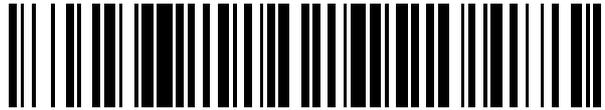


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 000**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/125 (2006.01)
A61K 39/235 (2006.01)
A61K 39/245 (2006.01)
A61K 39/215 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2000 E 08018165 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2013 EP 2016952**

54 Título: **Un método para tratar un tumor maligno en un sujeto y composición farmacéutica para uso en el mismo**

30 Prioridad:

25.11.1999 AU PQ425699

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

07.02.2014

73 Titular/es:

**VIRALYTICS LIMITED (100.0%)
Suite 305, 66 Hunter Street
Sydney NSW 2000, AU**

72 Inventor/es:

SHAFREN, DARREN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 442 000 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

Un método para tratar un tumor maligno en un sujeto y composición farmacéutica para uso en el mismo

5 **Campo De La Invención**

La presente invención se refiere a la destrucción de células anómalas utilizando un virus. También se describe un método de exploración de células para determinar si son susceptibles al tratamiento con el virus, así como composiciones farmacéuticas que incorporan el virus. La invención tiene uso veterinario así como una amplia aplicación en el campo médico humano.

Antecedentes De La Invención

El melanoma es una causa principal de morbilidad en la población humana. Australia tiene la tasa más alta de melanoma en el mundo. El melanoma es un cáncer de piel agresivo y es el tercer cáncer más común en Australia en hombres y mujeres. Se ha predicho que uno de cada treinta australianos tendrá una forma de melanoma, que da como resultado la muerte de más de mil personas al año solamente en ese país. Cuando se detecta de forma temprana, la mayoría de las formas de melanoma pueden tratarse eficazmente. Sin embargo, el control de formas más avanzadas tiene menos éxito y es un área de intensa investigación. Un objetivo principal en esta área de investigación es la identificación de moléculas que se expresan de forma diferencial en tumores melanocíticos benignos y malignos que pueden usarse para diagnóstico y como dianas para terapias anti-cáncer (Kageshita T. et al; 1993).

La molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), una molécula crucial en interacciones celulares inflamatorias, es un antígeno de avance del melanoma aceptado. La expresión en superficie de ICAM-1 en melanomas se ha correlacionado en gran medida con el avance de melanoma maligno (Kraus A. et al; 1997 y Morandini R. et al; 1998).

La molécula ICAM-1 es un miembro de la superfamilia de la inmunoglobulina (Ig) y un contra-receptor para el antígeno 1 de función de integrina leucocitaria (LFA-1/CD11a) y Mac-(CD11b) y es una molécula de unión celular para el 90% de los rinovirus humanos (Stuanton D.E., et al; 1989). Además, ICAM-1 juega un importante papel en la patogénesis no solamente de infección por rinovirus, sino también en infección por *Plasmodium falciparum* y en las exacerbaciones de asma, bronquitis crónica y fibrosis quística. Recientemente, se han presentado proteínas reguladoras del complemento que se regulan positivamente en la superficie de melanomas malignos, en particular el factor acelerador de la degradación conocido como DAF (Cheung NK et al; 1998).

Los virus capaces de inducir lisis de células malignas a través de su proceso de replicación se conocen como virus oncolíticos y se han realizado ensayos que usan virus oncolíticos para tratar tumores malignos (Nemunaitis J; 1999). La mayoría de los virus oncolíticos requieren proliferación en la misma especie o linaje celular. La infección de una célula por un virus implica la unión y captación dentro de la célula lo que conduce a o coincide con la retirada de la cápsida viral y la posterior replicación dentro de la célula (Fenner F., et al. The Biology of Animal Viruses. Academic Press. Nueva York, 1974 Segunda Ed.)

Los virus oncolíticos de los que se evaluó la capacidad de destruir células cancerosas incluían el subtipo Egipto 101 de adenovirus que mostraba actividad oncolítica en la línea celular de cáncer uterino/de cuello del útero HeLa, virus de las paperas para el tratamiento de carcinoma gástrico, carcinoma uterino y carcinoma cutáneo, virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de la gripe para el tratamiento del cáncer de ovario y adenovirus para el tratamiento de, por ejemplo, carcinoma cervicouterino (Nemunaitis J; 1999). Otros informes indicaban que adenovirus y poliovirus recombinantes atenuados pueden encontrar uso en el tratamiento de células de glioma maligno (Alemany R., et al 1999; Andreansky S.S., 1996) y que los reovirus muestran capacidad lítica en células de glioblastoma U87 humano y células NIH-3T3 con una ruta de señalización Ras activada (Coffey M.C. et al., 1998; Strong J.E. et al, 1998).

Además, se ha usado un oncolisado de vaccinia en ensayos clínicos para tratar pacientes de melanoma (Fase II) (Nemunaitis J., 1999). También se han presentado virus Herpes simplex (HSV) modificados, no neurovirulentos, como prometedores para el tratamiento de tumores cerebrales incluyendo melanoma intracraneal y melanoma subcutáneo humano (Randazzo B.R., 1997), mientras que se ha informado de que la infección con adenovirus potencia la destrucción de células de melanoma por la mitotoxina vegetal saporina (Satyamoorthy K., 1997).

El receptor en células diana reconocidas por adenovirus difiere para diferentes tipos de adenovirus. Esto es, los subgrupos de adenovirus A, C, D, E y F, por ejemplo, reconocen al receptor CAR mientras que el tipo 5 de adenovirus (sub-grupo C), tipo 2 de adenovirus (sub-grupo C) y tipo 9 de adenovirus (sub-grupo D) reconocen a la molécula principal de histocompatibilidad de clase II, integrinas $\alpha_m\beta_2$ y α_v , respectivamente. Se sabe que el receptor CAR se expresa en líneas celulares de melanoma (Hemmi S., et al, 1998): El heparán sulfato es reconocido por los tipos 1 y 2 de herpes simplex y el herpesvirus humano 7, virus adeno-asociado de tipo 2. El receptor para el herpesvirus humano 7 es CD4 mientras que el virus de Epstein-Barr reconoce al receptor del complemento Cr2

(CD21). Los poliovirus de tipo 1 y 2 reconocen al receptor de poliovirus (Pvr) para la adhesión celular mientras que el reovirus reconoce ácido siálico. Los virus de la gripe A y B reconocen al ácido siálico, ácido N-acetil neuramínico para adhesión celular. Por el contrario, el virus de la gripe de tipo C reconoce el ácido siálico, ácido 9-O-acetil neuramínico. El virus Vaccinia reconoce al receptor del factor de crecimiento epidérmico y al heparán sulfato. Los

5 coxsackievirus A13, A15, A18 y A21 reconocen a ICAM-1 y a la proteína reguladora del complemento DAF (CD55) (véase, por ejemplo, el documento, Shafren D.R., et al 1997). La DAF también es reconocida por el enterovirus 70. Véase, por ejemplo, el documento Flint SJ, et al (2000) Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis and control. ASM Press, Washington.

10 La extensión metastática tumoral es un proceso patológico asociado con una serie de eventos de adhesión/des-adhesión acoplados con degradación tisular regulada. Se sabe que la adhesión a y la migración a través de la matriz extracelular es esencial para la invasión tumoral. La familia más grande de moléculas de adhesión extracelular es la familia de la integrina (Marshall J.F. y Hart I.R., 1996) y miembros del grupo $\alpha\beta$ de integrinas han demostrado expresarse en diversos tipos celulares. Por ejemplo, $\alpha_v\beta_1$ se expresa en células de neuroblastoma, melanoma y

15 osteosarcoma, $\alpha_v\beta_3$ se expresa en células de melanoma, glioblastoma y carcinoma renal y $\alpha_v\beta_5$ se expresa en células de melanoma al igual que $\alpha_v\beta_8$ (Marshall J.F. y Hart I.R., 1996).

A pesar del avance realizado en el tratamiento de tumores malignos, el tratamiento del cáncer incluyendo melanoma plantea un gran desafío para la investigación y sigue existiendo la necesidad de alternativas a los enfoques de

20 terapia existentes.

Sumario De La Invención

25 La presente invención es el resultado del sorprendente descubrimiento de que puede conseguirse una destrucción significativa de células anómalas con el uso de un virus y reconocimiento/interacción de los marcadores expresados por la célula utilizados por el virus para la infectividad de las células.

En un aspecto se proporciona una composición para su uso en el tratamiento de una afección asociada con la presencia de células anómalas que expresan la molécula de adhesión celular ICAM-1, comprendiendo la

30 composición un virus que es un miembro de la familia Picornaviridae, que reconoce ICAM-1 para infectividad de una célula anómala y que puede infectar y destruir al menos algunas de dichas células, donde las células anómalas son células cancerosas.

Para los fines de la presente invención, la expresión "células anómalas" debe considerarse en su sentido más amplio para incluir células malignas, las células de cualquier crecimiento anómalo y cualquier célula que tenga expresión regulada positivamente de al menos una de las moléculas de adhesión celular y la proteína reguladora del

35 complemento relativa a células normales correspondientes del mismo tipo celular que expresan su fenotipo normal, en el que las células son células cancerosas o no y en el que las células proliferan a una velocidad anómala o no. Por consiguiente, la expresión incluye células preneoplásicas y neoplásicas y células no cancerosas que finalmente pueden desarrollarse o no en células cancerosas. Un crecimiento anómalo puede, por ejemplo, ser un tumor

40 benigno o maligno. Típicamente, las células anómalas serán células malignas y normalmente células de melanoma.

Generalmente, la expresión de al menos una de las moléculas de adhesión celular y la proteína reguladora del complemento se regularán positivamente en comparación con el tejido circundante en el que se encuentran las

45 células anómalas.

Por lo tanto, típicamente el virus infectará de manera preferente a las células anómalas debido a la mayor probabilidad de entrar en contacto al menos con una de la molécula de adhesión celular y proteína reguladora del

50 complemento en esas células. Como tal, el virus puede usarse para dirigirse eficazmente a las células anómalas. En las reivindicaciones adjuntas se exponen otros aspectos de la invención.

El virus también puede usarse para explorar células para determinar, por ejemplo, si el virus puede ser adecuado para el tratamiento del paciente del cual se obtienen las células o si un protocolo de tratamiento diferente que no implique el virus puede ser más beneficioso para el mamífero. A la inversa, pueden explorarse diferentes virus

55 usando muestras de células extraídas del paciente para seleccionar el virus más apropiado para tratar al mamífero.

Un método de exploración de células anómalas para determinar si las células son susceptibles a muerte celular inducida por virus comprende las etapas de:

- 60 (a) proporcionar las células anómalas;
- (b) añadir a las células una cantidad eficaz de un virus que reconozca al menos una de una molécula de adhesión celular de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y una proteína reguladora del complemento para infectividad de las células anómalas;
- (c) incubar las células anómalas en presencia del virus durante un periodo de tiempo; y
- 65 (d) determinar si el virus ha infectado y ocasionado la muerte de al menos alguna de las células anómalas.

