(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 402 138**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/76 (2006.01)
A61K 31/4188 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2007** **E 07025216 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012** **EP 2082745**

(54) Título: **Terapia contra el cáncer con un parvovirus combinado con quimioterapia**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.04.2013

(73) Titular/es:

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM, STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (50.0%)
IM NEUENHEIMER FELD 280
69120 HEIDELBERG, DE y
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG (50.0%)

(72) Inventor/es:

ROMMELAERE, JEAN;
RAYKOV, ZAHARI;
SCHLEHOFER, JÖRG;
KIPRIJANOVA, IRINA;
HEIMBERGER, TANJA;
ANGELOVA, ASSIA;
GELETNEKY, KARSTEN y
APRAHAMIAN, MARC

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 402 138 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia contra el cáncer con un parvovirus combinado con quimioterapia

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

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

La terapia del cáncer usando virus o derivados de vectores armados que matan específicamente las células transformadas neoplásicamente (oncolisis) es un nuevo enfoque al tratamiento de esta enfermedad mortal.[6] Algunos parvovirus autónomos pertenecen a la categoría de los denominados virus oncolíticos.[7] Los parvovirus son partículas pequeñas (25-30 nm) sin cubierta que contienen un genoma de ADN monocatenario de 5,1 kb desde el que se expresan dos proteínas no estructurales (NS1, NS2) y dos de la cápsida (VP1, VP2). [8] El parvovirus H-1PV tiene la única ventaja de desencadenar un proceso de muerte distinto, al menos en tumores cerebrales y en algunos otros tumores, a saber, la recolocación citosólica y la activación de las proteasas lisosómicas (catepsinas). [12] Varios miembros del género parvovirus (H-1PV, MVM, Lull), cuyos huéspedes naturales son los roedores, están actualmente siendo considerados para aplicaciones en terapia génica del cáncer debido a su fracaso para transformar las células huésped, la capacidad de producir infección asintomática de seres humanos y la habilidad para propagarse preferentemente (oncotropismo) y matar (oncolisis) células transformadas neoplásicamente. [9, 10, 23] Se ha demostrado que los virus MVMp y H-1PV ejercen actividades oncosupresoras *in vivo*, es decir son capaces de inhibir la formación de tumores espontáneos química o víricamente inducidos en animales de laboratorio. Los vectores basados en un casete de expresión de parvovirus conservan las características oncotrópicas de los virus silvestres. [11] A pesar de los impresionantes resultados conseguidos, la eficacia anticancerosa de los candidatos de parvovirus más prometedores para las aplicaciones clínicas en humanos (incluido el H-1PV) tienen que mejorarse, por ejemplo en lo que respecta a la prolongación del ciclo de vida tras el diagnóstico.

Además, se sabe que los vectores de parvoviridae se pueden emplear como vehículo con el fin de introducir un ácido nucleico supresor tumoral, es decir un gen supresor tumoral, en un paciente que sufre cáncer [24].

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

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

quimioterapéutico temzolomida. Por tanto, los parvovirus tienen un tremendo potencial terapéutico para tratar cánceres como ACDP y gliomas, preferentemente en combinación con quimioterapia en un protocolo de dos etapas.

Breve descripción de las figuras

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

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

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

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

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

(A) Micrografías de células Panc-1^R y BxPC-3^R resistentes a gemcitabina, infectadas (H-1PV) o no (simulado) con H- 1PV a una MOI de 10 ufc/célula.

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

(C) Sensibilidad de las células Panc-1 (parte superior) y BxPC-3 (parte inferior) resistentes a gemcitabina (R) y parentales al tratamiento con H-1PV frente al tratamiento con gemcitabina. Las células se sembraron a una densidad de 2 x 10^3 células/pocillo en placas de 96 pocillos y se trataron con H-1PV a una MOI de 10 ufc/célula (columnas de H-1PV) o con 0,04 µg/ml de gemcitabina (columnas de gemcitabina). Se realizaron ensayos de citotoxicidad MTT 144 horas después del tratamiento. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes realizados por duplicado.

(D) Transducción de células Panc-1 y Panc-1^R con un virus H-1PV recombinante que expresa EGFP. Los cultivos (2x10^3 células/pocillo) se trataron (parte inferior) o no (parte superior) con gemcitabina (0,04 µg/ml) y se infectaron de forma concomitante con el vector viral (5 ufc/célula). Las células transducidas se detectaron mediante microscopia de fluorescencia a las 48 horas de la infección. Se muestran los campos representativos.

Figura 3**:** Supresión inducida por H-1PV del crecimiento de celulas de ADCP de rata *in vitro* y formación de tumores *in vivo*

(A) Sensibilidad de la línea de células de ACDP de ratas HA-RPC al efecto de destrucción del H-1PV La supervivencia celular se midió mediante ensayos MTT realizados 72 horas después de la infección a las multiplicidades indicadas en comparación con cultivos tratados de forma simulada (100%) y se expresó de forma inversa como el porcentaje de la muerte celular.

(B) Efecto del H-1PV sobre la formación de ACDP de células HA-RPC implantadas. Las ratas (n=26) recibieron una inyección intrapancreática de células HA-RPC y las neoplasias en desarrollo se trataron 2 semanas después mediante inoculación intratumoral de 1 x 10^9 ufc de H-1PV (n= 16) o PBS (n= 10). Los volúmenes de los tumores se midieron mediante barrido TCm como una función del tiempo y se presentan como los valores medios con barras de SD.

(C) Supervivencia de animales tratados con H-1PV frente a simulado. Diez ratas de cada grupo se siguieron hasta 16 semanas, tiempo tras el cual se detuvo el experimento.

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

Figura 4: Imagen de TCm de tumores pancreáticos ortotópicos

(A) Imágenes TC abdominales de una rata en un estadio inicial (2 semanas) tras el inicio del tumor, que muestra un tumor de unos 5 mm^3 de tamaño (línea discontinua) en la cola del páncreas.

(B) Evolución del ACDP en ausencia de viroterapia, con una gran masa de tumor primario (líneas discontinuas)

y metástasis en los ganglios linfáticos y el hígado (flechas) a las 8 semanas del inicio.

(C) Regresión del tumor primario y ausencia de metástasis en una rata tratada con H-1PV y examinada 2 y 8 semanas después del inicio.

Se seleccionaron las imágenes más demostrativas de TCm sagitales, axiales y coronales para ilustrar la localización de los tumores primarios y las metástasis.

Figura 5: Supervivencia de las ratas portadoras de tumor tras el tratamiento combinado con gemcitabina y parvovirus

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

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

Se obtuvo sangre de 3 ratas portadoras de ACDP cada una de los grupos control, gemcitabina y gemcitabina antes de H-1PV (véase la Fig. 5) 2 semanas después del tratamiento terapéutico. Las muestras de sangre se analizaron para determinar los valores de (A) recuentos de glóbulos rojos (RBC), plaquetas y glóbulos blancos (WBC) y parámetros relacionados; y (B) marcadores en hígado (aspartato aminotransferasa [ASAT], alanina aminotransferasa [ALAT]) y en riñón (creatinina). Los datos mostrados son los valores medios con barras de SD.

Figura 7: Astrocitos tras tratamiento durante 6 días

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer, en la que dicha composición farmacéutica comprende (a) un parvovirus y (b) un agente quimioterapéutico, en el que dicho parvovirus es (a) H-1 (H-1PV) o un parvovirus de roedor relacionado seleccionado del grupo que consiste en Lull, virus diminuto del ratón (MMV), parvovirus del ratón (MPV), virus diminuto de rata (RMV), parvovirus de la rata (RPV) o virus de la rata (RV), y en el que dicho parvovirus (a) se ha de administrar tras el agente quimioterapéutico (b).

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

Una “dosis eficaz” hace referencia a cantidades de los ingredientes activos que son suficientes para afectar a la

evolución y gravedad de la enfermedad, que conduce a la reducción o remisión de dicha patología. Una “dosis eficaz” útil para tratar y/o prevenir enfermedades o trastornos se puede determinar usando procedimientos conocidos para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Fingl y col., The Pharmocological Basis of Therapeutics, Goodman yGilman, eds. Macmillan Publishing Co., New York, pág. 1-46 ((1975)).

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

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

Si el o los agentes parvoterapéuticos de la combinación de agentes de acuerdo con la invención comprenden partículas de virus infecciosas con la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, el tratamiento de puede realizar, o al menos iniciar, mediante inyección intravenosa del agente terapéutico viral, por ejemplo el virus H-1. Una vía de administración preferida es la administración intratumoral.

