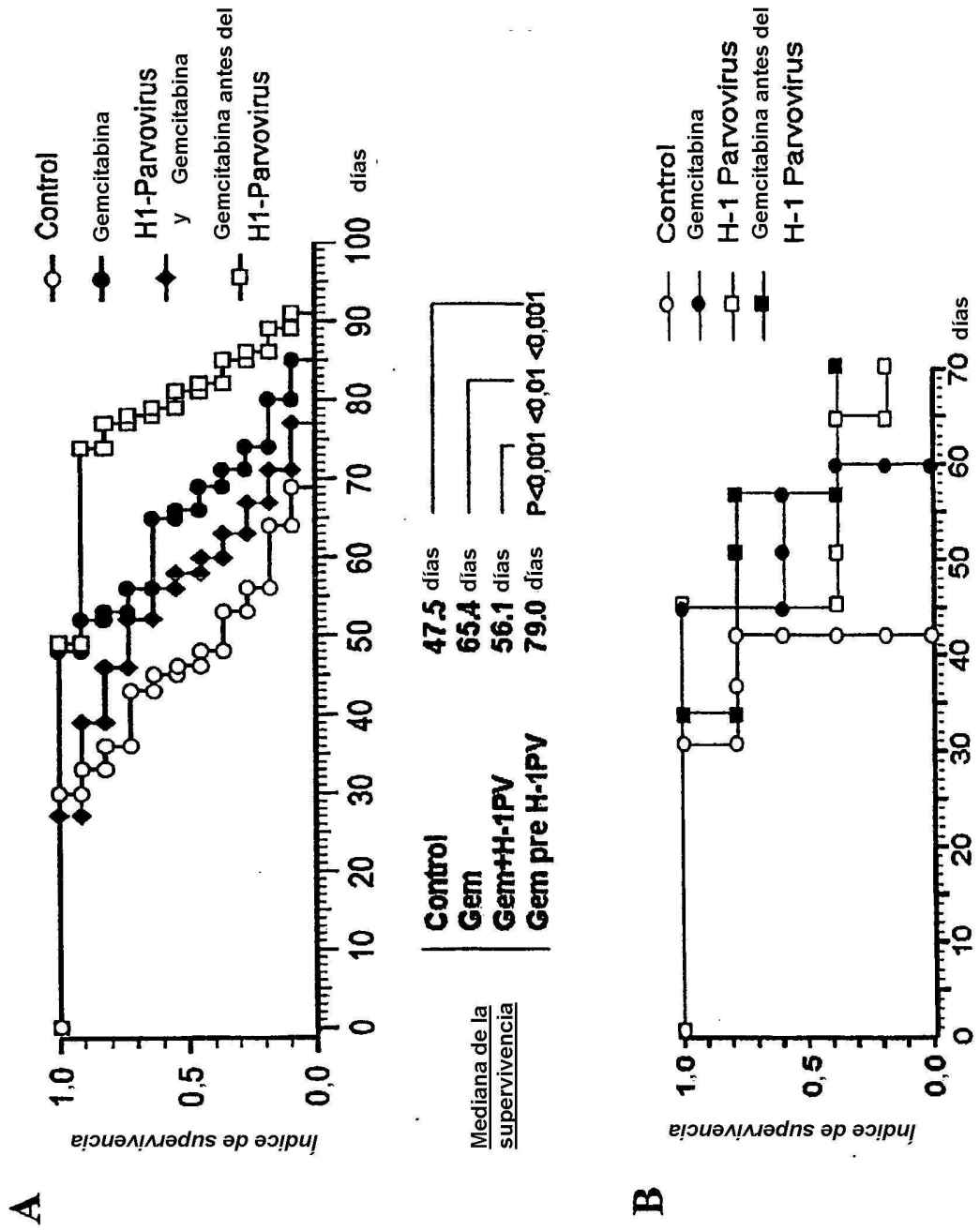


Fig. 4

5

10

FIG. 5



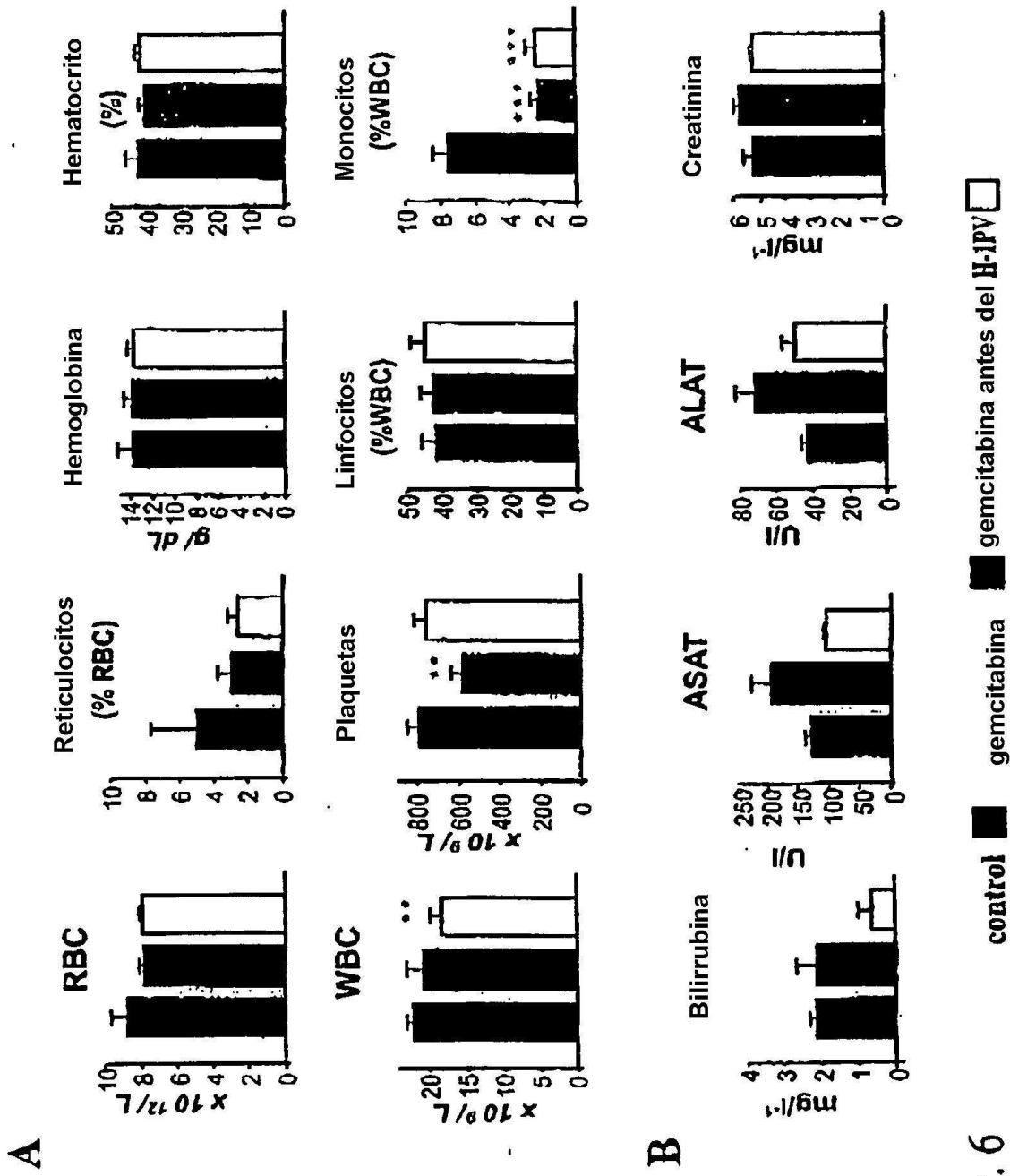


