

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 779**

51 Int. Cl.:
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03724713 .7**
96 Fecha de presentación: **08.05.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1505993**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

54 Título: **Sensibilización de células neoplásicas frente a la terapia de radiación con virus oncolíticos**

30 Prioridad:
10.05.2002 US 378948 P
29.01.2003 US 443189 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.08.2012

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

72 Inventor/es:
MORRIS, Donald;
COFFEY, Matthew, C.;
THOMPSON, Bradley, G. y
BALL, Douglas

74 Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

ES 2 386 779 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sensibilización de células neoplásicas frente a la terapia de radiación con virus oncolíticos

La presente invención se refiere métodos para sensibilizar células neoplásicas frente a la irradiación utilizando virus oncolíticos, en particular reovirus.

- 5 La radioterapia, también denominada terapia de radiación, consiste en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades con radiación, generalmente radiación ionizante. La radioterapia puede utilizarse para tratar tumores sólidos localizados, tales como cánceres de la piel, lengua, laringe, cerebro, mama o cuello del útero. También puede utilizarse para tratar la leucemia y el linfoma.
- 10 Un tipo de terapia de radiación que se emplea habitualmente utiliza fotones (energía electromagnética). Los rayos X fueron la primera forma de radiación fotónica que se empleó para tratar el cáncer. Dependiendo de la cantidad de energía que poseen, los rayos pueden utilizarse para destruir las células cancerosas sobre la superficie del cuerpo o más hacia su interior. Los aceleradores lineales y los betatrones son máquinas que producen rayos X con una energía creciente. El uso de máquinas para concentrar la radiación (tal como rayos X) sobre un sitio de cáncer se denomina radioterapia de haz externo.
- 15 Los rayos gamma son otra forma de fotones utilizada en la radioterapia. Los rayos gamma se producen de modo espontáneo a medida que ciertos elementos (tales como radio, uranio y cobalto 60) liberan radiación a medida que se descomponen. Cada elemento se descompone a una velocidad específica y libera energía en forma de rayos gamma y otras partículas. Los rayos X y los rayos gamma tienen el mismo efecto sobre las células cancerosas.
- 20 Otra técnica para administrar radiación a células cancerosas consiste en colocar implantes radiactivos directamente en un tumor o cavidad corporal. Esto se denomina radioterapia interna, y la braquiterapia, la irradiación intersticial y la irradiación intracavitaria son tipos de radioterapia interna. En este tratamiento, la dosis de radiación se concentra en un área pequeña. La radioterapia interna se emplea con frecuencia para cánceres de lengua, útero y cuello del útero. Se están evaluando varias estrategias nuevas para la terapia de radiación para determinar su eficacia para tratar el cáncer. Una de estas técnicas es la irradiación intraoperativa, en la que una alta dosis de radiación externa se dirige al tumor y al tejido circundante durante una cirugía. Otra estrategia de investigación es la terapia de radiación de haces de partículas. Este tipo de terapia se diferencia de la radioterapia de fotones porque implica el uso de partículas subatómicas de movimiento rápido para tratar cánceres localizados. Se necesita una máquina muy sofisticada para producir y acelerar las partículas requeridas para este procedimiento. Algunas partículas (neutrones, piones, e iones pesados) depositan más energía a lo largo del camino que recorren a través del tejido que los rayos X o los rayos gamma, provocando con ello daños en las células con las que impactan. Este tipo de radiación a menudo se denomina radiación de alta transferencia lineal de energía (alta LET). Otras investigaciones sobre radioterapia recientes se han centrado en el uso de anticuerpos radiomarcados para administrar dosis de radiación directamente al sitio del cáncer (radioinmunoterapia).
- 25 Se han buscado activamente métodos para aumentar la eficacia de la terapia de radiación. Se están estudiando dos tipos de fármacos de investigación por sus efectos sobre las células que están sometidas a radiación. Los radiosensibilizadores hacen que las células tumorales sean más fáciles de dañar, y los radioprotectores protegen a los tejidos normales de los efectos de la radiación. La hipertermia, el uso de calor, también se ha estudiado por su eficacia para sensibilizar los tejidos frente a la radiación. De modo ideal, un radiosensibilizador ejerce su función sólo sobre las células diana. Para facilitar su uso, el radiosensibilizador también debería ser capaz de encontrar las células diana incluso si se administra por vía sistémica. Sin embargo, los actuales radiosensibilizadores generalmente no son selectivos para las células tumorales, y se distribuyen en una animal sólo mediante difusión. Por tanto, es necesario un mejor radiosensibilizador.
- 35 La presente invención se refiere, entre otras cuestiones, al descubrimiento inesperado de que el reovirus puede aumentar la sensibilidad de las células tumorales frente a la radiación. El reovirus es un agente antitumoral muy selectivo que sólo se replica dentro de células neoplásicas con ras activado y sólo destruye a éstas. En la presente invención, se demuestra que los tumores pueden reducirse de manera eficaz tras una irradiación junto con un tratamiento con reovirus. Además, no es necesario que el reovirus se administre al tumor irradiado directamente. Por tanto, el reovirus no sólo es un radiosensibilizador selectivo, sino que también tiene un "efecto remoto", eliminando con ello la necesidad de administrar el reovirus a todas y cada una de las masas tumorales.
- 45 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona el uso de una cantidad eficaz de un reovirus para la preparación de una composición farmacéutica para sensibilizar una célula neoplásica frente a la irradiación, en el que:
- (a) la composición farmacéutica se administra a dicha célula neoplásica; y
- (b) la célula se somete a una dosis eficaz de un agente de irradiación para aumentar la sensibilidad de la célula neoplásica al agente de irradiación mediante el reovirus, en el que el reovirus se administra antes de la irradiación.
- 55

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para sensibilizar una célula neoplásica frente a la irradiación, que comprende:

(a) administrar a dicha célula neoplásica una cantidad eficaz de un reovirus; y

5 (b) someter dicha célula a una dosis eficaz de un agente de irradiación, con lo que la sensibilidad de la célula neoplásica al agente de irradiación aumenta por el reovirus, en el que el reovirus se administra antes de la irradiación.

El reovirus puede ser cualquier reovirus, preferiblemente un reovirus de mamífero o aviar. El reovirus de mamífero es preferiblemente un reovirus humano, más preferiblemente un reovirus de serotipo 3, y lo más preferiblemente el reovirus de serotipo 3 de la cepa Dearing.

10 El agente de irradiación puede ser cualquier agente de irradiación conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a rayos X, rayos gamma (por ejemplo, rayos gamma producidos por el radio, el uranio o el cobalto 60), y haces de partículas (por ejemplo, electrones, neutrones, piones e iones pesados). La irradiación puede estar en forma de radioterapia externa o radioterapia interna (incluyendo braquiterapia, irradiación intersticial e irradiación intracavitaria). Los agentes de irradiación pueden estar unidos a un anticuerpo, tal como en la radioinmunoterapia, o pueden emplearse durante una cirugía, tal como en la radioterapia intraoperativa.

