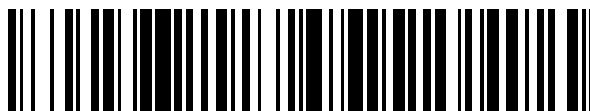


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 830**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010 E 10737746 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2437760**

54 Título: **Viroterapia oncolítica para la prevención de la recidiva tumoral**

30 Prioridad:

04.06.2009 EP 09007432

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.06.2014

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM,
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (50.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE y
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**ROMMELAERE, JEAN;
RAYKOV, ZAHARI;
GREKOVA, SVITLANA;
KIPRIJANOVA, IRINA;
GELETNEKY, KARSTEN;
KOCH, UTE y
APRAHAMIAN, MARC**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 468 830 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

Viroterapia oncolítica para la prevención de la recidiva tumoral

- 5 La presente invención proporciona un parvovirus H1 (H1PV) para prevenir la recidiva de un tumor, preferiblemente un cáncer de páncreas o tumor cerebral maligno.

10 El tratamiento a largo plazo insatisfactorio de tumores malignos se debe frecuentemente a recidiva tumoral. Esto es un problema en particular en la terapia de tumores cerebrales malignos. Incluso cuando es satisfactoria la extirpación quirúrgica del tumor sin que se demuestre tumor residual en IRM, más del 90% de los pacientes desarrollarán tumores con recidiva en el plazo de 2 a 3 años tras el tratamiento inicial. Las estrategias convencionales actuales para mejorar esta situación incluyen el uso de radio-quimioterapia. Sin embargo, este tratamiento sólo ha mostrado mejorar la supervivencia en de 3 a 4 meses pero no que altere la tasa de recidivas tumorales o supervivientes a largo plazo. Aunque actualmente están en investigación diversos fármacos y estrategias experimentales para prolongar la supervivencia y reducir la tasa de recidiva tumoral, hasta ahora no hay informes sobre ningún avance decisivo importante.

20 El documento WO 2006/047301 A2 se refiere a métodos y composiciones basados en virus adenoasociado tipo 2 (AAV-2) para destruir células neoplásicas.

El documento US 7.179.456 B2 y el resumen "Geletneky *et al.*, 186 póster, European J. of Cancer, Suplemento, Pergamon, Oxford, G.B., Vol. 3, N.º 2, pág. 53" describe el uso de parvovirus para la terapia de tumores cerebrales.

25 Por tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar medios para la prevención de la recidiva tumoral.

Según la invención, esto se logra mediante el contenido definido en las reivindicaciones. La presente invención se basa en los hallazgos del solicitante de que la prevención de la recidiva tumoral espontánea y la inducción de inmunidad específica de tumor pueden lograrse mediante viroterapia oncolítica con parvovirus H-1, ejemplificado para cáncer de páncreas y gliomas experimentales. El tratamiento de tumores con el parvovirus oncolítico H-1 da como resultado el desarrollo de inmunidad específica de tumor. Se detectó este efecto en ratas Wistar inmunocompetentes que portaban gliomas intracraneales RG-2. La inducción de inmunidad específica de tumor tras tratamiento satisfactorio de tumores cerebrales con parvovirus H-1 no se ha demostrado previamente.

35 Para analizar los efectos inmunológicos del tratamiento con H-1PV, se realizaron varios experimentos independientes:

40 El experimento 1 describe la reexposición de ratas Wistar tratadas satisfactoriamente con células tumorales RG-2. Se trataron ratas Wistar hembra (n = 7) que portaban grandes gliomas intracraneales RG-2 con parvovirus H-1PV (inyección intratumoral: n = 4; inyección intravenosa: n = 3). Tras la remisión completa del tumor demostrada mediante IRM y un periodo de seguimiento de > 6 meses tras el tratamiento satisfactorio, se reexpusieron los animales a células tumorales RG-2 (inyección intracraneal) y se observaron para determinar la formación de tumor incluyendo obtención de imágenes mediante RM. El objetivo del experimento era evaluar si los animales estaban protegidos frente al crecimiento tumoral con recidiva mediante el primer tratamiento.