Fig. 6

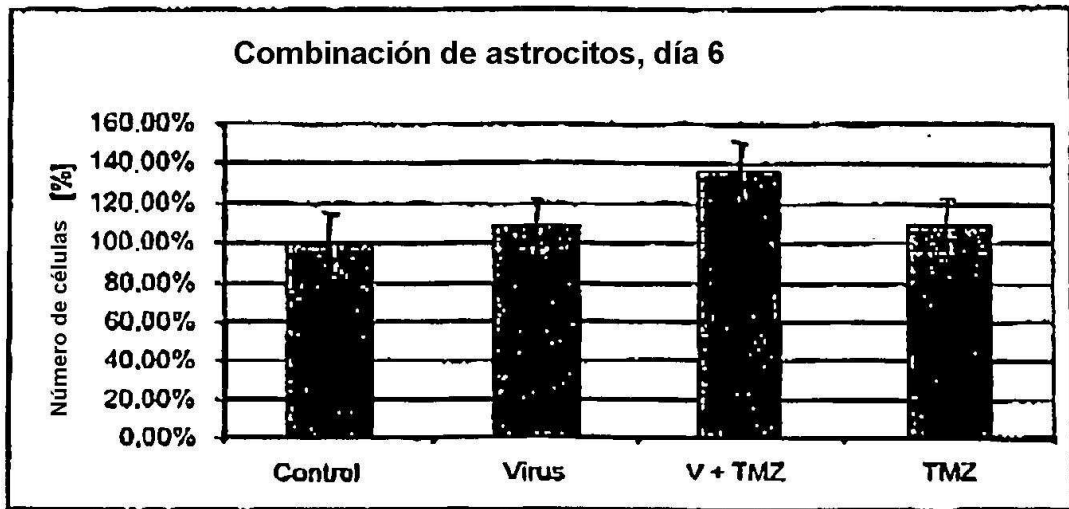


Fig. 7

5

10

15

20

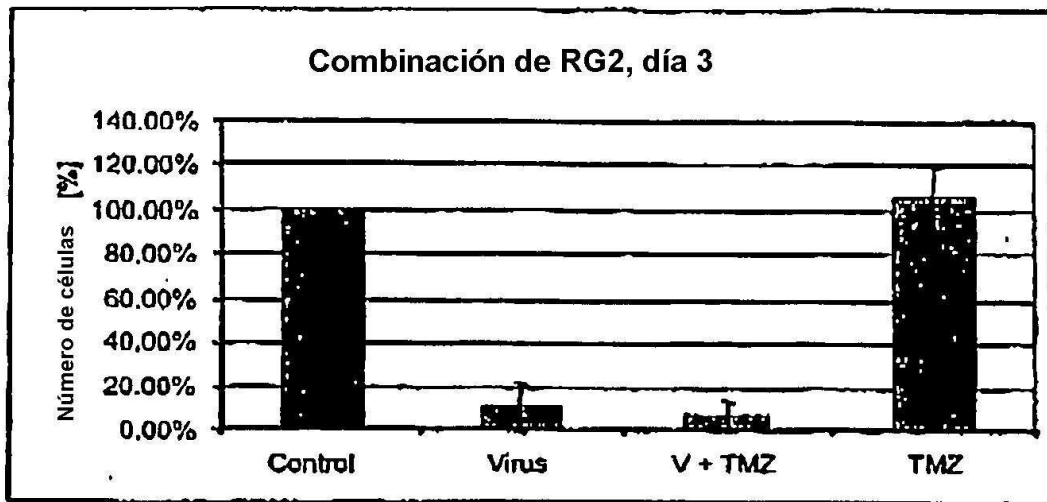


