

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 845**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07021569 .4**
- 96 Fecha de presentación: **25.06.2003**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1890151**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.02.2008**

54 Título: **Virus oncolíticos como agentes para la caracterización fenotípica de neoplasmas**

30 Prioridad:
28.06.2002 US 392031 P
29.01.2003 US 443188 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2012

73 Titular/es:
ONCOLYTICS BIOTECH INC.
SUITE 210 1167 KENSINGTON CRESCENT N. W.
CALGARY, AB T2N 1X7, CA

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

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 385 845 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

Virus oncolíticos como agentes para la caracterización fenotípica de neoplasmas

Esta invención se refiere a kits para detectar la causa subyacente de tumores, particularmente al uso de reovirus en el diagnóstico de tumores activados por ras. Además, también pueden usarse otros virus oncolíticos con diferentes selectividades en el diagnóstico de tipos particulares de tumores.

REFERENCIAS

Patente U.S. No. 6.136.307.

WO 94/18992, publicado el 1 de septiembre, 1994.

Bischoff JR. et al., "An Adenovirus Mutant that Replicates Selectively in p53-Deficient Human Tumor", *Science* 274(5286): 373-376 (1996).

Bos, J, "ras oncogenes in human cancer: a review", *Cancer Res.* 49: 4682-4689 (1989).

Campbell, S.L. et al., "Increasing complexity of Ras signaling", *Oncogene* 17: 1395-1413 (1998).

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).

Fueyo, J., et al., "A Mutant Oncolytic Adenovirus Targeting the Rb Pathway Produces Anti-Glioma Effect *in Vivo*", *Oncogene* 19(1): 2-12 (2000).

Gutkind, J.S., "The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades", *J Biol Chem.* 273: 1839-1842 (1998).

Kawagishi-Kobayashi, M. et al., *Mol. Cell. Biol.* 17: 4146-4158 (1997).

Nemunaitis, J., "Oncolytic viruses", *J. Invest. New Drugs* 17: 375-386 (1999).

Nibert, M.L., Schiff, L.A., y Fields, B.N., "Reoviruses and their replication", páginas 1557-96 en *Virology* (Fields et al., 3ª Edición), Lippencott-Raven Press, 1996.

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

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

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

Smith, C.A. et al., "Correlations among p53, Her-2/neu, and ras overexpression and aneuploidy by multiparameter flow cytometry in human breast cancer: evidence for a common phenotypic evolutionary pattern in infiltrating ductal carcinomas", *Clin Cancer Res.* 6(1): 112-26 (2000).

Ring, C.J.A., "Cytolytic viruses as potential anti-cancer agentes", *J. of Gen. Virology* 83(3): 491-502 (2002).

Con los desarrollos recientes en el campo de la oncología y la biología celular, los investigadores han sido capaces de comenzar programas de desarrollo de fármacos que tienen específicamente como diana la causa subyacente del cáncer, particularmente si la causa es la deficiencia o mutación de productos génicos específicos. Por lo tanto, si los médicos tienen las herramientas para determinar la causa del cáncer para cada paciente con cáncer, puede elegirse un régimen de tratamiento que está personalizado para la causa específica con una eficacia optimizada.

C.J.A. Ring describe el uso de virus citolíticos para tratar el cáncer.

El oncogén ras es el responsable de un gran número de tumores. Las mutaciones activadoras del gen ras en sí mismo aparecen en aproximadamente el 30% de todos los tumores humanos (Bos, J.L., 1989), principalmente en los carcinomas pancreático (90%), colorrectal esporádico (50%) y de pulmón (40%), así como en la leucemia mieloide (30%). Además de las mutaciones del gen ras en sí mismo, la activación de los factores aguas arriba o abajo de ras en la ruta ras también están asociadas con tumores. Por ejemplo, la sobreexpresión de HER2/Neu/ErbB2 o del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) es común en el cáncer de mama (25-30%) y la sobreexpresión del receptor del factor decrecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o del receptor de EGF es frecuente en gliomas y

glioblastomas (40-50%). Se sabe que tanto el receptor de EGF como el receptor de PDGF activan ras después de unirse a su respectivo ligando y v-erbB codifica un receptor activado constitutivamente que carece del dominio extracelular. Conjuntamente, se cree que la mutación directa del oncogén ras o un elemento aguas arriba en la ruta ras se produce en aproximadamente dos tercios de todos los tumores.

5 Dado el papel significativo de la ruta ras en la tumorigénesis, es deseable poder determinar si un tumor está asociado con la activación de la ruta ras de manera que pueda desarrollarse un régimen de tratamiento personalizado específicamente. Antes de la presente invención, sin embargo, no ha habido un método simple y sensible para diagnosticar la asociación de un cáncer con la ruta ras. Aunque las mutaciones en el gen estructural ras pueden detectarse con una alta sensibilidad por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hay muchos
10 otros factores en la ruta ras que pueden ser la causa de la alta actividad de ras, tales como mutaciones en las secuencias que flanquean el gen ras que dan lugar a un nivel de expresión anormalmente alto del producto génico ras, mutaciones en los genes estructurales de un factor aguas arriba o abajo de ras en la ruta ras o mutaciones reguladoras que afectan los niveles de expresión de estos factores aguas arriba o abajo. Por lo tanto, la PCR para el gen ras no identifica de manera precisa todos los cánceres asociados con la activación de la ruta ras. Todavía existe
15 la necesidad de un método simple y preciso para diagnosticar los tumores activados por ras.