Un método de exploración de células de melanoma para determinar si las células son susceptibles a muerte celular inducida por virus comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar las células de melanoma;
 (b) añadir a las células de melanoma una cantidad eficaz de un virus que reconozca al menos una de una molécula de adhesión celular y una proteína reguladora del complemento para infectividad de las células de melanoma;
 (c) incubar las células de melanoma en presencia del virus durante un periodo de tiempo; y
 10 (d) determinar si el virus ha infectado y ocasionado la muerte de al menos alguna de las células de melanoma.

15 Puede seleccionarse un virus para su uso en dicho método ensayando si un virus determinado puede infectar y ocasionar la muerte de células anómalas que expresan al menos una de una célula de adhesión celular y una proteína reguladora del complemento. En particular, el ensayo puede implicar explorar diversos virus diferentes incubando cada virus con una muestra de las células anómalas respectivamente y determinando si las células se destruyen como un resultado de infección.

Un método de exploración de un virus para determinar su capacidad para infectar y ocasionar la muerte de células anómalas comprende las etapas de:

- 20 (a) seleccionar un virus que reconozca al menos una de una molécula de adhesión celular de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y una proteína reguladora del complemento para infectividad de las células anómalas;
 (b) incubar dicho virus seleccionado con una muestra de las células anómalas durante un periodo de tiempo; y
 (c) determinar si dicho virus seleccionado puede producir la muerte de al menos alguna de las células anómalas.

25 Un método de exploración de un virus para determinar su capacidad para infectar y ocasionar la muerte de células de melanoma comprende las etapas de:

- (a) seleccionar un virus que reconozca al menos una de una molécula de adhesión celular y una proteína reguladora del complemento para infectividad de las células de melanoma;
 30 (b) incubar dicho virus seleccionado con una muestra de las células de melanoma durante un periodo de tiempo;
 y
 (c) determinar si dicho virus seleccionado produce la muerte de al menos alguna de las células de melanoma.

35 El método también puede comprender la etapa de comparar la capacidad del virus seleccionado para infectar y producir la muerte de las células con la de otro virus sometido en las etapas (b) y (c) utilizando otra muestra de las células.

40 La muerte de las células después de la infección con el virus puede ser el resultado de la lisis de las células debida a replicación intracelular del virus o debida a la apoptosis desencadenada por la infección más probablemente como resultado de la activación de caspasas celulares.

45 Una vez lisadas, el contenido citosólico de células infectadas se derrama desde las membranas plasmáticas rotas y pueden liberarse antígenos capaces de provocar una respuesta inmunitaria a las células anómalas. Por lo tanto, el tratamiento de células anómalas en un mamífero de acuerdo con dicho método puede proporcionar un refuerzo a la inmunidad del mamífero contra las células anómalas. Un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un mamífero comprende infectar células anómalas en el mamífero con un virus mediante el cual se produce la muerte y lisis de las células con liberación de antígenos de los mismos para la generación de dicha respuesta inmunitaria, en el que el virus reconoce al menos una de una molécula de adhesión celular de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y una proteína reguladora del complemento para infectividad de las células anómalas.

50 Un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un mamífero contra células de melanoma, comprende infectar las células de melanoma en el mamífero con un virus mediante el cual se produce la muerte y la lisis de las células con liberación de antígenos de los mismos para la generación de dicha respuesta inmunitaria, en el que el virus reconoce al menos una de una molécula de adhesión celular y una proteína reguladora del complemento para infectividad de las células de melanoma.

60 Generalmente el virus se proporcionará en forma de una composición farmacéutica para su uso en dicho método. Una composición farmacéutica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable junto con un virus capaz de infectar células anómalas mediante el cual se produce la muerte de las células y que reconoce al menos una de una molécula de adhesión celular de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y una proteína reguladora del complemento para infectividad de las células anómalas.

65 Una composición farmacéutica comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable junto con un virus capaz de infectar células de melanoma mediante el cual se produce la muerte de las células y que reconoce al menos una de una molécula de adhesión y una proteína reguladora del complemento para infectividad de las células de melanoma.

La descripción también se refiere a un medio de administración que se mantiene contra la piel de un mamífero para facilitar la administración del virus al mamífero y que está impregnado con una composición de la invención para la puesta en contacto con la piel, en el que el medio de administración se mantiene contra dicha piel del mamífero en uso. Generalmente, el medio de administración estará adaptado para permitir su sujeción sobre la piel en el sitio de tratamiento deseado.

Preferentemente, el virus será capaz de unirse a, o de otra manera, asociarse con la molécula de adhesión celular y la proteína reguladora del complemento. La proteína reguladora del complemento normalmente formará un complejo con la molécula de adhesión celular o tendrá una asociación espacial estrecha con la molécula de adhesión celular, y potenciará la capacidad del virus para infectar las células anómalas. Preferentemente, la proteína reguladora del complemento será un factor de aceleración de la degradación (DAF).

La molécula de adhesión celular es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) y es ICAM-1.

Normalmente, el virus será un virus de ARN animal y típicamente, un virus de ARN sin envoltura con una cápside icosaédrica y un genoma de ARN monocatenario.

El virus es un miembro de la familia Picornaviridae. Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) tienen una pluralidad de dominios extracelulares y el virus interaccionará deseablemente con el dominio más externo más próximo al extremo N de la molécula de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig). Preferentemente, el virus será del género *Enterovirus* y más preferentemente, el virus será un *Coxsackievirus*. El *Coxsackievirus* es un enterovirus humano y la mayoría de las infecciones enterovíricas, incluso con los miembros más virulentos del grupo, causan pocos o ningún síntoma clínico. La infección por CAV21, por ejemplo, se asocia con el desarrollo de resfriados comunes y diarrea infantil.

Un método de tratamiento de células anómalas en un mamífero comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de un *Coxsackievirus*.

Un método de tratamiento de melanoma en un mamífero comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de un *Coxsackievirus*.

Típicamente el *Coxsackievirus* será un *Coxsackievirus* del grupo A y normalmente se seleccionará del grupo constituido por los serotipos 1 a 24 de *Coxsackievirus* (CAV1-24) y más preferentemente de CAV13, CAV15, CAV18 y CAV21.

Aunque el virus será normalmente un virus animal común, la invención no se limita a estos y puede utilizarse un virus recombinante manipulado para que sea capaz de infectar a y causar la muerte de células anómalas, o un virus que se ha modificado de otra manera para potenciar su capacidad de infectar a las células y/o causar la muerte de las células después de la infección. Por ejemplo, el virus puede modificarse para que reconozca a moléculas de adhesión celular adicionales tales como $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ o $\alpha_v\beta_6$. Además, el mismo virus puede administrarse al mamífero durante diferentes ciclos de tratamiento. Sin embargo, preferentemente se usan diferentes virus para diferentes ciclos de tratamiento para evitar o disminuir el posible efecto de cualquier respuesta inmunitaria contra el virus administrado previamente. El virus puede administrarse al paciente, por ejemplo, por vía tópica, por vía intratumoral o por vía sistémica. El mamífero puede ser cualquier mamífero que padezca un cáncer maligno y que necesite tratamiento. Preferentemente, el mamífero será un ser humano.

Una composición de la invención puede usarse como un adjunto al tratamiento contra el cáncer convencional o como un tratamiento en ausencia de otros tratamientos terapéuticos. En particular, una composición de la invención puede utilizarse cuando el tratamiento convencional no es adecuado o práctico, o en el caso en que la escisión de células anómalas pueda dejar cicatrices o desfiguraciones que sean inaceptables para el paciente, particularmente en la cara del paciente tal como en su nariz o labios. Como alternativa, el virus puede administrarse al paciente antes de y/o inmediatamente después de la escisión de células anómalas.

Por consiguiente, las composiciones de la presente invención proporcionan un tratamiento terapéutico alternativo que puede usarse después del diagnóstico de cáncer maligno de fase temprana y fase tardía y que encuentra aplicación además para destruir células antes y las que quedan después de la cirugía.

Usando protocolos como se describen en este documento, el especialista en la técnica destinatario será capaz de seleccionar fácilmente un virus adecuado para su uso en las composiciones de la invención y determinar qué células anómalas son susceptibles de infección que conduce a la muerte de las células. Las células anómalas pueden ser, por ejemplo, células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de cáncer de estómago, células de carcinoma gástrico, células de cáncer de colon, células de cáncer colorrectal, células cancerosas de glioma, células de cáncer de piel u otras células malignas.

Una composición de la invención es particularmente adecuada para tratar un tumor maligno de la piel o un tumor maligno que se ha extendido desde la piel tal como melanoma.

A menos que el contexto requiera claramente otra cosa, en toda la descripción y las reivindicaciones, las palabras “comprende” “que comprende” y similares deben interpretarse en sentido inclusivo en oposición a un sentido exclusivo o exhaustivo, es decir, en el sentido de “incluyendo, aunque sin limitación”. La invención se describirá adicionalmente en lo sucesivo en este documento en referencia a varias realizaciones preferidas no limitantes.

5

Breve Descripción De Los Dibujos Acompañantes

- La figura 1 muestra la tinción con inmunoperoxidasa de la expresión superficial de ICAM-1 en células de melanoma. La expresión de ICAM-1 (flechas blancas) se indica mediante la tinción de células con color oscuro;
- 10 La figura 2 muestra niveles relativos de expresión de ICAM-1 y DAF por las líneas celulares de melanoma Sk-Mel-28 y ME4405;
- La figura 3 indica infección lítica de dos líneas celulares de melanoma humano por Coxsackievirus A21 en diferentes intervalos de tiempo después de la infección;
- 15 La figura 4 indica infección lítica de células de melanoma humano a partir de un melanoma primario inducido en un ratón desnudo con diversas dosis de Coxsackievirus A21;
- La figura 5 indica infección lítica de preparaciones de suspensión y células malignas primarias adherentes de un melanoma de la pared torácica por Coxsackievirus A21 a las 20 horas después de la infección;
- La figura 6 (A) indica infección lítica de seis líneas celulares de melanoma humano por Coxsackievirus A21 a las veintitrés horas después de la infección; (B) indica resultados de análisis de citometría de flujo de DAF (línea oscura) e ICAM-1 (línea clara) en la superficie de células de melanoma humano;
- 20 La figura 7 indica infección lítica de diferentes líneas celulares tumorales por enterovirus humanos representativos;
- La figura 8 indica infección lítica de una biopsia de melanoma humano de ganglio linfático por enterovirus humanos Coxsackievirus A21 y B3;
- 25 La figura 9 indica infección lítica de células de cáncer de próstata por Coxsackievirus seleccionados;
- La figura 10 muestra la capacidad de CAV21 y CAV 15 para destruir de forma lítica específicamente células de melanoma, sin infectar células no de melanoma;
- La figura 11 indica que la administración subcutánea de células infectadas por CAV21 a ratones NOD-SCID inhibe la formación de tumores de melanoma humano;
- 30 La figura 12 es un gráfico que muestra resultados de tratamiento intratumoral de melanoma de Sk-Mel-28 preformado, con CAV21;
- La figura 13 es un gráfico que muestra resultados de tratamiento intratumoral de melanoma de Sk-Mel-28 preformado, con CAV 15;
- 35 La figura 14 muestra tumores de Sk-Mel-28, 35 días después de la inoculación de PBS (tumor izquierdo) y CAV 15 (tumor derecho); y
- La figura 15 es un gráfico que muestra el efecto de tratamiento intratumoral de melanoma de ME4405 preformado, con CAV21.