45 El experimento 2 describe el análisis de efectos inmunológicos específicos de tumor tras la reexposición tumoral en animales tras la terapia con parvovirus H-1PV satisfactoria. El objetivo de este experimento era evaluar si tras la reexposición intracraneal a células RG-2, los animales que se habían curado de un glioma experimental mediante inyección de H-1PV mostraban una respuesta inmunitaria específica de tumor. Para someter esto a prueba, se recogieron linfocitos de ganglios linfáticos drenantes y se purificaron. Se estimularon los linfocitos purificados con células RG-2 irradiadas, con células RG-2 infectadas por H-1PV previamente e irradiadas o con células RG-2 congeladas y descongeladas. El tratamiento con concanavalina A de linfocitos sirvió como control para verificar la viabilidad de linfocitos específica. Tras 48 horas de exposición al antígeno respectivo, se pulsaron las células con 3H-timidina y se recogieron tras 72 horas.

55 El experimento 3 describe la participación de células T en el efecto oncosupresor de H-1PV.

El experimento 4 muestra que la transferencia adoptiva de células inmunitarias específicas de tumor a ratas que portaban tumor no infectadas da como resultado un efecto oncosupresor.

60 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: Ejemplo de obtención de imágenes mediante RM tras el tratamiento satisfactorio (i.c.) y reexposición

A1: RM (3 secciones en dirección cráneo-caudal) 1 día antes del tratamiento con H-1PV;

A2: RM 3 días tras el tratamiento i.c. con H-1PV que demuestra tumor en remisión;

A3: RM 7 días tras el tratamiento i.c. con H-1PV con remisión tumoral casi completa;

A4: RM 150 días tras la reexposición tumoral sin tumor visible.

5 Figura 2a: Recuentos absolutos (captación de 3H-timidina) tras el cocultivo de linfocitos con antígenos tumorales en 2 animales reexpuestos

LN = linfocitos de ganglios linfáticos drenantes

10 Figura 2b: Cambios relativos de la actividad de linfocitos tras el cocultivo de linfocitos con antígenos tumorales en 2 animales reexpuestos (% de diferencia con respecto al animal control)

Figura 3: Transferencia adoptiva de esplenocitos de donantes tratados a receptores no tratados previamente

15 (A) Representación esquemática del protocolo de tratamiento de los donantes. Se trataron ratas (n = 16) que portaban tumores de páncreas o bien con PBS (n = 8) o bien con H-1PV (1x10⁹ unidades formadoras de placas por animal, n = 8) por vía intratumoral. En ese momento, se indujeron tumores en 16 ratas que servían como receptores de esplenocitos.

20 (B) Índice de supervivencia de ratas receptoras 220 días tras la inoculación tumoral. Se realizó transferencia adoptiva 21 días (flecha) tras el inicio del tumor en el receptor. Las ratas recibieron esplenocitos de controles tratados con PBS (círculos rellenos) o donantes tratados con H-1PV (cuadrados en blanco).

25 La presente invención proporciona un parvovirus (H1 (H1PV) para su uso en un método para prevenir la recidiva de un tumor.

Preferiblemente, dicho parvovirus H1 (agente parvoterapéutico) se formula como una composición farmacéutica, en la que el parvovirus está presente en una dosis eficaz y se combina con un portador farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" pretende englobar cualquier portador que no interfiere en la eficacia de la actividad biológica de los principios activos y que no es tóxico para el paciente al que se administra. Se conocen bien en la técnica ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Portadores farmacéuticamente compatibles adicionales pueden incluir geles, materiales de matriz bioabsorbibles, elementos para implantación que contienen el agente terapéutico, o cualquier otro vehículo, material(es) o medio de suministro o dispensación adecuado. Tales portadores pueden formularse mediante métodos convencionales y pueden administrarse al sujeto a una dosis eficaz.

Una "dosis eficaz" se refiere a cantidades de los principios activos que son suficientes para prevenir la recidiva de un tumor. Una "dosis eficaz" puede determinarse usando métodos conocidos por el experto en la técnica (véanse, por ejemplo, Fingl *et al.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman y Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., Nueva York, págs. 1-46 ((1975)).

45 Puede efectuarse la administración de los compuestos de diferentes maneras, por ejemplo mediante administración intravenosa, intratumoral, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular o intradérmica. La vía de administración depende por supuesto de la clase de terapia y la clase de compuestos contenidos en la composición farmacéutica. Una vía de administración preferida es la administración intravenosa. El régimen de dosificación del parvovirus (agente parvoterapéutico) puede determinarse fácilmente dentro de los conocimientos de la técnica, por el médico responsable basándose en los datos del paciente, observaciones y otros factores clínicos, incluyendo por ejemplo la talla, el área superficial corporal, la edad, el sexo del paciente, el parvovirus particular etc. que va a administrarse, el momento y la vía de administración, el tipo y las características del tumor, la salud general del paciente, y otras terapias farmacológicas a las que esté sometido el paciente.