Resumen de la invención

La invención es su forma más amplia se define por la reivindicación independiente 1:

Un kit para diagnosticar un neoplasma por fenotipo que comprende al menos dos virus oncolíticos, en el que cada virus oncolítico se replica selectivamente en las células neoplásicas que tienen un fenotipo seleccionado del grupo
20 que consiste en activación de la ruta ras, resistencia a interferón, deficiencia de p53 y deficiencia de Rb y en el que cada uno de los virus oncolíticos se replica selectivamente en células neoplásicas que tienen un fenotipo diferente seleccionado del grupo que consiste en activación de la ruta ras, resistencia a interferón, deficiencia de p53 y deficiencia de Rb.

Las realizaciones preferidas se definen en las reivindicaciones dependientes 2-15.

25 Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un kit para diagnosticar neoplasmas que tienen fenotipos particulares, particularmente neoplasmas mediados por una actividad anormalmente alta de la ruta ras, usando reovirus u otros virus oncolíticos similares. El reovirus no se replica en las células normales. Sin embargo, el reovirus se replica selectivamente en las células con una ruta ras activada, lo que da lugar a la muerte de estas células. La ruta ras en
30 estas células puede estar activada debido a mutaciones del gen estructural ras o anomalías de cualquier otro factor en la ruta ras que da lugar a la activación de la ruta. Por lo tanto, una célula que se vuelve neoplásica debido, al menos en parte, a actividades elevadas en la ruta ras puede diagnosticarse por su susceptibilidad a la replicación de reovirus.

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un kit para diagnosticar un neoplasma por fenotipo que comprende al menos dos virus oncolíticos, en el que cada virus oncolítico se replica selectivamente en las células neoplásicas que tienen un fenotipo seleccionado del grupo que consiste en activación de la ruta ras, resistencia a interferón, deficiencia de p53 y deficiencia de Rb y en el que cada uno de los virus oncolíticos se replica selectivamente en las células neoplásicas que tienen un fenotipo diferente,

en el que los virus oncolíticos se seleccionan del grupo que consiste en reovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV), ONYX-015, Delta24, adenovirus mutados en la región VA1, virus de vaccinia mutados en la región K3L y/o E3L, virus parapoxvirus orf mutados en el gen OV20.0L, virus de influenza mutados en el gen NS-1 y virus del herpes mutados en el gen $\gamma_134.5$.

En la presente invención puede usarse cualquier reovirus capaz de replicarse en células activadas por ras, por ejemplo, un reovirus de mamífero o un reovirus aviar. El reovirus de mamífero es preferiblemente un reovirus de serotipo 3 y más preferiblemente un reovirus de la cepa Dearing.

El neoplasma puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer adrenal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer hematopoyético y cáncer del sistema nervioso central y periférico.

También se describe un método para diagnosticar un neoplasma activado por ras en un animal, que comprende:

- 50 (a) extraer una muestra biológica del animal, en el que la muestra comprende células;
- (b) poner en contacto la muestra con un reovirus en condiciones que permitan que el reovirus se replique en células activadas por ras;
- (c) determinar la capacidad del reovirus de replicarse en la muestra; e

(d) identificar que el animal tiene un neoplasma activado por ras si el reovirus puede replicarse en la muestra.

El animal es preferiblemente un mamífero, particularmente un ser humano. Puede usarse cualquier reovirus capaz de replicarse en células activadas por ras, por ejemplo un reovirus de mamífero o un reovirus aviar. El reovirus de mamífero es preferiblemente un reovirus de serotipo 3 y más preferiblemente un reovirus de la cepa Dearing.

5 Preferiblemente, la muestra biológica es de un animal que presenta un neoplasma seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer adrenal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer hematopoyético y cáncer del sistema nervioso central y periférico.

10 En cualquier realización de la presente invención, el reovirus puede ser un reovirus recombinante. El reovirus recombinante puede generarse por co-infección de células de mamífero con diferentes subtipos de reovirus. El reovirus recombinante puede ser natural o no natural. El reovirus recombinante puede ser de dos o más cepas de reovirus, particularmente dos o más cepas de reovirus seleccionadas del grupo que consiste en cepa Dearing, cepa Abney, cepa Jones y cepa Lang. El reovirus recombinante también puede resultar de la reagrupación de reovirus de diferentes serotipos, tales como los seleccionados del grupo que consiste en reovirus de serotipo 1, reovirus de serotipo 2 y reovirus de serotipo 3. El reovirus recombinante puede comprender secuencias codificadoras variantes naturales de la proteína de la de la cubierta o secuencias codificadoras mutadas de la proteína de la cubierta.

15 Además de los reovirus, varios virus oncolíticos adicionales también son selectivos para neoplasmas activados por ras y, por lo tanto, pueden usarse para poner en práctica la presente invención de la misma manera que los reovirus. Estos virus incluyen, sin estar limitados a, adenovirus mutados en la región VA1, virus de vaccinia mutados en la región K3L y/o E3L, virus parapoxvirus orf mutados en el gen OV20.0L, virus de influenza mutados en el gen NS-1 o virus del herpes mutados en el gen γ_1 34.5. También se describe un método para detectar células neoplásicas activadas por ras en una muestra biológica, que comprende poner en contacto la muestra con un virus oncolítico que se replica selectivamente en células deficientes de PKR y determinar la capacidad del virus para replicarse en la muestra, en el que la capacidad del virus para replicarse indica la presencia de células neoplásicas activadas por ras en la muestra. Preferiblemente, el virus oncolítico se selecciona del grupo que consiste en adenovirus mutados en la región VA1, virus de vaccinia mutados en la región K3L y/o E3L, virus parapoxvirus orf mutados en el gen OV20.0L, virus de influenza mutados en el gen NS-1 y virus del herpes mutados en el gen γ_1 34.5.