40

Descripción Detallada de Realizaciones Preferidas de la Invención

Para determinar si un virus es capaz de infectar y causar la muerte de las células de un tumor, puede hacerse una biopsia del tumor y puede realizarse una preparación de células usando técnicas convencionales antes de (i) confirmar la expresión en la superficie celular de receptores de virus y (ii) exponer las células al virus y supervisar la infección y muerte celular durante un periodo de incubación predeterminado, típicamente de aproximadamente 2 días aunque éste puede variar dependiendo del virus usado. Pueden explorarse varios virus de esta manera simultáneamente utilizando diferentes alícuotas de las células malignas preparadas, pudiendo seleccionarse después el virus que muestra el mayor grado de infectividad y muerte celular para administración al sujeto del que se hizo la biopsia. Análogamente, pueden emplearse diferentes preparaciones de células malignas de biopsias tomadas de diferentes fuentes, en un ensayo usando un virus específico. Las biopsias pueden tomarse de diferentes puntos de un único individuo o de varios individuos.

50

Un virus usado en un método como se describe en este documento causará deseablemente pocos o solo síntomas clínicos secundarios en el receptor. Dichos virus pueden obtenerse fácilmente de fuentes comerciales bien conocidas por el especialista en la técnica y pueden explorarse en base a su eficacia en los presentes métodos de la manera descrita anteriormente. Deseablemente, el virus se seleccionará normalmente de Coxsackievirus del grupo A. Se prefiere CAV21 y en particular CAV21 (cepa Kuykendall) (Sickles G.M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 102: 742; Shafren D. et al., J. Virol 1997, 71: 4736; Hughes et al., J. Gen Virol. 1989, 70: 2943; Schmidt, N.J., et al, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1961, 107: 63. El CAV21 (cepa Kuykendall) está disponible de la American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209. Estados Unidos de América, con el N° de Entrada VR-850.

60

Con el fin de explorar simplemente un virus dado para determinar si es capaz de infectar a y causar la muerte de células malignas, pueden usarse líneas celulares malignas para este fin en lugar de células malignas primarias aisladas de una biopsia.

65

Típicamente se utilizará el virus que reconoce al menos una de ICAM-1 y la proteína reguladora del complemento DAF. Además de expresarse en células de melanoma (Cheung N.K. et al 1998), DAF también ha demostrado tener una expresión regulada positivamente en células de adenocarcinoma de colon *in situ* y en la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT29. Se ha postulado que la expresión de DAF promueve la resistencia de las células al daño mediado por el complemento y de este modo representa un posible mecanismo de escape tumoral (Bjørge L., et al., 1996).

La expresión regulada positivamente de ICAM-1 se ha presentado en diversos tipos de líneas celulares, incluyendo células de carcinoma gástrico y de adenoma (Nasu R., 1996; y Koyama S., 1992), células de cáncer de próstata (Rokhlin O.W., y Cohen M.B., 1995) y células de cáncer de mama humano (Sgagius M.K., 1996). Estudios también han demostrado que V-CAM-1 se expresa con ICAM-1 en células de cáncer de mama (Regidor P.A., et al; 1998). Además, se sabe que ICAM-1 se expresa en células de carcinoma medular (Bacuss S.S. et al., 1994), células de mieloma (Maloney D.G. et al., 1999) y células de carcinoma de tiroides. También se ha presentado tinción de ICAM-1 positiva en tumores primarios tales como adenocarcinoma papilar y tumores metastáticos de cerebro, hígado y la glándula adrenal (Fernandez-Real J.M; 1996).

Los tumores que se producen en la piel, tales como melanoma, son candidatos particularmente adecuados para el tratamiento con el virus. En casos en los que el melanoma se ha extendido a los ganglios linfáticos, los pulmones y otros órganos, el virus puede administrarse a esos puntos y/o al tejido circundante como se ha descrito anteriormente durante un procedimiento quirúrgico para exponer dichos sitios al tratamiento.

Preferentemente, el virus seleccionado se inyectará directamente en varios puntos en un tumor maligno para maximizar el área de infección potencial del tumor por el virus. Normalmente, al tejido que rodea al tumor se le inyectará o tratará de otra manera con el virus dada la posibilidad de que estén presentes células malignas en el tejido. Si el tumor no se detecta hasta que está relativamente avanzado, puede inyectarse al tejido circundante con el virus después de la escisión quirúrgica del propio tumor.

En lugar de inyectarse directamente en un tumor maligno, el virus puede administrarse por vía sistémica mediante inyección intravenosa en el torrente sanguíneo del receptor en un punto adyacente al sitio del tumor para suministro al tumor. Análogamente, el virus puede administrarse por vía subcutánea, intraperitoneal o, por ejemplo, intramuscular si se considera apropiado. Generalmente, sin embargo, se prefiere la inyección directa en el propio tumor, dada la posibilidad de la existencia de anticuerpos específicos para el virus y por lo tanto la potencial eficacia reducida de alternar dichos modos de suministro de virus.

El virus también puede aplicarse por vía tópica a tumores en solitario o en combinación con inyección directa del virus en el tumor. En este caso, el virus puede aplicarse por medio de medios de suministro a presionar contra el punto del tumor maligno en la piel a tratar y que está impregnado con un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para mantener la integridad del virus para permitir la infección de las células malignas por el virus. El medio de suministro puede estar en forma de, por ejemplo, un parche, una compresa, un tampón, vendaje o similares para localizar el virus en el área a tratar. Típicamente, el medio de suministro será un parche provisto de un adhesivo alrededor del perímetro de su cara inferior para pegar el parche a la piel y de este modo mantener el parche en la posición deseada y el inoculante en contacto con la piel del paciente.

Generalmente, se realizarán una o más incisiones en el tumor maligno y/o tejido circundante para proporcionar un punto de entrada para el virus en el mismo.

El medio vehículo usado para inocular al receptor con el virus puede ser un fluido tal como solución salina fisiológica o cualquier otro medio conocido convencionalmente considerado apropiado, tal como geles disponibles en el mercado adecuados para uso farmacéutico y para administrar el virus al punto de tratamiento.

El inoculante generalmente contendrá de aproximadamente 1×10^2 a aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de placas por ml de inoculante. Preferentemente, el inoculante contendrá más de aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de placas por ml de inoculante. La cantidad de inoculante administrada al paciente puede determinarla fácilmente el médico o el cirujano responsable de acuerdo con la práctica médica aceptada teniendo en cuenta el estado general del paciente, la fase y ubicación del tumor maligno junto con el tamaño global y distribución del área a tratar con el virus. Típicamente, el paciente se tratará con una dosis inicial del virus y posteriormente se supervisará durante un periodo de tiempo adecuado antes de tomar una decisión de administrar virus adicionales al paciente en espera de factores tales como la respuesta del paciente a la administración inicial del virus y el grado de infección vírica y muerte de células malignas resultantes del tratamiento inicial.

Idealmente, se tratará un individuo durante un periodo de tiempo a intervalos predeterminados. Los intervalos pueden ser a diario o variar de 24 horas hasta 72 horas o más según se determine apropiado en cada circunstancia. Cada vez puede administrarse el mismo o un virus diferente para evitar o minimizar el efecto de cualquier respuesta inmunitaria a un virus administrado anteriormente y una tanda de tratamiento puede extenderse durante una o dos semanas o más según puede determinar el médico responsable. Más preferentemente, se administrará un virus al que el mamífero no se haya expuesto anteriormente o para el que el mamífero genera una respuesta inmunitaria

relativamente escasa según puede determinarse mediante técnicas convencionales.

Aunque idealmente pueden emplearse virus conocidos fácilmente disponibles, también puede utilizarse un virus modificado o manipulado usando técnicas convencionales. Por ejemplo, puede modificarse un virus para emplear moléculas de adhesión celular adicionales como receptores celulares. Por ejemplo, puede modificarse el Cocksackievirus A21 usando mutagénesis dirigida de modo que el motivo peptídico "RGD" se exprese en la superficie de la cápsida viral como es el caso del Cocksackievirus A9 (CAV-9). El motivo RGD es reconocido por todos los heterodímeros α_v de integrina y esta modificación de la cápsida puede, por ejemplo, permitir que el virus se una a la integrina $\alpha_v\beta_3$, una molécula de adhesión celular que ha demostrado regularse positivamente en combinación con ICAM-1 en la superficie de lesiones de melanoma maligno (Natali P.G.; 1997) lo que conduce a la captación potenciada del virus mediante interacción con la molécula de integrina o la posterior interacción con ICAM-1. Como alternativa, el virus puede modificarse para que reconozca a una selectina tales como E-selectina.

La invención se describirá a continuación en referencia a varios ejemplos que se describen a continuación.

Ejemplo 1

1.1. Líneas Celulares

Se mantuvieron cultivos continuos de células de Rbdomiosarcoma que expresan ICAM-1 (RD-ICAM-1), células HeLa-B y células de fibroblastos de pulmón humano (MRC5) en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) y suero fetal bovino al 10% (FCS). Se obtuvieron dos líneas celulares de melanoma Sk-Mel-28 y ME4405 de Dr. Ralph (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Monash University, Australia) y Dr. Peter Hersey, Departamento de Investigación sobre el Cáncer, Edificio David Maddison, Nivel 4, Royal Newcastle Hospital, Newcastle, Nueva Gales del Sur, Australia, respectivamente. La línea celular Sk-Mel-28 es una línea celular de melanoma metastático que se descubrió que era resistente a fármacos quimioterapéuticos (56). El cultivo celular de melanoma ME4405 se estableció a partir de muestras de lesiones de melanoma primario (69). Las dos líneas celulares de melanoma se mantuvieron en DMEM que contenía FCS al 10%. Las células de rbdomiosarcoma (RD) una línea celular embrionaria heteroploide humana y células HeLa-B, un clon aneuploide obtenido de células epiteliales escamosas humanas se obtuvieron del Laboratorio Entero-respiratorio, Fairfield Hospital, Melbourne Victoria, Australia. Las células RD transfectaban de forma estable con ADNc que codificaba la molécula de la superfamilia de la inmunoglobulina ICAM-1 proporcionando la línea celular RD-ICAM-1 que se ha descrito en otra parte (Shafren DR, et al., 1997). Las células MRC5, obtenidas de fibroblastos de pulmón humano se obtuvieron de Bio-Whittaker, EEUU.

1.2. Virus

Las cepas de CAV21 (cepa Kuykendall), CAV15 (G-9) y CVB3 (Nancy) se obtuvieron de Margery Kennett, Laboratorio Entero-respiratorio, Fairfield Hospital, Melbourne, Victoria, Australia.

1.3. Propagación de Virus

Se infectaron cultivos RD-ICAM-1 (confluente al 80-95%) con 10^4 TCID₅₀ (dosis infecciosa al 50% para cultivo tisular) de cepas de Cocksackievirus A de acuerdo con procedimientos convencionales. Las células infectadas se incubaron a 37°C hasta que se observó un efecto citopático completo (en 2 días). Después se congelaron las células a -80°C y se descongelaron para liberar las restantes partículas de virus intracelulares. El medio que contenía virus se limpió de restos celulares mediante centrifugado durante 5 minutos a 1000 x g y se almacenó como alícuotas de 500 μ l a -80°C. Se propagó CVB3 en células HeLa-B de la misma manera descrita anteriormente.

