

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 704**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2001 E 10153374 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2189162**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de trastornos celulares proliferativos**

30 Prioridad:

09.11.2000 US 246728 P

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

04.03.2014

73 Titular/es:

**ONCOLYTICS BIOTECH INC. (100.0%)
SUITE 210 1167 KENSINGTON CRESCENT N. W.
CALGARY, AB T2N 1X7, CA**

72 Inventor/es:

COFFEY, MATTHEW, C.

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 445 704 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

Métodos para el tratamiento de trastornos celulares proliferativos

La presente invención se refiere a uno o más reovirus para uso en el tratamiento de trastornos celulares proliferativos, y particularmente trastornos celulares proliferativos en donde las células proliferativas presentan fosforilación constitutiva de MAPK, en mamíferos. En particular, el uso incluye el tratamiento con reovirus de mamíferos para tratar los trastornos proliferativos que incluyen tumores de mama, un subconjunto de tumores en los no se cree que la mutación del gen ras juegue un papel significativo.

Referencias

Las siguientes publicaciones, solicitudes de patente y patentes se citan en esta solicitud:

- 10 U.S. Patent No. 5,023,252.
WO 99/08692, published February 25, 1999.
Archer et al. (1995), Br. J. Cancer 72:1259-1266.
Armstrong, G.D. et al. (1984), Virology 138:37.
- 15 Barbacid, M., Annu. Rev. Biochem., 56:779-827 (1987).
Baselga et al. (1996), J. Clin. Onc. 14:737-744.
Bos, J. (1989) Cancer Res.49:4682.
Carter et al. (1992), PNAS 89:4285-4289.
- 20 Chandron and Nibert, "Protease cleavage of reovirus capsid protein μ 1 and μ 1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subviral particle", J. of Virology72(1):467-75 (1998).
- 25 Chaubert, P. et al. (1994), Am. J. Path. 144:767.
Clark et al. (1995), Science268:233-239.
Clark et al. (1996), Intl. J. Cancer 65:186-191.
Cuff et al., "Enteric reovirus infection as a probe to study immunotoxicity of the gastrointestinal tract" Toxicological Sciences 42(2):99-108 (1998)
- 30 DiDomenico et al. (1996), Cancer Res. 56: 4516-4521
Duncan et al., "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein" Virology 182(2):810-9 (1991).
- 35 Dvorak et al. (1988), Am J Path 133:95-109.
Fields, B.N. et al. (1996), Fundamental Virology, 3rd Edition, Lippincott-Raven.
Gentsch, J.R.K. and Pacitti, A.F. (1985), J. Virol. 56: 356.
- 40 E. Harlow and D. Lane, "Antibodies: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1988).
Harweth et al. (1992), J Biol Chem 267: 15160-15167.
- 45 Hudziak et al. (1989), Mol Cell Biol 9:1165-1172.
Hung et al. (1995), Gene 159:65-71.
Jacobs et al. (1983), Cancer Res 43:1696-1702.
Janes, P.W., et al. (1994) Oncogene 9:3601.
- 50 Jardines et al. (1993) Pathobiology 61:268-282.
Koenders et al. (1991), Cancer Res 51:4544-4548.
Lee. J.M. et al. (1993) PNAS 90:5742-5746.
Lee, P.W.K. et al. (1981) Virology, 108:134-146.
Levitzki, A. (1994) Eur. J. Biochem. 226:1.
- 55 Lowe. S.W. et al. (1994) Science, 266:807-810.
Mah et al., "The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virion-anchoring function" Virology 179(1):95-103 (1990).
- 60 Migliaccio et al. (1996), EMBO J 15:1292-1300.
Migliaccio et al. (1998), EMBO J 17:2008-2018.
Millis, NE et al. (1995) Cancer Res. 55:1444.
Nagy et al. (1989) Biochim Biophys Acta 948: 305-326.
- 65 Paul R.W. et al. (1989) Virology 172:382-385.
Pietras et al. (1994), Oncogene 9:1829-1838.
Raybaud-Diogene. H. et al. (1997) J. Clin. Oncology, 15(3):1030-1038.
Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia PA 17th ed. (1985).
- 70 Rosen, L. (1960) Am. J. Hyg. 71:242.
Sabin, A.B. (1959), Science 130:966.

- Shackney et al. (1998), Clin Cancer Res 4:913-928.
 Slamon et al. (1989), Science 244:707-712.
 Smith, R.E. et al., (1969) Virology, 39:791-800.
 Spandiodos (1987), Anticancer Res 7:991-996.
 5 Stanley, N.F. (1967) Br. Med. Bull. 23:150.
 Strong, J.E. et al., (1993) Virology, 197:405-411.
 Strong, J.E. and Lee, P.W.K., (1996) J. Virol., 70:
 612-616.
 Strong, J.E. et al., (1998) EMBO J, 17:3351-3362.
 10 Turner and Duncan, "Site directed mutagenesis of
 the C-terminal portion of reovirus protein sigma1: evidence
 for a conformation-dependent receptor binding
 domain" Virology 186(1):219-27 (1992).
 Verbeek et al. (1996) J Path 180:383-388.
 15 Wiessmuller, L. and Wittinghofer, F. (1994), Cellular
 Signaling 6(3):247-267.
 Zhou et al. (1989), Oncogene 4:105-108.

Estado de la Técnica

20 La proliferación celular normal está regulada por un equilibrio entre proto-oncogenes promotores del crecimiento y genes de supresión tumoral que inhiben el crecimiento. La tumorigénesis puede estar causada por alteraciones genéticas en el genoma que provocan la mutación de esos elementos celulares que gobiernan la interpretación de señales celulares, tales como la potenciación de la actividad de los proto-oncogenes o la inactivación de la supresión tumoral. Se cree que la interpretación de estas señales finalmente influye en el crecimiento y la diferenciación de una célula, y que la mala interpretación de estas señales puede provocar crecimiento neoplásico (neoplasia).

25 Se cree que la alteración genética del proto-oncogén Ras contribuye en aproximadamente el 30% de todos los tumores humanos (Wiessmuller, L. y Wittinghofer, F. (1994), Cellular Signaling 6(3):247-267; Barbacid, M. (1987) A Rev. Biochem. 56, 779-827). El papel que desempeña Ras en la patogénesis de tumores humanos es específico del tipo de tumor. Se hayan mutaciones activadoras en el propio Ras en la mayoría de los tipos de malignidades humanas, y están altamente representadas en el cáncer pancreático (80%), carcinomas colorrectales esporádicos (40-50%), adenocarcinomas pulmonares humanos (15-24%), tumores de la tiroides (50%) y leucemia mieloide (30%) (Millis, NE et al. (1995) Cancer Res. 55:1444; Chaubert, P. et al (1994), Am. J. Path. 144:767; Bos, J. (1989) Cancer Res. 49:4682). La activación de Ras también está demostrada por elementos de señalización mitogénica cadena arriba, notablemente por receptores de tirosina quinasa (RTK). Estos elementos cadena arriba, si se amplifican o sobre-expresan, finalmente provocan una elevada actividad Ras por la actividad de transducción de señales de Ras. Ejemplos de esto incluyen la sobre-expresión de PDGFR en ciertas formas de glioblastomas, así como en c-erbB-2/neu en cáncer de mama (Levitzki, A. (1994) Eur. J. Biochem. 226:1; Janes, P.W., et al. (1994) Oncogene 9:3601; Bos, J. (1989) Cancer Res. 49:4682).

40 Los métodos actuales de tratamiento de la neoplasia incluyen cirugía, quimioterapia y radiación. La cirugía se usa típicamente como tratamiento principal para fases tempranas del cáncer; sin embargo, muchos tumores no pueden eliminarse completamente por medios quirúrgicos. Además, el crecimiento metastásico de neoplasmas puede evitar la cura completa del cáncer por cirugía. La quimioterapia implica la administración de compuestos que tienen actividad antitumoral, tales como agentes alquilantes, antimetabolitos, y antibióticos antitumorales. La eficacia de la quimioterapia a menudo está limitada por graves efectos secundarios, incluyendo náuseas y vómitos, depresión de la médula ósea, daño renal, y depresión del sistema nervioso central. La radioterapia depende de la mayor capacidad de las células normales, en contraste con las células neoplásicas, de repararse a sí mismas después del tratamiento con radiación. La radioterapia no puede usarse para tratar muchos neoplasmas, sin embargo, a causa de la sensibilidad del tejido que rodea el tumor. Además, ciertos tumores han mostrado resistencia a la radioterapia y ésta puede depender del estado oncogén o anti-oncogén de la célula (Lee, J.M. et al. (1993) PNAS 90:5742-5746; Lowe, S.W. et al. (1994) Science, 266:807-810; Raybaud-Diogene, H. et al. (1997) J. Clin. Oncology, 15(3): 1030-1038).

55 El cáncer de mama es el cáncer casi más común y temido en las mujeres con una estimación de que una de cada ocho mujeres americanas lo van a desarrollar a lo largo de su vida (NCI-SEER, 1998). Aunque ha habido tremendos logros en el tratamiento de cáncer de mama que han permitido un índice de mortalidad estable de cara al índice crecimiento de incidencia, la mayoría de estos avances pueden atribuirse a métodos de detección temprana mejorada y no a nuevas estrategias de tratamiento. El hecho de que haya pocos avances en el tratamiento real de esta afección demanda que se explore el desarrollo de estrategias de tratamiento no convencionales.

60 Nunca en la historia de la biología del cáncer ha habido un periodo más prometedor en el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer de mama. Muchos de estos agentes terapéuticos están dirigidos a receptores específicos que se sobre-expresan en subconjuntos de este cáncer, y ahora están encontrado algo de uso clínico. Quizá una de estas nuevas terapias más prometedoras es el uso de anticuerpos dirigidos al receptor HER2 que frecuentemente se sobre-expresa en cáncer de mama. Los resultados del uso de estos anticuerpos monoclonales dirigidos a los restos extracelulares de este receptor de factor de crecimiento son prometedores, y de hecho han contado con algo de éxito clínico (Baselga, 1996; para revisiones véase Nass, 1998; Hung, 1995). Hay, sin embargo, varios obstáculos técnicos que deben abordarse. En primer lugar, estos anticuerpos monoclonales dirigidos contra HER2 no son en sí mismos citocidas, pero son bastante citostáticos (Pietras, 1994; Harwerth, 1992; Hudziak, 1989; Carter, 1992). De forma importante, en un modelo de ratón SCID o desnudo, los anticuerpos anti-HER2 son eficaces solamente para reprimir el crecimiento tumoral y no realmente causando regresión del tumor. Además, esta represión del crecimiento tumoral se alivia rápidamente una vez que la administración del anticuerpo cesa. En una nota más positiva, hay evidencias de que el tratamiento de tumores con anticuerpos anti-HER2 en un animal inmuno-competente puede realmente provocar un efecto citocida mediado por citotoxicidad celular

dependiente de anticuerpo (ADCC) (Carter, 1992). En segundo lugar, marcar como diana el receptor de factor de crecimiento (EGFR) puede ser de valor limitado, ya que no todos los cánceres de mama expresan estos receptores a niveles elevados. Además, esta estrategia está dirigida solamente a receptores de tirosina quinasa y tendría poco beneficio terapéutico para aquellos cánceres de mama que sobre-expresan tirosina quinasa no receptoras tales como Src, que ya se han implicado en el crecimiento de algunos cánceres de mama (Clark, 1996). Finalmente, la biología de los vasos sanguíneos tumorales debe tener también en cuenta en la medida de lo posible las capacidades de suministrar estas grandes moléculas a sus células diana. Se ha demostrado que la vasculatura de un tumor es heterogénea y la capacidad de un vaso de filtrar grandes macromoléculas, tales como anticuerpos, es una función de su orientación espacial a la masa tumoral (Dvorak, 1988; Nagy y Dvorak, 1989). Se ha mostrado que los vasos con la mayor permeabilidad a estas moléculas residen principalmente en la superficie de contacto tumor-hospedador, y los vasos menos permeables son aquellos que realmente penetran en la masa tumoral (Dvorak, 1988). El resultado de esta permeabilidad diferencial es que estos anticuerpos específicos de tumor, y sus células efectoras citocidas, no lograrían penetrar en la masa tumoral y serían eficaces solamente en la periferia de la masa.