55 Si el parvovirus H1 (H1PV) según la invención comprende partículas virales infecciosas con capacidad para penetrar a través de la barrera hematoencefálica, puede realizarse el tratamiento o al menos iniciarse mediante inyección intravenosa del agente terapéutico viral, es decir, el virus H1. Una vía de administración preferida es la administración intratumoral o, en el caso de tumores cerebrales, intracraneal o intracerebral.

60 Como otra técnica de administración específica, el H1PV puede administrarse al paciente desde una fuente implantada en el paciente. Por ejemplo, un catéter, por ejemplo, de silicona u otro material biocompatible, puede conectarse a un pequeño reservorio subcutáneo (reservorio de Rickham) instalado en el paciente durante la extirpación del tumor o mediante un procedimiento independiente, para permitir que la composición parvoterapéutica se inyecte de manera local en diversos momentos sin intervención quirúrgica adicional. El parvovirus también puede inyectarse en el tumor mediante técnicas quirúrgicas estereotácticas o mediante técnicas de direccionamiento mediante neuronavegación.

65 También puede realizarse la administración de H1PV mediante infusión continua de partículas virales o fluidos que

contienen partículas virales a través de catéteres implantados a bajas velocidades de flujo usando sistemas de bomba adecuados, por ejemplo, bombas de infusión peristálticas o bombas de administración potenciada por convección (CED, *convection enhanced delivery*).

5 Como aún otro método de administración del H1PV es a partir de un dispositivo implantado construido y dispuesto para dispensar el agente parvoterapéutico al tejido tumoral deseado. Por ejemplo, pueden emplearse obleas que se han impregnado con parvovirus H-1PV, en las que la oblea se une a los bordes de la cavidad de resección al término de la extirpación quirúrgica del tumor. Pueden emplearse múltiples obleas en una intervención terapéutica de ese tipo. Pueden inyectarse células que producen activamente el agente parvoterapéutico, por ejemplo, parvovirus H1, en el tumor, o en la cavidad tumoral tras la extirpación del tumor.

15 La terapia según la invención es útil para la prevención de la recidiva de tumores, en particular tumores cerebrales y tumores de páncreas y puede mejorar, por tanto, significativamente el pronóstico de dichas enfermedades. El aumento de la respuesta antitumoral mediante infección con parvovirus oncolíticos combina la citotoxicidad directa y específica de este virus frente a células tumorales (pero no para células sanas) con una actividad antitumoral secundaria y a largo plazo basada en la inducción de inmunidad específica de tumor.

20 En una realización preferida de la presente invención, el parvovirus H1 se utiliza en la prevención de la recidiva de tumores cerebrales tales como glioma, meduloblastoma y meningioma. Gliomas preferidos son glioblastomas humanos malignos. Sin embargo, la terapia según la presente invención es, en principio, aplicable a cualquier tumor que pueda infectarse con el agente parvoterapéutico, por ejemplo, parvovirus H-1PV. Tales tumores comprenden tumores de páncreas, tumores de próstata, tumores de pulmón, tumores renales, hepatoma, linfoma, tumores de mama, neuroblastoma, tumores de colon y melanoma.

25 El término "H1PV" tal como se usa en el presente documento comprende virus de tipo natural, derivados competentes para la replicación modificados de los mismos, por ejemplo virus con brazos de CpG, así como virus no replicantes o competentes para la replicación relacionados o vectores basados en tales virus o derivados. Los parvovirus, derivados, etc. así como células adecuadas que pueden usarse para producir activamente dichos parvovirus y que son útiles para terapia, pueden determinarse fácilmente dentro de los conocimientos de la técnica basándose en la divulgación en el presente documento, sin un esfuerzo empírico excesivo.

30 Los pacientes que pueden tratarse mediante H1PV según la invención incluyen seres humanos así como animales no humanos. Los ejemplos de estos últimos incluyen, sin limitación, animales tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros y gatos.

35 Finalmente, la presente invención también se refiere al uso de parvovirus H-1 (H-1PV) para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención de la recidiva de un tumor. El tratamiento usando un agente parvoterapéutico puede combinarse con clases adicionales de terapia, por ejemplo, quimioterapia usando, por ejemplo, un agente quimioterápico como gemcitabina, radioterapia o inmunoterapia.