1.4. Anticuerpos monoclonales (MAb)

El MAb IH4 que reconoce la tercera SCR (repetición corta de consenso) de DAF (24) era un obsequio del Dr. B. Loveland, Austin Research Institute, Melbourne, Victoria, Australia. El MAb WE-HI-CAM reconoce el primer dominio de ICAM-1 (Berendt AR, et al., 1992) y lo proporcionó el Dr. A. Boyd, Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne, Victoria, Australia.

1.5. Análisis por Citometría de Flujo

Se incubaron células (1×10^6) en alícuotas de 100 μ l con MAb IH4 o MAb WEHI-CAM diluido en DMEM que contenía FCS al 1% en hielo durante 30 minutos. Después se lavaron las células con 5,0 ml de PBS, se sedimentaron a 1000 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en 100 μ l de inmunoglobulina G de cabra anti-ratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Silenus, Melbourne, Australia) diluida en PBS. Después de la incubación en hielo durante 30 minutos, las células se lavaron y sedimentaron y se resuspendieron en PBS para el análisis con un analizador FACStar (Becton Dickinson, Sydney, Australia).

1.6. Ensayo Colorimétrico de Infectividad

Las soluciones madre de virus de CAV21 y CAV15 se diluyeron de forma seriada 10 veces en DMEM que contenía suero fetal bovino (FCS) al 1%. Monocapas de células RD-ICAM-1 en placas de 96 pocillos se inocularon con 100 μ l de diluciones seriadas de los virus durante 48 h a 37°C. Para cuantificar la supervivencia celular, se incubaron monocapas con 100 μ l de una solución de cristal violeta-metanol (solución de 5% p/v de cristal violeta, 10% v/v de metanol, 10% v/v de formaldehído en PBS) y se lavaron con agua destilada. Las placas se leyeron en un lector de placas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas Multiscan a una longitud de onda de 540 nm. Se calcularon criterios de valoración del estudio al cincuenta por ciento (Reed LJ y Muench HA; 1938) y se expresaron como la dosis infecciosa al 50% para el cultivo tisular (TCID₅₀) por mililitro. Un pocillo se consideraba positivo si la absorbancia era menor de tres desviaciones típicas del control sin virus. Se determinó que la TCID₅₀ para CAV21 era de $2,7 \times 10^4$ unidades por ml, mientras que para CAV15, se determinó que la TCID₅₀ era de $1,6 \times 10^4$ unidades por ml.

15 1.7. Expresión en Superficie de ICAM-1 y DAF

Los niveles relativos de expresión de ICAM-1 y DAF en la superficie de las líneas celulares de melanoma SK-Mel-28 y ME4405 se determinaron mediante análisis por citometría de flujo. Los resultados se muestran en la figura 2.

20 Como puede observarse, los análisis de citometría de flujo mostraron un alto nivel comparable de expresión de ICAM-1 y DAF en la superficie de las dos líneas celulares de melanoma. 6 líneas celulares adicionales de melanoma obtenidas de melanomas metastáticos también expresaban niveles altos de ICAM-1 y DAF (no se muestran los datos). El descubrimiento de expresión de ICAM-1 a alto nivel en todas las células de melanoma metastático ensayadas apoya varios informes de la bibliografía que observan que los mayores niveles de expresión de ICAM-1 *in vivo* correlacionan con una mayor capacidad metastática (Johnson JP, et al: 1988; Kageshita T, et al: 1993; Miller BE y Weich DR; 1990; Natalie PG, et al: 1997).

Ejemplo 2

30 2.1. Infección de Líneas Celulares de Melanoma por CAV21

Monocapas de dos líneas celulares de melanoma adaptadas al cultivo, Miller y MM200, se infectaron con CAV21 preparado en el Ejemplo 1 a una multiplicidad de infección de 1,0 durante 1 hora antes de la retirada del inóculo y las células de incubaron en medio de cultivo (DMEM que contenía suero fetal bovino al 1% y penicilina-estreptomycin) durante 24 horas a 37°C. Los resultados mostrados en la figura 3 indican que CAV21 era capaz de inducir cambios significativos en la citopatología celular de las dos líneas celulares en tan solo cinco horas post-infección (PI) y a las nueve horas PI la casi completa destrucción de todas las células de melanoma.

Ejemplo 3

40 3.1. Infección de Células de Melanoma Primario por CAV21

Las células de un melanoma primario extraído de un ratón desnudo al que se le había inoculado previamente por vía subcutánea con células de melanoma humano de la línea celular ME4405 usando métodos convencionales, eran altamente susceptibles a la infección y destrucción por CAV21, incluso a una tasa de exposición de tan solo 0,005 partículas de CAV21 por célula de melanoma, como se muestra en la figura 4.

Ejemplo 4

50 4.1. Infección de Células de Melanoma Aisladas De Biopsia Tisular, por CAV21

Se aislaron células de melanoma de una biopsia reciente de melanoma primario de la pared torácica mediante la técnica de desbordamiento ("spilling") y mediante digestión en colágeno-tripsina y ADNasa. En resumen, las células se liberaron de la biopsia de melanoma macerando la biopsia con el émbolo de una jeringa de 10 ml. La suspensión de células de melanoma resultante se purificó en un gradiente de Ficol-Hypaque (Amersham Pharmacia, Uppsala, Suecia). Los fibroblastos y leucocitos contaminantes se retiraron mezclando con perlas Dybal recubiertas de anticuerpos monoclonales (Mab) para fibroblastos humanos (Nº de Cat: MAS516X, SeraLab) y para el antígeno común leucocitario (CD45, Nº de Cat 17-0804-3, Amrad Biotech, Victoria, Australia).

60 Posteriormente, se colocaron 1×10^6 células en pocillos de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos y se les inocularon aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de placas de CAV21 preparado en el Ejemplo 1. Después de la incubación a 37°C durante 20 horas, se evaluó la muerte celular en las células tiñendo con yoduro de propicio y análisis al microscopio.

65 La figura 5 muestra que tanto las células adherentes como las de la suspensión de melanoma primario eran destruidas eficazmente como resultado de la infección por CAV21 durante el periodo de incubación de 20 horas.

Ejemplo 5**5.1. Expresión de ICAM-1 y DAF en Células de Melanoma Susceptibles a CAV21 Infección**

Para confirmar que las células de melanoma son altamente susceptibles a la infección y la resultante destrucción por CAV21, se infectaron seis líneas celulares adicionales de melanoma humano con CAV21 preparado en el Ejemplo 1.

La figura 6(A) indica que todas las líneas celulares de melanoma excepto una (ME 105) eran destruidas como resultado de la infección por CAV21 durante un periodo de incubación de 23 horas.

Para confirmar el alto nivel de expresión de ICAM-1 y DAF en la superficie de células de melanoma maligno, se trataron células de cada línea celular con el Mab IH4 y el Mab WEHI-CAM. La unión del Mab anti-DAF y anti-ICAM-1 se determinó mediante análisis de citometría de flujo como se ha descrito anteriormente. Los histogramas de fluorescencia mostrados en la figura 6(B) confirman el alto nivel de expresión de DAF e ICAM-1 en la superficie de todas las líneas celulares de melanoma examinadas excepto la línea celular ME 105. La carencia de expresión de DAF e ICAM-1 hacía a esta línea refringente a la infección por CAV21.

Ejemplo 6**6.1 Infección Selectiva de Células de Melanoma que Expresan ICAM-1**

Para destacar la naturaleza selectiva de la infección por CAV21 de células de melanoma humano que expresan ICAM-1, se inocularon monocapas de la línea celular de melanoma MM 200 con aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de placas de CAV21, Coxsackievirus B3 (CVB3), Ecovirus de tipo 7 (E7) o Coxsackievirus B1 (CVB1) en pocillos de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos durante una hora a 37°C, respectivamente. Posteriormente, se retiró el inoculado viral y las monocapas de células se lavaban después con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se añadió 1,0 ml de DMEM que contenía suero fetal bovino al 1,0% a cada pocillo y las células se incubaron a 37°C durante 48 horas. Para cuantificar la supervivencia celular, se incubaron monocapas con una solución de cristal violeta/metanol, se lavaron con agua destilada y se examinaron al microscopio a 100 aumentos.

La figura 7 muestra que después del periodo de incubación de 48 horas solamente CAV21 infectaba las células de melanoma MM 200 mientras que ocurría lo contrario en las células de rhabdomyosarcoma (RD) en las que era evidente la infección y destrucción por CVB1, CVB3 y E7. Las células RD expresan DAF pero no ICAM-1. Sin embargo, cuando ICAM-1 se expresa en la superficie de células RD, éstas son altamente susceptibles a infección y destrucción inducida por CAV21.

Ejemplo 7**7.1 Infección de Biopsia de Melanoma Con CAV21**

Se colocaron secciones de biopsias sólidas de melanoma de ganglios linfáticos humanos en pocillos de una placa de cultivo tisular de 24 pocillos y se infectaron de forma simulada o expusieron a aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de placas de CAV21 o CVB3.

Los resultados mostrados en la figura 8 indican que la infección por CAV21 daba como resultado la grave destrucción tisular alrededor del perímetro de la biopsia de melanoma tratada con ese virus, mientras que no se observó destrucción de la membrana viral detectable en las biopsias infectadas de forma simulada y por CVB3.

Ejemplo 8**8.1 Infección Lítica de Células de Melanoma Humano por CAV21 y CAV15**

Para evaluar el potencial oncolítico de CAV15 y CAV21 en líneas celulares de melanoma humano, se sembraron células Sk-Mel-28 y ME4405 en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Becton Dickinson) a 3×10^4 células por pocillo. Después de la incubación durante 24 h a 37°C, se retiró el medio de cultivo y se sustituyó por medio recién preparado que contenía la dilución seriada viral apropiada en un volumen final de 100 μ l. Se diluyeron preparaciones virales madre de 10^{-1} hasta 10^{-7} . Después de la inoculación viral, las placas se incubaron a 37°C durante 48 h y se detectó la supervivencia celular mediante tinción con cristal violeta como se ha descrito anteriormente.

Se descubrió que las tres líneas celulares RD-ICAM-1, Sk-Mel-28 y ME4405 eran permisivas a la infección lítica por CAV21 y CAV15. Después de un periodo de incubación de 48 h, el control sin virus no mostraba signos de CPE (efecto citopático) inducido viral, mientras que se observaba una extensa lisis celular en todos los cultivos celulares a una dilución de 10^{-1} y 10^{-2} . A diluciones virales más altas, las células Sk-Mel-28 demostraron ser más permisivas a la lisis viral en comparación con las líneas celulares ME4405 y RD-ICAM-1.