A pesar del hecho de que las mutaciones activadoras en ras son infrecuentes en cáncer de mama, existe un creciente cuerpo de evidencia de que la activación de la vía Ras/MAPK es importante en el inicio y progreso de esta enfermedad. Elementos cadena arriba de la vía Ras, notablemente receptores de tirosina quinasa (RTK) se sobre-expresan frecuentemente en cánceres de mama. HER-2/neu (erbB-2) se sobre-expresa en aproximadamente el 30% de todos los cánceres de mama (Spandidos 1987; Zhou, 1989; Archer, 1995) y está asociado con un mal pronóstico del paciente (Slamon, 1989). Cuando se sobre-expresa en células en NIH-3T3, HER-2 media la transformación; sin embargo, no parece haber un nivel umbral de sobre-expresión que sea necesario para que suceda esta transformación (Jardines, 1993; Clark 1995). Parece que esta capacidad de transformación de HER-2 depende de la actividad Ras ya que las líneas celulares que sobre-expresan HER-2 muestran un aumento drástico en la actividad MAP quinasa, reflejando ésta última la actividad Ras (Janes, 1994). Se ha observado también que el receptor de factor de crecimiento EGFR que está muy relacionado con, pero es distinto de HER-2, se sobre-expresa en tumores de mama y también se ha correlacionado en gran medida con un mal pronóstico del paciente (Shackney, 1998; Koenders, 1991).

También se han implicado elementos adicionales cadena arriba de Ras en la etiología de cáncer de mama. La tirosina quinasa no receptora c-Src se ha implicado como un importante candidato para promover el progreso de cáncer de mama. Varios estudios indican un aumento de ~4 a ~30 veces de la actividad c-Src en tumores de cáncer de mama primarios en comparación con el tejido mamario normal (Verbeeks, 1996; Jacobs y Rubsamen, 1983). Se ha sugerido que c-Src también desempeña un papel importante en la transmisión de señales desde los receptores tanto de estrógeno como progestina mediante la vía Ras/MAPK. Varios grupos han observado que el tratamiento de células MCF-7 derivadas de tumor de mama con estradiol provoca la activación de la actividad quinasa de c-Src con activación resultante de MAPK (Di Domenico, 1996; Migliaccio, 1996). Más recientemente, Migliaccio (1998), ha demostrado en células T47D de cáncer de mama que la proliferación celular estimulada por progestina depende de la señalización Src/Ras/MAPK. El hecho de que estos receptores de esteroides puedan utilizar Ras para su señalización sugiere que Ras puede desempeñar un papel más central en la promoción del crecimiento en tumores de mama ER y PR positivos.

El propio Ras también puede desempeñar un papel más central en el desarrollo de cáncer de mama que el que inicialmente se pensaba. Aunque las mutaciones de activación de Ras son raras en el desarrollo de cáncer de mama, se ha observado sobre-expresión de H-Ras normal en tumores de mama (Shackney, 1998; Spandidos, 1987). Esta sobre-expresión de Ras puede proporcionar un mecanismo adicional para desacoplar la transducción normal de señales y promover un estado tumorigénico. Tomadas juntas estas observaciones sugieren la viabilidad de marcar como diana una vía de Ras activada en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer de mama.

Previamente se ha demostrado que los reovirus son competentes en la replicación solamente en aquellas células que contenían una vía de señalización de Ras activada, a través de mutación directa del propio Ras o mediante elementos cadena arriba que provocan su activación (Strong, 1993; Strong, 1998). Además, se ha podido demostrar que los reovirus pueden actuar contra tumores que contienen una activación de Ras in vivo (Coffey, 1998). Usando la línea celular de glioblastoma humano U87, se estableció un modelo de ratón SCID para xenoinjerto de tumor. Se seleccionaron células U87 como modelo apropiado ya que sobre-expresan el RTK PDGF que provoca la activación de Ras y muestra susceptibilidad aguda a la infección por reovirus in vitro. A los ratones SCID se les implantó un xenoinjerto de tumor U87 y después de que se establecieron tumores palpables, los tumores se trataron con una única inyección intratumoral de reovirus. El tratamiento único provocó una regresión drástica del tumor.

En vista de los inconvenientes asociados con los actuales medios para tratar el crecimiento neoplásico, aún existe la necesidad de métodos mejorados para el tratamiento de la mayoría de los tipos de cáncer y, particularmente, el cáncer de mama. Sería útil tener un medio disponible para determinar la susceptibilidad a reovirus para predecir la eficacia del tratamiento con reovirus.

La presente invención se refiere a uno o más reovirus para uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo en un mamífero, trastorno que se caracteriza por células proliferantes que presentan fosforilación MAPK constitutiva, en donde los reovirus se han de administrar a las células proliferantes en dicho mamífero en condiciones que dan como resultado la lisis sustancial de las células proliferantes.

Los reovirus pueden ser un reovirus de mamífero o un reovirus aviar. El reovirus puede modificarse de tal modo que se elimine la cápside externa, el virión se empaquete en un liposoma o micela o las proteínas de la cápside externa se hayan mutado. El agente reoviral puede administrarse en una única dosis o en múltiples dosis. El trastorno proliferativo puede ser un neoplasma. Pueden marcarse como diana neoplasmas tanto sólidos como hematopoyéticos. El uso de inmunosupresión precedente, concurrente o posterior puede provocar un tratamiento con reovirus más eficaz.

Se describe un método para determinar la susceptibilidad celular a infección con reovirus midiendo la señalización constitutiva de ras-MAP, donde la presencia de dicha señalización indica susceptibilidad a infección por reovirus. La señalización constitutiva de ras-MAP provoca la activación de la MAP quinasa haya un mitógeno o no, y la activación de la MAP quinasa conduce al fosforilación de la MAP quinasa. Por lo tanto, el estado de fosforilación de la MAP quinasa puede determinarse como una medición de la señalización constitutiva de ras-MAP. El estado de fosforilación de la MAP quinasa puede determinarse por cualquier método establecido en la técnica, y en particular usando un anticuerpo específico para MAP quinasa fosforilada.

El método descrito puede usarse para diagnosticar trastornos proliferativos que pueden tratarse con reovirus. Por tanto, puede recogerse una muestra biológica de un mamífero que se sospecha que tiene un trastorno proliferativo y se ensayan las células de la muestra para la señalización constitutiva de ras-MAP de acuerdo con la presente invención. El trastorno proliferativo puede ser cualquier afección asociada con un crecimiento celular anormalmente activo, tal como neurofibromatosis. Más preferiblemente, el trastorno proliferativo se selecciona entre el grupo compuesto por cáncer pulmonar, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer suprarrenal, cáncer hepático, cáncer pancreático, cáncer de mama y cáncer del sistema nervioso central y periférico. Un trastorno proliferativo particularmente preferido es el cáncer de mama.

La presente invención es aplicable a cualquier animal con un trastorno proliferativo. Preferiblemente, el animal es un mamífero. Más preferiblemente, el animal se selecciona entre el grupo compuesto por perros, gatos, ovejas, cabras, ganado vacuno, caballos, cerdos, ratones, primates no humanos, y seres humanos. Más preferiblemente, el animal es un ser humano.

La invención proporciona uno o más reovirus para uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo en un mamífero, trastorno que se caracteriza por células proliferantes que presentan fosforilación MAPK constitutiva, en donde los reovirus se han de administrar a las células proliferantes en dicho mamífero en condiciones que dan como resultado la lisis sustancial de las células proliferantes. El uso puede incluir: administrar a las células proliferantes en dicho mamífero una cantidad eficaz de un agente inmunosupresor; eliminar las células B o células T de dicho mamífero; eliminar los anticuerpos anti-reovirales de dicho mamífero; eliminar anticuerpos de dicho mamífero; administrar anticuerpos anti-antireovirales a dicho mamífero; y suprimir el sistema inmune del mamífero, así como métodos que comprenden adicionalmente la administración de un agente quimioterapéutico.

El uso puede también incluir: tratar un neoplasma en un ser humano, en el que el neoplasma que se caracteriza por células proliferativas que presentan fosforilación MAPK constitutiva, que comprende administrar al neoplasma un reovirus en una cantidad suficiente para dar como resultado una oncolisis sustancial de las células neoplásicas. Preferiblemente el reovirus se administra por vía sistémica o por inyección en o cerca de un neoplasma sólido. También se incluyen métodos que comprenden adicionalmente la etapa de suprimir o comprometer de otro modo previa, concurrente o posteriormente el sistema inmune del mamífero.

El uso puede también incluir: inhibir la metástasis de un neoplasma en un mamífero, en el que el neoplasma se caracteriza por células proliferativas que presentan fosforilación MAPK constitutiva, que comprende administrar al mamífero un reovirus en una cantidad suficiente para dar como resultado la lisis sustancial de las células neoplásicas. También están incluidos otros usos comprenden la etapa de suprimir o comprometer de otro modo previa, concurrente o posteriormente el sistema inmune del mamífero.

El uso puede también incluir: tratar un neoplasma sospechado en un mamífero, estando caracterizado dicho neoplasma por células proliferantes que muestran fosforilación constitutiva de MAPK, que comprende la eliminación quirúrgica de sustancialmente todo el neoplasma y la administración de una cantidad eficaz de reovirus en o cerca del sitio quirúrgico provocando la oncolisis de cualquier célula neoplásica restante. El reovirus también puede administrarse por vía sistémica. También se incluyen usos adicionales que comprenden la etapa de suprimir o comprometer de otro modo previa, concurrente o posteriormente el sistema inmune del mamífero.