15 La célula neoplásica está localizada preferiblemente en un mamífero, en particular un mamífero seleccionado del grupo que consiste en perros, gatos, roedores, ovejas, cabras, ganado vacuno, caballos, cerdos, seres humanos y primates no humanos. Lo más preferiblemente, el mamífero es un ser humano. El reovirus útil en la presente invención puede ser un reovirus recombinante. Los reovirus recombinantes pueden generarse mediante la coinfección de células de mamífero con diferentes subtipos de reovirus. El reovirus recombinante puede ser natural o no natural. El reovirus recombinante puede proceder de dos o más cepas de reovirus, en particular dos o más cepas de reovirus seleccionadas del grupo que consiste en la cepa Dearing, la cepa Abney, la cepa Jones, y la cepa Lang. El reovirus recombinante también puede proceder del reordenamiento de reovirus de diferentes serotipos, tales como los seleccionados del grupo que consiste en el reovirus de serotipo 1, el reovirus de serotipo 2 y el reovirus de serotipo 3. El reovirus recombinante puede comprender secuencias codificadoras de proteínas de la envuelta variantes naturales o secuencias codificadoras de proteínas de la envuelta mutadas.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el uso de una cantidad eficaz de un reovirus para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o mejorar un tumor en un sujeto, en el que:

30 (a) la composición farmacéutica se administra al sujeto bajo condiciones que producen la infección de las células del tumor por el reovirus; y

(b) el sujeto se irradia con una dosis eficaz de un agente de irradiación, en el que el reovirus se administra antes de la irradiación.

En particular, el tumor es resistente a la radiación en ausencia del reovirus.

35 Tanto el reovirus como el agente de irradiación pueden utilizarse para ser administrados al sujeto en una sola dosis o en dosis múltiples. El sujeto es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un mamífero seleccionado del grupo que consiste en perros, gatos, roedores, ovejas, cabras, ganado vacuno, caballos, cerdos, seres humanos y primates no humanos. Lo más preferiblemente, el sujeto es un ser humano.

40 Cualquier tumor puede someterse al método y al uso reivindicados, incluyendo tumores sólidos y tumores hematopoyéticos. El tumor sólido se selecciona preferiblemente 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, y cáncer del sistema nervioso central y periférico. El tumor hematopoyético se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en linfomas y leucemias. El tumor puede ser un tumor metastásico.

45 El reovirus puede utilizarse para ser administrado de cualquier manera que, en último término, provoque el contacto del reovirus con el tumor diana. Por ejemplo, el reovirus puede utilizarse para ser administrado por vía sistémica o local (por ejemplo, hacia el interior de un tumor sólido o cerca de éste).

50 La presente invención describe un método para aumentar la eficacia de una terapia de reovirus en un animal que tiene un tumor exponiendo al animal a una cantidad eficaz de un agente de irradiación. El reovirus y el agente de irradiación pueden administrarse por separado, concretamente en sitios diferentes. Por ejemplo, el virus puede administrarse por vía sistémica y el agente de irradiación a un tumor local. Como resultado, el tumor irradiado, así como otros tumores en el mismo animal, reduce su tamaño o frena su crecimiento en un grado mayor que si el virus o el agente de irradiación se utilizasen por separado. De manera similar, el virus puede administrarse a un tumor local, mientras que otro tumor local se irradia, y todos los tumores en el mismo animal se tratan o se alivian. El efecto combinado del virus y la radiación generalmente es más que un efecto aditivo.

- Además del reovirus, pueden utilizarse otros virus oncolíticos para practicar la presente invención de la misma manera que el reovirus. Sin embargo, estos usos no se incluyen en la presente invención. Los ejemplos de virus oncolíticos incluyen, pero no se limitan a virus que tienen mutaciones o deleciones para que no se inhiba la proteína quinasa activada por ARN bicatenario (PKR), Delta24, virus de la estomatitis vesicular (VSV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de vaccinia, virus de la encefalitis, virus del herpes zoster, virus de la hepatitis, virus de la gripe, virus de la varicela, y virus del sarampión. Preferiblemente, el virus oncolítico (a) no es un vehículo vírico para transportar un gen; (b) no expresa el gen E1A adenovírico; y/o (c) no es un herpes virus.
- En particular, el virus oncolítico y la radiación pueden administrarse a diferentes sitios en el sujeto que se va a tratar. Por tanto, un aspecto de la presente invención proporciona un método para sensibilizar una célula neoplásica en un animal frente a la irradiación, que comprende:
- (a) administrar a dicho animal una cantidad eficaz de un virus oncolítico; y
- (b) someter a dicha célula a una dosis eficaz de un agente de irradiación, con lo que la sensibilidad de la célula neoplásica al agente de irradiación aumenta por el virus oncolítico, y en el que el virus oncolítico y el agente de irradiación se administran a diferentes sitios en el animal.
- El virus oncolítico puede administrarse mediante cualquier vía, incluyendo la administración sistémica.
- Opcionalmente, el animal puede estar inmunosuprimido para evitar respuestas inmunológicas frente al virus terapéuticamente administrado. La inmunosupresión puede ser específica o no específica. Por tanto, los usos de la presente invención pueden asociarse con al menos uno de los siguientes:
- i) se administra al animal una cantidad eficaz de un agente inmunosupresor;
- ii) se retiran células B o células T del animal;
- iii) se retiran anticuerpos antiviral del animal;
- iv) se retiran anticuerpos del animal;
- v) se administran anticuerpos anti-antiviral al animal; y
- vi) se suprime el sistema inmunológico del animal.
- La presente invención se refiere, entre otras cuestiones, al descubrimiento inesperado de que el reovirus puede aumentar la sensibilidad de las células tumorales frente a la radiación. El reovirus es un agente antitumoral muy selectivo que sólo se replica dentro de células neoplásicas con ras activado y sólo destruye a éstas. En la presente invención, se demuestra que los tumores pueden reducirse de manera eficaz tras una irradiación junto con un tratamiento con reovirus. Además, no es necesario que el reovirus se administre al tumor irradiado directamente. Por tanto, el reovirus no sólo es un radiosensibilizador selectivo, sino que también tiene un "efecto remoto", eliminando con ello la necesidad de administrar el reovirus a todas y cada una de las masas tumorales. También pueden utilizarse otros virus oncolíticos.
- Antes de describir la invención con más detalle se definen como sigue los términos y las expresiones utilizados en esta solicitud, a menos que se indique lo contrario.
- Definiciones**
- "Sensibilizar" una célula neoplásica frente a la radiación, tal como se emplea en la presente, se refiere al acto de potenciar la sensibilidad de una célula neoplásica frente a la radiación.
- La "sensibilidad" de una célula neoplásica frente a la radiación es la susceptibilidad de la célula neoplásica al efecto inhibitorio de la radiación. Por ejemplo, la sensibilidad de una célula neoplásica frente a la radiación puede venir indicada por una reducción en la tasa de crecimiento de la célula en respuesta a la radiación. La sensibilidad también puede demostrarse mediante una reducción en los síntomas provocados por las células neoplásicas.
- Una célula neoplásica que es "resistente" a la radiación es una célula neoplásica que no muere ni su crecimiento se ve inhibido por la radiación. Para determinar si el crecimiento de una célula neoplásica se ve inhibido, puede determinarse la tasa de crecimiento de la célula en presencia o en ausencia de radiación mediante métodos establecidos en la técnica, tales como recuentos celulares. El crecimiento de la célula neoplásica no se ve inhibido por la radiación si la tasa de crecimiento no es significativamente diferente con o sin radiación.
- Un tumor que es "resistente" a la radiación es un tumor cuya tasa de aumento de tamaño o de aumento de peso no cambia en presencia de radiación. Como alternativa, si el sujeto que porta el tumor muestra unos síntomas o indicadores del tumor similares tanto si el sujeto recibe radiación como si no, el tumor es resistente a la radiación. Por ejemplo, habitualmente se emplea el recuento de leucocitos como indicador de la leucemia. Si el recuento de leucocitos de un paciente con leucemia no cambia significativamente después de recibir radiación, la leucemia de