20 Además, muchos otros virus oncolíticos que son capaces de infectar selectivamente células tumorales particulares también son útiles en la presente invención de la misma manera que los reovirus. Por ejemplo, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) puede usarse para diagnosticar tumores resistentes a interferón, el virus ONYX-015 puede usarse para diagnosticar tumores deficientes de p53 y el virus Delta24 puede usarse para diagnosticar tumores deficientes de Rb. Sin embargo, el virus oncolítico útil en la presente invención no es preferiblemente un adenovirus, particularmente no es el virus ONYX-015.

35 Un aspecto de la presente invención proporciona un kit que comprende un reovirus y un medio para detectar la replicación del reovirus. El medio de detección es una pareja de cebadores específicos para el ácido nucleico del reovirus y puede incluir opcionalmente reactivos para PCR. El medio de detección también puede ser un anticuerpo específico para una proteína del reovirus, así como reactivos auxiliares tales como anticuerpos secundarios. El medio de detección puede ser adicionalmente portaobjetos y agentes de tinción adecuados para observar la morfología de las células infectadas con el microscopio o medios de cultivo de virus y células que se usan para determinar la titulación del reovirus. De manera similar, la presente invención también proporciona kits que comprenden otro virus oncolítico capaz de replicarse en células tumorales específicas, así como medios para detectar la replicación del virus. Los ejemplos de estos virus incluyen, sin estar limitados a, VSV, virus ONYX-015 y virus Delta24.

40 Otro aspecto de esta invención proporciona un kit que comprende al menos dos virus oncolíticos que pueden usarse para caracterizar el fenotipo de tumores según la presente invención. Los virus son preferiblemente selectivos para neoplasmas con diferentes fenotipos. Preferiblemente, los virus se seleccionan del grupo que consiste en reovirus, VSV, el virus ONYX-015 y el virus Delta24.

Otro aspecto más de esta descripción proporciona un kit que comprende un virus útil para diagnosticar un neoplasma de un fenotipo particular, así como un agente terapéutico selectivo para el neoplasma.

50 Además, como los virus oncolíticos se replican selectivamente en las células neoplásicas y no en las células normales, otro aspecto de la presente descripción proporciona un método para diagnosticar la presencia de un neoplasma en un mamífero, que comprende poner en contacto una muestra de células de dicho mamífero con un virus oncolítico, en el que la capacidad de dicho virus para replicarse en dicha muestra indica la presencia de un neoplasma en dicho mamífero.

55 La presente invención proporciona un kit para diagnosticar neoplasmas que tienen fenotipos particulares usando al menos dos virus oncolíticos. En particular, los tumores mediados por una actividad anormalmente alta de la ruta ras pueden diagnosticarse usando reovirus. El reovirus no se replica en las células normales. Sin embargo, el reovirus se replica selectivamente en células con una ruta ras activada, lo que da lugar a la muerte de estas células. Por lo

tanto, un tumor activado por ras puede diagnosticarse por su susceptibilidad a la replicación del reovirus. El diagnóstico facilitará el tratamiento o mejora del tumor con una mayor eficacia.

5 Esta invención puede aplicarse además al diagnóstico de otros tumores, tales como tumores resistentes a interferón, tumores deficientes de p53 y tumores deficientes de Rb usando kits útiles en el diagnóstico o tratamiento descrito en la presente memoria.

Antes de describir la invención con más detalle, se definen los términos usados en esta solicitud como sigue a no ser que se indique otra cosa.

Definiciones

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

Un neoplasma puede ser benigno (tumor benigno) o maligno (tumor maligno o cáncer). Los tumores malignos pueden clasificarse de manera amplia en tres tipos principales. Los neoplasmas malignos que surgen de estructuras epiteliales se denominan carcinomas, los neoplasmas malignos que se originan a partir de tejidos conectivos tales como músculo, cartílago, grasa o hueso se denominan sarcomas y los tumores malignos que afectan a las
20 estructuras hematopoyéticas (estructuras relacionadas con la formación de células sanguíneas) incluyendo los componentes del sistema inmune, se denominan leucemias y linfomas. Otros neoplasmas incluyen, pero no están limitados a, neurofibromatosis.

Una "célula deficiente de PKR" es una célula en la que PKR no está activado como en las células normales. Dicha deficiencia de PKR puede deberse, por ejemplo, a mutación en el gen PKR o a un nivel reducido de la proteína o actividad PKR. Por ejemplo, las células neoplásicas activadas por ras son deficientes de PKR porque la ruta ras
25 activada bloquea la fosforilación de PKR. Los ensayos para los niveles de la proteína o actividad PKR son conocidos en la técnica.

Tal y como se usa en la presente memoria, "células neoplásicas activadas por ras" o "células neoplásicas mediadas por ras" se refiere a células que proliferan a una velocidad anormalmente alta debido, al menos en parte, a la
30 activación de la ruta ras. La ruta ras puede activarse mediante mutación del gen estructural ras, nivel elevado de la expresión génica de ras, estabilidad elevada del mensajero del gen ras o cualquier mutación u otro mecanismo que da lugar a la activación de ras o de un factor o factores aguas abajo o arriba de ras en la ruta ras, incrementando de esta maneja la actividad de la ruta ras. Por ejemplo, la activación del receptor de EGF, receptor de PDGF o Sos resulta en la activación de la ruta ras. Las células neoplásicas mediadas por ras incluyen, pero no están limitadas a,
35 células cancerosas mediadas por ras, que son células que proliferan de una manera maligna debido a la activación de la ruta ras.