También se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un reovirus y un excipiente farmacéuticamente aceptable. También se describe una composición farmacéutica que comprende un agente inmunosupresor o inmunoinhibidor, un reovirus y un excipiente farmacéuticamente aceptable. También se proporcionan kits que comprenden un reovirus y, opcionalmente, un agente inmunosupresor o inmunoinhibidor.

Los métodos y composiciones farmacéuticas descritos proporcionan un medio eficaz para tratar la neoplasia, sin los efectos secundarios asociados con otras formas de terapia contra el cáncer. Cuando se usa, la inhibición o supresión del sistema inmune aumenta la disponibilidad de reovirus para infectar y lisar células proliferantes que muestran fosforilación constitutiva de MAPK porque no se forman anticuerpos anti-reovirales. Como no se sabe si los reovirus están asociados con enfermedad, se minimiza cualquier preocupación de seguridad asociada con la administración deliberada de un virus.

Los objetos anteriores y otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción más particular de las realizaciones preferidas de la invención, que se ilustran en los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el efecto de la transformación de v-src sobre la susceptibilidad de la célula hospedadora a infección por reovirus. Se cultivaron células parentales NIH-3T3 no infectables y células NIH-3T3 transformadas con hasta el 80% de confluencia en una placa de 24 pocillos y después se expusieron a reovirus a una MOI estimada de 80 PFU por célula. Las células y los medios se recogieron en los tiempos indicados después de la infección y el lisado resultante se usó para el ensayo de titulación de placas. Células NIH-3T3 transformadas con v-src (círculos rellenos), células NIH-3T3 parentales (círculos sin rellenar). (Media \pm desviación típica).

Las Figuras 2A a 2C ilustran la replicación in vitro de reovirus en líneas celulares de tumor de mama humano. (A)

Síntesis de proteínas de reovirus en líneas celulares de cáncer de mama con infección simulada e infectadas con reovirus. Las células se marcaron con [³⁵S]-metionina de 46 a 48 horas después de la infección. Se prepararon los lisados y posteriormente se inmunoprecipitaron con un suero policlonal anti-reovirus tipo 3 y después se analizaron por SDS-PAGE. Las proteínas de reovirus se indican a la derecha. (B) La infectividad de reovirus se correlaciona con la fosforilación constitutiva de MAPK. La línea celular de tejido de mama HBL-100 y las líneas celulares de tumor de mama MDA-MB-468, MCF7, MDA-MB-435, T47D y SK-BR-3 se sembraron en una placa de seis pocillos. Las células se cultivaron en presencia de FCS al 10% o se privaron de suero (FCS al 0,5%) durante un periodo de 48 horas. Las monocapas se lavaron en PBS y se prepararon lisados celulares y se sometieron a SDS-PAGE. Después de la transferencia sobre papel de nitrocelulosa, las muestras se sondearon con anticuerpos dirigidos contra fosfo-MAPK. Los niveles de fosfo-MAPK se normalizaron todos por los niveles de MAPK total. (C) Los niveles de MAPK total en el tejido de mama humano y las líneas celulares de cáncer de mama.

La Figura 3 ilustra una oncolisis in vivo mediada por reovirus contra xenoinjerto de tumor de mama humano. Se implantó a ratones SCID por vía subcutánea y de forma unilateral xenoinjertos de tumor de mama humano MDA-MB-468. Después de que se estableciera una masa tumoral palpable tumor, se administró una única inyección intratumoral de reovirus vivo (círculos sin rellenar) o virus inactivado por UV (círculos rellenos) y se siguió el crecimiento tumoral durante un periodo de cuatro semanas. (Media ± SEM).

Previamente se ha demostrado que podría usarse el reovirus humano como agente oncolítico eficaz contra xenoinjertos de glioblastoma humano en un modelo de ratón SCID (documento WO 99/08692). Ahora se ha descubierto que la susceptibilidad celular a infección por reovirus puede determinarse midiendo la señalización constitutiva de ras-MAP de la célula, ya que la presencia de dicha señalización indica susceptibilidad a infección por reovirus. También se presentan evidencias de que el reovirus es útil como agente oncolítico contra tumores de mama. Aunque las mutaciones de ras son infrecuentes en la etiología del cáncer de mama, es común una señalización aberrante de Ras/MAPK mediante elementos de señalización cadena arriba, tales como receptores de tirosina quinasa y de tirosina quinasas no receptoras (tal como c-Src).

Por las mismas razones por que la el tratamiento de cánceres de mama con anticuerpos monoclonales puede alterarse (véase el análisis anterior), el reovirus puede ser una terapia atractiva contra el cáncer. En primer lugar, el propio reovirus es un agente citocida y no depende de las células inmunes efectoras para causar regresión tumoral. De hecho, el mecanismo natural de eliminación de células infectadas es mediante lisis directa debido a la replicación viral (Tyler y Fields, 1996). En segundo lugar, se dirige a esos cánceres de mama en los que hay activación de Ras. Esta activación no está restringida a mutaciones activadoras de Ras (aceptadamente un raro subconjunto de tumores de mama) pero también incluye la activación de Ras causada por elementos cadena arriba del propio Ras. Estos elementos incluyen no solamente receptores de tirosina quinasa tales como EGFR y HER2, sino también incluyen tirosina quinasas no receptoras tales como los miembros de la familia Src. Tomado en conjunto, este tipo de terapia podría usarse con gran eficacia contra un tipo de tumor tan heterogéneos como el cáncer de mama y no sería una estrategia tan restringida como una que se dirija solamente al receptor. Finalmente, la incapacidad de los anticuerpos de penetrar en masas tumorales sólidas sugiere que el reovirus, si se suministra por vía intratumoral, debe replicarse de forma desatendida. Por tanto, es útil conocer si las células de un trastorno proliferativo son susceptibles a la infección por reovirus para predecir la eficacia de dicho tratamiento.

Para evaluar si las quinasas de la familia Src podrían mediar la infección por reovirus, se transformaron células NIH-3T3 no infectables con v-src y después se expusieron a reovirus. Se determinó que la señalización de v-src confiere infectabilidad a infección por reovirus.

Después se examinaron cinco líneas celulares de cáncer de mama; MDA-MB-468, MCF7, MDA-MB-435, T47D, y SK-BR-3 así como una línea celular derivada de tejido mamario normal, HBL-100 para la replicación in vitro de reovirus. Las cinco líneas celulares derivadas de tumor eran infectables por reovirus mientras que la HBL-100 era incapaz de replicar de forma eficaz el virus.

Para determinar si la vía de Ras se activaba de hecho en estas líneas celulares, se evaluó el nivel de fosforilación de MAPK en presencia y ausencia de suero. Aquellas líneas celulares que eran infectables mostraban fosforilación constitutiva de MAPK incluso en ausencia de mitógeno, mientras que la línea celular que no era susceptible a infección por reovirus presentaba fosforilación de MAPK solamente en presencia de suero. Por lo tanto, la fosforilación constitutiva de MAPK es un indicio de la susceptibilidad a infección por reovirus.

Para determinar si el reovirus podría usarse como agente oncolítico in vivo contra tumores de mama, se implantó en ratones SCID xenoinjertos de tumor humano MDA-MB-468. Después de establecerse tumores palpables, los ratones se trataron con una única inyección de reovirus y se controló el tamaño del tumor durante un periodo de cuatro semanas. La única inyección provocó una regresión drástica del tamaño del tumor. Finalmente, se determinó la capacidad del reovirus de actuar contra tumores de cáncer de mama primarios, y los resultados indican que el reovirus era capaz de replicarse en muestra de biopsia recogidas de diversos pacientes. Por lo tanto, muchos tumores de mama son susceptibles a infección con reovirus.

El nombre reovirus (Respiratory and enteric orphan virus (virus respiratorio, entérico y huérfano)) es un acrónimo descriptivo que sugiere que estos virus, aunque no están asociados con ninguna patología conocida en seres humanos, puede aislarse de los tractos tanto respiratorio como entérico (Sabin, A.B. (1959), Science 130:966). El término "reovirus" se refiere a todos los virus clasificados en el género reovirus.

Los reovirus son virus con un genoma de ARN segmentado, bicatenario. Los viriones miden 60-80 nm de diámetro y tienen dos cápsides de armazón concéntricas, cada una de las cuales es icosaédrica. El genoma consta de ARN bicatenario en 10-12 segmentos diferentes con un tamaño de genoma total de 16-27 kpb. Los segmentos de ARN individuales varían de tamaño. Se ha recuperado tres tipos distintos pero relacionados de reovirus de muchas especies. Los tres tipos comparten un antígeno de fijación al complemento común.

El reovirus humano consta de tres serotipos: tipo 1 (cepa Lang o T1L), tipo 2 (cepa Jones, T2J) y tipo 3 (cepa Dearing o cepa Abney, T3D). Los tres serotipos son fácilmente identificables en base a ensayos de neutralización e inhibición de hemaglutinina (Sabin, A.B. (1959), *Science* 130:966; Fields, B.N. et al. (1996), *Fundamental Virology*. 3ª Edición. Lippincott-Raven; Rosen, L. (1960) *Am. J. Hyg.* 71:242; Stanley, N.F. (1967) *Br. Med. Bull.* 23:150).

5 Aunque no se sabe que el reovirus esté asociado a ninguna enfermedad particular, mucha gente ha estado expuesta a reovirus durante el tiempo que alcanzan la adultez (es decir, menos del 25% en niños con < 5 años de edad, hasta más del 50% en aquellos con 20-30 años de edad (Jackson G.G. y Muldoon R.L. (1973) *J. Infect. Dis.* 128:811; Stanley N.F. (1974) En: *Comparative Diagnosis of Viral Diseases*, editado por E. Kurstak y K. Kurstak, 385-421, Academic Press, Nueva York)).

10 Para reovirus de mamíferos, la señal de reconocimiento de superficie celular es el ácido siálico (Armstrong, G.D. et al. (1984), *Virology* 138:37; Gentsch, J.R.K. y Pacitti, A.F. (1985), *J. Virol.* 56:356; Paul R.W. et al. (1989) *Virology* 172:382-385). Debido a la naturaleza ubicua del ácido siálico, el reovirus se une de forma eficaz a una multitud de líneas celulares y por tanto pueden dirigirse potencialmente a muchos tejidos diferentes; sin embargo, hay diferencias significativas en la susceptibilidad a la infección por reovirus entre líneas celulares.

15 Como se describe en este documento, el solicitante ha descubierto que células que muestran fosforilación constitutiva de MAPK son susceptibles a infección con reovirus. La "resistencia" de las células a infección con reovirus indica que la infección de las células con el virus no provocaría producción o rendimiento viral significativo. Las células que son "susceptibles" son aquellas que muestran inducción de efectos citopáticos, síntesis de proteínas virales, y/o producción de virus. Se descubrió que la resistencia a infección por reovirus era a nivel de traducción
20 génica, en lugar de en la transcripción temprana: aunque se producían transcritos virales, no se expresan proteínas virales.