este paciente es resistente a la radiación.

Una "célula neoplásica", una "célula tumoral" o una "célula con un trastorno proliferativo" se refieren a una célula que prolifera a una velocidad anormalmente alta. Un nuevo crecimiento que comprende células neoplásicas es un neoplasma, también denominado "tumor". Un tumor es un crecimiento anómalo de tejido que en general forma una masa diferenciada que crece mediante proliferación celular con más rapidez que el crecimiento del tejido normal. Un tumor puede mostrar una carencia parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. Tal como se emplea en la presente, un tumor pretende incluir tumores hematopoyéticos así como tumores sólidos.

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

Una "lesión" es un daño, una herida o un área que es anómala desde el punto de vista estructural. En el contexto de un sujeto que porta un tumor, una lesión es una masa tumoral a menos que se indique lo contrario.

Las "células neoplásicas con ras activado" o las "células neoplásicas mediadas por ras" se refieren a células que proliferan a una velocidad anormalmente alta debido, en parte, a la activación de la vía ras. La vía ras puede activarse mediante una mutación en el gen ras, un nivel elevado de expresión del gen ras, una elevada estabilidad del mensajero del gen ras, o mediante cualquier mutación u otro mecanismo que conduce a la activación de ras o un factor o factores corriente abajo o arriba de ras en la vía de ras, aumentando con ello la actividad de la vía ras. Por ejemplo, la activación del receptor de EGF, el receptor de PDGF o sos produce la activación de la vía ras. Las células neoplásicas mediadas por ras incluyen, pero no se limitan a células de cáncer mediadas por ras, que son células que proliferan de una manera maligna debido a la activación de la vía ras.

Una "infección por reovirus" se refiere a la entrada y la replicación de un reovirus en una célula. De manera similar, una "infección de un tumor por reovirus" se refiere a la entrada y la replicación de un reovirus en las células del tumor.

Un "reovirus" se refiere a cualquier virus clasificado en el género reovirus, tanto si es natural, modificado o recombinante. Los reovirus son virus con un genoma de ARN bicatenario segmentado. Los viriones miden 60-80 nm de diámetro y poseen dos envueltas de cápsida concéntricas, siendo cada una icosaédrica. El genoma consiste en ARN bicatenario en 10-12 segmentos discretos con un tamaño total del genoma de 16-27 kpb. Los segmentos de ARN individuales tienen un tamaño variable. Se han recuperado de muchas especies tres tipos de reovirus diferenciados pero relacionados. Los tres tipos comparten un antígeno de fijación al complemento común.

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 con facilidad basándose en ensayos de neutralización y de inhibición de hemaglutinina (véase, por ejemplo, Fields, B.N., et al., 1996).

El reovirus puede ser natural o modificado. El reovirus es "natural" cuando puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y no ha sido modificado intencionadamente por los seres humanos en el laboratorio. Por ejemplo, el reovirus puede proceder de una "fuente de campo", es decir, de un ser humano que ha sido infectado por el reovirus.

El reovirus puede modificarse pero aún ser capaz de infectar lícitamente a una célula de mamífero que tenga una vía de ras activa. El reovirus puede estar pretratado de modo químico o bioquímico (por ejemplo, mediante un tratamiento con una proteasa, tal como quimotripsina o tripsina) antes de la administración a las células proliferativas. Un pretratamiento con una proteasa elimina la cápsida o envuelta externa del virus y puede aumentar la infectividad del virus. El reovirus puede estar revestido en un liposoma o una micela (Chandran y Nibert, 1998). Por ejemplo, el virión puede tratarse con quimotripsina en presencia de concentraciones formadoras de micelas de detergentes de sulfato de alquilo para generar una nueva partícula subviriónica infecciosa.

El reovirus puede ser un reovirus recombinante que resulte de la recombinación/reordenamiento de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente diferenciados. La recombinación/reordenamiento de segmentos genómicos de reovirus puede producirse en la naturaleza tras la infección de un organismo hospedante con al menos dos reovirus genéticamente diferenciados. También pueden generarse viriones recombinantes en un cultivo celular, por ejemplo, mediante la coinfección de células hospedantes permisivas con reovirus genéticamente diferenciados (Nibert et al., 1995).

Por consiguiente, la invención contempla el uso de reovirus recombinantes que resultan del reordenamiento de segmentos genómicos procedentes de dos o más reovirus genéticamente diferenciados que incluyen, pero no se limitan a reovirus humano, tal como de tipo 1 (por ejemplo, cepa Lang), de tipo 2 (por ejemplo, cepa Jones) y de tipo

3 (por ejemplo, cepa Dearing o cepa Abney), reovirus de mamíferos no humanos, o reovirus aviares. La invención contempla también el uso de reovirus recombinantes que resultan del reordenamiento de segmentos genómicos procedentes de dos o más reovirus genéticamente diferenciados, en los que al menos un virus de origen está genéticamente modificado, comprende uno o más segmentos genómicos sintetizados de modo químico, se ha tratado con mutágenos químicos o físicos, o en sí mismo es el resultado de un acontecimiento de recombinación. La invención también contempla el uso de un reovirus recombinante que ha sufrido recombinación en presencia de mutágenos químicos que incluyen, pero no se limitan a sulfato de dimetilo y bromuro de etidio, o mutágenos físicos que incluyen, pero no se limitan a luz ultravioleta y otras formas de radiación.