Un "tumor activado por ras" es un tumor en el que la ruta ras está activada.

Un "tumor resistente a interferón" o "un tumor que tiene un fenotipo de resistencia a interferón" es un tumor que no puede tratarse ni mejorarse con interferón alfa, beta o gamma.

40 Un "tumor deficiente de p53" o "un tumor que tiene el fenotipo de deficiencia de p53" es un tumor en el que el nivel del supresor tumoral celular p53 es menor que el de una célula normal.

Un "tumor deficiente de Rb" o "un tumor que tiene el fenotipo de deficiencia de Rb" es un tumor en el que el nivel del supresor tumoral celular Rb es menor que el de una célula normal.

45 Un "virus oncolítico" es un virus que mata selectivamente a las células neoplásicas. La muerte de las células neoplásicas puede detectarse por cualquier método establecido en la técnica, tal como determinando el recuento de células viables, efecto citopático, apoptosis de las células neoplásicas, síntesis de proteínas virales en las células neoplásicas (por ejemplo, por marcaje metabólico, análisis Western de las proteínas virales o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa de los genes virales necesarios para la replicación) o reducción del tamaño de un tumor.

50 Tal y como se usa en la presente memoria, "reovirus" se refiere a cualquier virus clasificado en el género reovirus. El nombre reovirus (Respiratory and enteric orphan virus) es un acrónimo descriptivo que sugiere que estos virus, aunque no están asociados con ningún estado patológico conocido en los seres humanos, puede aislarse de los tractos respiratorio y entérico. El término "reovirus" se refiere a todos los virus clasificados en el género reovirus.

El reovirus humano consiste en 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 pueden identificarse fácilmente tomando como base ensayos de neutralización e inhibición de hemaglutinina (Véase, por ejemplo, Nibert *et al.*, 1996).

5 El reovirus puede ser natural o modificado. El reovirus es "natural" cuando puede asilarse a partir de una fuente natural y no ha sido modificado intencionadamente por seres humanos en el laboratorio. Por ejemplo, el reovirus puede ser de una "fuente de campo", esto es, de un ser humano que se ha infectado con el reovirus.

10 Los reovirus pueden modificarse y aún así ser capaces de infectar lícitamente una célula de mamífero que tiene una ruta ras activa. El reovirus puede pretratarse químicamente o bioquímicamente (por ejemplo, por tratamiento con una proteasa, tal como quimiotripsina o tripsina) antes de la administración a las células en proliferación. El pretratamiento con una proteasa elimina la cubierta externa o cápside del virus y puede incrementar la infectividad del virus. El reovirus puede estar recubierto en un liposoma o micela (Chandron y Nibert, 1998) para reducir o evitar una respuesta inmune de un mamífero que ha desarrollado inmunidad frente al reovirus. Por ejemplo, el virión puede tratarse con quimiotripsina en presencia de concentraciones para formar micelas de detergentes sulfato de alquilo para generar una nueva partícula de subvirión infecciosa.

15 El reovirus puede ser un reovirus recombinante que resulta de la recombinación/reagrupación de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente distintos. El reovirus recombinante puede ser de dos o más tipos de reovirus con fenotipos patógenos diferentes de manera que contiene diferentes determinantes antigénicos, reduciendo o evitando de esta manera una respuesta inmune por un mamífero expuesto previamente a un subtipo de reovirus. Los reovirus recombinantes también pueden presentar diferentes actividades biológicas (por ejemplo actividades de replicación en células neoplásicas y biodistribución) comparadas con los reovirus originales. La recombinación/reagrupación de segmentos genómicos de reovirus puede ocurrir en la naturaleza después de la infección de un organismo huésped con al menos dos reovirus genéticamente distintos. Los viriones recombinantes también pueden generarse en cultivo celular, por ejemplo, por co-infección de células huéspedes permisivas con reovirus genéticamente distintos (Nibert *et al.* 1996).

25 De acuerdo con esto, la invención contempla el uso de reovirus recombinantes que resultan de la reagrupación de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente distintos, incluyendo pero no limitado a, reovirus humano, tal como tipo 1 (por ejemplo, cepa Lang), tipo 2 (por ejemplo, cepa Jones) y tipo 3 (por ejemplo, cepa Dearing o cepa Abney), reovirus de mamíferos no humanos o reovirus aviar. La invención contempla además el uso de reovirus recombinantes que resultan de la reagrupación de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente distintos en los que al menos un virus parental se modifica por ingeniería genética, comprende uno o más segmentos genómicos sintetizados químicamente, ha sido tratado con mutágenos químicos o físicos o es en sí mismo el resultado de un evento de recombinación. La invención contempla además el uso de reovirus recombinante que ha experimentado recombinación en presencia de mutágenos químicos, incluyendo pero no limitado a sulfato de dimetilo y bromuro de etidio, o mutágenos físicos, incluyendo pero no limitado a luz ultravioleta y otras formas de radiación.

30 La invención contempla además reovirus recombinantes que comprenden deleciones o duplicaciones en uno o más segmentos genómicos, que comprenden información genética adicional como resultado de recombinación con el genoma de una célula huésped o que comprenden genes sintéticos.

40 "Caracterización fenotípica" de un tumor significa clasificar un tumor de acuerdo con su fenotipo. Por ejemplo, los fenotipos de los tumores incluyen activación de la ruta ras, resistencia a interferón, deficiencia de p53 y deficiencia de Rb. Los fenotipos no son mutuamente excluyentes, es decir, un tumor puede caracterizarse fenotípicamente en más de una clase.