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

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

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

Como otro procedimiento de administración más de la composición parvoterapéutica es un artículo implantado construido y dispuesto para dispensar el agente parvoterapéutico al tejido canceroso deseado. Por ejemplo, se pueden emplear obleas que se han impregnado con la composición parvoterapéutica, por ejemplo el parvovirus H-1, en las que la oblea está unida a los bordes de la cavidad de resección al final de la eliminación quirúrgica del tumor. En dicha intervención terapéutica se pueden emplear múltiples obleas. Las células que producen de forma activa el agente parvoterapéutico, por ejemplo el parvovirus H1, o vectores H1, se pueden inyectar en el tumor o en la cavidad tumoral tras la eliminación del tumor.

La terapia combinada de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento terapéutico del cáncer, en particular en tumores cerebrales y cáncer pancreático, y puede mejorar significativamente el pronóstico de dichas enfermedades. La infección por parvovirus H-1 efectúa la muerte de las células tumorales, pero no daña las células normales y dicha infección puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, uso intracerebral de un parvovirus adecuado, por ejemplo parvovirus H-1, o un virus relacionado, o vectores basados en dichos virus, para efectuar la terapia específica de tumor sin efectos secundarios neurológicos adversos o de otro tipo.

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

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

El término “parvovirus”, como se usa en el presente documento, comprende derivados del mismo silvestre o de

replicación competente modificados. Parvovirus adecuados que se pueden usar para producir activamente dichos parvovirus y que son útiles para terapia se pueden determinar con facilidad dentro de la experiencia en la técnica en base a la divulgación del presente documento, sin esfuerzos empíricos indebidos.

De acuerdo con la presente invención, el parvovirus de la composición incluye parvovirus H-1 (H-1PV) o un parvovirus relacionado, tal como Lulll, virus diminuto del ratón (MMV), parvovirus del ratón (MPV), virus diminuto de la rata (RMV), parvovirus de la rata (RPV) o virus de la rata (RV).

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

Los agentes quimioterapéuticos útiles para los fines de la presente invención incluyen compuestos químicos que son eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral. La administración de agentes quimioterapéuticos se puede conseguir de diversas formas (véase anteriormente), incluidas, sistémicamente, las vías parenteral y enteral. Preferentemente, el parvovirus y el agente quimioterapéutico se administran como compuestos separados.

De acuerdo con la presente invención, el parvovirus se administra después del agente quimioterapéutico. El periodo de tiempo preferido entre la administración del agente quimioterapéutico y el parvovirus es de 14 a 35 días.

Ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen agentes alquilantes, por ejemplo mostazas de nitrógeno, compuestos de etilenimina y sulfonatos de alquilo; antimetabolitos, por ejemplo ácido fólico, antagonistas púricos o pirimidínicos, inhibidores de la mitosis, por ejemplo alcaloides de la vinca y derivados de podofilotoxina; antibióticos citotóxicos; compuestos que dañan o interfieren en la expresión del ADN; y antagonistas del receptor del factor de crecimiento.

Ejemplos concretos de agentes quimioterapéuticos adecuados para la terapia de combinación incluyen cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina mecloretamina (mostaza de nitrógeno), estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina, daunorubicina, procarbazina, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo, vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleukina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxiurea, ifosfamida, leuprólido, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobroman, plicamiina, estreptozocina, tamoxifen, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo y combinaciones del mismo. Agentes quimioterapéuticos particularmente preferidos son gemcitabina y temozolodina.

Los ejemplos siguientes explican con detalle la invención.

Ejemplo 1

Materiales y procedimientos

(A) Cultivo celular y tratamiento

Las líneas celulares de carcinoma pancreático humano se obtuvieron de la ATCC (Manassas, VA) y se cultivaron en medios RPMI 1640 (BxPC-3 y Capan-1) o DMEM (Panc-1) suplementados con 10% de suero bovino fetal (FCS). Las células resistentes se generaron mediante múltiples pases de células con dosis crecientes de gemcitabina a partir de una concentración de 0,0004 μg/ml durante 2 horas y se amplió a 0,004 μg/ml durante 24 horas.

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

(B) Viabilidad celular

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

(C) Producción y detección de virus

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

Para el análisis de la transcripción del virus en los órganos de animales tratados o cultivos de células de ACDP, se extrajo el ARN total de las muestras de los tejidos obtenidos o sedimentos celulares con reactivo Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN se sometió a transcripción inversa en ADNc y se cuantificó usando el protocolo RT-PCR detallado anteriormente. [15] Los tránscritos de H-1PV se detectaron en forma de fragmentos de PCR de 512 y de 415 pb, dependiendo de la escisión del intrón pequeño, usando el par de cebadores: 5'-TCAATGCGCTCACCATCTCTG-3' (directo) y 5'-TCGTAGGCTTCGTCGTGTTCT-3' (inverso). Los cebadores específicos para los ARNm de hENT y dCK fueron los siguientes: hENT-5'-AAAGGAGAGGAGCCAAGAGC-3' (directo) y 5'-GGCCCAACCAGTCAAAGATA-3' (inverso); dCK- 5'-CCCGCATCAAGAAAATCTCC-3' (directo) Y 5'-TCCATCCAGTCATGCCAGTC-3' (inverso). Los cebadores usados para detectar la expresión de ß-actina humana y los genes de MDR, MRP1 y MRP2 se han descrito anteriormente .[16]

(D) Estudios en animales

(i) Anestesia. Todos los procedimientos quirúrgicos y de imagen se realizaron con anestesia gaseosa con 3% de isoflurano (Aerrane®, Baxter, Maurepas, Francia) en oxígeno puro y una inyección intramuscular concomitante de 2-3 mg/lg de xilazina clorhidrato (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Alemania) como analgesia para cirugía.

(ii) Modelo de tumor. Para la implantación de un carcinoma pancreático se usaron ratas macho de Lewis (Janvier, Le Genest Saint Isle, Francia) de un peso de 180-200 g. Se inyectaron 5.10^6 células HA-RPC en el parénquima pancreático. La progresión del tumor se confina a la cola pancreática durante las primeras3 semanas de la implantación, lo que conduce a la invasión de los ganglios linfáticos durante la 4 ª semana. La metástasis hepática aparece a la semana 5-6 y la muerte con metástasis pulmonar se produce en un plazo de 6-9 semanas. [17] Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales (Temperatura 22 ± 2 ºC, humedad relativa 55 ± 10 %, ritmo de oscuridad-luz de 12 horas) con acceso sin restricciones a una dieta de pienso equilibrada y agua. Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las directivas francesa y europea para la protección de animales (número 86/609/CEE de 24 de noviembre de 1986). Se aplicó gemcitabina mediante inyección intraperitoneal (100 mg/kg). El H-1PV se inoculó por vía intratumoral (i.t.). Las muestras de sangre se extrajeron de la vena de la cola del animal 2 semanas después del último tratamiento terapéutico. Los marcadores toxicológicos se analizaron en el Strasbourg University Hospital usando análisis clínicos de laboratorio automáticos (dispositivo de multiparámetros bioquímicos ADVIA 160, Siemens, Cergy Pontoise, Francia).

(iii) Adquisición y reconstrucción de imágenes. Las imágenes se obtuvieron en un aparato Imtek microCT (microCAT-II, Imtek Inc., Knowville, TN) usando una tensión de rayos X de 80 kVp y corriente anódica 500 PA. Se usó adquisición encuadrada por respiratorio para evitar los cambios en la posición del órgano abdominal y el consiguiente borrado de la delineación. Los agentes de contraste Fenestra® LC y Fenestra® VC (Alerion Biomedical Inc., San Diego, CA) para el hígado y contraste vascular persistente, respectivamente, se inyectaron de forma concomitante por vía intraperitoneal 9 horas antes de la imagen. Los datos de las imágenes se adquirieron y reconstruyeron usando el software autorizado de Imtek (versión Cobra 4.1-4, Exxim computing corporation, Knoxville, TN). Las imágenes 3Dn se visualizaron usando el software Amira (Amira Advanced Visualization, Data analysis, and Geometry Reconstruction v.3.1, San Diego, CA). Los tumores o metástasis que aparecieron como defectos de color negro dentro del hígado o el lóbulo pancreático contrastado se midieron tridimensionalmente usando el conjunto de datos Amira 3D.

(E) Análisis estadístico

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

Ejemplo 2

H-1PV mata de forma eficaz cultivos de células de cáncer pancreático humanas, tanto solo como en combinación con gemcitabina

Dos líneas celulares de origen humano, Panc-1 and BxPC-3, se analizaron primero según su sensibilidad al efecto tóxico del H-1PV. Se encontró que el virus era muy eficaz en la prevención de ambas líneas celulares de formar colonias, alcanzando un 50 % de inhibición en una MOI tan baja como de 1 ufc por célula (Fig. 1A). Esta Supresión de clonogenicidad se podía asignar, al menos en parte, al efecto de muerte del H-1PV sobre las células de ACDP humanas, confirmado mediante ensayos de viabilidad (Fig. 1B).