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

El reovirus puede modificarse mediante la incorporación de proteínas mutadas de la envuelta tales como, por ejemplo, en la cápsida externa del virión. Las proteínas puede mutarse mediante sustitución, inserción o deleción. La sustitución incluye la inserción de aminoácidos diferentes en lugar de los aminoácidos nativos. Las inserciones incluyen la inserción de restos aminoácidos adicionales en la proteína en uno o más emplazamientos. Las deleciones incluyen deleciones de uno o más restos aminoácidos en la proteína. Estas mutaciones pueden generarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida específica de sitios oligonucleotídicos del gen que codifica una de las proteínas de la envuelta puede producir la generación de la proteína mutante de la envuelta deseada. La expresión de la proteína mutada en células de mamífero infectadas por reovirus *in vitro*, tales como células COS1, dará como resultado la incorporación de la proteína mutada en la partícula viriónica del reovirus (Turner y Duncan, 1992; Duncan et al., 1991; Mah et al., 1990).

El reovirus es preferiblemente un reovirus modificado para reducir o eliminar una reacción inmunológica frente al reovirus. Este reovirus modificado se denomina "reovirus inmunoprotegido". Estas modificaciones pueden incluir la encapsulación del reovirus en un liposoma, una micela u otro vehículo para ocultar al reovirus del sistema inmunológico. Como alternativa, la cápsida externa de la partícula viriónica del reovirus puede eliminarse, puesto que las proteínas presentes en la cápsida externa son el principal determinante de las respuestas humoral y celular del hospedante.

La "administración" de un virus a un sujeto se refiere al acto de administrar el virus a un sujeto de tal manera que se ponga en contacto con las células neoplásicas diana. La vía mediante la cual se administra el virus, así como la formulación, el portador o el vehículo, dependerán de la localización, así como del tipo de células diana. Puede emplearse una amplia variedad de vías de administración, y esto se analiza con más detalle a continuación.

Un "virus oncolítico" es un virus que se replica de manera preferente en células neoplásicas y las destruye. Un virus oncolítico puede ser un virus natural o un virus modificado. Los virus oncolíticos también incluyen virus inmunoprotegidos y reordenados, según se describe en detalle para los reovirus. El virus es "natural" si puede aislarse de una fuente en la naturaleza y no ha sido modificado intencionadamente por los seres humanos en el laboratorio. Por ejemplo, el virus puede proceder de una "fuente de campo", es decir, de un animal infectado. El virus se "modifica" cuando se ha modificación por la intervención humana.

"Tratar o aliviar un tumor" significa aliviar o eliminar los síntomas de un tumor, o frenar el avance del tumor. El alivio es preferiblemente de al menos aproximadamente 10%, más preferiblemente al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%.

Un "tumor metastásico" es un tumor que ha metastatizado a partir de un tumor localizado en otro lugar en el mismo animal.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad de un agente de irradiación o un reovirus que es suficiente para producir el efecto previsto. Para un agente de irradiación utilizado para tratar o mejorar un tumor, una cantidad eficaz es una cantidad del agente de irradiación suficiente para aliviar o eliminar los síntomas del tumor, o para frenar el avance del tumor. Para un reovirus para sensibilizar a un tumor frente a un agente de irradiación, una cantidad eficaz es una cantidad de reovirus suficiente para aumentar la sensibilidad del tumor frente al agente de irradiación.

Métodos y usos

El reovirus es un agente terapéutico eficaz contra la neoplasia por ras activado porque se replica de modo selectivo en células con la vía de ras activada (patente de EEUU n1 6.136.307). La vía de ras no está activada en células normales y, por tanto, el reovirus destruye las células neoplásicas con alta selectividad. Sin limitarse a ninguna teoría, se cree que la transcripción génica vírica en células normales se correlaciona con la fosforilación de una proteína celular de aproximadamente 65 kDa, determinándose que es una proteína quinasa activada por ARN bicatenario (PKR), que no se observa en las células con ras activado. La fosforilación de PKR conduce a la inhibición de la traducción y, por tanto, no puede completarse la replicación vírica. Sin embargo, en células con ras activado, ras o sus factores corriente abajo bloquean la fosforilación de PKR, permitiendo con ello que se desarrolle la traducción y la replicación víricas.

En la presente invención, los inventores han descubierto, de modo inesperado, que un reovirus puede aumentar la sensibilidad de células neoplásicas frente a la radiación. Un paciente con cáncer de cabeza y cuello con varias lesiones en el área del cuello había sido tratado con radioterapia, pero la lesión tratada se expandía de nuevo con rapidez después de una respuesta moderada. Posteriormente, se inyectó el reovirus en una de las lesiones, y 5 días después se irradió una lesión diferente. Esta vez, la radiación produjo una reducción notable en la masa tumoral, indicando que el reovirus puede sensibilizar a las células tumorales frente a la radiación. Además, estos resultados también indican que el reovirus y la radiación no tienen que administrarse al mismo tiempo o en el mismo lugar, puesto que la administración local del reovirus puede conducir a un efecto de sensibilización sistémico (ejemplo 1).

En la presente invención, resulta preferible que el reovirus aumente la sensibilidad de las células o animales frente a la radiación en al menos aproximadamente 20%, comparado con el efecto de la radiación en ausencia del reovirus. El aumento en la sensibilidad es más preferiblemente de al menos aproximadamente 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o mayor. En la realización más preferida, el reovirus resulta útil para sensibilizar un tumor que es resistente a la radiación en ausencia de reovirus, y el efecto de sensibilización no puede expresarse de forma numérica.

La sensibilidad de una célula o un tumor frente a la radiación puede observarse o medirse según métodos establecidos en la técnica, que pueden variar según la naturaleza de la enfermedad. Por ejemplo, la sensibilidad de una célula neoplásica frente a la radiación puede determinarse mediante el tamaño del tumor o la velocidad de crecimiento de la célula neoplásica (por ejemplo, véase el ejemplo 1). La sensibilidad también puede observarse como una reducción de los síntomas o indicadores de la enfermedad cognados, tales como el recuento de células sanguíneas en pacientes con leucemia, o la función hepática en pacientes con hepatoma. Como alternativa, la sensibilidad puede evaluarse como la incapacidad del tumor irradiado para comenzar a expandirse de nuevo o para volver a crecer hasta su tamaño original. Esta incapacidad puede ser determinada mediante el tiempo que tarda el tumor irradiado hasta comenzar a expandirse de nuevo o a crecer hasta su tamaño original después de la irradiación, puesto que un tiempo más largo indica una mayor sensibilidad al tratamiento.

La presente invención puede utilizarse para aumentar la sensibilidad de células neoplásicas frente a cualquier agente de irradiación que incluye, pero no se limita a rayos X, rayos gamma (por ejemplo, rayos gamma producidos por el radio, el uranio o el cobalto 60), y haces de partículas (por ejemplo, electrones, neutrones, piones e iones pesados). La irradiación puede estar en forma de radioterapia externa o radioterapia interna (incluyendo braquiterapia, irradiación intersticial e irradiación intracavitaria). Los agentes de irradiación pueden estar unidos a un anticuerpo, tal como en la radioinmunoterapia, o pueden emplearse durante una cirugía, tal como en la radioterapia intraoperativa.