Una "muestra biológica" es una muestra recogida de un sujeto biológico, tal como un animal.

45 El kit de la presente invención es útil en la caracterización fenotípica precisa de tumores, facilitando de esta manera el desarrollo de un régimen de tratamiento que está personalizado para un tumor específico. Los reovirus pueden usarse para infectar una muestra biológica recogida de un animal que presenta un tumor. Como los reovirus infectan selectivamente las células neoplásicas activadas por ras pero no las células normales o las células tumorales en las que la ruta ras no está activada, el método permite al médico determinar de manera precisa si el tumor está asociado con la activación de la ruta ras. Si se diagnostica que está activado por ras, el tumor puede tratarse con regímenes de tratamiento específicos de ras, tal como terapia con reovirus (Patente U.S. No. 6.136.307).

50 La ruta ras es una ruta de transducción de señales compleja que da lugar a la proliferación celular. Ras es un transmisor central en esta ruta, que recibe señales de elementos aguas arriba (por ejemplo, receptores de factores de crecimiento) y las transmite a los elementos aguas abajo.

55 Muchos receptores de factores de crecimiento tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), así como las moléculas relacionadas con el receptor de EGF (por ejemplo, Her-2/Neu/ErbB2), poseen una actividad tirosina quinasa intrínseca que se activa por la dimerización del receptor inducida por el ligando. Esto resulta en la autofosforilación del receptor en residuos de tirosina y en la unión de proteínas que contienen dominios de homología Src 2 (SH2). Dos de estas proteínas SH2

son Grb2 y SHC que activan indirectamente la proteína pequeña asociada a la membrana plasmática que une GTP, Ras. La activación de Ras también ocurre en respuesta a la unión del ligando a los receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G (por ejemplo, Gutkind, 1998). La activación de Ras y otras rutas de señalización reguladas por receptores de factores de crecimiento dan lugar finalmente a cambios en el citoesqueleto y la expresión génica que son necesarios para la proliferación, diferenciación y transformación celulares (revisado en Campbell et al., 1998).

Los tres genes ras humanos (Ha-Ras, N-Ras y Ki-Ras) codifican 4 proteínas (debido al corte y empalme alternativo del ARNm de Ki-Ras). En circunstancias normales, las proteínas Ras se alternan entre un estado activo (unido a GTP) y un estado inactivo (unido a GDP). La activación de Ras ocurre por intercambio de GDP unido por GTP, lo que se facilita por una familia de factores de intercambio de nucleótidos de guanina. La inactivación de Ras ocurre por hidrólisis de GTP unido a GDP. Esta reacción se facilita por las proteínas activadoras de GTPasa (GAP). En muchos cánceres humanos, las proteínas Ras se activan oncogénicamente por mutaciones que destruyen su actividad GTPasa y así desregulan la señalización de Ras (revisado en Campbell et al., 1998).

Existen múltiples efectores de Ras candidatos que pueden actuar aguas abajo de Ras en la transducción de la señal y la transformación oncogénica, incluyendo miembros de la familia Rho de GTPasas pequeñas, fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa de serina/treonina c-Raf-1 (revisado en Campbell et al., 1998). La señalización mediada por Raf es la ruta de efector Ras mejor caracterizada. Ras activado recluta Raf a la membrana donde ocurre la activación de Raf. Raf activado es el componente inicial de una cascada de quinasas, la cascada de la Proteína Quinasa Activada por Mitógeno (MAPK). Raf fosforila y activa las proteínas quinasas MEK1 y MEK2 (quinasa MAPK/ERK) que, a su vez, fosforilan y activan las Quinasas Reguladas por Señales Extracelulares ERK1 y ERK2 (también conocidas como MAPK1 y MAPK2). A diferencia de sus dianas aguas abajo, ERK1,2, las proteínas MEK1,2 son enzimas altamente específicas cuyos únicos sustratos conocidos son las proteínas ERK1,2. Después de la activación, ERK1 y ERK2 fosforilan (y así regulan) varias proteínas diana, incluyendo factores de transcripción nucleares, lo que da lugar a la respuesta celular final.

De acuerdo con esto, numerosos eventos pueden dar lugar a la activación de la ruta ras. Por ejemplo, puede ocurrir una mutación en cualquiera de los tres genes estructurales ras. Las mutaciones estructurales también pueden tener lugar en los receptores aguas arriba de ras, los transductores de la señal aguas abajo de ras (tales como raf o mek1,2) o los efectores finales MAPK1 y 2. De manera similar, las mutaciones reguladoras que dan lugar a niveles anormalmente altos de expresión de cualquier proteína de la ruta ras también pueden causar respuestas celulares mitogénicas. Dichas mutaciones reguladoras pueden ocurrir en cualquier lugar en las secuencias reguladoras de un miembro de la ruta ras, o incluso en la región estructural o reguladora de un factor que controla la expresión de un miembro de la ruta ras. Consecuentemente, la detección de la aberración de cualquier miembro específico de la ruta ras no es una manera eficaz para determinar si la ruta ras está activada.

Es posible medir la actividad de MAPK, el efector final de la ruta ras, ya que la activación constitutiva de MAPK es indicativa de la activación de la ruta ras. Sin embargo, dicha estrategia bioquímica requiere una cantidad sustancial de material de muestra, así como procedimientos tediosos tales como extracción y/o purificación parcial de MAPK.