El potencial oncolítico global de CAV21 y CAV15 era más alto en las líneas celulares de melanoma, en comparación con las células de control RD-ICAM-1. Aunque todos los tipos celulares expresaban niveles similares de ICAM-1, la expresión de DAF en células RD-ICAM-1 es significativamente más baja que en células de melanoma (véase la figura 2) lo que suponía una menor unión viral mediante DAF a células RD-ICAM-1. DAF previamente ha demostrado ser una molécula de secuestro de baja afinidad por muchos Coxsackievirus, que evalúa la captura de partículas virales y por lo tanto la infectividad de las células (Lea SM, et al., 1998). La presencia de niveles más altos de expresión de DAF en las líneas celulares de melanoma en comparación con las células RD-ICAM-1 aumentaba la probabilidad de que el virus accediera a receptores de ICAM-1, conduciendo de este modo a un mayor nivel de infección y lisis celular.

8.2. Infección Lítica de Células de Cáncer de Próstata Humano por Coxsackievirus

Se sembraron células de la línea celular de cáncer de próstata humano CP3 (que expresa ICAM-1) en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano (Becton Dickinson) a 3×10^4 células por pocillo y se trataron con diluciones seriadas de CAV13, CAV15, CAV21 y el virus Coxsackievirus del grupo B CVB3 después de la incubación de las células, como se ha descrito en el Ejemplo 8.1 anteriormente. Las células PC3 están disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, Virginia, EEUU, con el N° de Entrada CRL-1435.

Como se muestra en la figura 9, las células PC3 eran altamente permisivas a la infección lítica por CAV 15. También se observó una extensa infección lítica para CAV13 y CAV21.

8.3. Replicación Selectiva de CAV21 y CAV15 en las Líneas Celulares de Melanoma Humano Sk-Mel-28 y ME4405

La selectividad de CAV21 y CAV15 por las líneas celulares de melanoma Sk-Mel-28 y ME4405 se estudió usando un ensayo de especificidad *in vitro*.

Se usaron insertos de cultivo celular estéril para dividir los pocillos de una placa de cultivo tisular de seis pocillos convencional. Dentro del inserto de cultivo celular, se cultivaron células Sk-Mel-28 o células ME4405, con células MRC5 o RD creciendo alrededor del inserto de cultivo celular. Una vez que las células se habían adherido, se retiraron los insertos de cultivo celular de cada uno de los pocillos permitiendo que el medio de cultivo cubriera uniformemente el co-cultivo. Cuando los perímetros de ambas poblaciones celulares se habían fusionado, los co-cultivos se lavaron dos veces con PBS y después se les inocularon 500 μ l de PBS o solución madre de virus (10^5 TCID₅₀) durante 1 h a 37°C. Después de la incubación a 37°C, se añadió DMEM recién preparado que contenía FCS al 1% a cada uno de los pocillos y las placas se incubaron durante 48 h a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las monocapas de células se supervisaron mediante microscopía en campo claro para detectar signos de CPE inducido por virus, antes de que cada pocillo se tiñera con 3 ml de solución de cristal violeta para la detección de la supervivencia celular de infección lítica inducida por virus. La capacidad de virus CAV21 y CAV15 para destruir líticamente de forma específica células de melanoma sin infectar a células circundantes no de melanoma se ilustra en la figura 10.

Como puede observarse, los cultivos internos de células de melanoma en cada pocillo tratado con CAV21 o CAV15 fueron destruidos totalmente por los virus, pero no resultaron afectados por el virus CVB3 que no emplea ICAM-1 como receptor para la entrada en la célula. CVB3 que emplea el receptor de Coxsackievirus y adenovirus (CAR) para la entrada en la célula (10). Las células MRC5 parecían ser refringentes a la infección lítica por CAV21 y CAV15. Estas células se obtienen de un cultivo de fibroblastos de pulmón humano y solamente expresan niveles bajos de ICAM-1 (datos no publicados). Los presentes datos muestran que la rápida y eficaz infección lítica de células diana facilitaba la expresión a alto nivel de ICAM-1 y DAF. Las células RD, que no expresan ICAM-1, no eran destruidas por infección por CAV21 o CAV15. Además, los resultados muestran poca, si hay alguna, dispersión de CAV21 y CAV15 a células negativas para el receptor que están en contacto directo con células portadoras del receptor infectadas por virus.

Ejemplo 9

La infección lítica de tumores de melanoma preformados *in vivo* se evaluó mediante una serie de experimentos de exposición animal usando ratones NOD-SCID.

9.1. Desarrollo de Xenoinjertos de Melanoma en Ratones NOD-SCID

Se realizó un trabajo con animales bajo directrices aprobadas por El Comité de Atención y Ética para Animales de la Universidad de Newcastle (University of Newcastle Animal Care and Ethics Committee). Se alojaron ratones NOD-SCID en alojamientos libres de patógenos en la instalación para el manejo de animales situada en el Edificio David Maddison, Nivel 5, Newcastle, NSW, Australia.

Se cultivaron células Sk-Mel-28 y ME4405 en DMEM que contenía FCS al 10%. Las células se recogieron y se lavaron dos veces con DMEM y se resuspendieron en PBS estéril. La concentración celular de la suspensión se

determinó con un hemocitómetro y la viabilidad celular se evaluó mediante tinción con azul de tripano. Solamente las preparaciones celulares con > 95% de viabilidad se usaron para el xenotransplante. Antes del xenotransplante, los animales se anestesiaron con inyecciones intraperitoneales (i.p.) de Rompun/Ketamina (50 mg/kg). Para la supervisión de animales y la medición de crecimiento tumoral, los animales se anestesiaron con isoflurano al 3%.

Las células tumorales se xenoinjertaron en el flanco de ratones NOD-SCID hembra de 4-6 semanas de edad anestesiados. El crecimiento del tumor xenoinjertado se observaba cada día y se medía con compases calibradores a diversos intervalos con todas las mediciones registradas en mililitros en el transcurso de 5 semanas. Se calcularon estimaciones de volúmenes tumorales usando métodos conocidos (Davies CD, et al., 1997).

9.2. Suministro Viral Subcutáneo

En un experimento preliminar que empleaba quince ratones NOD-SCID, se evaluó el suministro local subcutáneo de virus a través de células infectadas *ex vivo* para la inhibición del crecimiento tumoral. A los ratones del grupo de control (n = 5) se les inyectaron por vía subcutánea células Sk-Mel-28 (1×10^7) en puntos individuales en el flanco superior e inferior. El grupo de CAV21 (n = 5) recibía una inyección de 1×10^7 células Sk-Mel-28 en el flanco superior y una segunda inyección de células Sk-Mel-28 (1×10^7) que se habían pre-incubado con 10^4 TCID₅₀ de CAV21 a temperatura ambiente durante 1 hora *ex vivo*. El grupo de CAV15 (n = 5), se trataba de la misma forma que el grupo de CAV21 excepto que la segunda inyección en el flanco inferior contenía células Sk-Mel-28 (1×10^7) que se habían incubado con 10^4 TCID₅₀ de CAV15. Cuatro semanas después de la inyección, se sacrificó un representante del grupo de control y demostró tener dos masas tumorales individuales correspondientes a los dos puntos de inyección de las células Sk-Mel-28 (1×10^7). Por el contrario, un representante del grupo de CAV21 no presentaba formación de tumores detectable en los puntos de inyección de células no infectadas o de células infectadas con el virus (figura 11). Después del examen de la autopsia, todos los restantes miembros del grupo de control demostraron poseer dos crecimientos tumorales de xenoinjerto de melanoma distintos, mientras que los restantes miembros del grupo de CAV21 (17 semanas después de la inyección) no mostraban crecimiento tumoral detectable en ningún punto de inyección. Los ratones del grupo de CAV15 no mostraban formación tumoral a las 4 semanas después de la inyección.

9.3. Suministro Viral Intratumoral

Se inyectaron veinte ratones NOD-SCID con células Sk-Mel 28 (1×10^7) en el flanco superior. Cuando el volumen tumoral alcanzaba ~ 50 - 100 mm^3 los animales se dividían aleatoriamente en grupos de cinco y se alojaron en jaulas diferentes. A los grupos de ratones se les inyectaron por vía intratumoral con 100 μl de CAV21 o CAV15 activo que contenían dosis de $10^{3.2}$ o $10^{4.2}$ TCID₅₀, respectivamente. Los restantes animales recibían 100 μl de PBS inyectado directamente en los xenoinjertos. Los diferentes grupos de tratamiento se alojaron en jaulas ventiladas individualmente mantenidas a presión negativa, asegurándose que las jaulas individuales contenían virus y otros patógenos.

Una dosis de $10^{3.2}$ o $10^{4.2}$ TCID₅₀ de CAV21 o CAV15 respectivamente, era suficiente para producir una significativa reducción del tumor en animales portadores de tumores de Sk-Mel-28 preformados, a los 14 días después de la inyección. La tendencia de la reducción de la carga tumoral continuaba en los siguientes 14-21 días. No se observaron tumores detectables a los 30-35 días después de la inyección (véase figuras 12 y 13). La diferencia observada entre el grupo tratado con CAV21 y el grupo tratado con PBS de control era estadísticamente significativa (P = 0,0023, test t). Los animales portadores de tumores de Sk-Mel-28 e inyectados con CAV21 no mostraban signos clínicos de enfermedad por CAV21. La capacidad de CAV15 para reducir drásticamente la carga tumoral de melanoma se muestra en la figura 14. A los 35 días después de la inyección, el xenoinjerto de melanoma tratado con PBS era de aproximadamente 2037 mm^3 mientras que el tumor tratado con CAV15 era de aproximadamente 2 mm^3 de volumen (P = 0053, test t). El tumor tratado con CAV15 mostrado comprende en su mayor parte tejido conectivo residual.

9.4 Suministro Intratumoral de CAV21 a Xenoinjerto de ME4405

Se realizó el suministro intratumoral de CAV21 a un xenoinjerto de melanoma diferente (ME4405) para confirmar adicionalmente el potencial de terapia anti-tumoral de este virus. A quince ratones NOD-SCID se les inyectaron células ME4405 (5×10^6) por vía subcutánea en un único punto en el flanco. Cuando los volúmenes tumorales habían alcanzado aproximadamente 500 mm^3 , los animales se dividieron aleatoriamente en grupos de cinco y se alojaron en jaulas diferentes. A cinco animales se les inyectaron por vía intratumoral 100 μl de CAV21 activo que contenían dosis de $10^{3.2}$ TCID₅₀, mientras que cinco ratones recibían 100 μl de PBS inyectados directamente en los xenoinjertos y los restantes cinco ratones se dejaron sin tratamiento. Como se muestra en la figura 15, la administración intratumoral de CAV21 era capaz de reducir marcadamente el desarrollo de tumores de células ME4405 en 25 días después de la inyección incluso aunque el volumen tumoral inicial pre-inyección era 5 veces mayor que los utilizados anteriormente. Se observó que los xenoinjertos de ME4405 eran más agresivos que los tumores de Sk-Mel-28 según lo evaluado mediante velocidades de crecimiento de tumores significativamente más rápidas en los grupos de control.

La línea celular ME4405 generaba tumores agresivos muy vasculares en comparación con tumores de Sk-Mel-28 que crecían a una velocidad más lenta y no eran tan vasculares como los tumores de ME4405.

5 Al contrario que los ratones portadores de xenoinjertos de Sk-Mel-28, cuando se inyectaba CAV21 en animales con tumores de ME4405, se observaron algunos signos de enfermedad, siendo el más notable una debilidad transitoria en las patas delanteras y traseras. No se observaron alteraciones posicionales.