El reovirus se administrará a un mamífero de tal manera que, en último término, se ponga en contacto con las células neoplásicas diana. La vía a través de la cual se administrará el reovirus, así como la formulación, el portador o el vehículo, dependerá de la localización, así como del tipo de células diana. Puede emplearse una amplia variedad de vías de administración. Por ejemplo, para un neoplasma sólido que sea accesible, el reovirus puede usarse para ser administrado mediante una inyección directamente al neoplasma. Para un neoplasma hematopoyético, por ejemplo, el reovirus puede administrarse por vía intravenosa o intravascular. Para neoplasmas que no son fácilmente accesibles dentro del cuerpo, tales como metástasis, el reovirus se usa para ser administrado de una manera tal que pueda transportarse por vía sistémica a través del cuerpo del mamífero y, con ello, alcanzar el neoplasma (por ejemplo, por vía intravenosa o intramuscular). Como alternativa, el reovirus puede emplearse para ser administrado directamente a un solo neoplasma sólido, desde el cual se traslada después por vía sistémica a través del cuerpo hasta la metástasis. El reovirus también puede utilizarse para ser administrado por vía subcutánea, intraperitoneal, intratecal (por ejemplo, para un tumor cerebral), tópica (por ejemplo, para un melanoma), oral (por ejemplo, para un neoplasma oral o esofágico), rectal (por ejemplo, para un neoplasma colorrectal), vaginal (por ejemplo, para un neoplasma cervical o vaginal), nasal o mediante un pulverizado para inhalación (por ejemplo, para un neoplasma de pulmón).

El reovirus o el agente de irradiación pueden usarse para ser administrados en una sola dosis, o en múltiples dosis (es decir, más de una dosis). Las dosis múltiples pueden emplearse para ser administradas al mismo tiempo en diferentes sitios o mediante diferentes vías, o de modo consecutivo (por ejemplo, a lo largo de un periodo de días o semanas). El reovirus se administrará antes de la radiación.

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

La presente invención puede aplicarse a cualquier sujeto animal, preferiblemente un mamífero. El mamífero se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en caninos, felinos, roedores, ganadería doméstica (tal como ovejas, cabras, ganado vacuno, caballos y cerdos), seres humanos y primates no humanos. Preferiblemente, el

mamífero es un ser humano.

Se contempla que la presente invención pueda combinarse con otras terapias tumorales, tales como quimioterapia, cirugía y/o inmunoterapia.

5 Además del reovirus, pueden utilizarse otros virus oncolíticos en la práctica de la presente invención de la misma manera que el reovirus. Sin embargo, estos usos no se incluyen en la presente invención. En particular, el virus oncolítico puede utilizarse para ser administrado a un sitio diferente o en un momento diferente que la radiación. Por ejemplo, el virus puede emplearse para ser administrado por vía sistémica, y la radiación se administra a un tumor local. Como resultado, el tumor local que se irradia muestra una mayor sensibilidad frente a la radiación que en ausencia del virus. Además, otros tumores en el mismo sujeto que no han recibido el virus ni la irradiación también pueden hacerse más sensibles frente a la radiación que en ausencia del virus. De manera similar, el virus puede usarse para ser administrado a un tumor local mientras se irradia otro tumor local, y ambos tumores, así como otros tumores en el mismo animal, pueden tratarse de modo más eficaz con radiación que en ausencia del virus.

15 A continuación se analizan unos cuantos virus oncolíticos, y los expertos en la técnica también pueden practicar la presente invención empleando otros virus oncolíticos, según la presente descripción y el conocimiento disponible en la técnica. El virus oncolítico puede ser un miembro de la familia myoviridae, siphoviridae, podpviridae, tecoviridae, corticoviridae, plasmaviridae, lipothrixviridae, fuselloviridae, poxviridae, iridoviridae, phycodnaviridae, baculoviridae, herpesviridae, adnoviridae, papovaviridae, polidnaviridae, inoviridae, microviridae, geminiviridae, circoviridae, parvoviridae, hepadnaviridae, retroviridae, cyctoviridae, reoviridae, birnaviridae, paramixoviridae, rhabdoviridae, filoviridae, orthomyxoviridae, bunyaviridae, arenaviridae, leviviridae, picornaviridae, sequiviridae, comoviridae, potyviridae, calciviridae, astroviridae, nodaviridae, tetraviridae, tombusviridae, coronaviridae, glaviviridae, togaviridae, o barnaviridae. Al igual que con los reovirus, los virus inmunoprottegidos o reordenados de otros virus oncolíticos también están incluidos en la presente invención. Además, también puede emplearse una combinación de al menos dos virus oncolíticos, incluyendo reovirus, para la práctica de la presente invención, y no deben excluirse de la presente invención.

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

35 Las células neoplásicas con ras activado no están sujetas a la inhibición de la síntesis proteica por la PKR, porque ras inactiva la PKR. Por tanto, estas células son susceptibles a una infección vírica incluso aunque el virus no tenga un sistema inhibitorio de la PKR. Por consiguiente, si los inhibidores de PKR en adenovirus, virus de vaccinia, virus del herpes simplex, o un virus orf de parapoxvirus se muta para que ya no bloquee la función PKR, los virus resultantes no infectarán a las células normales debido a la inhibición de la síntesis proteica por la PKR, pero se replicarán en las células neoplásicas con ras activado que carecen de actividades PKR.

40 Por consiguiente, un virus que se modifique o se mute para que no inhiba la función PKR se replica de modo selectivo en células neoplásicas con ras activado, 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 orf de parapoxvirus mutado en el gen OV20.0L, o un virus de la gripe mutado en el gen NS-1. El virus preferiblemente no es un herpes virus mutado en el gen γ 134.5.

45 Los virus pueden modificarse o mutarse según la conocida relación entre estructura y función de los inhibidores de PKR víricos. Por ejemplo, puesto que la región amino-terminal de la proteína E3 interacciona con el dominio de la región carboxi-terminal de PKR, una deleción o una mutación puntual en 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 la PKR. Hay una mutación de pérdida de función dentro de K3L. Los truncamientos o las mutaciones puntuales dentro de la porción C-terminal de la proteína K3L, que es homóloga a los restos 79 a 83 en eIF-2, suprimen la actividad inhibidora de PKR (Kawagishi-Kobayashi et al., 1997).