El implante de células tumorales humanas en ratones SCID está reconocido como un sistema de modelo bien conocido para ensayar la eficacia de diversos agentes anti-tumores en seres humanos. Se ha demostrado previamente que los agentes farmacéuticos eficaces contra tumores humanos implantados en ratones SCID son
25 predictivos de su eficacia contra los mismos tumores en seres humanos.

En base a estos descubrimientos, el solicitante ha desarrollado métodos para determinar la susceptibilidad a infección por reovirus midiendo la señalización constitutiva de ras-MAP y métodos para tratar trastornos proliferativos en mamíferos donde las células proliferantes muestran fosforilación constitutiva de MAPK. Los mamíferos representativos incluyen perros, gatos, ovejas, cabras, ganado vacuno, caballos, cerdos, ratones, primates no
30 humanos, y seres humanos. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano.

En métodos de diagnóstico, puede determinarse el nivel de fosforilación de MAPK de células proliferantes en presencia o ausencia de mitógenos. La presencia de dicha señalización constitutiva de ras-MAP en las células es indicativa de susceptibilidad a infección por reovirus.

35 En los usos de la invención, puede administrarse reovirus a células proliferantes en el mamífero individual que muestra fosforilación constitutiva de MAPK. En una realización de esta invención, se administra un tratamiento de terapia con reovirus una o más veces.

En los usos de la invención, se administra reovirus a células proliferantes en el mamífero individual que muestra fosforilación constitutiva de MAPK. Los tipos representativos de reovirus humanos que pueden usarse incluyen el tipo 1 (por ejemplo, cepa Lang o T1L); el tipo 2 (por ejemplo, cepa Jones o T2J); y el tipo 3 (por ejemplo, cepa Dearing o cepa Abney, T3D o T3A); también pueden usarse otras cepas de reovirus. En una realización preferida, el reovirus es el reovirus humano serotipo 3, más preferiblemente el reovirus es reovirus humano serotipo 3, cepa Dearing. Como alternativa, el reovirus puede ser un reovirus de mamífero no humano (por ejemplo, reovirus de primate no humano, tal como reovirus de babuino; reovirus equino; o canino), o un reovirus no de mamíferos (por ejemplo, reovirus aviar). Puede usarse una combinación de diferentes serotipos y/o diferentes cepas de reovirus,
40 tales como reovirus de diferentes especies de animales.

El reovirus puede ser de origen natural o puede estar modificado. El reovirus es "de origen natural": cuando puede aislarse de una fuente de la naturaleza y no se ha modificado intencionadamente por los seres humanos en el laboratorio. Por ejemplo, el reovirus puede ser de una "fuente de campo": por ejemplo, de un paciente.

El reovirus puede modificarse pero aún ser capaz de infectar de forma lítica una célula de mamífero que muestre fosforilación constitutiva de MAPK. Los reovirus puede pretratarse química o bioquímicamente (por ejemplo, por tratamiento con una proteasa, tal como quimiotripsina o tripsina) antes de la administración a las células proliferantes. El pretratamiento con una proteasa elimina la envuelta externa o cápside del virus y puede aumentar la infectividad del virus. El reovirus puede recubrirse en un liposoma o micela (Chandron y Nibert, "Protease cleavage of reovirus capsid protein mu1 and mu1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subviral particle", *J. of Virology* 72(1):467-75 (1998)) para reducir o evitar una respuesta inmune por parte del mamífero que ha desarrollado inmunidad contra el reovirus. Por ejemplo, el virión puede tratarse con quimiotripsina en presencia de concentraciones formadoras de micelas de detergentes de sulfato de alquilo para generar una nueva partícula subviral infecciosa (ISVP del inglés infectious subviral particle). Puede usarse una ISVP sola o en combinación con virus completos para proporcionar un agente que el sistema inmune del paciente reconozca mal o no esté prevenido contra el mismo.
50
55
60

El reovirus puede ser un reovirus recombinante de dos o más tipos de reovirus con fenotipos patogénicos diferentes de modo que contenga diferentes determinantes antigénicos reduciendo o evitando de este modo una respuesta inmune por un mamífero previamente expuesto a un subtipo de reovirus. Dichos viriones recombinantes, también conocidos como reordenantes, puede generarse por co-infección de células de mamífero con diferentes subtipos de reovirus con el reordenamiento e incorporación resultantes de las proteínas de envuelta de subtipo
65

diferentes en las cápsides resultantes del virión.

Los reovirus pueden modificarse por incorporación de proteínas de envuelta mutadas, tales como por ejemplo σ_1 , en la cápside externa del virión. Las proteínas pueden mutarse por reemplazo, inserción o delección. El reemplazo incluye la inserción de diferentes aminoácidos en lugar de los aminoácidos nativos. Las inserciones incluyen la inserción de restos aminoacídicos adicionales en la proteína en una o más ubicaciones. Las delecciones incluyen delecciones de uno o más restos aminoacídicos en la proteína. Dichas mutaciones pueden generarse por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida a un sitio oligonucleotídico del gen que codifica una de las proteínas de envuelta podría provocar la generación de la proteína de envuelta mutante deseada. La expresión de la proteína mutada en células de mamífero infectadas con reovirus in vitro tal como células COS1 provocará la incorporación de la proteína mutada en la partícula viriónica de reovirus (Turner y Duncan, "Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma1: evidence for a conformation-dependent receptor binding domain" *Virology* 186(1):219-27 (1992); Duncan et al., "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein" *Virology* 182(2):810-9 (1991); Mah et al., "The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virion-anchoring function" *Virology* 179(1):95-103 (1990)).

El reovirus es preferiblemente un reovirus modificado para reducir o eliminar una reacción inmune contra el reovirus. Dichos reovirus modificados se llaman "reovirus inmunoprottegidos". Dichas modificaciones podrían incluir el empaquetamiento del reovirus en un liposoma, una micela u otro vehículo para ocultar el reovirus del sistema inmune del mamífero. Como alternativa, la cápside externa de la partícula viriónica de reovirus puede eliminarse ya que las proteínas presentes en la cápside externa son el determinante principal de las respuestas humoral y celular del hospedador.

Un "trastorno proliferativo" es cualquier trastorno celular en el que las células proliferan más rápidamente que el crecimiento de tejido normal. Por tanto una "célula proliferante" es una célula que está proliferando de forma más rápida que las células normales. El trastorno proliferativo, incluye, aunque sin limitación, neoplasmas. Un neoplasma es un crecimiento tisular anormal, que generalmente forma una masa distinta, que crece por proliferación celular de forma más rápida que el crecimiento de tejido normal. Los neoplasmas muestran ausencia parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. Estos pueden clasificarse ampliamente en tres tipos principales. Los neoplasmas malignos que surgen de estructuras epiteliales se llaman carcinomas, los neoplasmas malignos que se originan a partir de tejidos conectivos tales como músculo, cartílago, grasa o hueso se llaman sarcomas y los tumores malignos que afectan a estructuras hematopoyéticas (estructuras que pertenecen a la formación de células sanguíneas) incluyendo componentes del sistema inmune, se llaman leucemias y linfomas. Un tumor es el crecimiento neoplásico de la enfermedad del cáncer. Como se usa en este documento, se entiende que un "neoplasma", también mencionado como "tumor", abarca neoplasmas hematopoyéticos así como neoplasmas sólidos. Otros trastornos proliferativos incluyen, aunque sin limitación, neurofibromatosis.

Al menos algunas de las células del trastorno proliferativo que se tratan usando los métodos de la presente invención muestran fosforilación constitutiva de MAPK. Asimismo, al menos algunas de las células que se determina que son susceptibles a infección con reovirus usando los métodos de la presente invención muestran fosforilación constitutiva de MAPK.

"Células B" se refiere a linfocitos B. Hay dos subpoblaciones principales de linfocitos B, células B-1 y B-2. Las células B-1 son auto-renovables y frecuentemente secretan elevados niveles de anticuerpos que se unen a un intervalo de antígenos (polic especificidad) con una afinidad relativamente baja. La mayoría de las células B, las células B-2, se generan directamente a partir de precursores en la médula ósea y secretan anticuerpos muy específicos.

"Células T" se refiere a linfocitos T. Las células T se diferencian en la glándula del timo y se especializan para funcionar contra células que albergan organismos intracelulares. Las células T solamente reconocen el antígeno cuando está sobre la superficie de una célula corporal.

"Anticuerpo anti-reoviral" se refiere a un anticuerpo que se une al reovirus. "Anticuerpos IgG" se refiere a anticuerpos de inmunoglobulina G. IgG, el tipo más abundante de anticuerpo, lleva la carga principal de neutralizar toxinas bacterianas y de unirse a microorganismos para potenciar su fagocitosis. "Anticuerpos humanizados" se refiere a moléculas de anticuerpo en las que la secuencia de aminoácidos en las regiones no de unión al antígeno se ha alterado de modo que el anticuerpo se parezca más a un anticuerpo humano, y aún retenga su capacidad de unión original.

"Administración a una célula proliferante o neoplasma" indica que el reovirus se administra de un modo tal que contacta con las células proliferantes o células del neoplasma (también mencionadas en este documento como "células neoplásicas"). La vía por la que se administra el reovirus, así como la formulación, medio o vehículo, dependerán de la localización así como el tipo de neoplasma. Puede emplearse una amplia diversidad de vías de administración. Por ejemplo, para un neoplasma sólido que es accesible, el reovirus puede administrarse por inyección directamente al neoplasma. Para un neoplasma hematopoyético, por ejemplo, el reovirus puede administrarse por vía intravenosa o intravascular. Para neoplasmas que son fácilmente accesibles dentro del cuerpo, tal como metástasis o tumores cerebrales, el reovirus se administra de un modo tal que pueda transportarse de forma sistémica a través del cuerpo del mamífero y que de este modo alcance el neoplasma (por ejemplo, por vía intratecal, intravenosa o intramuscular). Como alternativa, el reovirus puede administrarse directamente a un único neoplasma sólido, donde después se transporta de forma sistémica a través del cuerpo hasta la metástasis. El reovirus también puede administrarse por vía subcutánea, intraperitoneal, tópica (por ejemplo, para melanoma), oral (por ejemplo, para neoplasma oral o esofágico), rectal (por ejemplo, para neoplasma colorrectal), vaginal (por ejemplo, para neoplasma cervical o vaginal), nasal o por pulverización de inhalación (por ejemplo, para neoplasma pulmonar).