Fig. 8a

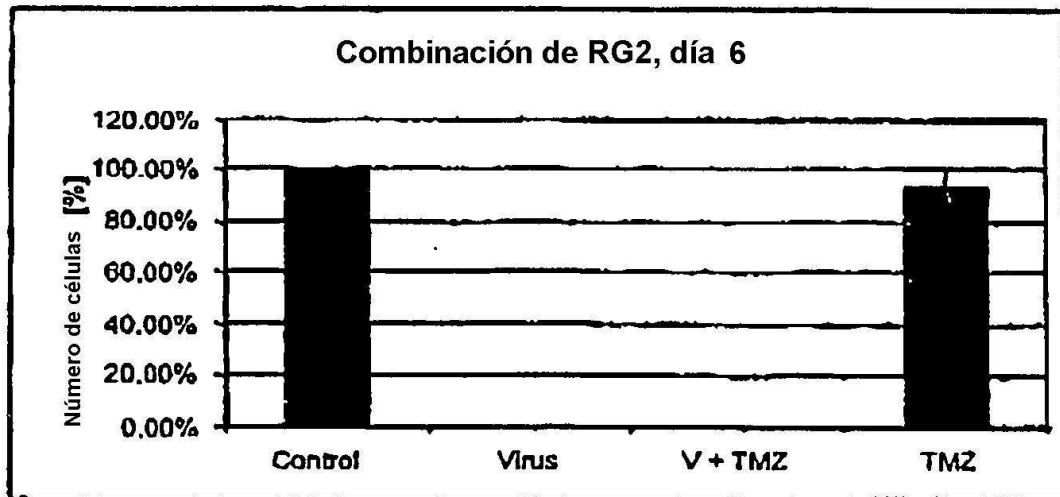


Fig. 8b

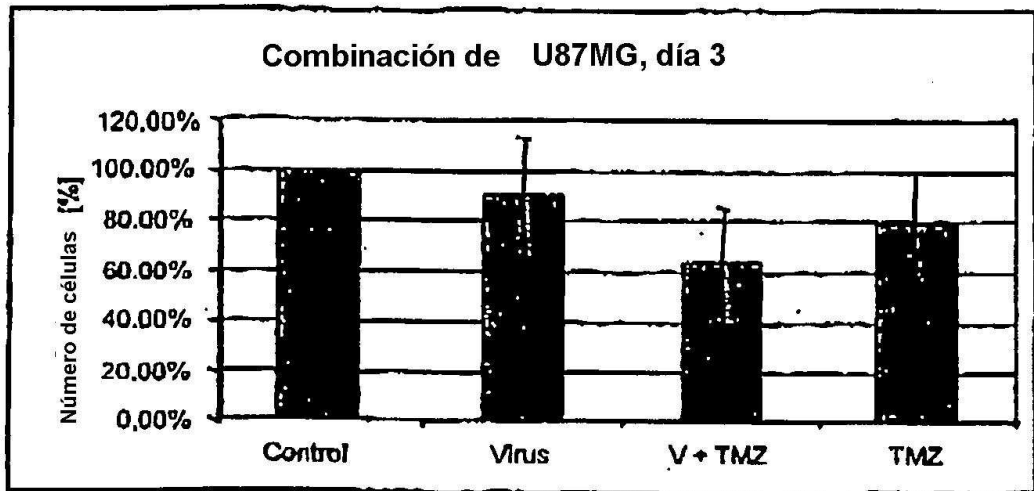