50 Otro ejemplo es el virus Delta24, que es un adenovirus mutante que porta una deleción de 24 pares de bases en la región E1A (Fueyo et al., 2000). Esta región es responsable de la unión al supresor de tumor celular Rb y de la inhibición de la función Rb, permitiendo con ello que la maquinaria proliferativa celular avance, y por tanto la replicación vírica, de una manera incontrolada. Delta 24 tiene una deleción en la región de unión a Rb y no se une a Rb. Por tanto, la replicación del virus mutante se ve inhibida por Rb en una célula normal. Sin embargo, si Rb se inactiva y la célula se convierte en neoplásica, Delta24 ya no es inhibido. En lugar de ello, el virus mutante se replica con eficacia y lisa la célula deficiente en Rb.

Además, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) destruye de manera selectiva las células neoplásicas (y puede

- añadirse opcionalmente interferón). Se ha demostrado que un mutante del virus del herpes simplex 1 (HSV-1) deficiente en la expresión de la ribonucleótido reductasa, hrR3, se replica en células de carcinoma de colon pero no en células hepáticas normales (Yoon et al., 2000). El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) se replica de manera preferente en células malignas, y la cepa que se utiliza con más frecuencia es 73-T (Reichard et al., 1992; Zorn et al., 1994; Bar-Eli et al., 1996). El virus de vaccinia se propaga en varias líneas de células tumorales malignas. Se ha demostrado que el virus de la encefalitis tiene un efecto oncolítico en un tumor de sarcoma de ratón, pero puede ser necesaria una atenuación para reducir su infectividad en células normales. Se ha descrito una regresión tumoral en pacientes con tumores infectados por el virus del herpes zoster, el virus de la hepatitis, el virus de la gripe, de la varicela y del sarampión (para un análisis, véase Nemunaitis, 1999).
- 10 El virus oncolítico puede ser natural o modificado. El virus puede estar pretratado de modo químico o bioquímico (por ejemplo, mediante un tratamiento con una proteasa, tal como quimotripsina o tripsina) antes de la administración a las células neoplásicas. Un pretratamiento con una proteasa elimina la cápsida o envuelta externa del virus y puede aumentar la infectividad del virus. El virus puede estar revestido en un liposoma o una micela (Chandran y Nibert, 1998) para reducir o prevenir una respuesta inmunológica de un mamífero que ha desarrollado
- 15 inmunidad frente al virus. Por ejemplo, el virión puede tratarse con quimotripsina en presencia de concentraciones formadoras de micelas de detergentes de sulfato de alquilo para generar una nueva partícula subviriónica infecciosa. El virus oncolítico también puede ser un virus reordenado.
- Resulta preferible que el virus no sea un vehículo para transportar un gen con el objetivo de una terapia génica. Por ejemplo, se han modificado virus para que transporten el gen E1A adenovírico, el gen supresor de tumores p53, genes codificadores de profármacos (Chmura et al., 1999; 2001) o genes bajo un promotor inducible por radiación. Estos virus, de hecho, habitualmente no se replican de manera preferente en células neoplásicas y por tanto no son virus oncolíticos. También resulta preferible que el virus no sea un adenovirus o un herpes virus modificado, o un virus que exprese una proteína E1A funcional.
- 20 Cuando el virus se va a administrar por vía sistémica a mamíferos inmunocompetentes, los mamíferos pueden producir una respuesta inmunológica frente al virus. Esta respuesta inmunológica puede evitarse si el virus es de un subtipo frente al cual el mamífero no ha desarrollado inmunidad, o el virus se ha modificado tal como se ha descrito previamente en la presente de modo que esté inmunoprotegido, por ejemplo, mediante una digestión con proteasas de la cápsida externa o la encapsulación en una micela.
- 25 Como alternativa, se contempla que la inmunocompetencia del mamífero frente al virus pueda suprimirse mediante la coadministración de productos farmacéuticos conocidos en la técnica para suprimir el sistema inmunológico en general (Cuff et al., 1998) o, como alternativa, mediante la administración de anticuerpos anti-antivirus. La inmunidad humoral del mamífero contra el virus también puede reducirse o suprimirse de manera temporal mediante una plasmáforésis de la sangre para eliminar los anticuerpos antivirus. La inmunidad humoral del mamífero contra el virus también puede reducirse o suprimirse de manera temporal mediante la administración intravenosa de una inmunoglobulina no específica al mamífero.
- 30 Se contempla que el virus pueda utilizarse para ser administrado a mamíferos inmunocompetentes junto con la administración de anticuerpos anti-antivirus. Los anticuerpos anti-antivirus utilizados en esta invención se seleccionan, por ejemplo, de anticuerpos anti-antirreovirus, anticuerpos anti-antiadenovirus, anticuerpos anti-antiHSV, anticuerpos anti-antivirus de vaccinia, anticuerpos anti-antigripe, y anticuerpos anti-antivirus orf de parapoxvirus. Estos anticuerpos pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow et al., 1998). Estos anticuerpos anti-antivirus puede utilizarse para ser administrados antes, al mismo tiempo o poco rato después de la administración del virus. Preferiblemente, una cantidad eficaz de los anticuerpos anti-antivirus se utiliza para ser administrada con tiempo suficiente para reducir o eliminar una respuesta inmunológica del mamífero frente al virus.
- 40 En un caso de la presente descripción, que comprende la presente invención, una pauta de terapia vírica se administra una o más veces. Tras la primera administración de la terapia vírica, los constituyentes inmunológicos concretos que podrían interferir con las posteriores administraciones del virus deben retirarse del paciente. Estos constituyentes inmunológicos incluyen células B, células T, anticuerpos y similares.
- 45 La retirada de la población de células B o células T puede realizarse mediante diversos métodos. En un método, la sangre puede filtrarse y realizarse una hemodiálisis. Otro método es la filtración de la sangre acoplada con compuestos extracorpóreos que puedan retirar las poblaciones celulares, por ejemplo con anticuerpos inmovilizantes que reconozcan a los receptores específicos sobre la población celular que se va a retirar. Otro método para eliminar una población celular es mediante la supresión inmunológica. Esto puede realizarse mediante terapia de radiación de primera línea o mediante esteroides cíclicos, tales como ciclosporina.
- 50 La retirada selectiva de los anticuerpos antivirus también puede evitar que el sistema inmunológico del paciente elimine al virus administrado de modo terapéutico. Los anticuerpos pueden retirarse mediante varios métodos, que incluyen la hemodiálisis y hacer pasar la sangre sobre virus inmovilizados (retirada de anticuerpos selectiva); mediante la retirada de todos los anticuerpos IgG mediante hemodiálisis y hacer pasar de la sangre sobre proteína A inmovilizada (disponible en el mercado como PROSORBA, Cypress Biosciences, San Diego, CA); o mediante la
- 55

administración de anticuerpos antiidiotípicos humanizados, en los que el idiotipo es contra el virus que se va a administrar.