El reovirus puede administrarse de forma sistémica a mamíferos que están inmunocomprometidos o que no han desarrollado inmunidad a los epítomos del reovirus. En dichos casos, el reovirus administrado de forma sistémica, es decir, por inyección intravenosa, contactará con las células proliferantes provocando la lisis de las células. Cuando los animales a tratar tienen títulos mayores de anticuerpos anti-reovirales, deben administrarse más reovirus para que sean eficaces.

Mamíferos inmunocompetentes previamente expuestos a un subtipo de reovirus pueden haber desarrollado inmunidad humoral y/o celular contra ese subtipo de reovirus. No obstante, se ha descubierto que la inyección directa del reovirus en un tumor sólido en mamíferos inmunocompetentes provocará la lisis de las células neoplásicas. Por otro lado, cuando el reovirus se administra de forma sistémica a mamíferos inmunocompetentes, los mamíferos pueden producir una respuesta inmune contra el reovirus. Dicha respuesta inmune puede evitarse si el reovirus es de un subtipo contra el que el mamífero no ha desarrollado inmunidad, o el reovirus se ha modificado como se ha descrito previamente en este documento de modo que esté inmunoprotectado, por ejemplo, por digestión con proteasa de la cápsida externa o empaquetado en una micela.

Como alternativa, se contempla que la inmunocompetencia del mamífero contra el reovirus puede suprimirse por la administración previa o co-administración de agentes farmacéuticos conocidos en la técnica que suprimen el sistema inmune en general (Cuff et al., "Enteric reovirus infection as a probe to study immunotoxicity of the gastrointestinal tract" *Toxicological Sciences* 42(2):99-108 (1998)) o como alternativa por la administración de dichos inmunoinhibidores como anticuerpos anti-antireovirales. La inmunidad humoral del mamífero contra reovirus también puede reducirse o suprimirse temporalmente por plasmaféresis de la sangre del mamífero para eliminar los anticuerpos anti-reovirales. La inmunidad humoral del mamífero contra el reovirus puede reducirse o suprimirse temporal de forma adicional por la administración intravenosa de inmunoglobulina no específica al mamífero.

Se contempla que el reovirus puede administrarse a mamíferos inmunocompetentes inmunizados contra el reovirus junto con la administración de inmunosupresores y/o inmunoinhibidores. Dichos inmunosupresores e inmunoinhibidores son conocidos para los especialistas en la técnica e incluyen agentes tales como ciclosporina, rapamicina, tacrolimo, ácido micofenólico, azatioprina y sus análogos, y similares. Se sabe que otros agentes también tienen propiedades inmunosupresoras (véase, por ejemplo, Goodman y Gilman, 7ª Edición, página 1242, cuya descripción se incorpora en este documento por referencia). Dichos inmunoinhibidores también incluyen "anticuerpos anti-antireovirales" que son anticuerpos dirigidos contra anticuerpos anti-reovirales. Dichos anticuerpos pueden crearse por métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, "Antibodies: A laboratory manual" E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988). Dichos anticuerpos anti-antireovirales pueden administrarse antes de, al mismo tiempo o poco después de la administración del reovirus. Preferiblemente se administra una cantidad eficaz de los anticuerpos anti-antireovirales en un tiempo suficiente para reducir o eliminar una respuesta inmune del mamífero contra el reovirus administrado. Las expresiones "inmunosupresor" o "agente inmunosupresor" incluyen inmunosupresores convencionales, inmunoinhibidores, anticuerpos, y estados tales como radioterapia o infección por VIH que provocan el compromiso del sistema inmune.

La expresión "lisis sustancial" significa que se lisa al menos el 10% de las células proliferantes, más preferiblemente se lisa al menos el 50% y mucho más preferiblemente al menos el 75% de las células. El porcentaje de lisis puede determinarse para células tumorales midiendo la reducción en el tamaño del tumor en el mamífero o la lisis de las células tumorales *in vitro*.

Un "mamífero que se sospecha que tiene un trastorno proliferativo" significa que el mamífero puede tener un trastorno proliferativo o tumor o se ha diagnosticado con un trastorno proliferativo o tumor o se ha diagnosticado previamente con un trastorno proliferativo o tumor, se ha eliminado quirúrgicamente el tumor o sustancialmente todo el tumor y se sospecha que el mamífero alberga algunas células tumorales residuales.

También se describen composiciones farmacéuticas que contienen, como ingrediente activo, uno o más inmunosupresores o inmunoinhibidores y uno o más reovirus asociados con "vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables". Al preparar las composiciones, los ingredientes activos/inmunosupresor o inmunoinhibidor y el reovirus se mezclan habitualmente con un excipiente, se diluyen por un excipiente o se encierran dentro de dicho vehículo que puede estar en forma de una cápsula, sobrecito, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente farmacéuticamente aceptable sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semi-sólido, o líquido, que actúa como vehículo, excipiente o medio para el ingrediente activo. Por tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, grageas, sobrecitos, obleas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (en forma de un sólido o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta el 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles, y polvos envasados estériles.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato cálcico, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe, y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio, y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes tales como metil- y propilhidroxi-benzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de su administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, los ingredientes activos principales/inmunosupresor o inmunoinhibidor y el reovirus se mezclan con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contenga una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se entiende que el ingrediente activo se dispersa uniformemente en toda la composición de modo que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias igual de eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas.

Los comprimidos o píldoras pueden recubrirse o componerse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que produzca la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender una dosificación interior y un componente de dosificación externo, estando el último en forma de una envuelta sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la disgregación en el estómago y permitir que el componente interior pase intacto al duodeno o para retardar la liberación. Puede usarse una diversidad de materiales para dichas capas entéricas o recubrimientos, incluyendo dichos materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con dichos materiales como goma laca, alcohol cetílico, y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que pueden incorporarse las nuevas composiciones para administración oral o por inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes adecuadamente aromatizados, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco, o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describe en este documento. Preferiblemente, las composiciones pueden administrarse por vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables preferiblemente pueden nebulizarse por el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización puede unirse a un soporte de máscara facial, o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Pueden administrarse composiciones en solución, suspensión, o polvo, preferiblemente por vía oral o nasal, desde dispositivos que suministran la formulación de un modo apropiado.

Otra formulación emplea dispositivos de suministro transdérmico ("parches"). Dichos parches transdérmicos pueden usarse para proporcionar infusión continua o discontinua de reovirus de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y uso de parches transdérmicos para el suministro de agentes farmacéuticos es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 5.023.252. Dichos parches pueden construirse para suministro continuo, pulsátil, o a petición de agentes farmacéuticos.

Otras formulaciones adecuadas pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences.

El inmunosupresor o inmunoinhibidor y el reovirus o la composición farmacéutica que comprende el inmunosupresor o inmunoinhibidor y el reovirus puede envasarse en kits adecuados que proporcionan los materiales necesarios envasados en recipientes adecuados. Los kits también pueden incluir un agente quimioterapéutico.

El inmunosupresor o inmunoinhibidor puede administrarse en una cantidad apropiada y usando un programa apropiado de administración suficiente para provocar la inmunosupresión o inmunoinhibición del sistema inmune del mamífero. Dichas cantidades y programas son bien conocidos para los especialistas en la técnica.

El reovirus se puede administrar en una cantidad que es suficiente para tratar el trastorno proliferativo (por ejemplo, una "cantidad eficaz"). Un trastorno proliferativo se "trata" cuando la administración del reovirus a las células proliferantes realiza la lisis de las células proliferantes. Esto puede provocar una reducción en el tamaño del neoplasma, o una eliminación completa del neoplasma. La reducción en el tamaño del neoplasma, o la eliminación del neoplasma, está generalmente causado por la lisis de células neoplásicas ("oncolisis") por el reovirus. Preferiblemente, la cantidad eficaz puede ser aquella cantidad capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales. Preferiblemente, la cantidad eficaz puede ser de aproximadamente $1,0 \text{ pfu/kg}$ de peso corporal a aproximadamente 10^{15} pfu/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 10^2 pfu/kg de peso corporal a aproximadamente 10^{13} pfu/kg de peso corporal. Por ejemplo, para el tratamiento de un ser humano, pueden usarse de aproximadamente 10^2 a 10^{17} unidades formadoras de placas (PFU del inglés plaque forming units) de reovirus, dependiendo del tipo, tamaño y cantidad de tumores presentes. La cantidad eficaz se determinará en una base individual y puede basarse, al menos en parte, en la consideración del tipo de reovirus; la vía elegida de administración; el tamaño, edad, género del individuo; la gravedad de los síntomas del paciente; el tamaño y otras características del neoplasma; y similares. El tratamiento de la terapia puede durar desde varios días hasta varios meses o hasta que se consiga la disminución de la enfermedad.

El inmunosupresor o inmunoinhibidor y el reovirus pueden administrarse en una única dosis, o múltiples dosis (es decir, más de una dosis). Las múltiples dosis pueden administrarse de forma concurrente, o consecutiva (por ejemplo, durante un periodo de días o semanas). El reovirus también puede administrarse a más de un neoplasma en el mismo individuo.

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

Como se ha mencionado anteriormente, se ha descubierto que el reovirus es eficaz para el tratamiento de neoplasmas sólidos en mamíferos inmunocompetentes. La administración de reovirus no modificados directamente al neoplasma provoca la oncolisis de las células neoplásicas y una reducción en el tamaño del tumor en animales inmunocompetentes. Cuando los animales se vuelven inmunosuprimidos o inmunodeficientes de algún modo, la administración sistémica de reovirus será más eficaz en la producción de oncolisis.

El reovirus puede administrarse junto con cirugía o eliminación del neoplasma. Por lo tanto, con la presente se proporcionan métodos para el tratamiento de un neoplasma sólido que comprende la eliminación quirúrgica del

neoplasma y la administración de un reovirus en o cerca del sitio del neoplasma.

El reovirus puede administrarse junto con o además de radioterapia que vuelve al mamífero inmunosuprimido.

5 El reovirus puede administrarse adicionalmente junto con o además de compuestos anticancerígenos o agentes quimioterapéuticos conocidos. Los agentes quimioterapéuticos son compuestos que pueden inhibir el crecimiento de los tumores. Dichos agentes, incluyen, aunque sin limitación, 5-fluorouracilo, mitomicina C, metotrexato, hidroxiurea, ciclofosfamida, dacarbazina, mitoxantrona, antraciclinas (epirrubicina y doxorrubicina), anticuerpos contra receptores, tales como herceptina, etopósido, pregnasome, compuestos de platino tales como carboplatino y cisplatino, taxanos tales como taxol y taxotero, terapias hormonales tales como tamoxifeno y anti-estrógenos, interferones, inhibidores de aromatasa, agentes progestacionales y análogos de LHRH.

10 Se ha descubierto que los reovirus y los inmunosupresores descritos reducen el crecimiento de tumores que son metastásicos. Se proporciona un método para reducir el crecimiento de tumores metastásicos en un mamífero que comprende administrar una cantidad eficaz de un reovirus al mamífero inmunosuprimido.