Debido a estos alentadores resultados, después se evaluó la extensión hasta la cual la infección por H-1PV podía añadirse al efecto citotóxico de la gemcitabina sobre las líneas celulares mencionadas anteriormente. Con este fin, se suplementaron los cultivos a un intervalo de 24 horas con diferentes concentraciones de gemcitabina y el H-1PV se incubó además durante 3 días y se analizó su viabilidad usando los ensayos MTT. Como se ilustra en la Fig. 1B, el parvovirus y la gemcitabina colaboraron en la muerte de las líneas celulares ACDP en un intervalo de dosis a las que cada agente solo era poco o moderadamente activo. Por tanto, el tratamiento con gemcitabina era necesario para que la fracción muerta de células infectadas por H-1PV (MOI 10) alcanzara el 50 % (Fig. 1B, triángulos), sino una concentración de fármaco (CC50) que era hasta 10 veces menor en comparación con la requerida para matar la misma proporción de células no infectadas (Fig. 1B, círculos).

Ejemplo 3

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

Dado que el desarrollo de resistencia a gemcitabina es un inconveniente fundamental del tratamiento a largo plazo de los pacientes de ACDP con este fármaco, se analizó el efecto de la infección por PV sobre la supervivencia de las variantes celulares resistentes a gemcitabina derivadas de las líneas mencionadas anteriormente. Las poblaciones resistentes (R) se seleccionaron mediante tratamiento secuencial de las líneas Panc-1 and BxPC-3 con dosis crecientes del fármaco hasta 0,0004 µg/ml durante 24 horas (Fig.2 A). Las variantes resistentes eran distinguibles de las respectivas líneas celulares parentales por una expresión potenciada de fármacos MDR y de exportación del fármaco MRP, mientras que los niveles de los marcadores de importación (hENT) y activación (dCK) permanecieron invariables (Fig. 2A), lo que sugiere que el fenotipo resistente se debía principalmente a una descarga de gemcitabina más eficiente. En contraste con su mayor resistencia al tratamiento con gemcitabina (0,04 µg/ml durante 6 días), que era muy tóxico para las líneas originales (Fig. 2C, columna de gemcitabina), las variantes resistentes a fármacos mantuvieron la sensibilidad de sus homólogos no seleccionados a la infección por H-1PV (Fig. 2C, columna de H-1PV). En las poblaciones celulares BxPC-3^{R} frente a BxPC-3 incluso se observó un ligero pero significativo incremento de la muerte inducida por H-1PV- Estos resultados abren la intrigante posibilidad del uso de H-1PV como tratamiento de segunda línea del ACDP para sortear la resistencia adquirida a la gemcitabina. Esta situación se respaldó también mostrando que el fenotipo resistente a gemcitabina se correlaciona con la protección de las células contra la interferencia de dosis de fármaco tóxicas con la progresión del ciclo de vida del parvovirus. De hecho, la expresión del marcador proteico (EGFP) dirigida por un vector parvovirus recombinante persistió en células Panc-1^{R}, con independencia de su exposición a una dosis de gemcitabina que abolía la transducción de las células parentales (Fig. 2D). Se concluyó que las variantes de células tumorales quimiorresistentes siguen siendo dianas de H-1PV incluso en condiciones en las que se continúa la terapia con gemcitabina.

En conjunto, estos experimentos in vitro sugerían que el H-1PV puede mejorar el efecto terapéutico de la gemcitabina, no solo reforzando la muerte global de las células sensibles al fármaco sino erradicando las variantes quimiorresistentes que surgen en estadios tardíos del tratamiento con fármacos. Por tanto, el potencial anti-ADPC del H-1PV se evaluó después en una situación *in vivo*.

Ejemplo 4

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

Para simular la situación clínica más estrechamente se usó un modelo de rata inmunocompetente de carcinoma ductal implantado con localización intrapancreática para evaluar la actividad anticancerosa del H-1PV. Dado que la rata es el huésped natural de H-1PV, el sistema también es adecuado para la evaluación toxicológica del parvovirus, otro requisito previo para su aplicación clínica. Las células de ACDP de rata usadas en el modelo (HA-RPC) se analizaron primero *in vitro* para determinar su susceptibilidad a la infección por H-1PV y se descubrió que se destruían con una eficiencia similar a las células de ACDP humanas (Fig. 3A).

A continuación, el virus oncolítico se administró *in vivo* mediante una única inyección intratumoral 2 semanas después del inicio del proceso neoplásico (es decir, implantación de las células HARPC en el páncreas). Se determinaron el tamaño del tumor (medido mediante TCm e inspección macroscópica tras la muerte), la supervivencia del animal y la distribución del virus. La viroterapia produjo un retraso en el crecimiento tumoral (Fig. 3B) y, en algunos casos, la desaparición completa del tumor previo (Fig. 4, compárese A y C). Como se ilustra en la

Fig. 3C, las ratas en el grupo tratado con virus sobrevivieron mucho más tiempo que los controles tratados de forma simulada, con un 20% de los animales sin enfermedad durante 16 semanas, momento en el cual se detuvo el experimento. Una característica principal de los virus oncolíticos reside en su expresión selectiva dentro de los tumores frente a los tejidos normales. Se analizaron los órganos de la cavidad abdominal para determinar la presencia de tránscritos H-1PV mediante RT-PCR. Como se muestra en la Fig. 3D, se observó una descarga de expresión del virus poco después de la infección en el tumor y en el tejido pancreático de alrededor y, en menor medida, en los órganos linfoides de acuerdo con observaciones previas en otros modelos. [15]. A partir del décimo día, la expresión del virus disminuyó, muy probablemente a causa de la aparición de anticuerpos neutralizantes del virus que redujeron la diseminación del virus y solo persistió en el tumor durante hasta 20 días después de la inoculación. [18]

Además de la expansión local del tumor primario, las metástasis linfo y hematógenas que afectan a los ganglios linfáticos viscerales de la cavidad abdominal superior y el hígado, respectivamente, desempeñan un papel fundamental en la mortalidad por ACDP. De hecho, la monitorización de TCm de ratas no infectadas reveló invasión metastásica de los ganglios linfáticos pancreáticos, pilóricos y hepáticos y del hígado (Fig. 4B, flechas). La inoculación del tumor primario con H-1PV en un estadio primario (correspondiente a las imágenes de la Fig. 4A) tuvo como resultado la supresión no solo de este tumor sino también de las metástasis distantes (Fig. 4C). Es interesante el hecho de que la formación de metástasis hepáticas en ratas control pero no en las infectadas se correlacionó con la expresión tardía del virus en el órgano (Fig. 3C), lo que sugiere que el H-1PV puede controlar de forma activa la enfermedad metastásica.

Ejemplo 5

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

En base a la capacidad bien documentada anteriormente del H-1PV para colaborar con gemcitabina en la supresión del crecimiento de células ACDP (Fig. 1B y 2C), los inventores investigaron después si el parvovirus mejoraba la eficiencia terapéutica del fármaco, también en condiciones *in vivo.* Para simular una situación clínicamente plausible, primero se trató a las ratas portadoras de ACDP con gemcitabina y, después, fueron infectadas por vía intratumoral con H-1PV (gemcitabina pre H-1PV). Como se representa en la Fig. 5, la aplicación secuencial de ambas modalidades terapéuticas prolongó la supervivencia de los animales en una medida significativa en comparación con el tratamiento simulado o la monoterapia con gemcitabina. Cabe indicar que el H-1PV no mejoraba el efecto terapéutico de la gemcitabina cuando se aplicaba de forma simultánea con el fármaco (H-1PV y Gemcitabina), que muy probablemente sea asignado a la interferencia negativa del fármaco genotóxico con el ciclo vital del parvovirus (véase también la Fig. 2D). En conjunto, estos datos confirman que la protección transitoria proporcionada por la gemcitabina contra el ACDP y que y mostraron que la mediana de la supervivencia de los animales inducida por el fármaco solo podrían extenderse significativam4nte con la infección por H-1PV seguido del tratamiento con gemcitabina. La evaluación toxicológica de los regímenes terapéuticos indicó que los marcadores sanguíneos de la actividad en médula ósea no se vieron afectados (Fig. 6A), aparte de un descenso en los niveles de reticulocitos y monocitos debido al tratamiento con gemcitabina. Los informes clínicos indujeron a los inventores a monitorizar las funciones hepática y renal también (Fig. 6B). En los grupos sin tratar y tratados con gemcitabina los niveles de bilirrubina, ASAT y ALAT estaban elevados, lo que revela un proceso lítico de grado bajo en los hígados de ratas portadoras de ACDP y se restablecieron al intervalo fisiológico mediante la parvoviroterapia adicional. Los niveles de creatinina permanecieron estables, lo que demuestra un aclaramiento renal no afectado. En conclusión, las anomalías detectadas en los parámetros sanguíneos podrían atribuirse por completo al tratamiento con gemcitabina y no se vieron agravados por la administración de H-1PV en una etapa posterior..