40 Los siguientes ejemplos explican la invención en más detalle.

Ejemplo 1

45 Materiales y métodos

(A) Líneas celulares

50 Se hicieron crecer las líneas celulares de glioblastoma de rata RG-2 en DMEM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) complementado con FCS al 10% (Biocrom KG, Berlín, Alemania) y antibióticos al 1% (penicilina, estreptomina; Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe, Alemania) en una atmósfera humidificada con el 5% de CO₂ a 37°C. Se sometieron a tripsinización células RG-2 con crecimiento exponencial que iban a inyectarse en cerebros de rata y se centrifugaron (1000 rpm/10 min) y se resuspendió el sedimento en DMEM sin complementos.

55 (B) Irradiación de células RG-2

Antes del cocultivo de células RG-2 con linfocitos, se irradiaron las células con 3000 cGy, una dosis que pudo detener la proliferación celular.

60 (C) Producción e infección de parvovirus H-1 (H-1PV)

65 Se amplificó H-1PV en células NBK humanas y se purificó en gradientes de iodixanol tal como se describió anteriormente (Faisst *et al.*, J Virol 69 (1995), 4538-43). Se tituló H-1PV en células indicadoras NBK mediante ensayo de placas de lisis y se usaron adicionalmente a multiplicidades de infecciones (MOI) expresadas en unidades formadoras de placas (ufp) por célula.

(D) Ensayo de estimulación *in vitro*

Se usó esta prueba para someter a ensayo la activación específica de linfocitos mediante el cocultivo con antígenos tumorales. Se recogieron células LN de ganglios linfáticos drenantes mediante ruptura mecánica del ganglio linfático con un émbolo de jeringa y filtración de los desechos a través de una malla. Se usó solución salina tamponada con fosfato (PBS) complementada con albúmina sérica bovina al 0,1% (BSA; Sigma Chemical Co, St Louis, MO) para todas las manipulaciones *in vitro* de los linfocitos. Se sembraron células LN a $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en una placa de fondo redondo de 96 pocillos y se cultivaron adicionalmente en medio RPMI 1640 complementado con suero de ternero fetal al 10%, glutamina 2 mmol/l, penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50 µg/ml, Hepes 25 mM y 2-mercaptoetanol 0,05 mmol/l. Se incubaron los cultivos en medio RPMI completo a 37°C y el 7% de CO₂ durante 48 horas y se añadió 1 µCi de [³H]TdR/pocillo a cada pocillo. A las 72 horas, se recogieron las células sobre filtros de fibra de vidrio (Wallac Oy, Turku, Finlandia) con un aparato Harvester 96 (TomTec, Orange, CT) y se contaron en un lector 1205 Beta-Plate (Wallac, Gaithersburg, MD). Se expresaron los resultados como las CPM medias ± la desviación estándar (D.E.) de cultivos por cuadruplicado.

(E) Experimentos en animales

Se llevaron a cabo todos los experimentos en animales según las directrices institucionales y estatales.

(F) Implantación intracerebral de células tumorales

Se usaron 8 ratas Wistar hembra (Charles River, Sulzfeld, Alemania) que se trataron satisfactoriamente con parvovirus H-1PV entre 6 y 12 meses antes del experimento de reexposición (5 ratas habían recibido tratamiento intratumoral, tres ratas habían recibido tratamiento intravenoso). Se anestesiaron ratas consanguíneas Wistar hembra con isoflurano (dosis inicial al 2,5%, de mantenimiento al 1,6%) y se montaron en un marco estereotáctico. Tras una incisión lineal en el cuero cabelludo, se realizó un trepanado de 0,5 mm a 2 mm a la derecha de la línea media y a 1 mm de manera anterior con respecto a la sutura coronal. Se introdujo de manera estereotáctica la aguja de una jeringa Hamilton de 10 µl a través del trepanado en el lóbulo frontal a una profundidad de 5 mm por debajo del nivel de la duramadre, y se inyectaron células de glioma RG-2 (1000000 células en un volumen de 5 µl) a lo largo de 5 min. Se retiró la aguja lentamente, y se selló el trepanado con cera ósea.

30 Ejemplo 2

Reexposición de ratas Wistar tratadas satisfactoriamente con células tumorales RG-2

Un total de 7 ratas se habían tratado satisfactoriamente con H-1PV con remisión completa de gliomas intracraneales. De estas 7 ratas, 4 ratas habían recibido tratamiento intracerebral (i.c.) y 3 ratas habían recibido tratamiento intravenoso (i.v.). En ratas tratadas por vía i.v., se demostró la respuesta inmunitaria humoral intacta mediante la formación de anticuerpos neutralizantes (tabla 1). Tras un periodo de observación de 6 meses sin nuevo crecimiento de gliomas, se reexpusieron las ratas a inyección intracerebral de 100.000 células tumorales RG-2. A 2 animales control se les inyectó el mismo número de células tumorales. 0/7 animales reexpuestos desarrollaron gliomas RG-2, en cambio, 2/2 animales control murieron por la formación de tumor en el día 14 y 15 tras la inyección de células tumorales. El periodo de seguimiento para los animales reexpuestos supervivientes fue >3 meses, IRM no mostró crecimiento tumoral en ninguna de las ratas reexpuestas (tabla 2 y figura 1).