Utilidad

15 Los métodos de diagnóstico descritos pueden usarse para identificar la susceptibilidad de las células a infección con reovirus midiendo la señalización constitutiva de ras-MAP. Esto será útil para determinar en qué casos existe la probabilidad de que el tratamiento con reovirus de trastornos celulares proliferativos sea eficaz.

20 Los reovirus e inmunosupresores descritos pueden usarse para una diversidad de propósitos. Pueden usarse en métodos para tratar trastornos proliferativos que muestran fosforilación constitutiva de MAPK en un mamífero. Pueden usarse para reducir o eliminar neoplasmas. Pueden usarse en métodos para tratar la metástasis. Pueden usarse junto con tratamientos conocidos para el cáncer incluyendo cirugía, quimioterapia y radiación.

Además, la presente descripción también proporciona:

(1) Un método para determinar la susceptibilidad de una célula a una infección por reovirus midiendo la señalización ras-MAP constitutiva en dicha célula, en donde la presencia de dicha señalización constitutiva indica susceptibilidad a infección por reovirus.

25 (2) El método de (1) en donde la señalización ras-MAP se mide determinando es estado de la fosforilación de la MAP quinasa.

(3) El método de (2) en donde el estado de la fosforilación de la MAP quinasa se determina usando un anticuerpo específico para la MAP quinasa fosforilada.

30 (4) El método de (1) en donde la célula está comprendida en una muestra biológica recogida de un mamífero sospechoso de tener un trastorno proliferativo.

(5) El método de (4) en donde el trastorno proliferativo es neurofibromatosis.

(6) El método de (4) en donde el trastorno proliferativo es un neoplasma sólido.

35 (7) El método de (4) en donde el trastorno proliferativo se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer suprarrenal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de mama y cáncer del sistema nervioso periférico y central.

(8) El método de (4) en donde el trastorno proliferativo es cáncer de mama.

(9) El método de (4) en donde el mamífero se selecciona del grupo que consiste en perros, gatos, ovejas, cabras, ganado vacuno, caballos, cerdos, ratones, primates no humanos y seres humanos.

(10) El método de (4) en donde el mamífero es un ser humano.

40 (11) Un método para tratar un trastorno proliferativo en un mamífero, en el que el trastorno se caracteriza por células proliferativas que presentan fosforilación de MAPK constitutiva, que comprende administrar a las células proliferativas en dicho mamífero una cantidad eficaz de uno o más reovirus en condiciones que dan como resultado la lisis sustancial de las células proliferativas.

(12) El método de (11) que además comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

45 administrar a las células proliferativas en dicho mamífero una cantidad eficaz de un agente supresor; eliminar las células B o células T de dicho mamífero; eliminar los anticuerpos anti-reovirales de dicho mamífero; eliminar los anticuerpos de dicho mamífero;

administrar anticuerpos anti-antireovirales a dicho mamífero, y suprimir el sistema inmune del mamífero.

- (13) El método de (11), en donde el reovirus se selecciona del grupo que consiste en una reovirus de mamífero y un reovirus aviar.
- (14) El método de (13), en donde el reovirus es un reovirus de mamífero.
- (15) El método de (14), en donde el reovirus es un reovirus humano.
- 5 (16) El método de (15), en donde el reovirus se selecciona del grupo que consiste en reovirus serotipo 1, reovirus serotipo 2 y reovirus serotipo 3.
- (17) El método de (16), en donde el reovirus es reovirus serotipo 3.
- (18) El método de (13), en donde el reovirus es un reovirus aviar.
- (19) El método de (11), en donde se administra más de un tipo de reovirus.
- 10 (20) El método de (11), en donde se administra más de una cepa de reovirus.
- (21) El método de (11), en donde el reovirus es un aislado de campo.
- (22) El método de (11), en donde el trastorno proliferativo es un neoplasma.
- (23) El método de (11), en donde el trastorno proliferativo es neurofibromatosis.
- (24) El método de (22), en donde el neoplasma es un neoplasma sólido.
- 15 (25) El método de (22), en donde el neoplasma se selecciona del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer suprarrenal, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de mama y cáncer del sistema nervioso periférico y central.
- (26) El método de (22), en donde el neoplasma es un cáncer del sistema nervioso central.
- (27) El método de (22), en donde el neoplasma es un cáncer de mama.
- 20 (28) El método de (22), en donde el neoplasma es un neoplasma hematopoyético.
- (29) El método de (24), en donde el reovirus se administra por inyección en o cerca del neoplasma sólido.
- (30) El método de (11), en donde el reovirus se administra intravenosamente al mamífero.
- (31) El método de (11), en donde el reovirus se administra intraperitonealmente al mamífero.
- (32) El método de (11) en donde el mamífero es inmunocompetente.
- 25 (33) El método de (11) en donde el reovirus está inmunoprotegido.
- (34) El método de (11) en donde el reovirus está encapsulado en un micelio.
- (35) El método de (11), en donde el mamífero es un ser humano.
- (36) El método de (11), en donde se administran aproximadamente 1 a 10^{15} unidades formadoras de placa de reovirus/kg peso corporal.
- 30 (37) El método de (11), en donde el reovirus se administra en una sola dosis.
- (38) El método de (11), en donde el reovirus se administra es más de una dosis.
- (39) El método de (22), en donde el neoplasma es metastásico.
- (40) El método de (11) que comprende además la administración de una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico.

(41) El método de (11), en donde el reovirus se trata con una proteasa antes de la administración.

(42) El método de (22), en donde el neoplasma es cáncer pancreático.

5 (43) El método de (22) que además comprende la eliminación quirúrgica de sustancialmente todo el neoplasma y la administración del reovirus al sitio quirúrgico en una cantidad suficiente para dar como resultado la oncolisis sustancial de cualquier célula neoplásica remanente.

(44) Un método para tratar un neoplasma en un ser humano, en el que el neoplasma se caracteriza por células proliferativas que presentan fosforilación MAPK constitutiva, que comprende administrar al neoplasma un reovirus en una cantidad suficiente para dar como resultado una oncolisis sustancial de las células neoplásicas.

(45) El método de (44) en donde dicho reovirus se administra por inyección en o cerca de un neoplasma sólido.

10 (46) El método de (44) que además comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

administrar a las células proliferativas en dicho mamífero una cantidad suficiente de un agente supresor inmune; eliminar las células B o células T de dicho mamífero; eliminar los anticuerpos anti-reovirales de dicho mamífero; eliminar los anticuerpos de dicho mamífero;

administrar anticuerpos anti-antireovirales a dicho mamífero; y suprimir el sistema inmune del mamífero.

15 (47) Un método para inhibir la metástasis de un neoplasma en un mamífero, en el que el neoplasma se caracteriza por células proliferativas que presentan fosforilación MAPK constitutiva, que comprende administrar al mamífero un reovirus en una cantidad suficiente para dar como resultado la lisis sustancial de las células neoplásicas.

(48) El método de (47) que además comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

20 administrar a las células proliferativas en dicho mamífero una cantidad eficaz de un agente inmunosupresor; eliminar las células B o células T de dicho mamífero; eliminar los anticuerpos anti-reovirales de dicho mamífero; eliminar los anticuerpos de dicho mamífero;

administrar anticuerpos anti-antireovirales a dicho mamífero; y suprimir el sistema inmune del mamífero.

25 (49) Un método para tratar un neoplasma sospechoso en un mamífero, en el que el neoplasma se caracteriza por células proliferativas que presentan fosforilación MAPK constitutiva, que comprende la eliminación quirúrgica de sustancialmente todo el neoplasma y la administración de una cantidad eficaz de reovirus en o cerca del sitio quirúrgico que da como resultado la oncolisis de cualquier célula neoplásica remanente.

(50) El método de (49) que además comprende una etapa seleccionada del grupo que consiste en:

30 administrar a las células proliferativas en dicho mamífero una cantidad eficaz de un agente supresor; eliminar las células B o células T de dicho mamífero; eliminar los anticuerpos anti-reovirales de dicho mamífero; eliminar los anticuerpos de dicho mamífero;

administrar anticuerpos anti-antireovirales a dicho mamífero; y suprimir el sistema inmune del mamífero.

Para ilustrar adicionalmente la presente invención y las ventajas de la misma, se dan los siguientes ejemplos específicos pero no se pretende que limiten el alcance de las reivindicaciones de ningún modo.

EJEMPLOS

35 En los siguientes ejemplos, todas las temperaturas son en grados Celsius (a menos que se indique otra cosa) y todos los porcentajes son porcentajes ponderales (también a menos que se indique otra cosa).

En los siguientes ejemplos, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Si una abreviatura no está definida, tiene su significado generalmente aceptado:

μ M=micromolar

40 mM=milimolar

M=molar

ml=mililitro

μ l=microlitro

mg=miligramo

45 μ g=microgramo

PAGE=electroforesis en gel de poliacrilamida

rpm=revoluciones por minuto

FBS=suero bovino fetal

DTT=ditiotrietol

5 SDS=dodecil sulfato sódico

PBS=solución salina tamponada con fosfato

DMEM=medio de Tagle modificado por Dulbecco

α -MEM=medio de Tagle α -modificado

β -ME= β -mercaptoetanol

10 MOI=multiplicidad de infección

PFU=unidades formadoras de placas

MAPK=MAP quinasa

fosfo-MAPK=MAP quinasa fosforilada

HRP=peroxidasa de rábano rústicano

15 PKR=proteína quinasa activada por ARN bicatenario

RT-PCR=reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

GAPDH=gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenada

EGFR=receptores del factor de crecimiento epidérmico

MEK quinasa=quinasa regulada por señales extracelulares activada por mitógenos

20 DMSO=sulfóxido de dimetilo

SCID=inmunodeficiencia combinada severa

Métodos Generales

Células y Virus

25 Las células NIH-3T3 parentales junto con células NIH-3T3 transformadas con v-Src fueron un generoso presente del Dr. Jove (University of Florida). Las líneas celulares de tumor de mama MDA-MB-468, MCF7, MDA-MB-435, T-47D, SK-BR-3 y las células de control HBL-100, fueron un generoso presente del Dr. Karl Riabowol (University of Calgary). Todas las líneas celulares se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10%.

30 La cepa Dearing del reovirus serotipo 3 usado en estos estudios se propagó en cultivos de suspensión de células L y se purificó de acuerdo con Smith et al. (1969) con la excepción de que se omitió β -mercaptoetanol (β -ME) del tampón de extracción.

Infección de Células y Cuantificación de Virus

35 Se cultivaron monocapas confluyentes de células en placas de 24 pocillos y se infectaron con reovirus a una multiplicada de infección estimada de 80 PFU/célula. Después de 1 h de incubación a 37°C, las monocapas se lavaron con DMEM caliente-FBS al 10%, y después se incubaron en el mismo medio. En diversos momentos después de la infección, se añadió una mezcla de NP-40 y desoxicolato sódico directamente al medio sobre las monocapas infectadas hasta concentraciones finales del 1% y el 0,5% respectivamente. Después se recogieron los lisados y se determinaron las producciones de virus por titulación de placas sobre células L-929.