Uno de los méritos del modelo animal usado en este estudio reside en el hecho de que el proceso neoplásico tiene lugar en su ambiente natural, es decir el páncreas, y progresa a la formación de metástasis en órganos clínicamente relevantes, en particular el hígado. Esta progresión se correlacionó con la distribución tisular de la expresión del gen del H-1PV, que se localizaba principalmente en el páncreas desde unos pocos días después de la infección al tiempo que es detectable en el hígado solo 10-20 días después. Estas observaciones son consistentes con el oncotropismo conocido mostrado por los parvovirus de roedores. [7,15] Además, el modelo de rata era adecuado para determinar el perfil de seguridad del H-1PV en su especie huésped natural. Se administre como monoterapia o en combinación con gemcitabina, el H-1PV no indujo ningún signo patológico, los efectos tóxicos observados tras el tratamiento combinado se pueden atribuir por completo a su componente gemcitabina. Junto con el hecho de que las células ACDP son dianas de la actividad de destrucción de H-1PV y gemcitabina, la falta de patogenicidad del parvovirus indica un índice terapéutico mejorado del tratamiento combinado, lo que permite reducir la dosis del fármaco y los consiguientes efectos secundarios.

La respuesta inmunitaria del huésped contribuye de un modo muy significativo al desenlace de la viroterapia oncolítica. [19] De hecho, las células tumorales infectadas con un agente oncolítico también sirven como dianas del sistema inmunológico, de modo que representan una vacuna autóloga en la que el virus desempeña el papel de un adyuvante. Recientemente se encontró que el H-1PV estaba provisto de una capacidad inmunoestimulante que también potencia el efecto de vacunación terapéutica de las células tumorales lisadas. [20] Generalmente, la quimioterapia es tóxica y desfavorable para las estrategias inmunoterapéuticas. No obstante, la gemcitabina se puede distinguir de la mayoría de los análogos nucleosídicos por su aparente falta de propiedades

inmunosupresoras directas .[21] El tratamiento con este fármaco ejerce efectos inmunomoduladores, lo que produce reducción de los linfocitos B y reacciones de anticuerpos, y un desplazamiento hacia una respuesta antitumoral Th1 .[22] Por tanto, la gemcitabina puede influir sobre los componentes inmunitarios celulares y humorales de un modo que es bastante beneficioso para el desenlace de la infección vírica oncolítica, reduciendo los daños (anticuerpos neutralizantes frente al virus) y potenciando los efectos antitumorales (mediados por LCT) del sistema inmunológico. Este dato también respalda el potencial de combinar gemcitabina con virus oncolíticos para el tratamiento del cáncer de páncreas.

En conclusión, el H-1PV es un prometedor candidato para la monoterapia del carcinoma de páncreas debido a sus propiedades oncolíticas y el perfil de seguridad. Además, una aplicación retardada del virus tras gemcitabina mejora significativamente el efecto anticanceroso global, lo que implica que las células resistentes al fármaco son dianas para el parvovirus.

Ejemplo 6

La infección por H-1PV puede mejorar el efecto terapéutico de la temozolomida sobre las células de glioblastoma in vitro

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

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

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

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

Como se muestra en la Fig.10, el tratamiento con TMZ no mostró efectos citotóxicos sobre las células U373 (6 días después del tratamiento). Tras la infección con H-1PV, aproximadamente el 60 % de las células se había lisado tras 6 días. El mismo resultado se obtiene con el tratamiento combinado (H-1PV + TMZ).

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

Como se muestra en la Fig.12, el tratamiento combinado con H-1PV y TMZ proporciona un efecto citopático potenciado en comparación con los tratamientos con H-1PV solo y con TMZ solo, respectivamente.

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

Otras líneas celulares humanas eran sensibles al tratamiento con TMZ. El tratamiento combinado con H-1PV y TMZ mostró que el efecto oncolítico del virus no se veía alterado por el tratamiento con TMZ. Por otro lado, el virus no

tenía ningún efecto de inhibición sobre el tratamiento con TMZ. Puede esperarse que, de un modo similar a los resultados comunicados para el tratamiento combinado del cáncer pancreático con H-1PV and gemcitabina, no sólo se pueden conseguir efectos aditivos sino también sinérgicos, *in vivo* con el tratamiento combinado con H-1PV y TMZ.

Lista de referencias

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

23. Documento US 2004/220124 A1

24. Documento US 2001/220124 A1

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento del cáncer, en la que dicha composición farmacéutica comprende (a) un parvovirus y (b) un agente quimioterapéutico, en el que dicho parvovirus (a) es H-1 (H-1PV) o un parvovirus de roedor relacionado, seleccionado del grupo que consiste en Lull, virus diminuto del ratón (MMV), parvovirus del ratón (MPV), virus diminuto de la rata (RMV), parvovirus de la rata (RPV) o virus de la rata (RV), y en el que dicho parvovirus (a) se ha de administrar tras el agente quimioterapéutico (b).

2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho cáncer es un tumor cerebral o cáncer pancreático.

3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicho tumor cerebral es un glioma, meduloblastoma o meningioma.

4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que dicho glioma es un glioblastoma humano maligno.

5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el agente quimioterapéutico es gemcitabina o temozolomida.

6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que dicho parvovirus se ha de administrar mediante administración intratumoral.

Fig. 1

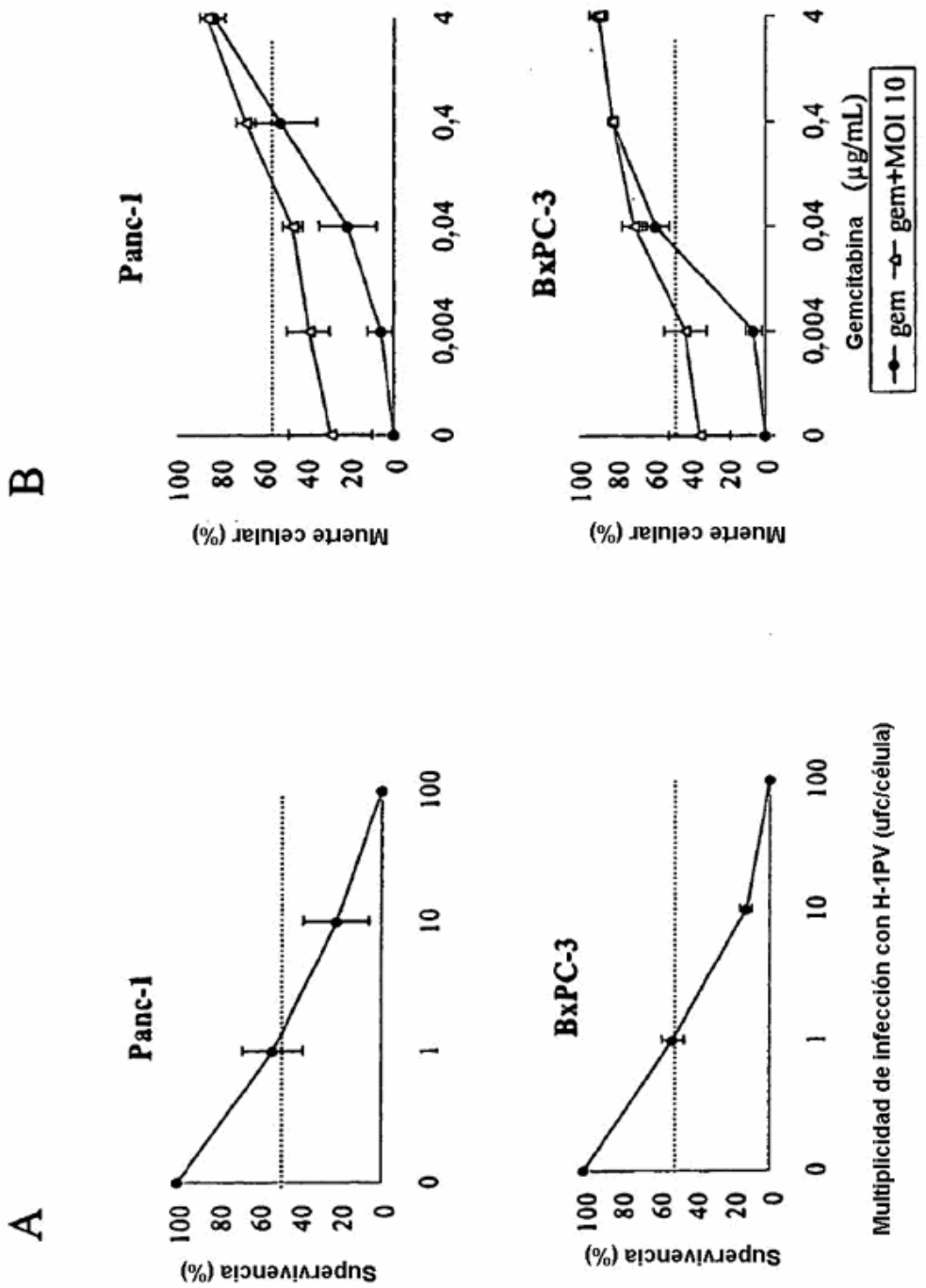

A
Panc-1
Supervivencia (%)
100
80
60
40
20
0
0
1
10
100
BxPC-3
Multiplicidad de infección con H-1PV (ufc/célula)
B
Panc-1
Muerte celular (%)
0
0,004
0,04
0,4
4
BxPC-3
Gemcitabina (µg/mL)
gem
gem+MOI 10