Mediante la detección del fenotipo activado por ras en lugar de la aberración de cualquier gen o producto génico específico, la presente invención es útil si la activación de la ruta ras se debe a mutación del gen estructural ras, secuencias reguladoras del gen ras o cualquier otro factor de la ruta ras.

La capacidad de los reovirus para infectar células en una muestra puede determinarse por cualquier método en la técnica. Por ejemplo, la replicación del ácido nucleico del reovirus puede medirse por la reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos para el reovirus usado; la síntesis de las proteínas del reovirus puede detectarse por anticuerpos específicos; las células infectadas pueden observarse con un microscopio y detectarse la evidencia de efectos citopáticos inducidos por el reovirus; y los reovirus replicados pueden recogerse de la muestra y determinarse la titulación del virus, para evaluar si ha tenido lugar la replicación viral. Otros métodos para determinar la presencia de replicación del reovirus son conocidos para o pueden desarrollarse por expertos en la técnica.

Debe indicarse que un tumor puede contener múltiples anomalías oncogénicas. En particular, se ha indicado que la activación de ras está precedida frecuentemente por la sobreexpresión de p53 en cáncer de mama (Smith et al., 2000). La presencia de otras anomalías oncogénicas además de la activación de la ruta ras, sin embargo, no dificulta la capacidad de un régimen de terapia personalizado específicamente para los tumores activados por ras. Por ejemplo, los reovirus aún pueden matar selectivamente a las células neoplásicas activadas por ras incluso si las células también contienen niveles anormalmente altos de p53.

Además, como los reovirus se replican selectivamente en células neoplásicas activadas por ras pero no en células normales, otro aspecto de la presente invención proporciona un método para diagnosticar la presencia de un neoplasma en un mamífero, que comprende poner en contacto una muestra de células de dicho mamífero con un reovirus en condiciones que permitan que el reovirus se replique en las células activadas por ras, en el que la capacidad de dicho reovirus de replicarse en dicha muestra indica la presencia de un neoplasma en dicho mamífero.

De manera similar a los reovirus, varios virus oncolíticos adicionales también se replican selectivamente en células activadas por ras. Se contempla que estos virus oncolíticos pueden emplearse para poner en práctica la presente

invención de la misma manera que los reovirus. Estos virus son típicamente mutantes que son sensibles a la quinasa de ARN bicatenario (PKR), mientras que sus equivalentes de tipo salvaje no son sensibles a PKR.

Normalmente, cuando un virus entra en una célula, PKR se activa y bloquea la síntesis de proteínas y el virus no puede replicarse en esa célula. Algunos virus han desarrollado un sistema para inhibir PKR y facilitar la síntesis de proteínas virales así como la replicación viral. Por ejemplo, los adenovirus producen una gran cantidad de un ARN pequeño, ARN VA1. El ARN VA1 tiene estructuras secundarias extensas y se une a PKR en competición con el ARN bicatenario (ARNds) que activa normalmente PKR. Como se requiere una longitud mínima de ARNds para activar PKR, el ARN VA1 no activa PKR. En lugar de esto, secuestra PKR debido a su gran cantidad. Consecuentemente, la síntesis de proteínas no se bloquea y los adenovirus pueden replicarse en la célula.

Las células neoplásicas activadas por Ras no están sometidas a la inhibición de la síntesis de proteínas por PKR ya que ras inactiva PKR. Estas células son por lo tanto susceptibles a la infección viral incluso si el virus no tiene un sistema inhibitor de PKR. De acuerdo con esto, si los inhibidores de PKR en los adenovirus se mutan de manera que no bloqueen más la función de PKR, el virus resultante no infecta a las células normales debido a la inhibición de la síntesis de proteínas por PKR pero se replican en las células neoplásicas activadas por ras que carecen de actividades PKR.

De acuerdo con esto, un virus que está modificado o mutado de manera que no inhibe la función de PKR se replica selectivamente en células neoplásicas activadas por ras mientras que las células normales son resistentes. Preferiblemente, el virus es un adenovirus mutado en la región VA1, un virus de vaccinia mutado en la región K3L y/o E3L, un virus parapoxvirus orf mutado en el gen OV20.0L, un virus de influenza mutado en el gen NS-1 o un virus de herpes mutado en el gen $\gamma_134.5$.

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

En otra realización de la presente invención, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) puede usarse para diagnosticar tumores resistentes a interferón. Los interferones son factores circulantes que se unen a receptores de la superficie celular y finalmente dan lugar tanto a una respuesta antiviral como a una inducción de señales inhibitoras del crecimiento y/o apoptóticas en las células diana. Aunque los interferones pueden usarse teóricamente para inhibir la proliferación de las células tumorales, este intento no ha tenido mucho éxito debido a mutaciones específicas de tumor de los miembros de la ruta del interferón.

Sin embargo, mediante la interrupción de la ruta del interferón para evitar la inhibición del crecimiento ejercida por el interferón, las células tumorales pueden comprometer simultáneamente su respuesta anti-viral. De hecho, se ha mostrado que VSV, un virus con cubierta con ARN de sentido negativo, se replicaba rápidamente en y mataba varias líneas celulares tumorales humanas en presencia de interferón, mientras que los cultivos celulares primarios humanos normales estaban aparentemente protegidos por el interferón. VSV puede usarse así para diagnosticar tumores resistentes a interferón aún sensibles a VSV. Como en la realización de reovirus, el diagnóstico basado en VSV es una evaluación del fenotipo y no depende del mecanismo de la resistencia a interferón.