Fig. 9a

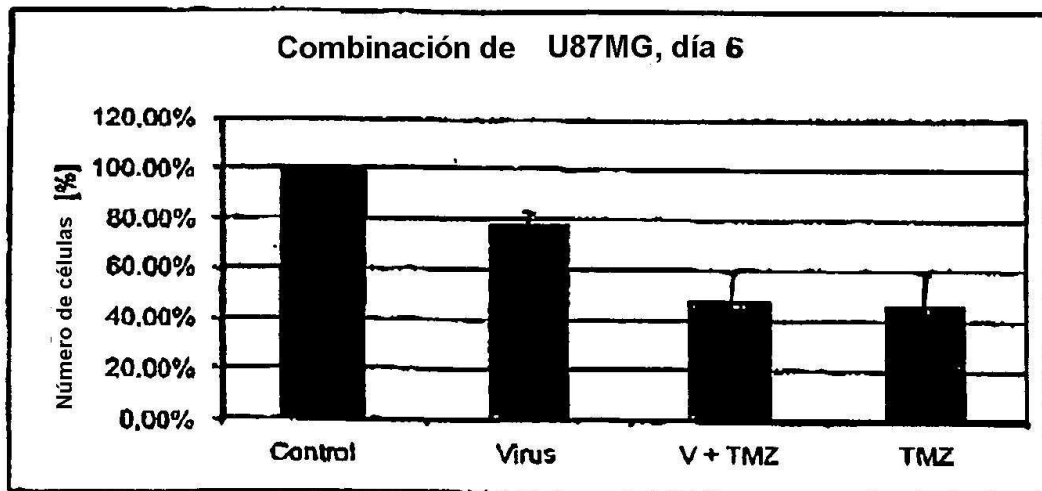


Fig. 9b

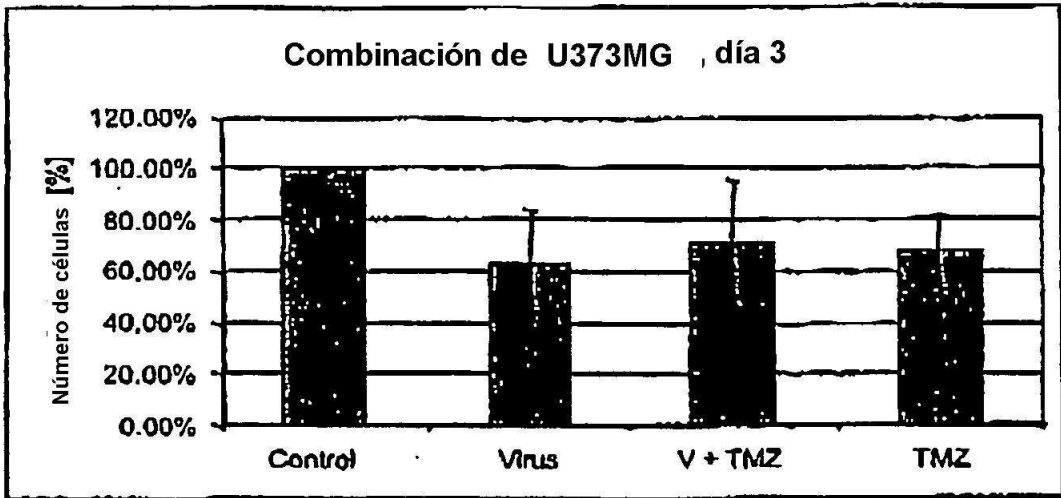