9.5. Discusión de Resultados

10 Este estudio demuestra que CAV13, CAV15 y CAV21 tienen la capacidad de destruir líticamente líneas celulares malignas.

15 Específicamente, el análisis *in vitro* de infección por CAV21 y CAV15 de células de melanoma muestra que estos dos virus son capaces de infectar de forma selectiva a líneas celulares Sk-Mel-28 y ME4405 como resultado de la expresión de ICAM-1 y DAF mientras que cada uno de los Coxsackievirus mencionados anteriormente era capaz de infectar a y causar la muerte de células de la línea celular de cáncer de próstata PC3. Además, la inyección intratumoral de CAV21 y CAV15 en xenoinjertos de líneas celulares de melanoma humano que crecieron en los flancos de ratones NOD-SCID, mostraba que CAV21 y CAV15 poseen aplicaciones terapéuticas contra el melanoma maligno. La inyección directa de cualquiera de los dos virus en tumores de melanoma pre-formados suprimía el crecimiento tumoral y conducía a una regresión tumoral significativa y, en algunos casos, a la completa destrucción del tumor en comparación con animales de control. Además, el suministro de células infectadas por virus *ex vivo* producía la inhibición total del crecimiento tumoral y demuestra que las células de melanoma infectadas por CAV21 *ex vivo* son capaces de suministrar suficientes virus para inhibir el crecimiento tumoral local. Además, la inyección de células infectadas por vía subcutánea en una región distante de la exposición inicial al tumor, muestra que el virus puede viajar por vía sistémica.

20 Las patogénesis de infecciones por CAV21 y CAV15 son principalmente asintomáticas o solamente se manifiestan como malestar general leve. La cepa Coe de CAV21 ha sido aprobada recientemente para administración a seres vivos por la Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) de los Estados Unidos de América para la evaluación clínica de agentes anti-virales específicos contra CAV21 (90). El reciente desarrollo de agentes anti-virales específicos contra CAV21 y CAV15 proporciona una precaución de seguridad añadida para la intervención de fármacos para controlar la infección viral.

30 Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente en este documento en referencia a varias realizaciones preferidas, el especialista en la técnica destinatario entenderá que son posibles numerosas modificaciones y variaciones sin alejarse del alcance de la invención.

REFERENCIAS MENCIONADAS:

- 40 1. Kageshita T, Yoshii A, Kimura T, Kuriya N, Ono T, Tsujisaki M, Imai K y Ferrone S (1993). Clinical relevance of ICAM- 1 expression in primary lesions and serum of patients with malignant melanoma. *Cancer Res.* 15 de octubre; 53(20): 4927-32.
- 45 2. Kraus A, Masat L y Johnson JP (1997). Analysis of the expression of intercellular adhesion molecule-1 and MUC18 on benign and malignant melanocytic lesions using monoclonal antibodies directed against distinct epitopes and recognising denatured, non-glycosylated antigen. *Melanoma Res.* 7 de agosto; Supl 2: S75-81.
3. Morandini R, Beeynaems JM, Hedley SJ, MacNeil S y Ghanem G (1998). Modulation of ICAM-1 expression by alpha-MSH in human melanoma cells and melanoxytes. *J Cell Physiol.* Junio; 175(3): 276-82.
- 50 4. Staunton DE, Merluzzi VJ, Rothlein R, Barton R, Marlin SD y Springer TA (1989). A cell adhesion molecule, ICAM-1 is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell.* 1. 56: 849-853.
5. Cheung NK, Walter EI, Smith-Mensah WH, Ratnoff WD, Tykocinski ML y Medof ME (1998). Decay-accelerating factor protects human tumor cells from complement-mediated cytotoxicity *in vitro*. *J Clin Invest.* Abril; 81(4): 1122-8.
6. Nemunaitis J (1999). *Oncolytic viruses.* *Investigational New Drugs* 17: 375-386
- 55 7. Fenner F, McAuslan BR, Mims CA, Sambrook J y White DO. *The Biology of Animal Viruses.* Academic Press, Nueva York, 1974 Segunda Ed.
8. Alemany R, Gomez-Manzano C, Balague C, Yung WK, Curiel DT, Kyritsis AP y Fueyo J (1999). Gene therapy for gliomas: molecular targets, adenoviral vectors, and oncolytic adenoviruses. *Exp Cell Res.* 252: 1-12.
- 60 9. Andreansky SS, He B, Gillespie GY, Soroceanu L, Markert J, Chou J, Roizman B y Whitley RJ (1996). The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci EEUU* 93: 113 13-8.
10. Coffey MC, Strong JE, Forsyth PA y Lee PWK (1998). Reovirus therapy of tumours with activated Ras pathway. *Science.* 282: 1332-1334.
- 65 11. Strong JE, Coffey MC, Tang D, Sabinin P y Lee PWK (1998). The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signalling pathway by reovirus. *17(12):* 3351-3362
12. Randazzo BP, Kesari S, Gesser RM, Alsop D, Ford JC, Brown SM, Maclean A y Fraser NW (1995),

Treatment of experimental intracranial murine melanoma with a neuroattenuated herpes simplex virus 1 mutant. *Virology* 211: 94-101.

13. Satyamoorthy K, Soballe PW, Soans F y Herlyn M (1997). Adenovirus infection enhances killing of melanoma cells by a mitotoxin. *Cancer Research* 57: 1873-1876.
- 5 14. Hemmi S, Geertsens R, Mezzacasa A, Peter I y Dummer R (1998). The presence of human Coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Human Gene Therapy* 9: 2363-2373.
- 15 15. Shafren DR, Dorahy DJ, Ingham RA, Bums GF y Barry RD (1997). Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J Virol.* Junio; 71 (6): 4736-43.
- 10 16. Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Racaniello VR y Skalka AM (2000). Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control. ASM Press, Washington.
17. Marshall JF y Hart IR (1996). The role of α vntegrins in tumour progression and metastasis.
18. Bjørge L, Jensen TS y Matre R (1996). Characterisation of the complement-regulatory proteins decay-accelerating factor (DAF, CD55) and membrane cofactor protein (MCP, CD46) on a human colonic adenocarcinoma cell line. *Cancer Immunol Immunother.* 42: 185-192.
- 15 19. Nasu R, Mizuno M, Kiso T, Shirio K, Uesu T, Nasu J, Tomoda J, Okada H y Tsuji T (1997). Immunohistochemical analysis of intercellular adhesion molecule-1 expression in human gastric adenoma and adenocarcinoma. *Virchows Arch* 430: 279-283.
- 20 20. Koyama S, Ebihara T y Fukao K (1992). Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1) during the development of invasion and/or metastasis of gastric carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 118: 609-614.
21. Rokhlin OW y Cohen MB (1995). Expression of cellular adhesion molecules on human prostate tumor cell lines. *Prostate.* Abril; 26(4): 205-12.
22. Sgagias MK, Nieroda C, Yannelli JR, Cowan KH y Danferth Jr. DN (1996). Upregulation of DF3, in association with ICAM-I and MHC class II by IFN-gamma in short-term human mammary carcinoma cell cultures. *Cancer Biother Radiopharm.* 11: 177-85.
- 25 23. Regidor PA, Callies R, Regidor M y Schindler AE (1998). Expression of the cell adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 in the cytosol of breast cancer tissue, benign breast tissue and corresponding sera. *Eur J Gynaecol Oncol.* 19: 377-83.
24. Bacuss SS, Zelnick CR, Chin DM, Yarden Y, Kaminsky DB, Bennington J, Wen D, Marcus JN y Page DL (1994). Medullary carcinoma is associated with expression of intercellular adhesion molecule-1. Implication to its morphology and its clinical behaviour. *Am J Pathol.* Diciembre; 145(6): 1337-1148.
- 30 25. Maloney DG, Donovan K y Hamblin TJ (1999). Antibody therapy for treatment of multiple myeloma. *Seminars in Hematology.* 36 (1 Supl 3): 30-33.
26. Fernandez-Real JM, Villabona C, Fernandez-Castaner M, Sagarra E, Gomez-Saez JM y Soler J (1996). Expression of ICAM-1 in distant metastatic thyroid carcinoma. *J Endocrinol Invest.* Mar; 19(3): 183-185.
- 35 27. Natalie PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicotra MR, Di Filippo F, Giannarelli D, Temponi M, Ferrone S (1997). Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res.* 15 de abril; 57(8):1554-60.
28. Reed LJ y Muench HA (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* 27: 493-497.
- 40 29. Berendt AR, McDowall A, Craig AG, Bates PA, Sternberg MJE, Marsh K, Newbold CI y Hogg M (1992). The binding site on ICAM-1 for plasmodium falciparum-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from the LFA-1 binding site. *Cell.* 68: 71-81.
30. Johnson JP, Stade BG, Hupke U, Holzmann B, Schwable W y Reithmuller G (1988) The melanoma progression-associated antigen P3. 58 is identical to the intercellular adhesion molecule ICAM-1. *Immunology.* 178: 275-284.
- 45 31. Miller BE y Welch DR (1990). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by human melanoma cells; association with leukocyte aggregation and metastatic potential. *Clin. Exp. Metastasis.* 8: 80.
32. Lea SM, Powell RM, McKee T, Evans DJ, Brown D, Stuart DI y van der Merwe PA (1998). Determination of the affinity and kinetic constants for the interaction between the human virus echovirus 11 and its cellular receptor, CD55. *J. Biol. Chem.* 273: 30443-30447.
- 50 33. Davies CDL, Muller H, Hagen I, Garsel M y Hjelsfuen MH (1997). Comparison of extracellular matrix in human osteosarcomas and melanomas growing as xenografts, multicellular spheroids and monolayer cultures. *Anticancer Research.* 17: 4317-4326.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para su uso en el tratamiento de una afección asociada con la presencia de células anómalas que expresan la molécula de adhesión celular ICAM-1, comprendiendo la composición un virus que es un miembro de la familia Picornaviridae, que reconoce a ICAM-1 para infectividad de una célula anómala y que puede infectar y destruir al menos alguna de dichas células, en el que las células anómalas son células cancerosas.
- 10 2. Una composición para su uso en el tratamiento de una afección asociada con la presencia de células anómalas que expresan la molécula de adhesión celular ICAM-1 de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la expresión de ICAM-1 está regulada positivamente en las células anómalas con respecto a dichas células no malignas que expresan su fenotipo normal.
- 15 3. Una composición para su uso en el tratamiento de una afección asociada con la presencia de células anómalas que expresan la molécula de adhesión celular ICAM-1 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que las células anómalas son células de cáncer de próstata, células de cáncer de mama, células de carcinoma gástrico, células de cáncer colorrectal, células de cáncer de glioma o células de cáncer de piel.
- 20 4. Una composición para su uso en el tratamiento de una afección asociada con la presencia de células anómalas que expresan la molécula de adhesión celular ICAM-1 de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las células anómalas son células de melanoma.
- 25 5. Una composición para su uso en el tratamiento de una afección asociada con la presencia de células anómalas que expresan la molécula de adhesión celular ICAM-1 de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las células anómalas son células de cáncer de próstata.
- 30 6. Una composición para su uso en el tratamiento de una afección asociada con la presencia de células anómalas que expresan la molécula de adhesión celular ICAM-1 de acuerdo con la reivindicación 1, en la que las células anómalas son células de cáncer de mama.
- 35 7. Una composición para su uso en el tratamiento de una afección asociada con la presencia de células anómalas que expresan la molécula de adhesión celular ICAM-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el virus reconoce a ICAM-1 y a la proteína reguladora del complemento DAF.
- 40 8. Una composición para su uso en el tratamiento de una afección asociada con la presencia de células anómalas que expresan la molécula de adhesión celular ICAM-1 de acuerdo con la reivindicación 7, en la que las células anómalas son células de melanoma y expresan ICAM-1 y DAF.
- 45 9. Una composición para su uso en el tratamiento de una afección asociada con la presencia de células anómalas que expresan la molécula de adhesión celular ICAM-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el virus está en forma modificada, consistiendo la modificación en emplear moléculas de adhesión celular adicionales como receptores celulares o en producir un virus para reconocer una selectina.
10. Una composición para su uso en el tratamiento de una afección asociada con la presencia de células anómalas que expresan la molécula de adhesión celular ICAM-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la administración por vía intravenosa, intratumoral, intraperitoneal, intramuscular o por aplicación tópica.