5 En esta invención también se incluye permitir que el virus actúe de modo sistémico sin deteriorar la función inmunológica normal ocultando o afectando el reconocimiento inmunológico del virus. Para evitar que el sistema inmunológico del paciente reconozca el virus administrado, el virus puede revestirse con anticuerpos humanizados no virotóxicos, tal como un revestimiento con la porción Fab del anticuerpo, o revestirse en una micela. Además, el virus puede tratarse con quimotripsina para producir una partícula subvívica infecciosa (ISVP). Una ISVP puede utilizarse por sí sola o en combinación con el virus completo para proporcionar un agente que es poco reconocido o que no ha sido previamente prevenido por el sistema inmunológico del paciente.

10 Otro caso de la presente invención, que comprende la presente invención, incluye la retirada del virus del paciente después de la administración. Puesto que este método puede emplearse en pacientes que están inmunosuprimidos o que son inmunoincompetentes, puede ser importante retirar el virus de la corriente sanguínea después de la pauta de tratamiento. El virus puede retirarse mediante una cromatografía de afinidad empleando anticuerpos antiviral extracorpóreos asociados con la hemodiálisis, agentes proliferativos de células B, o adyuvantes para estimular la respuesta inmunológica contra el virus, tales como un virus inactivado por UV o adyuvante de Freund.

15 En los ejemplos que aparecen a continuación, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Las abreviaturas no definidas tienen su significado generalmente aceptado.

°C = grados Celsius

hr = hora

20 min = minuto

μM = micromolar

mM = milimolar

M = molar

ml = mililitro

25 μl = microlitro

mg = miligramo

μg = microgramo

FBS = suero bovino fetal

DTT = ditioneitol

30 PBS = disolución salina tamponada con fosfato

DMEM = medio de Eagle modificado de Dulbecco

MEM = medio de Eagle modificado

MOI = multiplicidad de infección

PFU = unidades formadoras de placa

35 PKR = proteína quinasa activada por ARN bicatenario

EGF = factor del crecimiento epidérmico

PDGF = factor del crecimiento derivado de plaquetas

DMSO = dimetilsulfóxido

CPE = efecto citopático

40 cGy = centiGray

EJEMPLO 1

Combinación de reovirus y terapias de radiación

5 Una paciente de 48 años padecía un tumor de cabeza y cuello (nasofaríngeo). Tenía tres lesiones grandes en el área del cuello, una en el lado derecho, otra bajo la mandíbula y la tercera en el lado izquierdo. La del lado derecho era la más grande y se extendía casi desde la oreja hasta el hombro. La paciente había sido tratada con quimioterapia y terapia de radiación sin que tuviesen efecto o con recurrencia al poco tiempo después de una moderada respuesta.

10 Después de la quimioterapia y de la terapia de radiación, la paciente se trató con terapia de reovirus. Así, se inyectaron 1×10^9 reovirus de la cepa Dearing en la lesión del lado izquierdo en los días 0, 2 y 4, respectivamente. El reovirus se preparó como se ha descrito previamente (publicación de solicitud de patente de EEUU nº 200220037576). Los tumores se midieron en el día 0 para establecer el nivel de línea de base para cada tumor. Tal como se muestra en la tabla 1, la lesión del lado izquierdo y la lesión bajo la mandíbula medían aproximadamente 4 cm^2 y 19 cm^2 en el día 0, respectivamente. La lesión del lado derecho no se midió porque era tan grande que la medición no iba a ser significativa.

Tabla 1. Tamaño de los tumores, RT-PCR sérico y titulación de anticuerpos después de la administración del reovirus

	Mediciones del tamaño de los tumores		Reovirus sérico mediante RT-PCR	Titulación de los anticuerpos séricos
	Lesión en el lado izquierdo	Lesión bajo la mandíbula		
Día 0	4,39	18,87	negativo	<8
Día 7	4,56	13,95	negativo	1024
Día 14	6,76	18,62	negativo	1024
Día 21	7	31,5	negativo	1024
Día 28	4,08	28,06	negativo	1024
Día 35	4,14	17,1	negativo	1024
Día 42	4,83	19,6	positivo	1024
Día 70	1,12	21,12	negativo	1024
Día 98	4	4,64	negativo	1024

20 Para otras mediciones de la línea de base, se obtuvo sangre de la paciente para determinar la presencia del reovirus mediante una reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) utilizando cebadores específicos de reovirus. Además también se determinó la titulación de anticuerpos neutralizantes antirreovirus en el suero de la paciente, lo cual se realizó incubando muestras de suero diluidas con un cultivo de células L929 y reovirus. Mientras que la infección de las células L929 por el reovirus produce un efecto citopático (CPE) en las células infectadas, el CPE puede ser inhibido por los anticuerpos neutralizantes antirreovirus. Por tanto, la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero viene indicada por la inhibición del CPE en este ensayo, y el factor de dilución del suero más alto que fue capaz de inhibir en 50% de las células el desarrollo de un CPE se consideró que era la valoración de los anticuerpos. Tal como se muestra en la tabla 1, el reovirus no pudo detectarse mediante RT-PCR en el día 0, y el nivel de anticuerpos antirreovirus fue insignificante.

30 Entonces se midieron periódicamente el tamaño de los tumores, el reovirus y los anticuerpos antirreovirus, y los resultados se muestran en la tabla 1. El tumor en el lado izquierdo y la lesión bajo la mandíbula continuaron creciendo durante unas pocas semanas. Sin embargo, en el día 28, las mediciones de los tumores revelaron que la lesión en el lado izquierdo (el sitio inyectado) disminuyó en tamaño y estaba palpablemente más blanda. La lesión bajo la mandíbula también se redujo ligeramente. La lesión en el lado derecho era demasiado grande para ser medida con precisión, pero parecía que no habían producido cambios. Unos niveles significativos de anticuerpos antirreovirus aparecieron en el suero después de la inyección del reovirus, indicando que los reovirus se habían replicado en la paciente y habían sido reconocidos por el sistema inmunológico. A veces incluso se detectaron partículas víricas en la sangre mediante RT-PCR. Por tanto, el reovirus se había propagado más allá del sitio de

inyección.

5 En el día 50, el paciente recibió una terapia de radiación en la masa tumoral del lado derecho utilizando sólo haces de electrones, a una dosis tumoral de 300 cGy6 definida a 100% de isodosis en diez fracciones diarias durante 14 días. De manera sorprendente, la evaluación visual en el día 70 reveló que este tumor había disminuido un poco de tamaño aunque la irradiación se había iniciado sólo hacía 20 días. En el día 98, este tumor se redujo en aproximadamente 10-25% del tamaño de la línea de base. Por tanto, el reovirus es capaz de sensibilizar células tumorales frente a la terapia de radiación. Este efecto no se limita a las células que se habían puesto en contacto directamente con el reovirus, puesto que las células en la masa tumoral del lado derecho no recibieron una inyección de reovirus. Este fenómeno resulta coherente con la observación previa de los inventores de que el tratamiento de un tumor en un sujeto con el reovirus puede conducir a la reducción de otro tumor en el mismo sujeto.