Tabla 1

	Títulos de anticuerpos de animales tratados por vía i.v.		
	N.º de animal		
	712 i.v.	722 i.v.	735 i.v.
Días tras el tratamiento con H-1PV			
0	0	0	0
2			640
3		0	
4			640
5	20	0	
7	320	80	2560
10			5120
11		640	
13			2560

14			
15		320	
18			
21	10240	2560	

Tabla 2

Datos de los animales reexpuestos			
animal	tratamiento	Supervivencia tras la reexposición (días)	Tumor en IRM tras la reexposición
712	i.v.	> 90	ninguno
735	i.v.	> 90	ninguno
703	i.v.	> 90	ninguno
62	i.c.	> 90	ninguno
100	i.c.	> 90	ninguno
308	i.c.	> 90	ninguno
378	i.c.	> 90	ninguno

Ejemplo 3

5 **Detección de células inmunes específicas de tumor tras la reexposición tumoral en animales tras la terapia con parvovirus H-1PV satisfactoria**

10 La incubación de linfocitos de ganglios linfáticos drenantes de animales que se trataron satisfactoriamente con H-1PV 6 meses antes del experimento de reexposición conduce a un fuerte aumento en la activación linfocítica por células RG-2. Este efecto específico de tumor pudo detectarse cuando se usaron como antígeno células RG-2 irradiadas o células RG-2 tras tratamiento de congelación/descongelación. Los recuentos absolutos fueron mayores tras la incubación de linfocitos con células RG-2 irradiadas que con células RG-2 tratadas con congelación/descongelación (figura 2a). Sin embargo, el aumento relativo en la actividad específica de linfocitos en comparación con controles fue mayor tras el tratamiento de congelación/descongelación de células de glioma RG-2 (figura 2b).

Ejemplo 4

20 **Papel de las células T en la supresión de gliomas tras el tratamiento de animales con una única dosis intratumoral de H-1PV**

25 Se sometió a prueba la reducción temporal de células CD8 en ratas Wistar que portaban glioma RG2 para determinar su efecto sobre el destino de gliomas establecidos tras una única inyección intratumoral de H-1PV. Se observó la regresión completa de la masa del glioma en animales sin reducción en estas condiciones. En cambio, cuando se bloquearon células T positivas para CD8 mediante inyección i.p. de anticuerpos específicos, la infección por H-1PV no pudo provocar la supresión tumoral en ratas con reducción. Sin embargo, cuando estos animales que portaban tumor e infectados se reconstituyeron posteriormente con células T positivas para CD8 (cese de la inyección de anticuerpos anti-CD8), tuvo lugar la remisión tumoral completa en ausencia de ninguna inyección de H-1PV adicional. De manera importante, en ausencia del tratamiento con H-1PV, la mera presencia de células T no fue suficiente para la recuperación, puesto que no se ha observado la regresión tumoral espontánea en animales que portaban glioma en las condiciones experimentales. A partir de estos datos, puede concluirse que la activación de una respuesta antitumoral del huésped de células T mediante infección por parvovirus H-1PV es esencial para la terapia basada en H-1PV satisfactoria de gliomas.

35 **Ejemplo 5**

Tratamiento de cáncer de páncreas con H-1PV

40 Se transfirieron esplenocitos de ratas con tumores de páncreas tratados con H-1PV a receptores no tratados previamente que portaban el mismo tipo de tumor. Se esperaba que las células inmunes transferidas protegieran pasiva (linfocitos citotóxicos) o activamente (células presentadoras de antígenos) a los receptores frente al desarrollo de tumores. En efecto, la transferencia adoptiva desde donantes tratados con H-1PV provocó casi la duplicación de la mediana del tiempo de supervivencia en estos animales, en comparación con receptores control que recibieron esplenocitos de ratas con tumores no tratados.