Figura 1

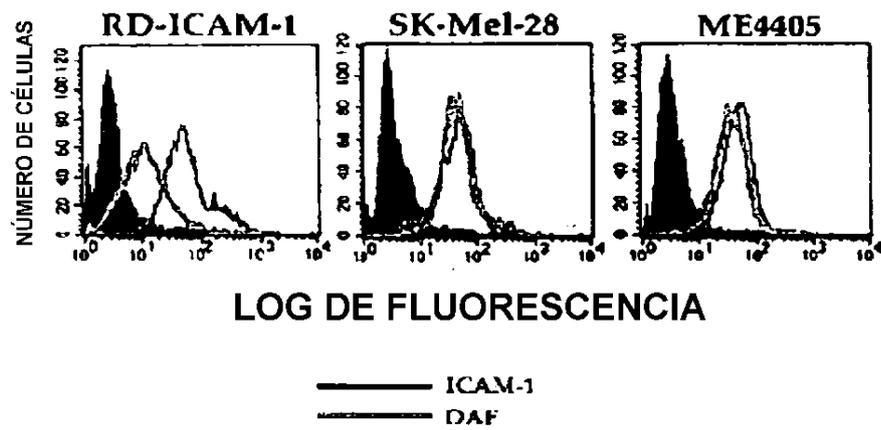


Figura 2

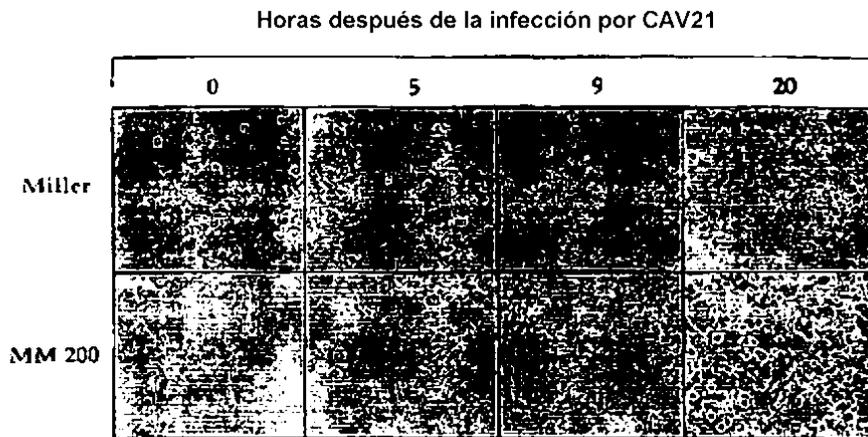


Figura 3

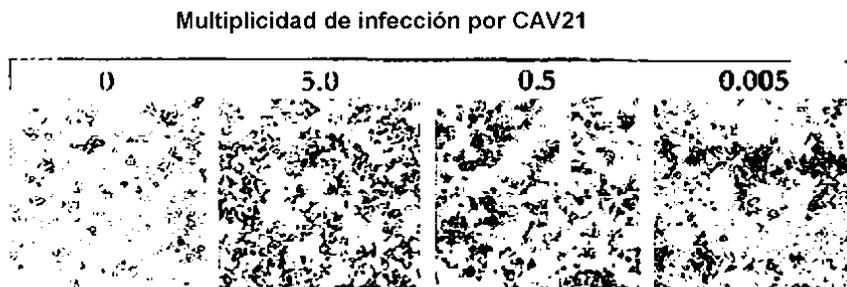


Figura 4

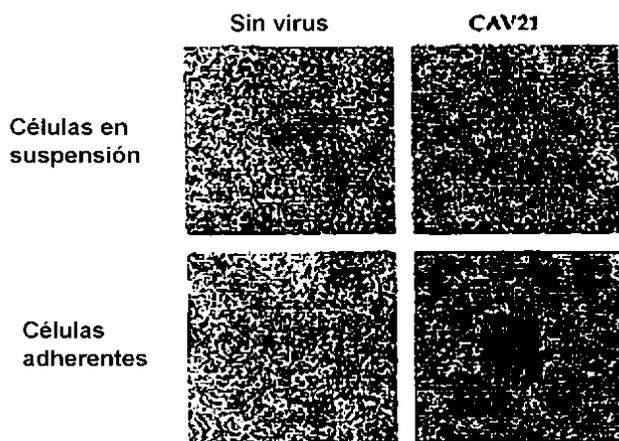


Figura 5

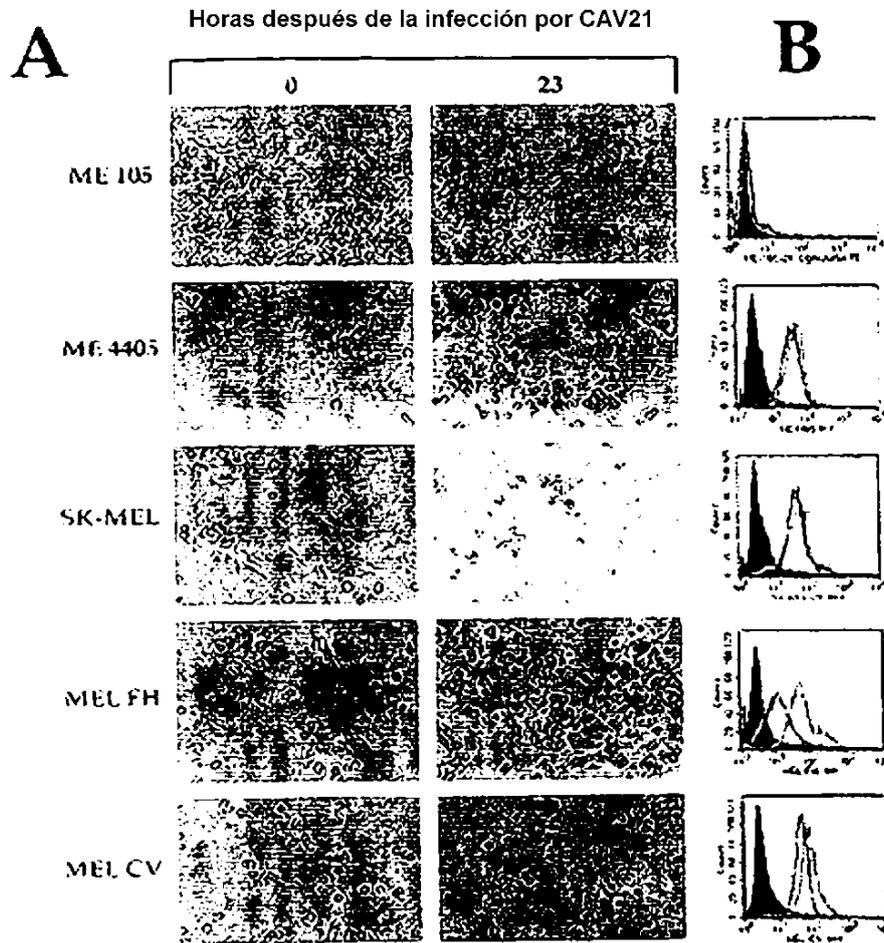


Figura 6

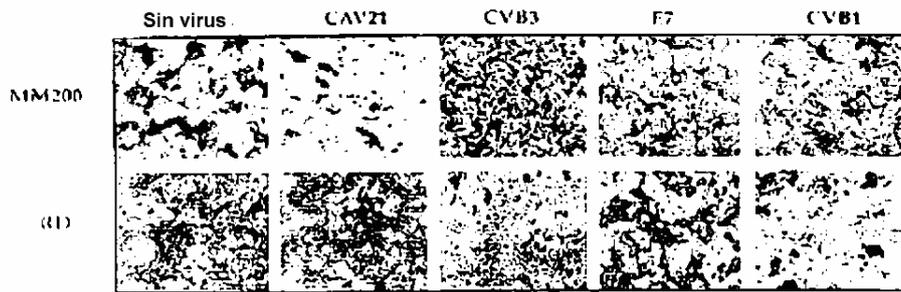


Figura 7

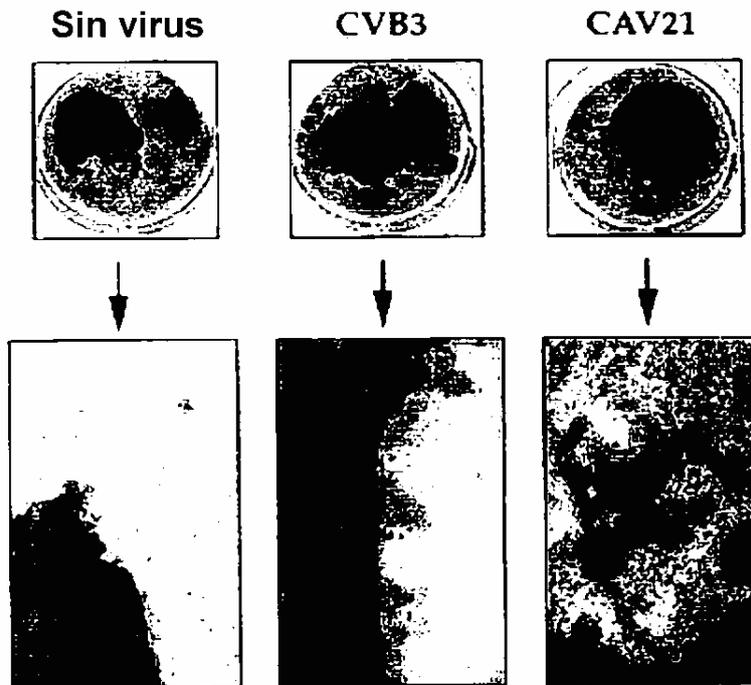


Figura 8