Fig. 10a

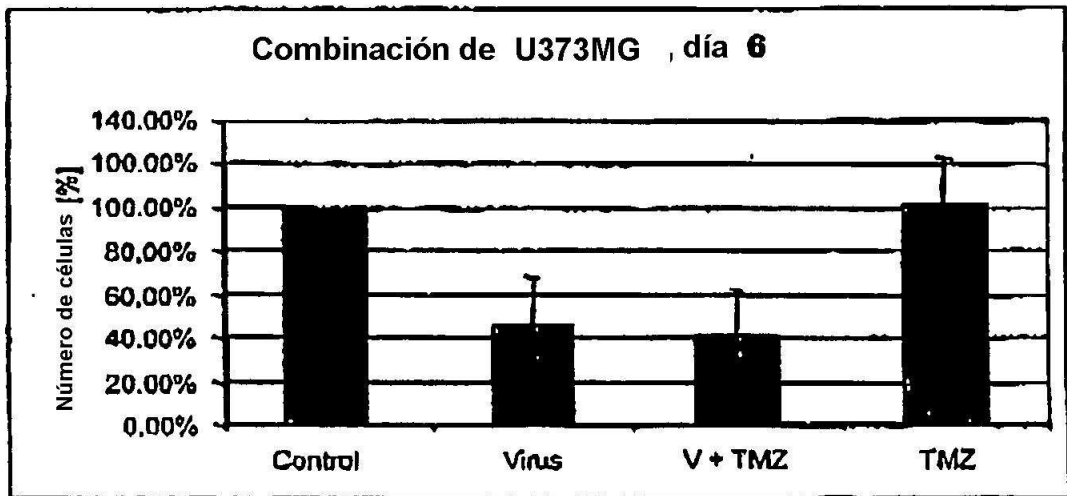


Fig. 10b

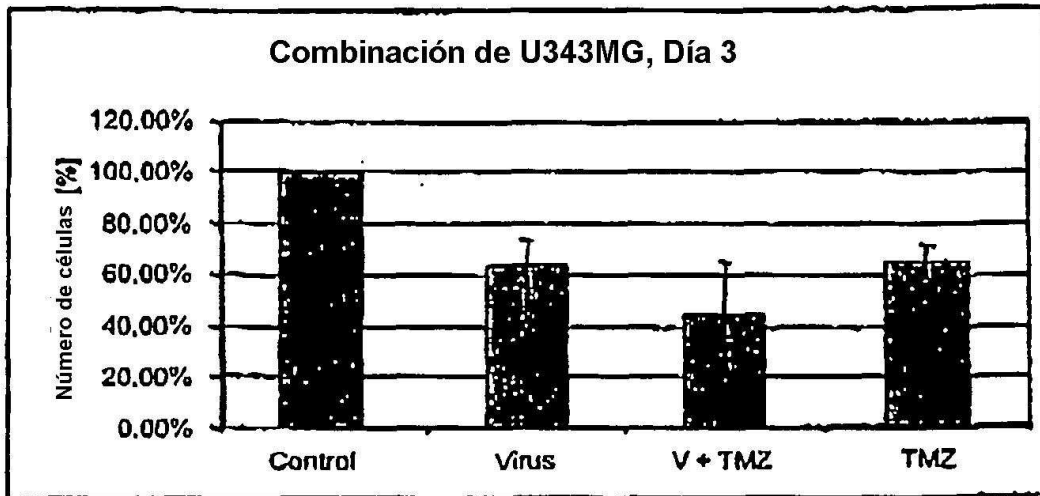