Fig. 2

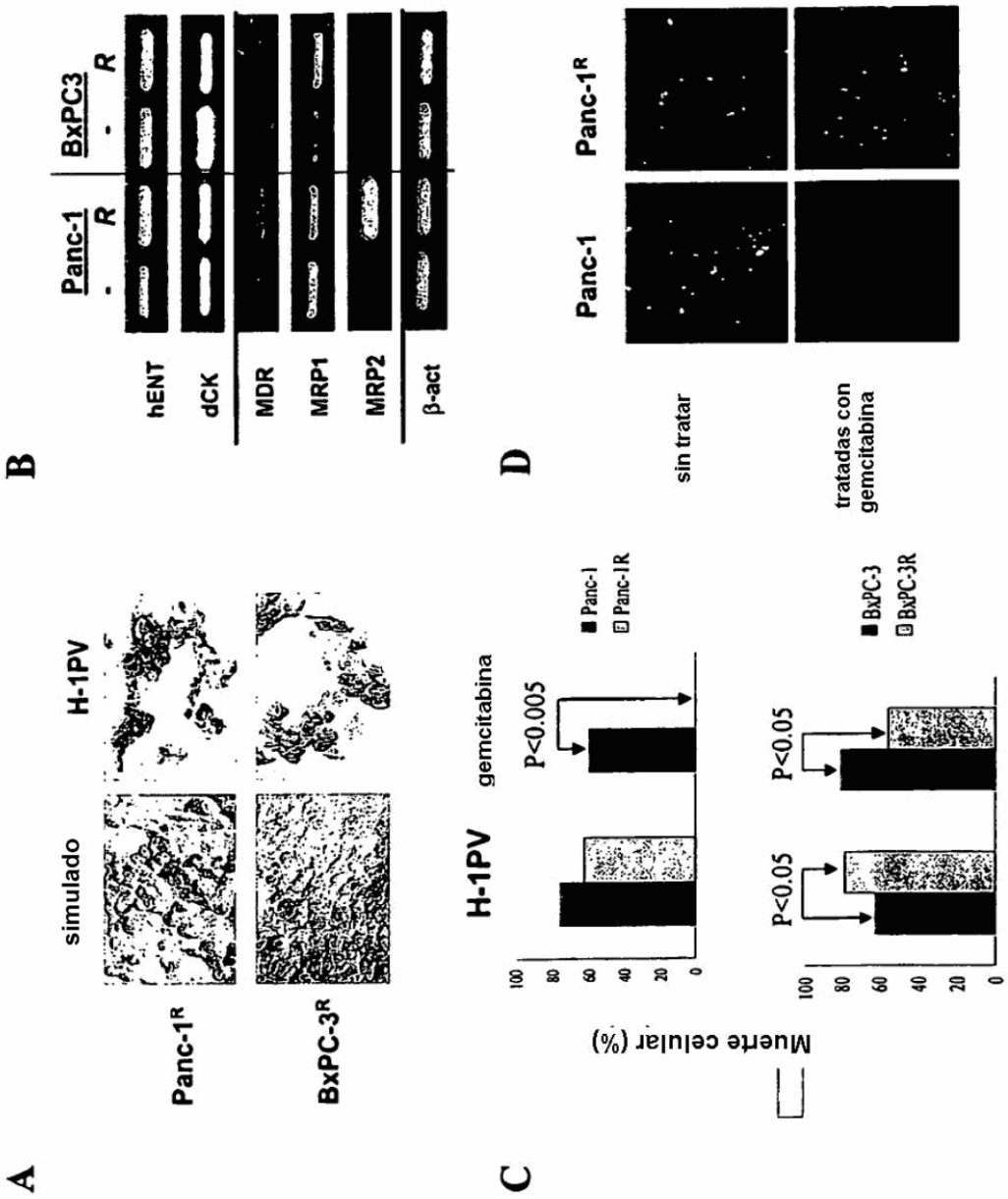

A
simulado
H-1PV
Panc-1R
BxPC-3R
B
Panc-1
BxPC3
-
R
-
R
hENT
dCK
MDR
MRP1
MRP2
β-act
C
H-1PV
gemcitabina
Panc-1
Panc-1R
P<0.005
P<0.05
P<0.05
BxPC-3
BxPC-3R
Muerte celular (%)
100
80
60
40
20
0
D
Panc-1
Panc-1R
sin tratar
tratadas con gemcitabina

Fig. 3

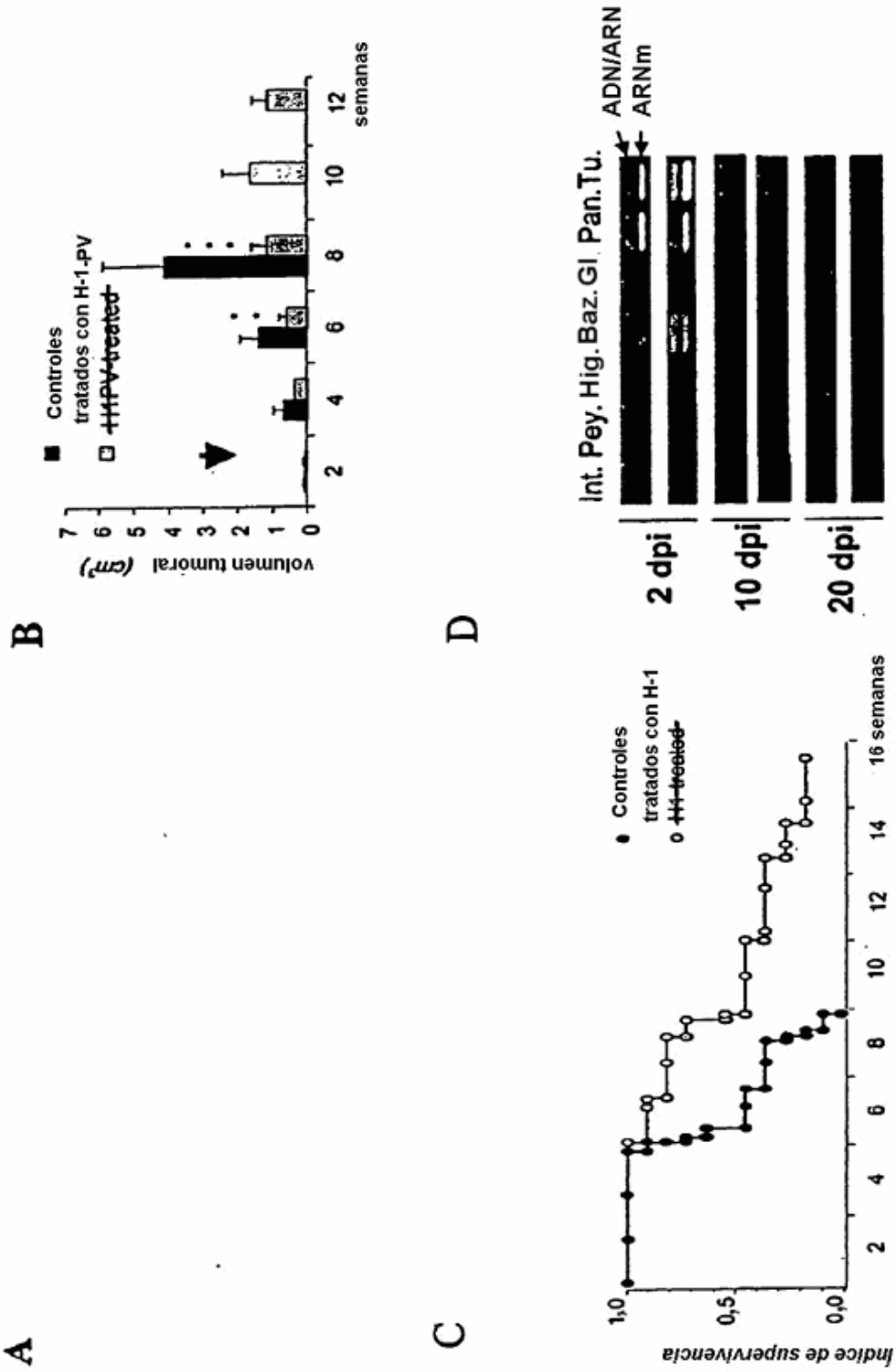

A
B
C
D
Controles
tratados con H-1-PV
H1PV-treated
volumen tumoral (cm³)
semanas
Controles
tratados con H-1
o H1-treated
índice de supervivencia
16 semanas
Int. Pey. Hig. Baz. GI. Pan. Tu.
ADN/ARN
ARNm
2 dpi
10 dpi
20 dpi