Radiomarcaje de células infectadas con reovirus y preparación de lisados

40 Se infectaron monocapas subconfluyentes (80% confluyentes) de células con reovirus (MOI ~10 PFU/célula). A las 46 horas después de la infección, el medio se reemplazó con DMEM libre de metionina que contenía FBS al 10% y 0,1 mCi/ml de [³⁵S]-metionina. Después de incubación adicional durante 2 horas a 37°C, las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lisaron en el mismo tampón que contenía Triton X-100 al 1%, y desoxicolato sódico al 0,5%. Después los lisados se hirvieron y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

45 Inmunoprecipitación y análisis SDS-PAGE

Se realizó inmunoprecipitación de lisados celulares infectados con reovirus marcados con ³⁵S con suero anti-reovirus serotipo 3 como se ha descrito previamente (Lee, P.W.K. et al. (1981) Virology, 108:134-146).

Detección de Fosfo-MAPK y MAPK Total

Se usó el kit de anticuerpo p44/42 MAP quinasa (Thr202/Tyr204) 'PhosphoPlus' (New England Biolabs) para la detección de MAP quinasa en lisados celulares de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, se lisaron cultivos de monocapas subconfluentes con el tampón de muestra que contenía SDS recomendado, y se sometieron a SDS-PAGE, seguido de electrotransferencia sobre papel de nitrocelulosa. Después se sondeó la membrana con el anticuerpo primario (anti-MAPK total o anti-fosfo-MAPK), seguido del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano rústico (HRP) como se describe en el manual del fabricante.

Ratones con Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID)

Se adquirieron ratones SCID macho de cinco a ocho semanas de edad de Charles River Canada y se trataron de acuerdo con un protocolo aprobado por el Comité de Cuidados Animales de la Universidad de Calgary (University of Calgary Animal Care Committee).

Implante de Aloinjertos y Xenoinjertos

Se recogieron células de cáncer de mama humano MDA-MB-468 de crecimiento activo, se lavaron, y se resuspendieron en PBS estéril a una densidad de 2×10^7 células/ml. Se inyectaron por vía subcutánea $2,0 \times 10^6$ células en $100 \mu\text{l}$ en un sitio que cubría la ijada trasera. Se dejó que los tumores implantados crecieran durante 2-3 semanas hasta que se obtuvieron tumores palpables de $0,5 \times 0,5 \text{ cm}$.

Inyección Intratumoral de Reovirus

Una vez que los tumores establecidos obtuvieron un tamaño tratable, se hizo una única inyección intratumoral de $1,0 \times 10^7$ PFU de reovirus vivo o inactivado por UV (serotipo 3, cepa Dearing) en $20 \mu\text{l}$ de PBS estéril. Se midió el tamaño del tumor dos veces a la semana durante un periodo de dos a cuatro semanas. Se sacrificó a los animales cuando presentaron morbilidad severa debido a la excesiva carga tumoral o cualquier nivel observable de sufrimiento.

Análisis Histoinmunológico de Infección por Reovirus

Se realizó un análisis inmunofluorescente usando secciones tumorales impregnadas en parafina, fijadas con formalina montadas sobre cubreobjetos. Después de eliminar la parafina por xileno, las secciones se rehidrataron, y se expusieron al anticuerpo primario (suero policlonal de conejo anti-reovirus tipo 3 diluido 1/100 en PBS) durante 2 h a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS, las secciones se expusieron al anticuerpo secundario [conjugado de cabra anti-IgG de conejo (molécula completa)-isotiocianato de fluoresceína (FITC) o dependiendo del experimento, la misma concentración de Cy3, diluido 1/100 en PBS que contenía suero de cabra al 10% y tinte de contraste Azul de Evans al 0,005%] durante 1 h a temperatura ambiente. Como tinte de contraste adicional, también se usó el tinte nuclear DAPI. Finalmente, las secciones fijadas y tratadas se lavaron tres veces más con PBS y después una vez con agua doblemente destilada. Los portaobjetos después se secaron y se montaron en portaobjetos en glicerol al 90% que contenía fenilendiamina al 0,1%, y se vieron con un microscopio Zeiss Axiophot sobre el que se montó una cámara Carl Zeiss (el aumento para todas las imágenes fue 200X).

Infección con Reovirus de Muestras de Tumor de Mama Primario

Se esterilizaron muestras de tumor de mama de biopsia por inmersión en etanol al 95% seguido de varios lavados de PBS estéril. La muestra después se cortó en pequeñas secciones y se colocó en una placa de 24 pocillos que contenía DMEM con FCS al 10%. Se añadió reovirus (1×10^8 PFU). En diversos momentos después de la infección, las muestras se lavaron en PBS estéril y después se fijaron en formalina. Las muestras después se impregnaron en parafina y se seccionaron para su uso en análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos dirigidos contra las proteínas reovirales totales.

Ejemplo 1. La Transformación por el miembro v-src de la Familia de Tirosina Quinasas no Receptoras Confiere Susceptibilidad a Infección por Reovirus

Aunque se ha demostrado previamente que la transfección de células NR6 y NIH-3T3 no infectables con receptores de tirosina quinasa era suficiente para permitir la replicación de reovirus (Strong, 1993), se desconocía si la introducción por transfección de tirosina quinasa no receptoras podría provocar susceptibilidad a reovirus. Para determinar si la actividad de quinasas de la familia, que frecuentemente contribuye a la proliferación incontrolada de muchos cánceres de mama, provoca suficiente actividad Ras para posibilitar la replicación de reovirus, se transformaron células NIH-3T3 no infectables con v-src y se evaluó la susceptibilidad a reovirus. Se expusieron monocapas confluentes de células NIH-3T3 transformadas con v-src o sus células parentales a reovirus a una multiplicidad de infección (MOI) de ~ 50 unidades formadoras de placas (PFU) de reovirus. Las células y los medios se recogieron en diversos momentos después de la infección y se usaron muestras resultantes para el análisis de titulación de placas para determinar la replicación de reovirus. Estos resultados muestran un drástico efecto citopático en las células transformadas con v-src en 48 horas después de la infección (datos no mostrados) así como una producción potenciada de reovirus medida por el ensayo de titulación de placas. Estos resultados (Figura 1) muestran que incluso las tirosina quinasas no receptoras podrían mediar potencialmente la infección por reovirus y por tanto pueden ser capaces de dirigirse a un subconjunto adicional de tumores de mama.

Ejemplo 2. Los Reovirus Pueden Infectar un Panel de Líneas Celulares Derivadas de Cáncer de Mama Humano en las Que Puede Evaluarse la Señalización Constitutiva de Ras/MAPK

Para evaluar la viabilidad de usar reovirus contra tumores derivados de mama, se seleccionó un panel de células de cáncer de mama que incluía: MDA-MB-468, MCF7, MDA-MB-435, T-47D, y SK-BR-3 y se determinó la susceptibilidad a infección por in vitro. Como control, se usaron células HBL-100, que derivan de tejido mamario

normal. Estas seis líneas celulares se cultivaron hasta una confluencia del 80% y después se expusieron a reovirus a una MOI de 10. Las células se marcaron con [³⁵S]-metionina durante un periodo de dos horas a las 48 horas después de la infección. Las células después se lavaron en solución salina tamponada con fosfato y se lisaron. Los lisados preparados después se usaron para inmunoprecipitación usando anticuerpos dirigidos contra las proteínas totales reovirales. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Los resultados (Figura 2A) demuestran claramente una replicación eficaz de reovirus dentro de las líneas celulares derivadas de tumor de mama, sin embargo, la replicación de reovirus estuvo restringida en la línea celular HBL-100. Esto sugiere que estas células de tumor de mama son infectables como resultado de una activación de Ras, a través de una mutación directa o mediante un elemento de señalización cadena arriba. Es significativo porque sugiere que un elevado porcentaje de cánceres de mama podría tratarse potencialmente por agentes terapéuticos que se dirijan a Ras, aunque esta activación específica es rara en este tipo de cáncer.

Como la fosforilación de MAPK es el resultado inevitable de la señalización a través de Ras, el estado fosforilado de la proteína debe observarse solamente en una línea celular con señalización normal de Ras si está presente un estímulo mitogénico. En una línea celular con señalización normal de Ras, la eliminación de estos estímulos mitogénicos debe provocar el cese de la expresión a través de esta vía con una desfosforilación resultante de MAPK. En una célula con actividad Ras aberrante, directamente a través de activación mutacional de Ras o como alternativa mediante un elemento cadena arriba, la forma fosforilada de MAPK debe persistir en presencia o ausencia de suero. Para establecer que la infectabilidad observada en las líneas celulares de tumor de mama es un resultado de la activación de la vía de señalización Ras/MAPK, se realizó análisis de transferencia de Western de estas líneas celulares usando anticuerpos dirigidos contra fosfo-MAPK. Se sembraron células MDA-MB-468, MCF7, MDA-MB-435, T-47D, SK-BR-3 y HBL-100 en una placa de seis pocillos. Después las células se cultivaron en suero de ternera fetal al 10% (FCS) o se privaron de suero (FCS al 0,5%) durante 48 horas. Las células después se lavaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se recogieron en tampón de muestra de proteínas. Los lisados celulares se sometieron a SDS-PAGE y se transfirieron posteriormente sobre papel de nitrocelulosa y se sondearon con anticuerpo anti-fosfo-MAPK como recomienda el fabricante. Los resultados (Figura 2B) demuestran claramente que la única línea celular no infectable, HBL-100, tiene fosfo-MAPK en presencia de suero y no en su ausencia, lo que indica que la señalización de Ras en esta vía no es aberrante. Las líneas celulares infectables restantes tienen fosfo-MAPK independiente de la presencia de señales mitogénicas, como se esperaría si tuvieran activación constitutiva de esta vía. Las concentraciones de proteínas se normalizaron usando anticuerpos dirigidos contra MAPK total (Figura 2C).

Ejemplo 3. Los Reovirus Pueden Actuar como un Agente Anti-tumoral Contra Tumores de Mama In Vivo

La línea celular de cáncer de mama humano, MDA-MB-468 se introdujo en forma de xenoinjertos de tumor de forma subcutánea en un sitio que recubría la ijada trasera de ratones SCID. Después de establecerse tumor palpable, se administró al tumor MDA-MB-468 una única inyección intratumoral de $1,0 \times 10^7$ unidades formadoras de placas (PFU) de reovirus serotipo 3 (cepa Dearing) en PBS. A los animales de control se les dio una inyección intratumoral de reovirus inactivado por UV. Se siguió el crecimiento tumoral durante un periodo de cuatro semanas. Como se demuestra (Figura 3), el tratamiento con reovirus provoca una regresión drástica del tamaño del tumor. Como anteriormente, la tinción con hematoxilina/eosina (HE) de la masa restante indicó que la inyección única de reovirus provoca la destrucción completa de las células tumorales en comparación con los tumores de control (datos no mostrados). Para determinar si la lisis observada de las células tumorales se debía a la replicación viral y para determinar si había propagación de proteínas reovirales más allá de la masa tumoral, se realizó microscopía de inmunofluorescencia. Usando anticuerpos dirigidos contra las proteínas totales reovirales y secciones delgadas impregnadas de parafina de la masa tumoral restante se determinó que la replicación de reovirus está restringida a las células tumorales MDA-MB-468 y no se extiende en el músculo esquelético adyacente.