Fig. 11a

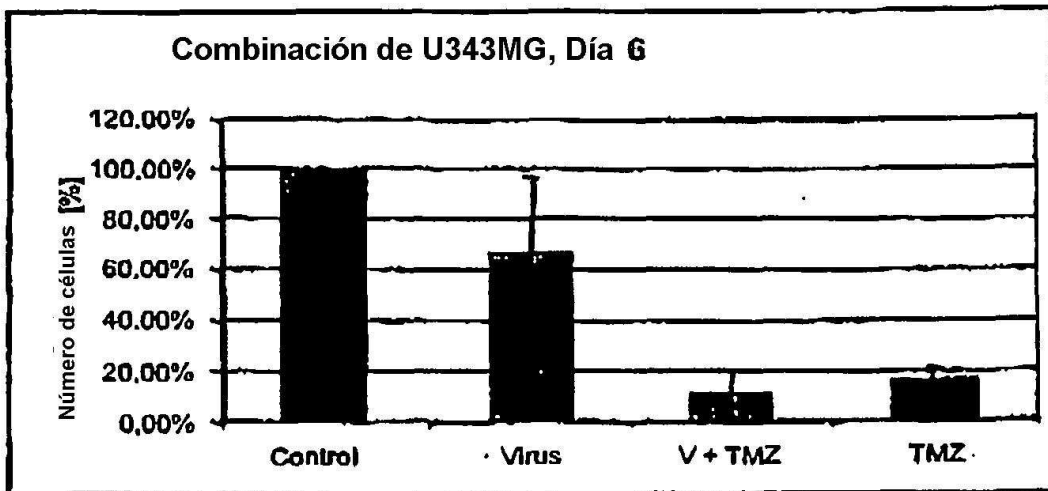


Fig. 11b

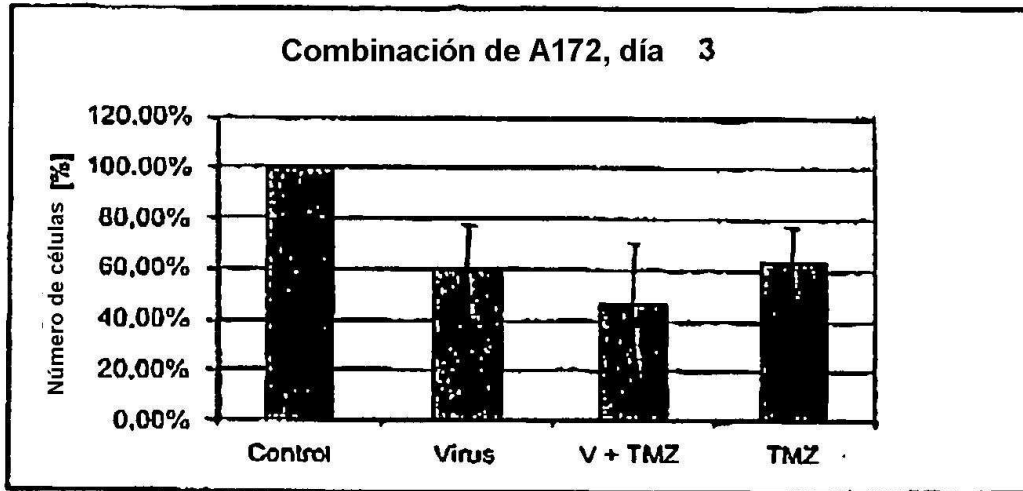