En otra realización de la presente invención, el virus ONYX-015 puede usarse para diagnosticar tumores deficientes de p53. p53 es un supresor tumoral potente, que está presente en todas las células y controla el crecimiento celular. Como los virus dependen de la maquinaria de la proliferación celular para replicarse, están sometidos a la regulación de p53 y no pueden sobre replicarse. Determinados adenovirus, SV40 y virus del papiloma humano, sin embargo, incluyen proteínas que inactivan p53, permitiendo de esta manera su propia replicación (Nemunaitis, 1999).

Para los adenovirus serotipo 5, esta proteína es una proteína de 55 Kd codificada por la región E1B. Si la región E1B que codifica esta proteína de 55 kd está delecionada, como en el virus ONYX-015 (Bischoff et al. 1996; WO 94/18992), el inhibidor de p53 de 55 kd no está ya presente. Como resultado, cuando ONYX-015 entra en una célula normal, p53 funciona para suprimir la proliferación celular así como la replicación viral. Por lo tanto, ONYX-015 no se replica en las células normales. Por otra parte, en las células neoplásicas con función p53 interrumpida, ONYX-015 puede replicarse y eventualmente causar la muerte de la célula. De acuerdo con esto, este virus puede usarse para detectar células neoplásicas deficientes de p53 en una muestra. Un experto en la técnica también puede mutar e interrumpir el gen inhibidor de p53 en el adenovirus 5 u otros virus usando técnicas establecidas y los virus resultantes son útiles en la presente invención para diagnosticar tumores deficientes de p53.

De manera similar, el virus Delta24 puede usarse para diagnosticar tumores deficientes de Rb. El virus Delta24 es un adenovirus mutante que porta una delección de 24 pares de bases en la región E1A (Fueyo et al., 2000). Esta región es la responsable de unirse al supresor tumoral celular Rb e inhibir la función de Rb, permitiendo de esta manera que la maquinaria proliferativa celular, y por lo tanto la replicación del virus, funcionen de una forma incontrolada. Delta24 tiene una delección en la región de unión a Rb y no se une a Rb. Por lo tanto, la replicación del

virus mutante se inhibe por Rb en una célula normal. Sin embargo, si Rb está inactivado y la célula se vuelve neoplásica, Delta24 no está ya inhibido. En lugar de esto, el virus mutante se replica eficazmente y lisa la célula deficiente de Rb. De acuerdo con esto, el virus Delta24 puede usarse para determinar si una muestra contiene células tumorales deficientes de Rb.

- 5 Como en el caso de las células tumorales activadas por ras, las células deficientes de p53 o deficientes de Rb pueden ser el resultado de varias razones. Por ejemplo, una mutación en el gen estructural de p53 o Rb puede dar lugar a un producto génico con mal funcionamiento o traducción baja, una mutación en la secuencia reguladora del gen p53 o Rb puede causar una cantidad reducida de transcripción, una mutación en un factor de transcripción para el gen p53 o Rb puede resultar en la producción deficiente de p53 o Rb o una mutación en un co-factor necesario para la función de p53 o Rb también puede ser la razón de deficiencia de p53 o Rb. Como la presente invención detecta el fenotipo, en lugar de únicamente la aberración estructural del gen/proteína p53 o Rb, es más potente que los métodos basados en estructura, tal como PCR.

Una vez que se ha determinado el fenotipo de un tumor, el tumor puede tratarse según su fenotipo. Por ejemplo, un tumor activado por ras puede tratarse con reovirus o inhibidores de la ruta ras.

- 15 Debe indicarse que Delta24 y ONYX-015 son meramente ejemplos para elucidar la aplicación de la presente invención, mientras que un experto en la técnica será capaz de identificar o desarrollar otros virus útiles en el diagnóstico y tratamiento de tumores según la presente descripción.

- Como con los reovirus, el uso de virus inmunoprotegidos o reagrupados de otros virus oncolíticos también está englobado en la presente invención. Adicionalmente, además de los virus que se discuten específicamente en la presente solicitud, un experto en la técnica puede poner en práctica la presente invención usando virus oncolíticos adicionales según la descripción de la presente memoria y el conocimiento disponible en la técnica. El virus oncolítico puede ser un miembro de la familia de myoviridae, siphoviridae, podoviridae, tecoviridae, corticoviridae, plasmaviridae, lipothrixviridae, fuselloviridae, poxviridae, iridoviridae, phycodnaviridae, baculoviridae, herpesviridae, adenoviridae, papovaviridae, polydnaviridae, inoviridae, microviridae, geminiviridae, circoviridae, parvoviridae, hepadnaviridae, retroviridae, cyctoviridae, reoviridae, birnaviridae, paramyxoviridae, rhabdoviridae, filoviridae, orthomyxoviridae, bunyaviridae, arenaviridae, leviviridae, picornaviridae, sequiviridae, comoviridae, potyviridae, calciviridae, astroviridae, nodaviridae, tetraviridae, tombusviridae, coronaviridae, glaviviridae, togaviridae o barnaviridae.

- La presente invención puede aplicarse a cualquier animal, particularmente mamíferos. Los mamíferos preferidos incluyen perros, gatos, ovejas, cabras, ganado, caballos, cerdos, seres humanos y primates no humanos. Lo más preferiblemente, el mamífero es humano.