Potencial Oncolítico de Virus en Células PC3

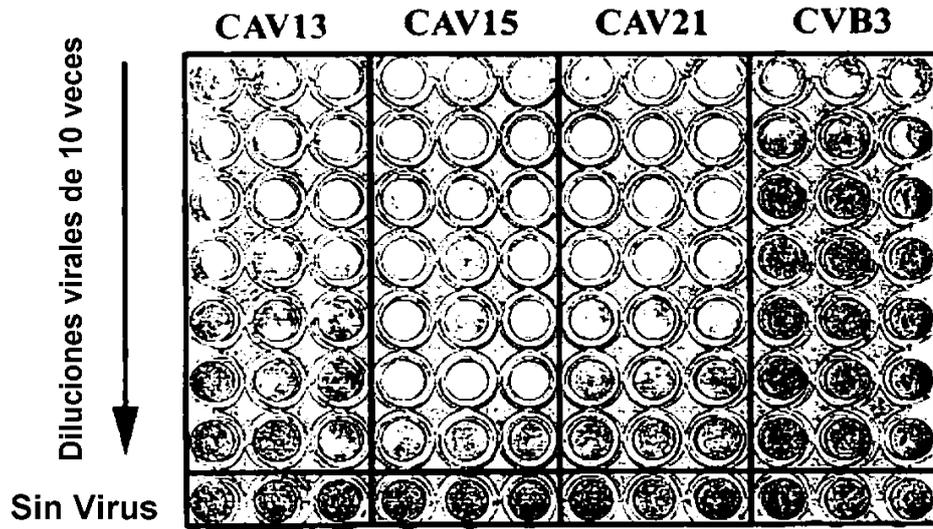


Figura 9

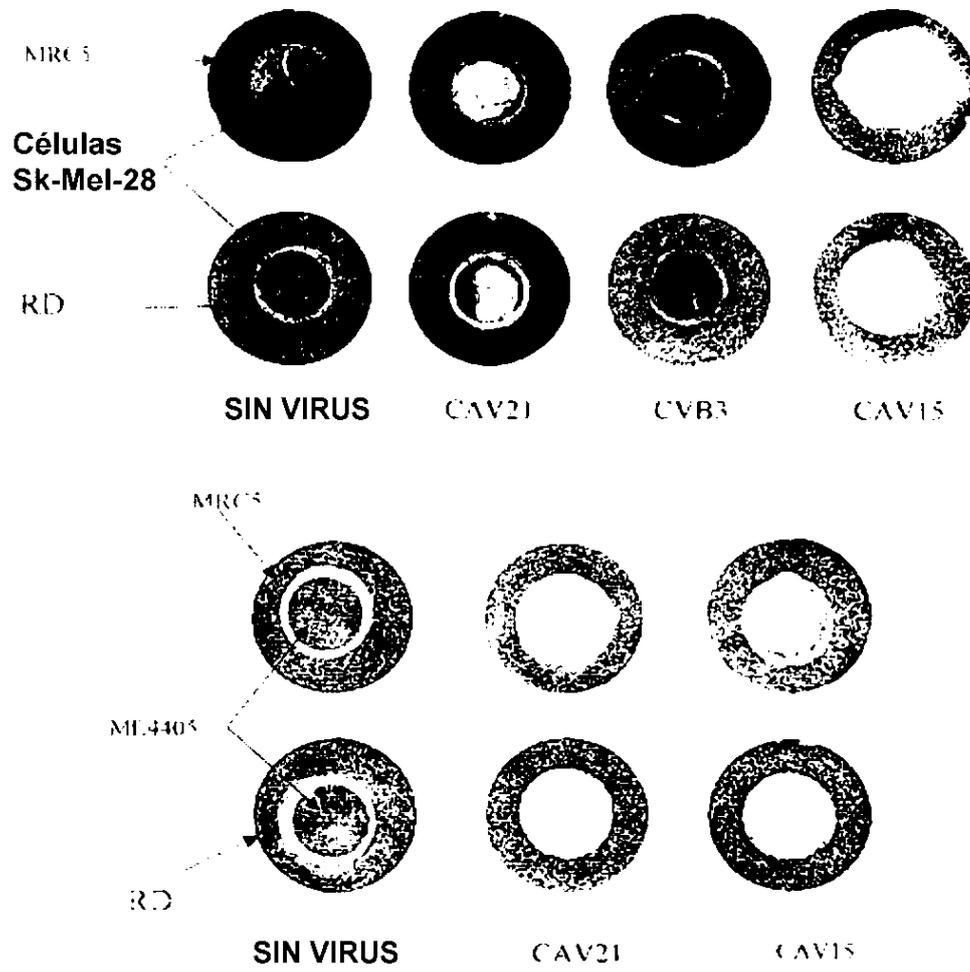


Figura 10

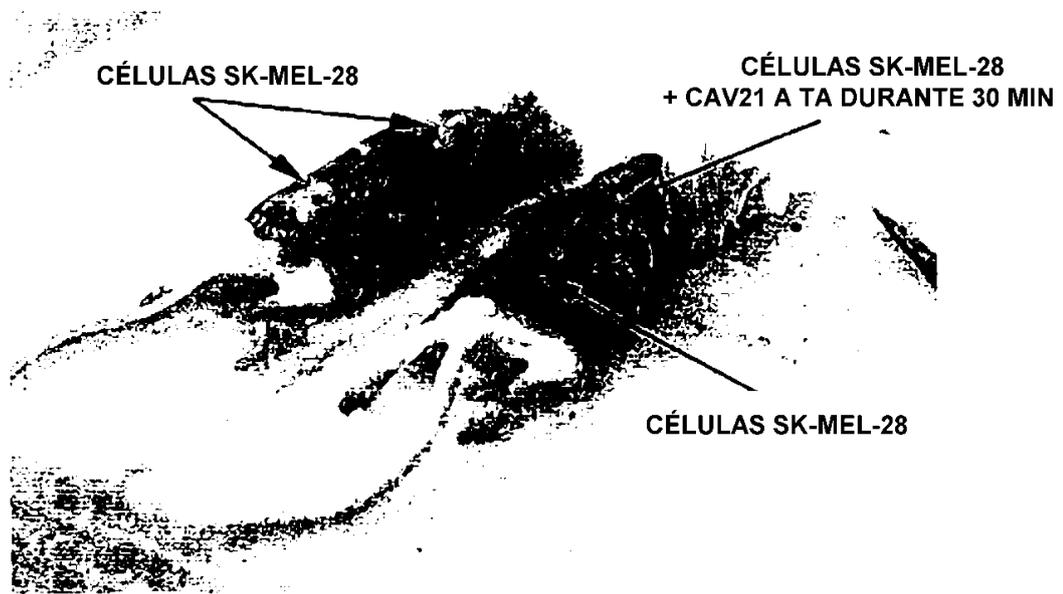


Figura 11

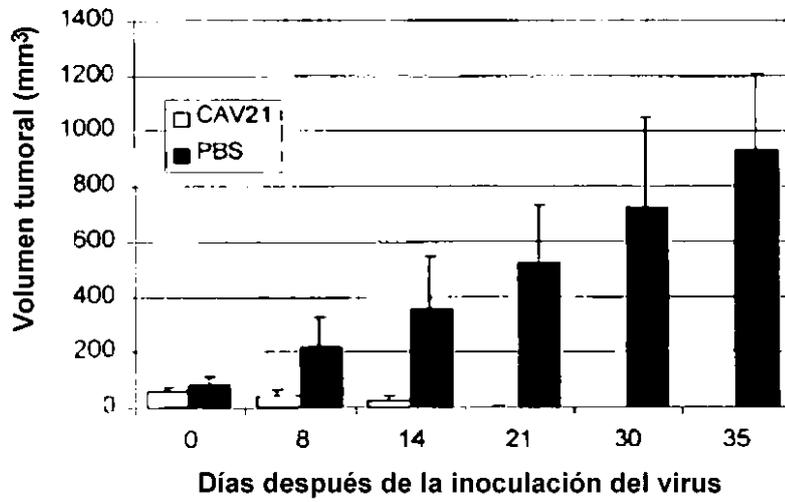


Figura 12

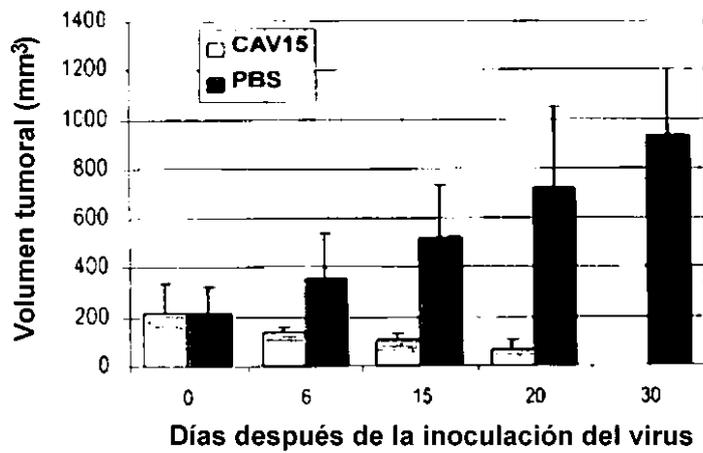


Figura 13

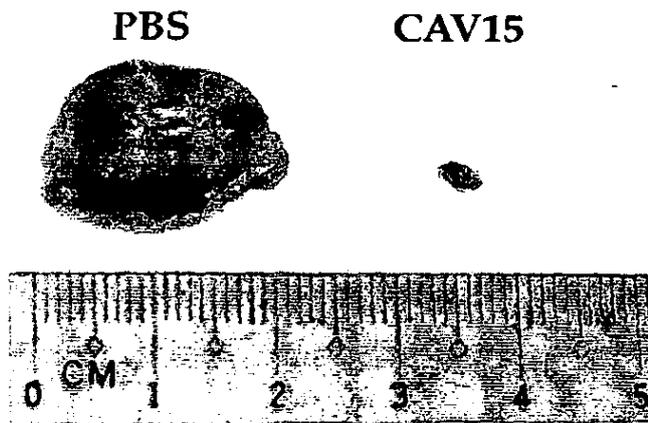


Figura 14

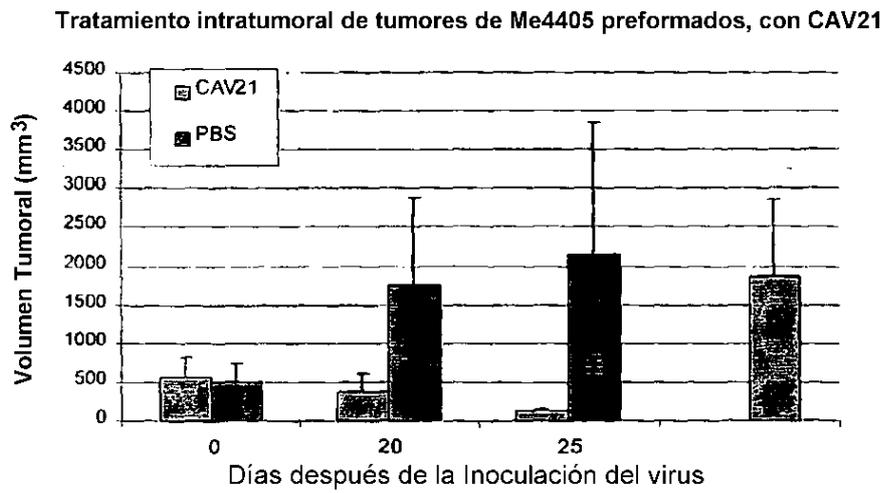


Figura 15