10 Además, la lesión en el lado izquierdo, que se había inyectada con el reovirus pero no se había irradiado, disminuyó su tamaño hasta una cuarta parte del tamaño de la línea de base 20 días después de la irradiación de la lesión del lado derecho (día 70), lo cual indica que la administración de radiación y reovirus puede inducir un efecto espectador entre ellas. Como otro resultado putativo del efecto espectador, la lesión bajo la mandíbula, que no estaba en el campo de la radiación ni fue inyectada con reovirus, redujo su tamaño hasta una cuarta parte del tamaño de la línea de base en el día 98.

15 A la vista de estos resultados, la combinación de una terapia con reovirus y una terapia de radiación es un régimen de tratamiento sorprendentemente eficaz, y su efecto no se limita a las lesiones que reciben el reovirus o la radiación. En lugar de ello, todos los tumores en el mismo sujeto, incluyendo los tumores metastásicos, son inhibidos por la combinación de reovirus y radiación.

Referencias citadas en la descripción

- 20 Patente de EEUU nº 6.136.307.
- Patente de EEUU nº 6.100.243.
- Publicación de solicitud de patente de EEUU nº 20020037576.
- 25 Bar-Eli, N., et al., "Preferential cytotoxic effect of Newcastle disease virus on lymphoma cells", J. Cancer Res. Clin. Oncol., 122:409-415 (1996).
- Chandran 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):467-475 (1998).
- Chang et al., PNAS, 89:4825-4829 (1992).
- 30 Chang, H.W., et al., Virology, 194:537-547 (1993).
- Chang et al., J. Virol., 69:6605-6608 (1995).
- Chmura et al., "Strategies for enhancing viral-based gene therapy using ionizing radiation", Radiation oncology Investigations, 7:261-269 (1999).
- 35 Chmura et al., "Prospects for viral-based strategies enhancing the anti-tumor effects of ionizing radiation", Seminars in Radiation Oncology, 11(4):338-345 (2001).
- Cuff et al., "Enteric reovirus infection as a probe to study immunotoxicity of the gastrointestinal tract", Toxicological Sciences, 42(2):99-108 (1998).
- Duncan et al., "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein", Virology, 182(2):810-819 (1991).
- 40 Fields, B.N., et al., Fundamental Virology, 3ª edición, Lippincott-Raven (1996).
- Fueyo, J., et al., "A Mutant Oncolytic Adenovirus Targeting the Rb Pathway Produces Anti-Glioma Effect in Vivo", Oncogene, 19(1):2-12 (2000).
- Harlow et al., "Antibodies. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988.
- Kawagishi-Kobayashi, M., et al., Mol. Cell. Biology, 17:4146-4158 (1997).
- 45 Mah et al., "The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possess intrinsic virion-anchoring function", Virology, 179(1):95-103 (1990).
- Nemunaitis, J., Invest. New Drugs, 17:375-386 (1999).

Nibert, M.L., Shiff, L.A., y Fields, B.N., "Reoviruses and their replication", pp. 1557-1596, en *Fundamental Virology* (Fields et al., 3ª edición), Lippencott-Raven Press, 1996.

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

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

Sharp et al., *Virology*, 250:301-315 (1998).

Turner y Duncan, "Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma1: evidence for a conformation-dependent receptor binding domain", *Virology*, 186(1):219-227 (1992).

10 Yoon, S.S., et al., "An Oncolytic Herpes Simplex Virus Type I Selectively Destroys Diffuse Liver Metastases from Colon Carcinoma", *FASEB J.*, 14:301-311 (2000).

Zorn, U., et al., "Induction of Cytokines and Cytotoxicity against Tumor Cells by Newcastle Disease Virus", *Cancer Biotherapy*, 9(3):22-235 (1994).

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de una cantidad eficaz de un reovirus para la preparación de una composición farmacéutica para sensibilizar una célula neoplásica frente a la irradiación, en el que:
- (a) la composición farmacéutica se administra a dicha célula neoplásica; y
- 5 (b) la célula se somete a una dosis eficaz de un agente de irradiación para aumentar la sensibilidad de la célula neoplásica frente al agente de irradiación mediante el reovirus,
- en el que el reovirus se administra antes de la irradiación.
- 2.- Uso de una cantidad eficaz de un reovirus para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o mejorar un tumor en un sujeto, en el que:
- 10 (a) la composición farmacéutica se administra al sujeto bajo condiciones que producen la infección de las células del tumor por el reovirus; y
- (b) el sujeto se irradia con una dosis eficaz de un agente de irradiación,
- en el que el reovirus se administra antes de la irradiación.
- 3.- El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el reovirus se administra en dosis múltiples.
- 15 4.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula neoplásica se localiza en un mamífero o el sujeto es un mamífero.
- 5.- El uso de la reivindicación 4, en el que el mamífero se selecciona del grupo que consiste en perros, gatos, roedores, ovejas, cabras, ganado vacuno, caballos, cerdos, seres humanos y primates no humanos.
- 20 6.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el agente de irradiación se selecciona del grupo que consiste en electrones, rayos X, y rayos gamma.
- 7.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la célula neoplásica está en un tumor sólido, un tumor hematopoyético o un tumor metastásico, o el tumor es un tumor sólido, un tumor hematopoyético o un tumor metastásico.
- 25 8.- El uso de la reivindicación 7, en el que el tumor sólido se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmon, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer adrenal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de mama, y cáncer del sistema nervioso central y periférico.
- 9.- El uso de la reivindicación 7 u 8, en el que el reovirus se administra en el tumor sólido o cerca de éste.
- 10.- El uso de la reivindicación 7, en el que el tumor hematopoyético se selecciona del grupo que consiste en linfomas y leucemias.
- 30 11.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 ó 10, en el que el reovirus se administra por vía sistémica.
- 12.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el reovirus es un reovirus de mamífero.
- 13.- El uso de la reivindicación 12, en el que el reovirus de mamífero es un reovirus humano.
- 14.- El uso de la reivindicación 13, en el que el reovirus humano es un reovirus de serotipo 3.
- 35 15.- El uso de la reivindicación 14, en el que el reovirus de serotipo 3 es un reovirus de la cepa Dearing.
- 16.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que el reovirus es un reovirus recombinante.
- 17.- Un método *in vitro* para sensibilizar una célula neoplásica frente a la irradiación, que comprende:
- (a) administrar a dicha célula neoplásica una cantidad eficaz de un reovirus; y
- 40 (b) someter dicha célula a una dosis eficaz de un agente de irradiación, con lo que la sensibilidad de la célula neoplásica al agente de irradiación aumenta por el reovirus,
- en el que el reovirus se administra antes de la irradiación.

18.- El método de la reivindicación 17, en el que el agente de irradiación se selecciona del grupo que consiste en electrones, rayos X, y rayos gamma.

19.- El método de la reivindicación 17 ó 18, en el que el reovirus es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16.