Fig. 4

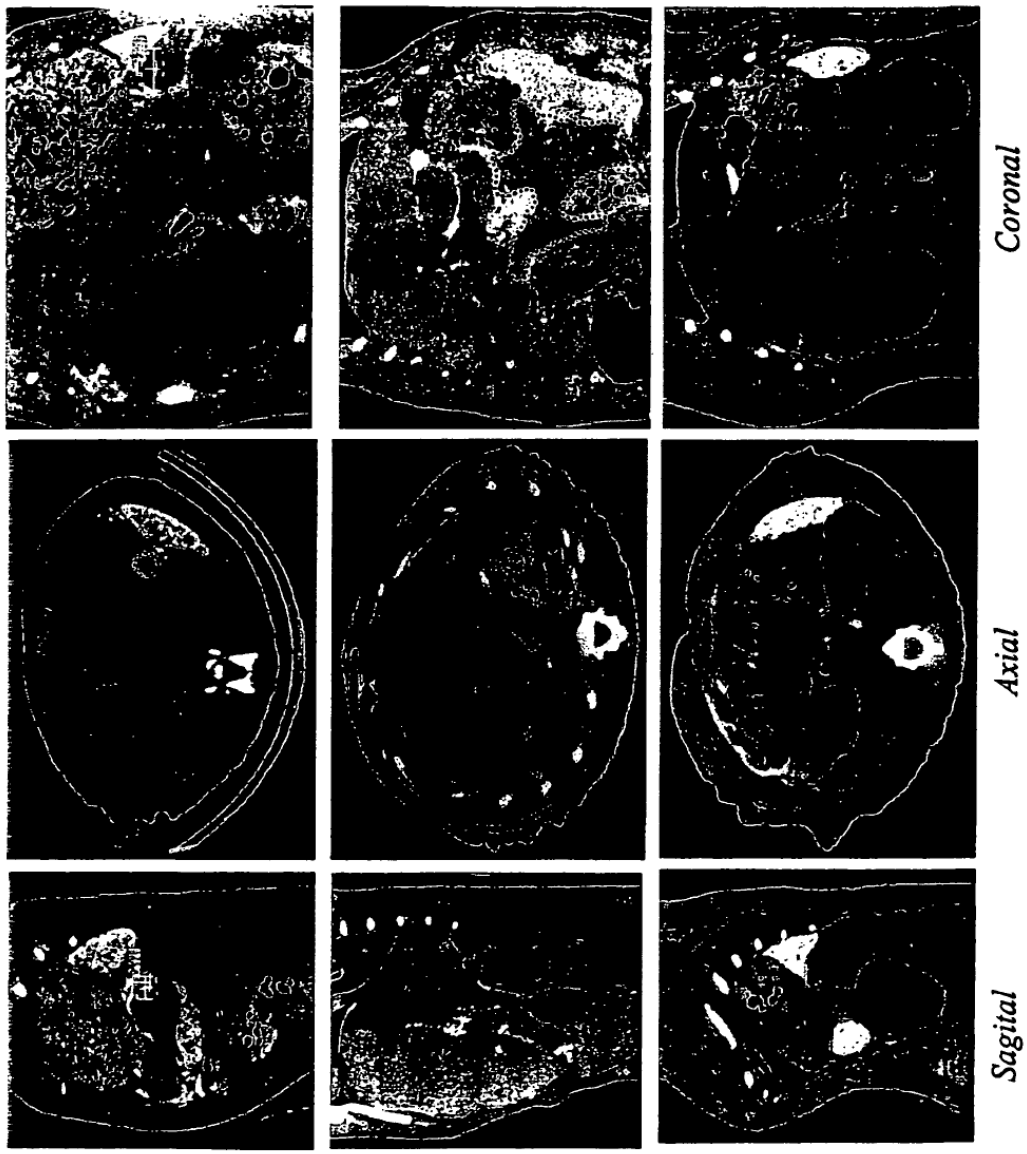
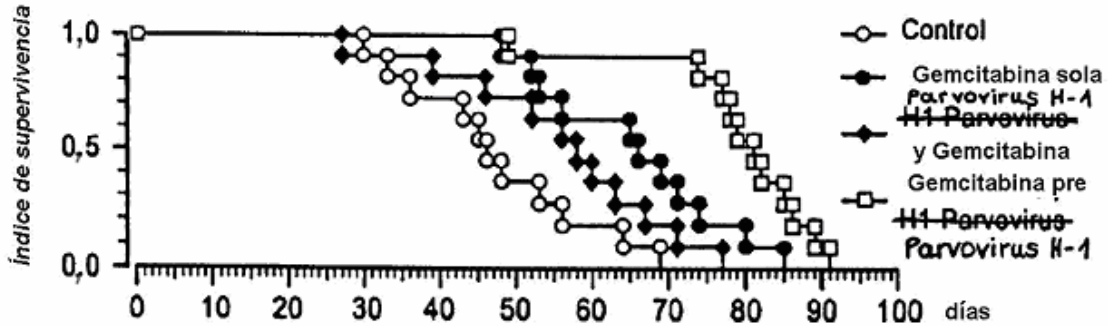


Fig. 5



Número en riesgo

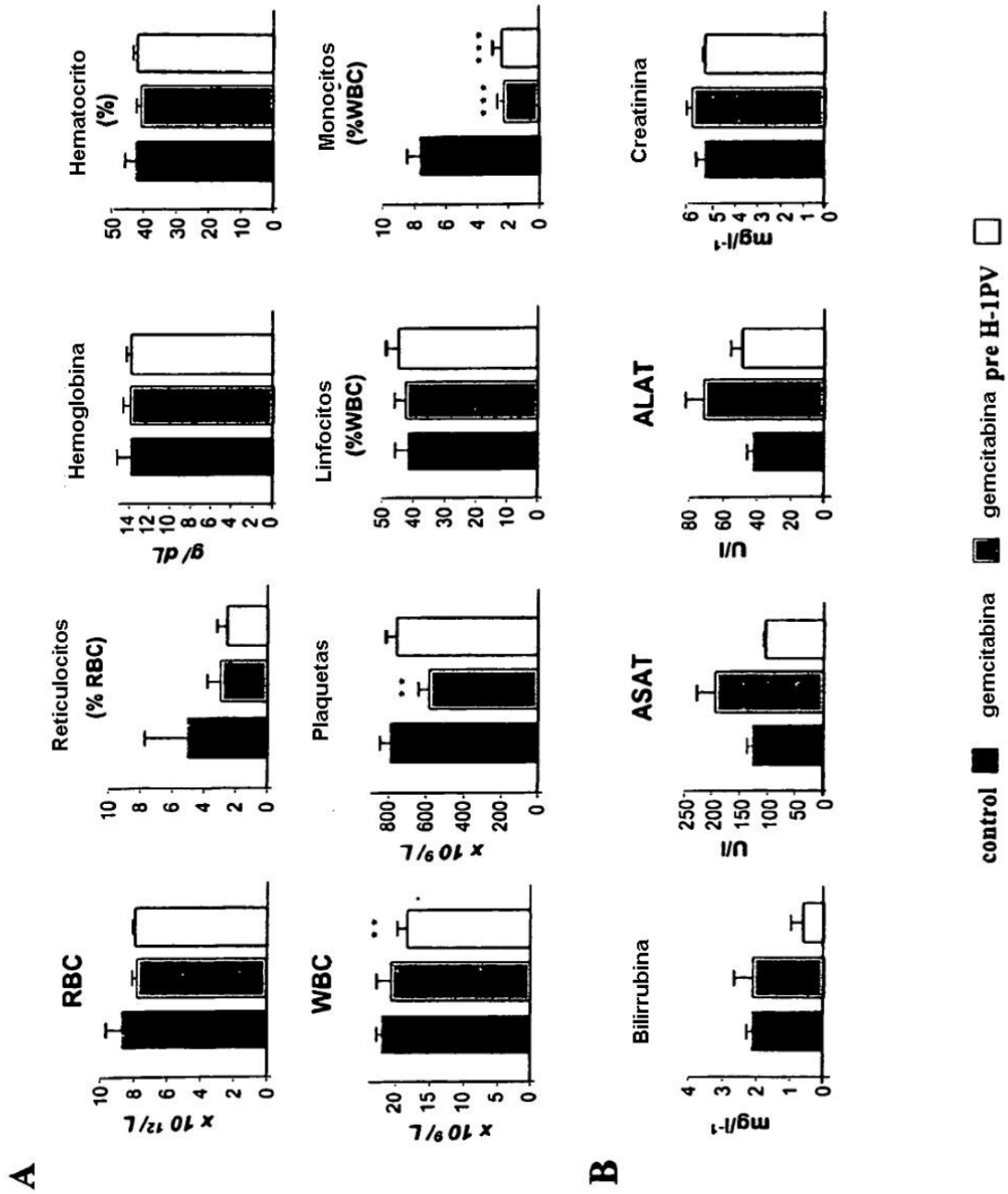
Control	11	11	11	10	8	4	2	0	0	0	0
G Gemcitabina sola	11	11	11	11	11	10	7	4	1	0	0
~~H1 Parvovirus~~ Parvovirus H-1 y Gemcitabina	11	11	11	10	9	8	4	2	0	0	0
Gemcitabina pre ~~H1 Parvovirus~~ Parvovirus H-1	11	11	11	10	10	10	10	10	5	1	0