Fig. 12a

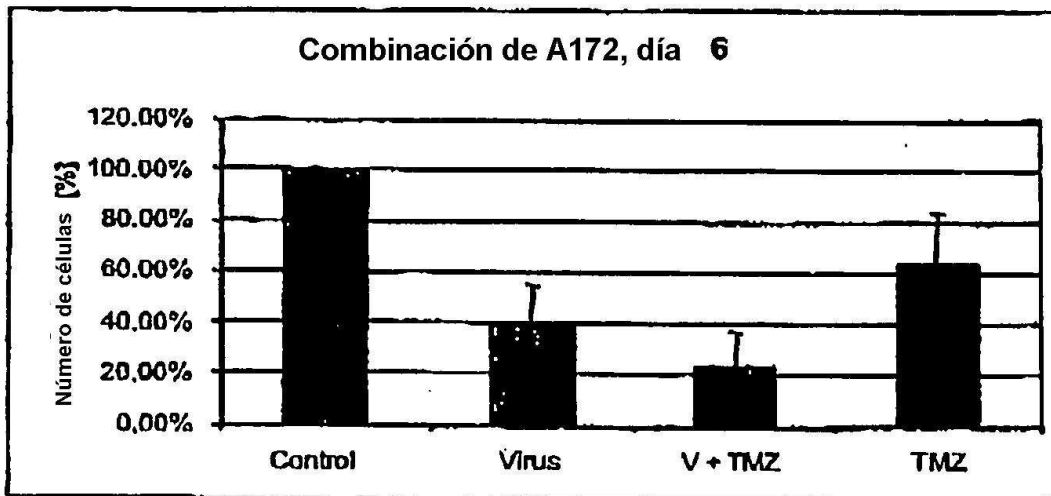
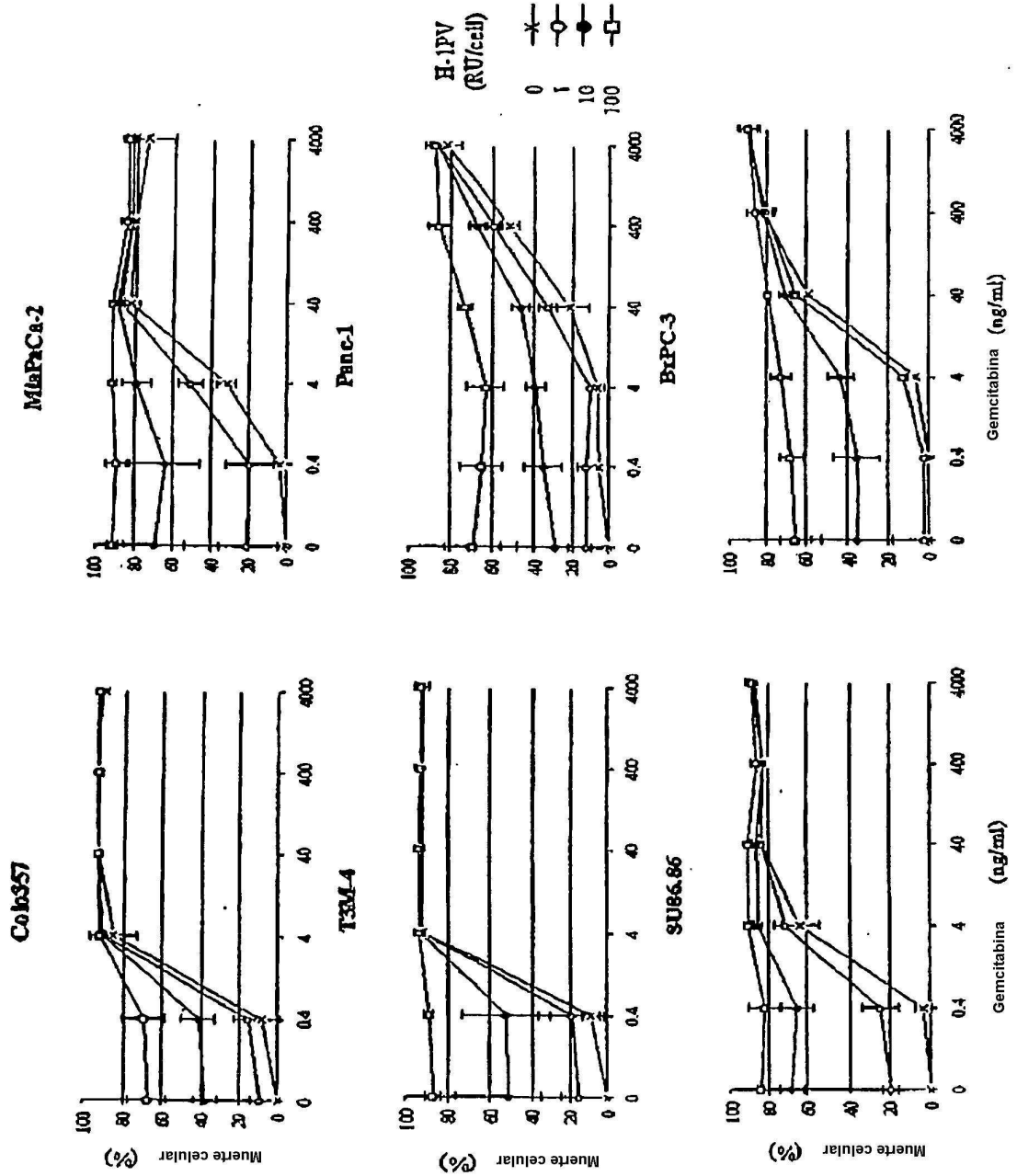