Modelo tumoral

Se realizaron todos los procedimientos quirúrgicos y de obtención de imágenes con anestesia en aerosol. Se usaron ratas Lewis inmunocompetentes macho (Janvier, Le Genest Saint Isle, Francia) que pesaban 180-200 g para la implantación de carcinoma de páncreas. Se preparó una suspensión de 5×10^6 células en 200 μ l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) a partir de tumores subcutáneos formados por células HA-RPC implantadas, y se inyectaron en el parénquima pancreático. Se confinó la progresión tumoral a la cola pancreática durante las 3 primeras semanas tras la implantación, conduciendo a la invasión de ganglios linfáticos durante la cuarta semana. Aparecieron metástasis hepáticas tras 5-6 semanas, y se produjo la muerte debida a metástasis de pulmón a las semanas 6-9.

Transferencia adoptiva

Se extirparon los bazo intactos y se desmenuzaron en PBS usando una técnica estéril. Se obtuvo una suspensión monocelular triturando los bazo con el émbolo encima de un filtro seguido por centrifugación a 1000 rpm durante 15 minutos. Se suspendieron los esplenocitos en RPMI 1640 complementaron y se contaron en un hemocitómetro en azul tripano para garantizar la viabilidad. La viabilidad promedio era >90%. Se inyectaron esplenocitos aislados de ratas que portaban tumor tratadas con PBS o H-1PV en las ratas receptoras que portaban tumor por vía intravenosa y por vía intraperitoneal (en total 1×10^7 células/animal) en animales anestesiados.

Resultados

Se evaluaron las características inmunomoduladoras de la infección por H-1PV de tumores de páncreas usando transferencia adoptiva de células inmunes derivadas de los bazo de animales tratados con H-1PV. Las ratas recibieron una inyección intratumoral de H-1PV dos semanas después del inicio del tumor en el páncreas (figura 3A). Tres semanas después, en el punto en el que aparecieron anticuerpos neutralizantes antivirales, indicativo de una reacción inmunitaria en curso y que conduce al aclaramiento de H-1PV de tejidos periféricos (datos no mostrados), se recogieron los bazo de los animales y se usaron para la transferencia de células a animales receptores no tratados previamente que portaban tumores de páncreas de tres semanas. Los esplenocitos que se derivaron de donantes tratados con H-1PV podían proteger a los animales receptores, lo que condujo a un retraso del crecimiento tumoral y una prolongación significativa ($p < 0,01$) de la supervivencia (152 frente a 90 días) en comparación con células de donantes control. Tres semanas tras la transferencia, se evaluaron los sueros de receptores mediante un ensayo de protección de citotoxicidad para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra H-1PV. No se observó una elevación de los títulos de anticuerpos, lo que indicó que no se habían transferido virus junto con los esplenocitos (datos no mostrados). Esto excluyó la posibilidad de que pudiera haber participado algún efecto oncolítico mediado por H-1PV en el efecto antitumoral observado en animales receptores.

De este modo, en cáncer de páncreas, como en el modelo de hepatoma usado previamente, H-1PV tiene efectos inmunoestimuladores que pueden sensibilizar el sistema inmunitario para que reaccione frente a tumores. Los experimentos de transferencia adoptiva mencionados anteriormente muestran claramente que el sistema inmunitario de donantes tratados con virus puede proteger a animales no tratados previamente que portaban la misma entidad tumoral.

REIVINDICACIONES

1. Parvovirus para su uso en un método para prevenir la recidiva de un tumor, en el que dicho parvovirus es H1 (H1PV).
5
2. Parvovirus para su uso según la reivindicación 1, en el que dicho tumor es un tumor cerebral o tumor de páncreas.
3. Parvovirus para su uso según la reivindicación 2, en el que dicho tumor cerebral es glioma, meduloblastoma o meningioma.
10
4. Parvovirus para su uso según la reivindicación 3, en el que dicho glioma es un glioblastoma humano maligno.
5. Parvovirus para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho parvovirus se administra mediante administración intravenosa (i.v.), intratumoral, intracraneal o intracerebral.
15
6. Uso de H1PV según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención de la recidiva de un tumor.