Mediana de la supervivencia

Control	47,5	días
Gem	65,4	días
Gem+H-1PV	56,1	días
Gem pre H-1PV	79,0	días

P<0.001 <0.01 <0.001

Fig. 6


A
RBC
x 10 12/L
Reticulocitos
(% RBC)
Hemoglobina
g/ dL
Hematocrito
(%)
WBC
x 10 9/L
Plaquetas
x 10 9/L
Linfocitos
(%WBC)
Monocitos
(%WBC)
B
Bilirrubina
mg/l-1
ASAT
U/l
ALAT
U/l
Creatinina
mg/l-1
control
gemcitabina
gemcitabina pre H-1PV

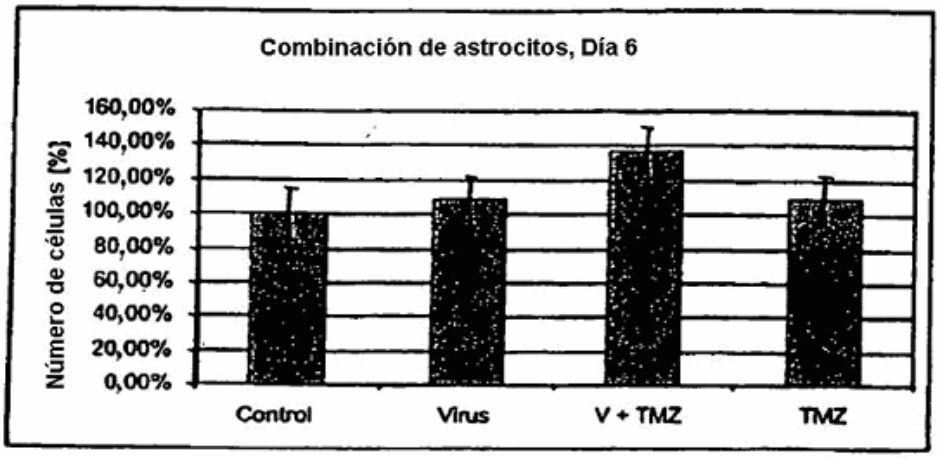

Combinación de astrocitos, Día 6
Número de células [%]
160,00%
140,00%
120,00%
100,00%
80,00%
60,00%
40,00%
20,00%
0,00%
Control
Virus
V + TMZ
TMZ

Fig. 7

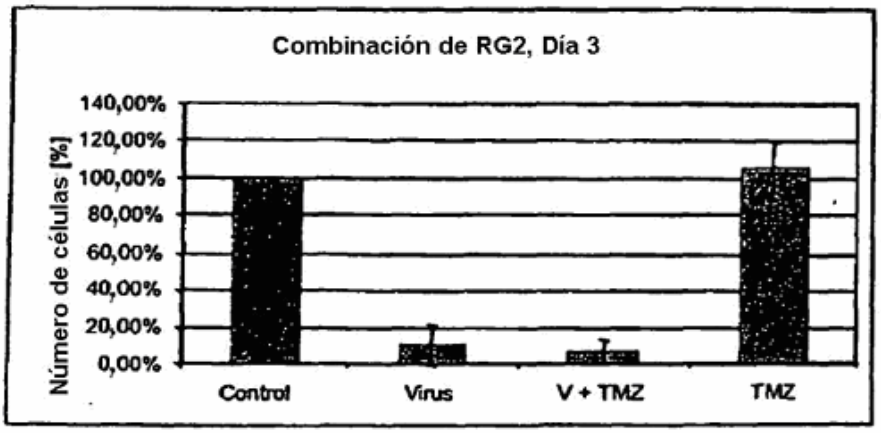

Combinación de RG2, Día 3
Número de células [%]
140,00%
120,00%
100,00%
80,00%
60,00%
40,00%
20,00%
0,00%
Control
Virus
V + TMZ
TMZ

Fig. 8a

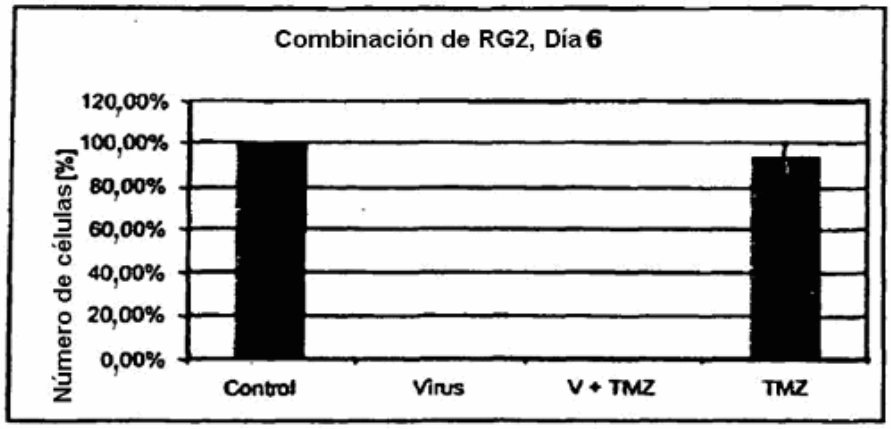

Combinación de RG2, Día 6
Número de células [%]
120,00%
100,00%
80,00%
60,00%
40,00%
20,00%
0,00%
Control
Virus
V + TMZ
TMZ

Fig. 8b

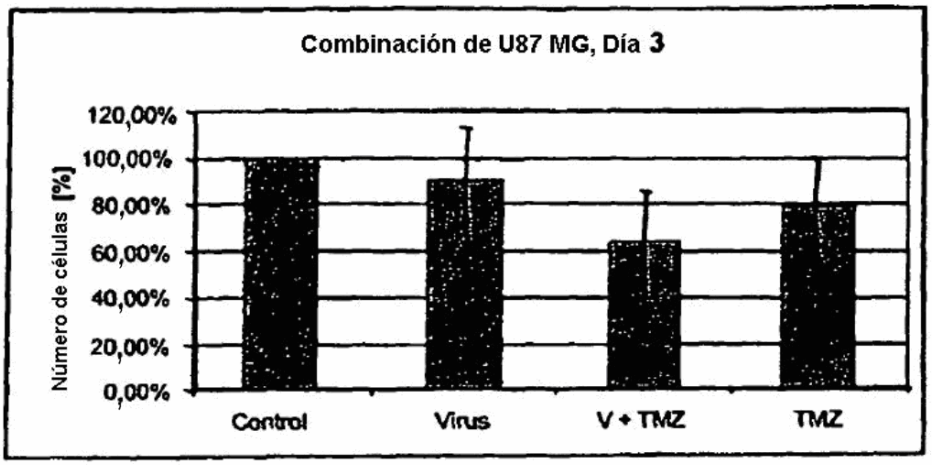

Combinación de U87 MG, Día 3
Número de células [%]
120,00%
100,00%
80,00%
60,00%
40,00%
20,00%
0,00%
Control
Virus
V + TMZ
TMZ

Fig. 9a

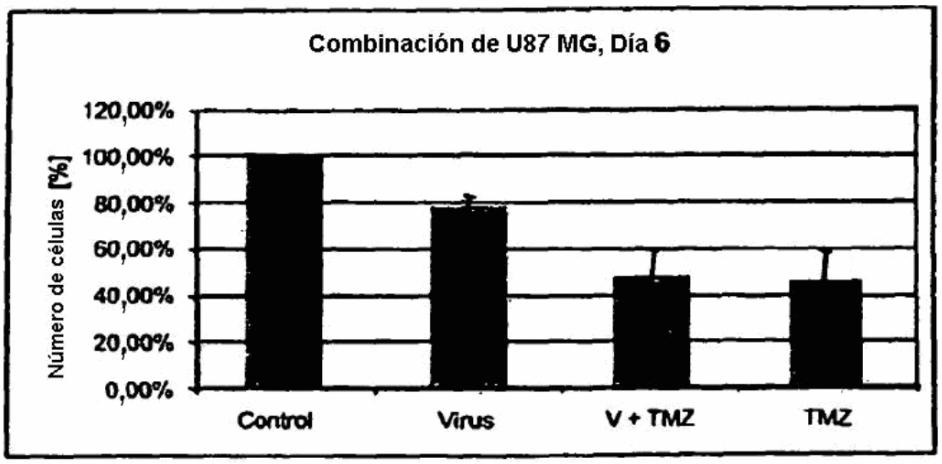

Combinación de U87 MG, Día 6
Número de células [%]
120,00%
100,00%
80,00%
60,00%
40,00%
20,00%
0,00%
Control
Virus
V + TMZ
TMZ