Kits

- La presente invención proporciona kits útiles para el diagnóstico de tumores. Un aspecto de la presente invención proporciona un kit que comprende un reovirus y un medio para detectar la replicación del reovirus. El medio de detección puede ser una pareja de cebadores específicos para el ácido nucleico del reovirus y puede incluir opcionalmente reactivos para PCR. El medio de detección también puede ser un anticuerpo específico para una proteína del reovirus y puede contener opcionalmente además un anticuerpo secundario. El medio de detección puede ser adicionalmente portaobjetos y agentes de tinción adecuados para observar la morfología de las células infectadas con el microscopio o medios de cultivo de virus y células que se pueden usar para determinar la titulación del reovirus. De manera similar, la presente invención también proporciona kits que comprenden otros virus oncolíticos capaces de replicarse en células tumorales específicas, así como medios para detectar la replicación de los virus. Los ejemplos de estos virus incluyen, sin estar limitados a, VSV, el virus ONYX-015 y Delta24.

- Otro aspecto de esta invención proporciona un kit que comprende al menos dos virus oncolíticos que pueden usarse para caracterizar el fenotipo de tumores según la presente invención. Preferiblemente, los virus se seleccionan del grupo que consiste en reovirus, VSV, el virus ONYX-015 y el virus Delta24.

Los ejemplos siguientes se ofrecen para ilustrar esta invención y no debe considerarse que limitan de ninguna forma el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

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

$^{\circ}\text{C}$ = grados Celsius

hr = hora

min = minuto

μM = micromolar

mM = milimolar

M = molar

ml = mililitro

μ l = microlitro

5 mg = miligramo

μ g = microgramo

PAGE = electroforesis en gel de poliacrilamida

rpm = revoluciones por minuto

FBS = suero fetal bovino

10 DTT = ditioneitol

SDS = dodecil sulfato de sodio

PBS = disolución salina tamponada con fosfato

DMEM = medio de Eagle modificado por Dulbecco

α -MEM = medio de Eagle con modificación α

15 β -ME = β -mercaptoetanol

MOI = multiplicidad de infección

PFU = unidades formadoras de placas

EGF = factor de crecimiento epidérmico

PDGF = factor de crecimiento derivado de plaquetas

20 CPE = efecto citopático

VSV = virus de la estomatitis vesicular

PCR = reacción en cadena de la polimerasa

SH2 = homología src-2

EJEMPLO 1

25 **Caracterización fenotípica de un tumor con reovirus**

Se encuentra un bulto en una mujer de 65 años durante su mamografía regular. Se recoge una muestra del bulto durante la biopsia y parece ser un tumor maligno. Con el fin de determinar si el tumor contiene células activadas por ras, la muestra se pone en cultivo celular y se incuba con reovirus.

30 La cepa Dearing del reovirus serotipo 3 se propaga en cultivos en suspensión de células L-929 purificado según Smith (Smith et al., 1969) con la excepción de que se omite el β -mercaptoetanol (β -ME) del tampón de extracción. La proporción partícula/PFU para el reovirus purificado es típicamente 100/1. La muestra de la biopsia se trocea en DMEM, se incuba con reovirus durante 2 horas a 37°C, se cambia a DMEM fresco más 20% FBS y se cultiva durante 48 horas. Posteriormente, el sobrenadante del cultivo se recoge y se determina la titulación del reovirus. El resultado indica que el reovirus se ha replicado en la muestra. Por lo tanto, el tumor de mama contiene células tumorales activadas por ras.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un kit para diagnosticar un neoplasma por fenotipo que comprende al menos dos virus oncolíticos, en el que cada virus oncolítico se replica selectivamente en las células neoplásicas que tienen un fenotipo seleccionado del grupo que consiste en activación de la ruta ras, resistencia a interferón, deficiencia de p53 y deficiencia de Rb y en el que cada uno de los virus oncolíticos se replica selectivamente en células neoplásicas que tienen un fenotipo diferente seleccionado del grupo que consiste en activación de la ruta ras, resistencia a interferón, deficiencia de p53 y deficiencia de Rb.
- 10 2. El kit de la reivindicación 1, en el que los virus oncolíticos se seleccionan del grupo que consiste en reovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV), ONYX-015, Delta24, adenovirus mutados en la región VA1, virus de vaccinia mutados en la región K3L y/o E3L, virus parapoxvirus orf mutados en el gen OV20.0L, virus de influenza mutados en el gen NS-1 y virus del herpes mutados en el gen $\gamma_134.5$.
3. El kit de la reivindicación 1, en el que los virus oncolíticos se seleccionan del grupo que consiste en reovirus, VSV, ONYX-015 y Delta24.
4. El kit de la reivindicación 2, en el que el reovirus es un reovirus de mamíferos.
- 15 5. El kit de la reivindicación 4, en el que el reovirus de mamíferos es un reovirus de serotipo 3.
6. El kit de la reivindicación 5, en el que el reovirus de serotipo 3 es un reovirus de la cepa Dearing.
7. El kit de la reivindicación 2, en el que el reovirus es un reovirus aviar.
8. El kit de la reivindicación 1, que comprende además un medio para detectar la replicación de los virus.
- 20 9. El kit de la reivindicación 8, en el que el medio de detección es una pareja de cebadores específicos para el ácido nucleico del virus.
10. El kit de la reivindicación 9, que comprende además reactivos para PCR.
11. El kit de la reivindicación 8, en el que el medio de detección es un anticuerpo específico para una proteína del virus.
12. El kit de la reivindicación 11, que comprende además un anticuerpo secundario.
- 25 13. El kit de la reivindicación 8, que comprende además portaobjetos adecuados para observar la morfología de las células infectadas con un microscopio.
14. El kit de la reivindicación 8, que comprende además agentes de tinción adecuados para observar la morfología de las células infectadas con un microscopio.
- 30 15. El kit de la reivindicación 8, que comprende además medios de cultivo de virus y células que se usan para determinar la titulación del virus.