Fig. 12b

FIG. 13



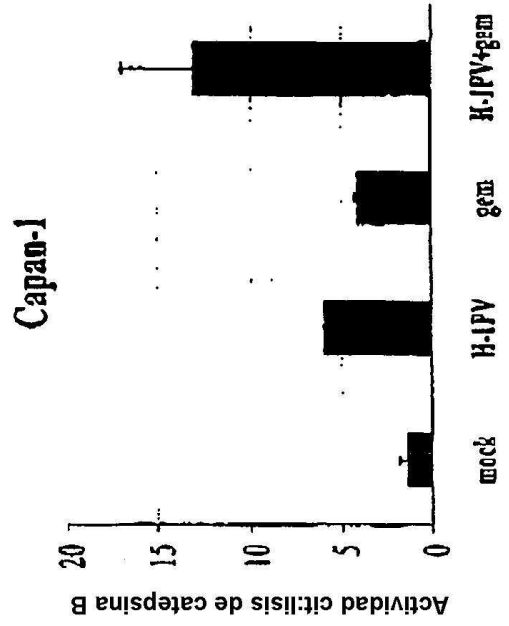
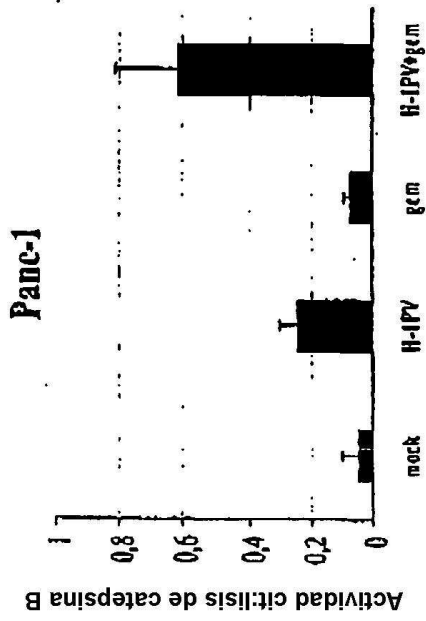
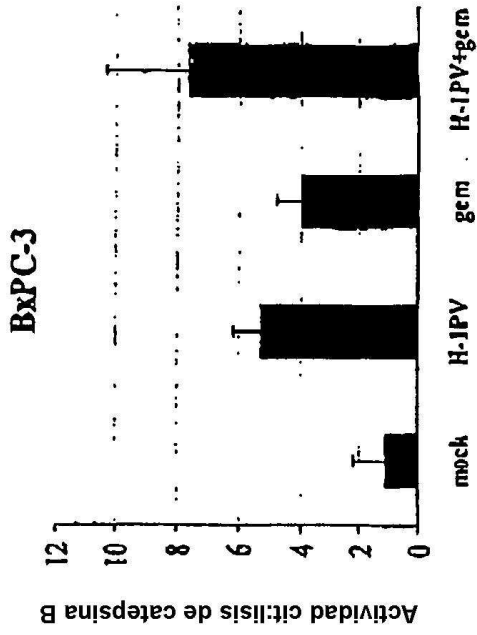
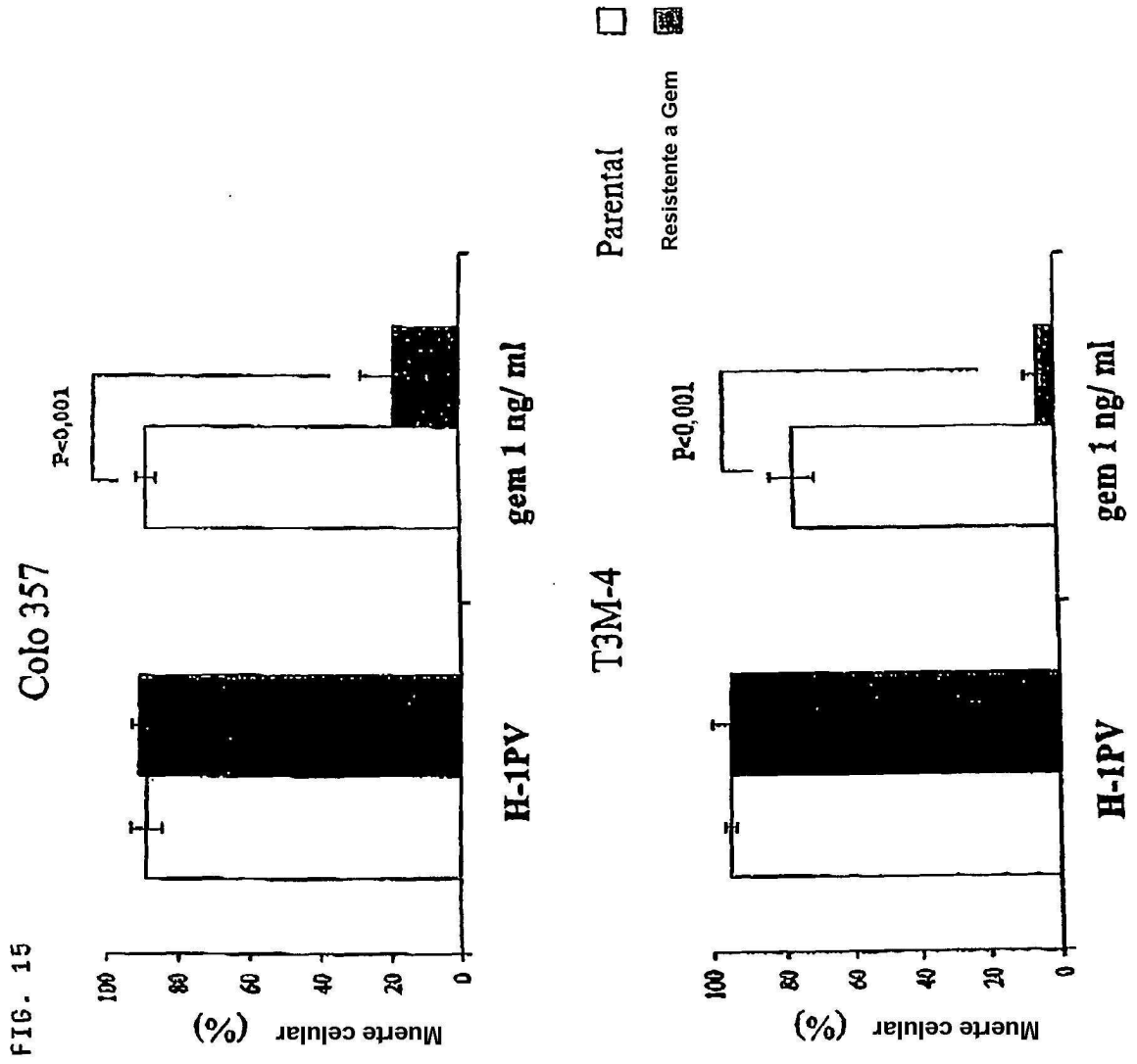


Fig. 14



5

10