Fig. 9b

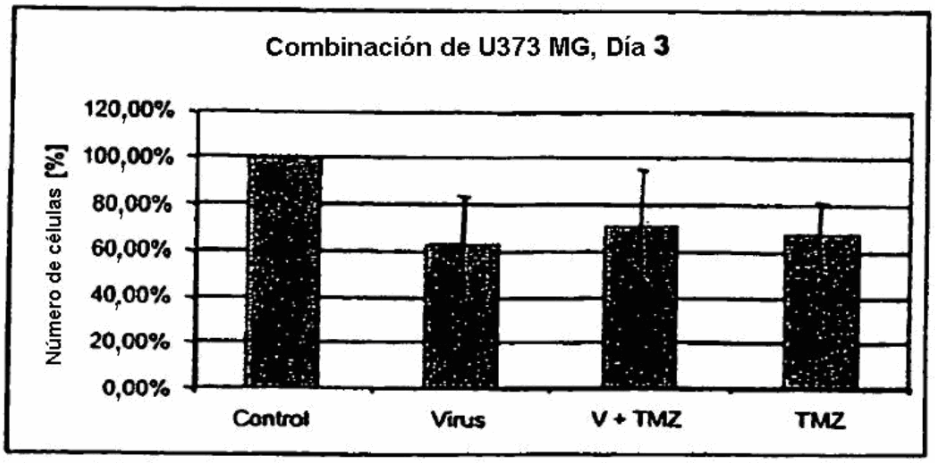


Fig. 10a

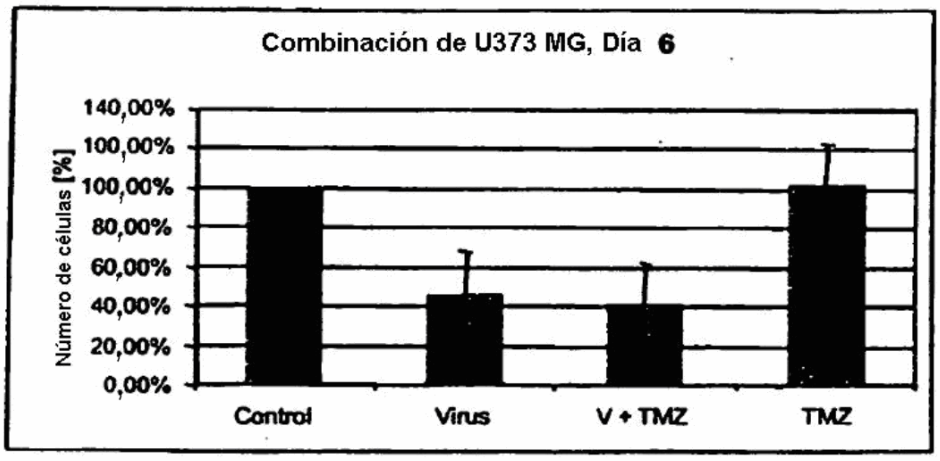


Fig. 10b

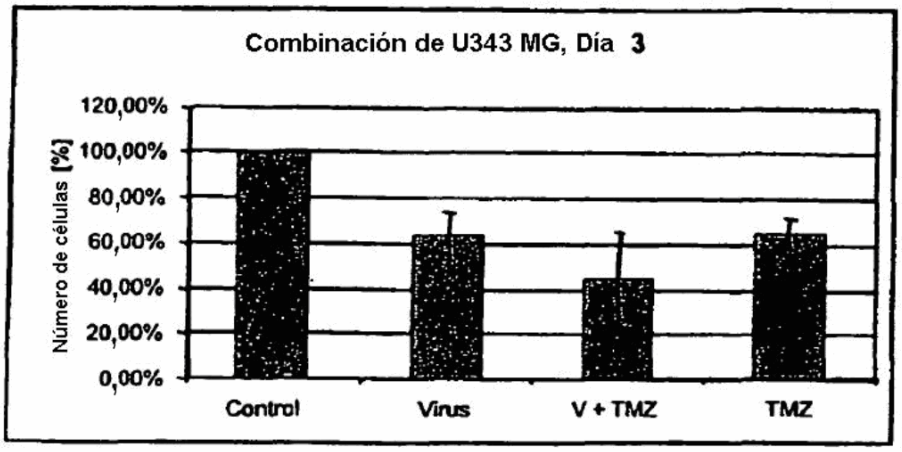


Fig. 11a

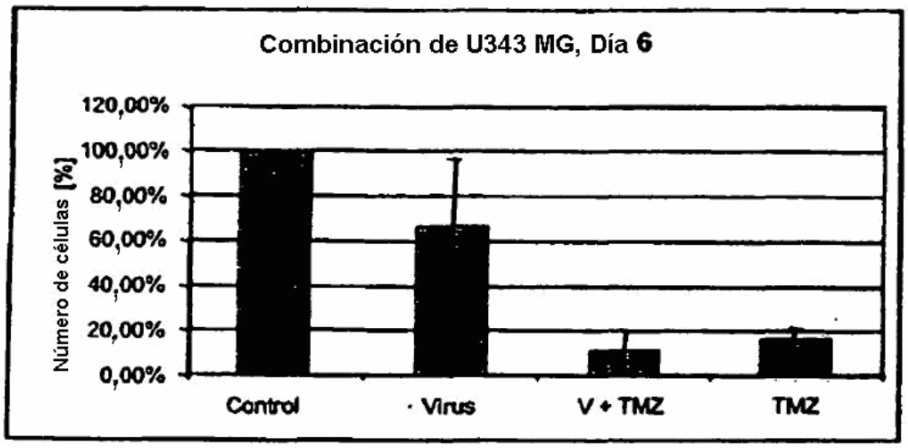


Fig. 11b

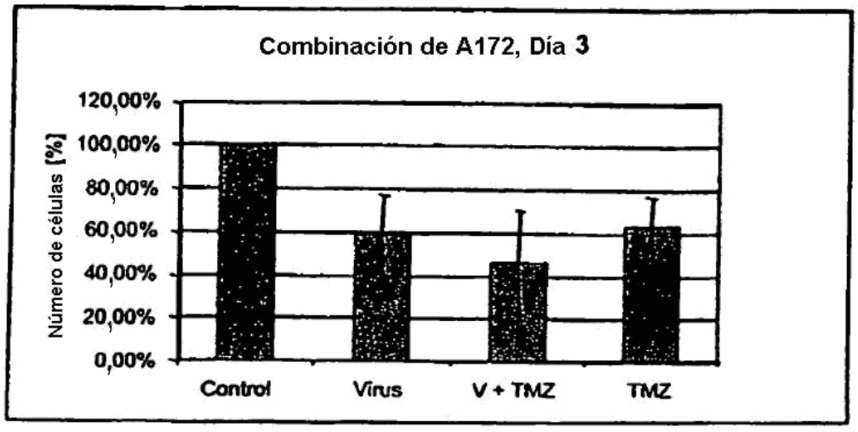


Fig. 12a

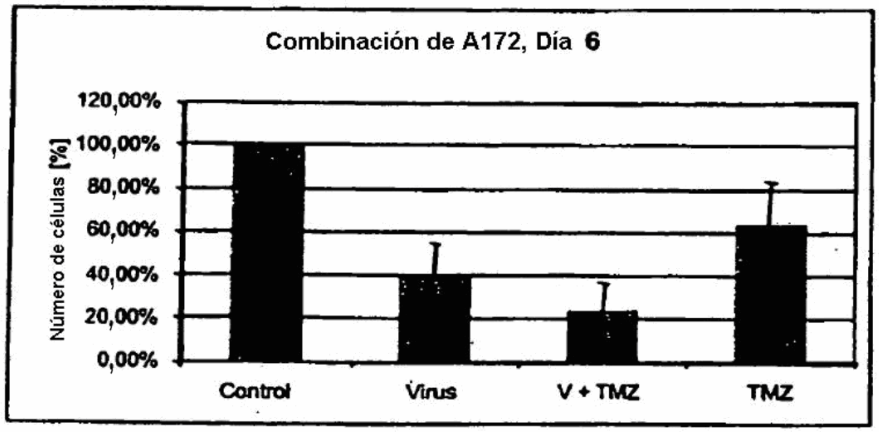


Fig. 12b