Ejemplo 4. Los Reovirus pueden Replicarse en Muestras de Mama Primarias

Para asegurar que el efecto oncolítico del reovirus no se debe a una característica innata de una línea celular pasada, se obtuvieron muestras primarias de cánceres de mama humanos para evaluar la capacidad de infección de los reovirus. Se esterilizaron muestras de tumor de mama de biopsia por inmersión en etanol al 95% seguido de varios lavados de PBS estéril. La muestra después se cortó en pequeñas secciones y se colocó en una placa de 24 pocillos que contenía DMEM con FCS al 10%. Se añadió reovirus (1×10^8 PFU). En diversos momentos después de la infección, las muestras se lavaron en PBS estéril y después se fijaron en formalina. Las muestras después se impregnaron en parafina y se seccionaron para su uso en un análisis inmunohistoquímico usando anticuerpos dirigidos contra las proteínas totales reovirales. Los resultados (no mostrados) muestran claramente tinción de reovirus en aquellos tumores expuestos, lo que demuestra la replicación viral en estas muestras primarias.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uno o más reovirus para uso en el tratamiento de un trastorno proliferativo en un mamífero, en el que el trastorno se caracteriza por células proliferativas que presentan fosforilación MAPK constitutiva, en donde el(los) reovirus se va(n) a administrar a las células proliferativas en dicho mamífero en condiciones que dan como resultado la lisis sustancial de las células proliferativas.
2. El uno o más reovirus según se reivindica en la reivindicación 1, para uso en combinación con un agente quimioterapéutico, un agente inmunosupresor o anticuerpos anti anti-retrovirales.
- 10 3. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en las reivindicaciones 1 ó 2, que se selecciona(n) del grupo que consiste en un reovirus de mamífero, un reovirus aviar, opcionalmente en donde el reovirus de mamífero es un reovirus humano, opcionalmente en donde el reovirus humano se selecciona del grupo que consiste en reovirus serotipo 1, reovirus serotipo 2 y reovirus serotipo 3.
4. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde se va a administrar más de un tipo o más de una cepa de reovirus.
- 15 5. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el trastorno proliferativo es un neoplasma o neurofibromatosis, opcionalmente en donde el neoplasma es metastásico.
6. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en la reivindicación 5, en donde el(los) reovirus se va(n) a administrar mediante inyección en o cerca del neoplasma sólido.
7. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el(los) reovirus(es) se va(n) a administrar intravenosamente o intraperitonealmente al mamífero.
- 20 8. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el(los) reovirus se trata(n) con una proteasa antes de la administración, se inmunoprotege(n) o se encapsula(n) en un micelio.
9. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde se van a administrar aproximadamente 1 a 10^{15} unidades formadoras de placa de reovirus/kg peso corporal.
- 25 10. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el(los) reovirus se va(n) a administrar en una sola dosis o en más de una dosis.
11. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en la reivindicación 5, en donde el tratamiento es en un sitio en el que se ha eliminado quirúrgicamente sustancialmente todo el neoplasma.
- 30 12. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en la reivindicación 1, en donde el reovirus es un reovirus recombinante.
13. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en la reivindicación 12, en donde el reovirus recombinante es de dos o más cepas de reovirus, opcionalmente en donde dos o más cepas de reovirus se seleccionan del grupo que consiste en la cepa Dearing, cepa Abney, cepa Jones y cepa Lang.
- 35 14. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en la reivindicación 12, en donde el reovirus recombinante se genera por co-infección de células de mamífero con diferentes subtipos de reovirus o en donde el reovirus recombinante es el resultado del reordenamiento de reovirus seleccionados del grupo que consiste en reovirus serotipo 1, reovirus serotipo 2 y reovirus serotipo 3.
- 40 15. El uno o más reovirus para uso según se reivindica en la reivindicación 12, en donde el reovirus recombinante comprende secuencias que codifican una variante que se produce de forma natural de proteína de cabra o secuencias que codifican proteína de cabra mutada.

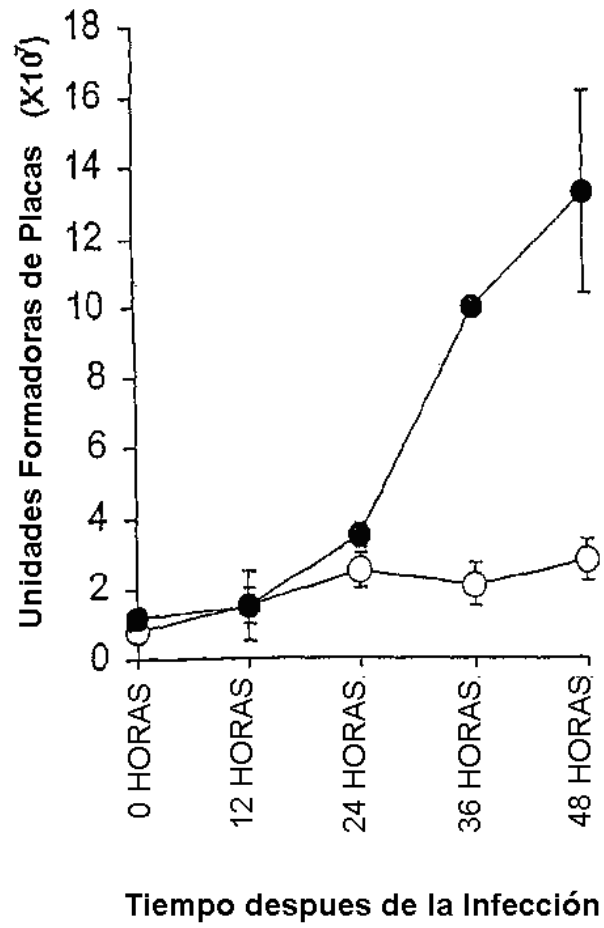
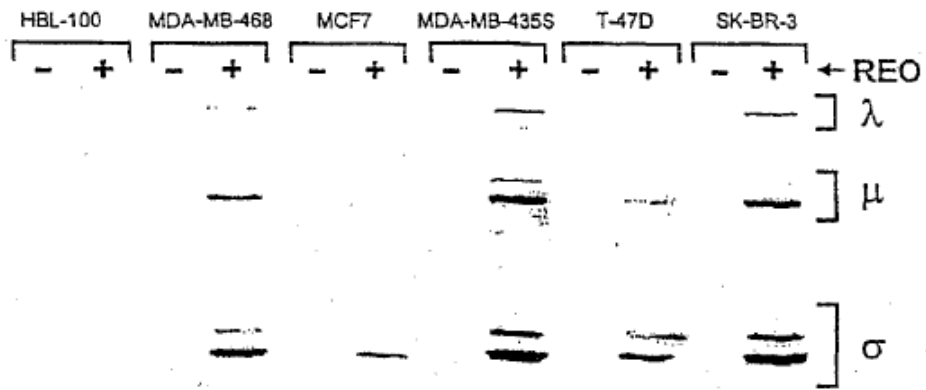
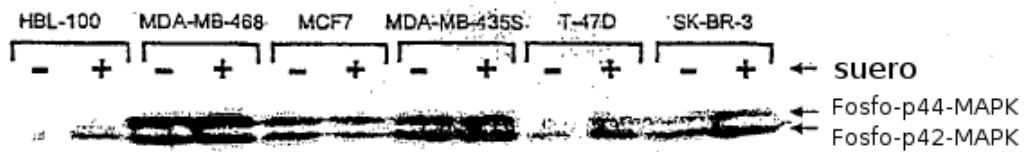


FIGURA 1

A Inmunoprecipitación



B Fosfo-MAPK



C MAPK Total

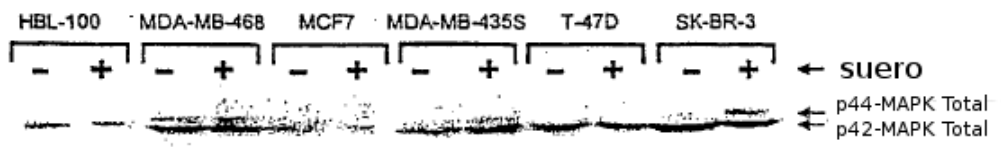


FIGURA 2

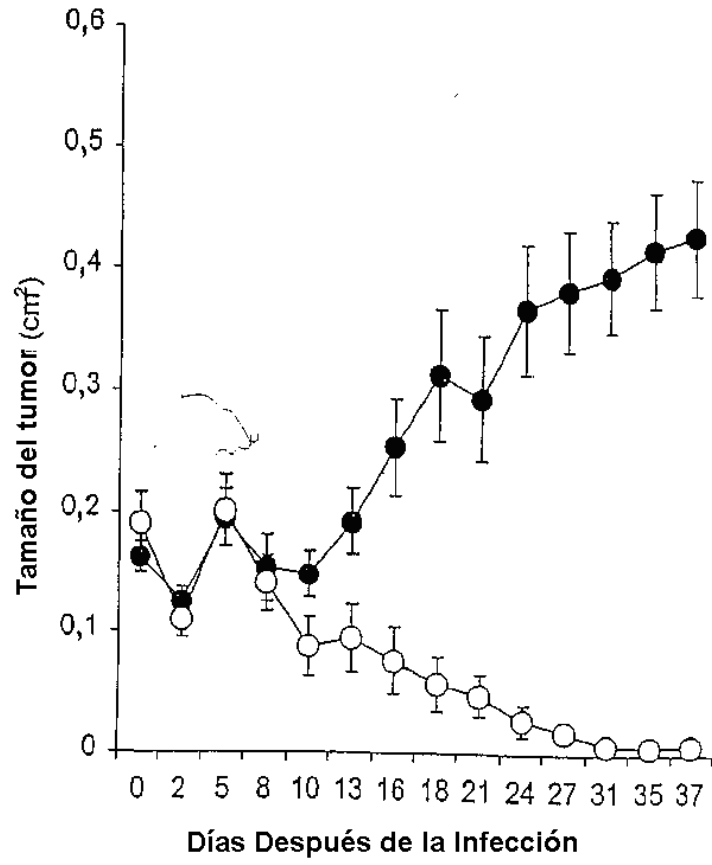


FIGURA 3