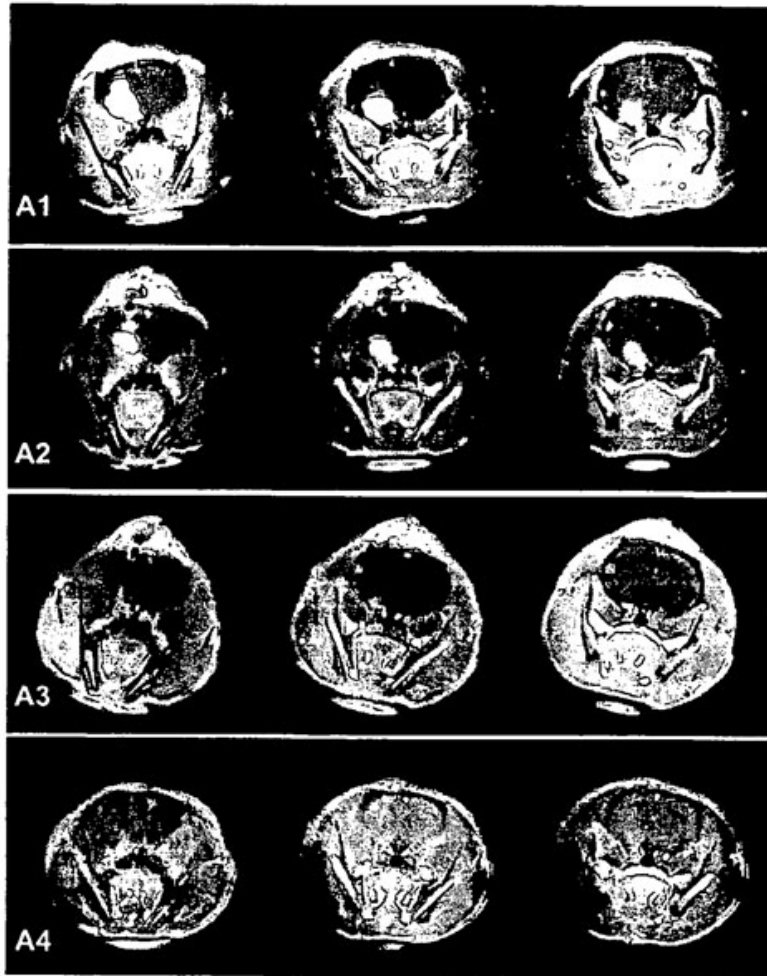


Figura 1

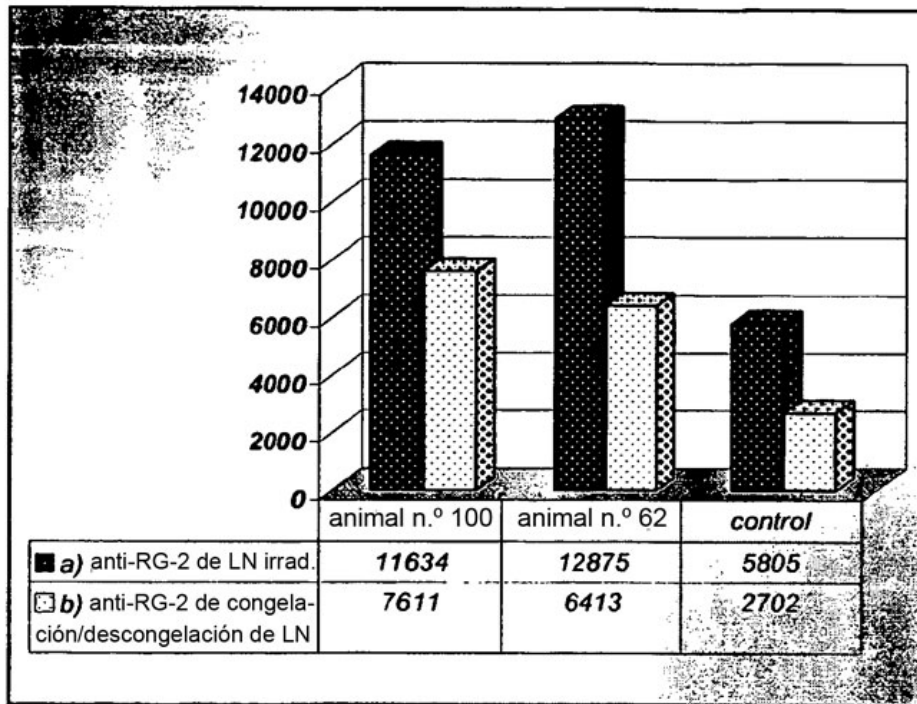


Figura 2A

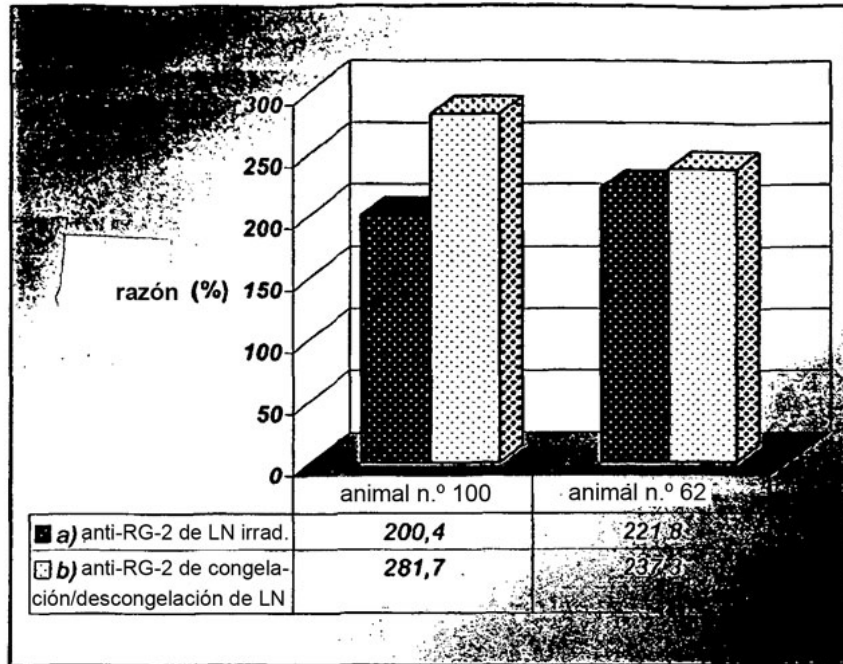
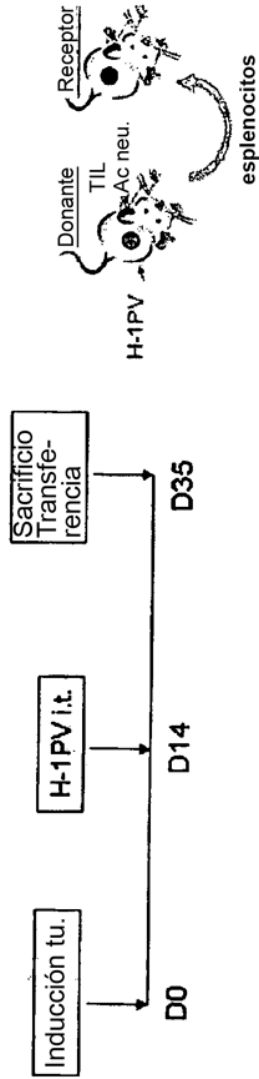


Figura 2B

A



B

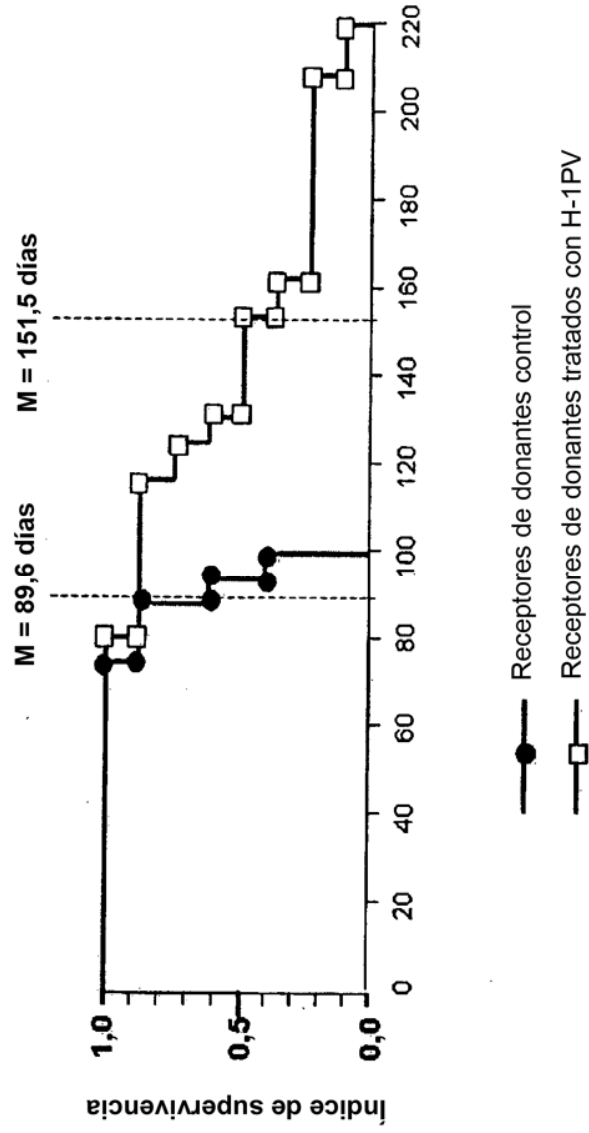


FIG. 3