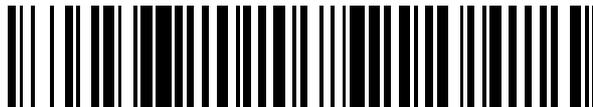


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 518 116**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76** (2006.01)

**A61K 31/165** (2006.01)

**A61K 31/19** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2011 E 11714685 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 2547349**

54 Título: **Terapia contra el cáncer con un parvovirus combinado con un inhibidor de HDAC**

30 Prioridad:

**17.03.2010 EP 10002829**

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

**04.11.2014**

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM  
(100.0%)**

**Im Neuenheimer Feld 280  
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**MARCHINI, ANTONIO;  
ROMMELAERE, JEAN;  
EL-ANDALOUSSI, NAZIM;  
HRISTOV, GEORGI y  
LI, JUNWEI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 518 116 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Terapia contra el cáncer con un parvovirus combinado con un inhibidor de HDAC

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden (a) un parvovirus y (b) un inhibidor de la histona-desacetilasa (HDACI, por sus siglas en inglés) y el uso de dicha composición para el tratamiento del carcinoma cervicouterino o carcinoma pancreático.

El carcinoma cervicouterino es la segunda neoplasia maligna más frecuente en mujeres a nivel mundial y es responsable de más 270 000 muertes y de 500 000 nuevos casos cada año. Ciertos tipos de virus de los papilomas humanos (HPV, por sus siglas en inglés), denominados tipos de alto riesgo (p. ej., los tipos 16 y 18), son los agentes causantes de la carcinogénesis cervicouterina. Dos oncogenes víricos de los HPV de alto riesgo, E6 y E7, son responsables de la conversión maligna de la célula y su expresión continua está asociada con la inactivación de las rutas de muerte celular que activan normalmente los agentes genotóxicos o ligandos solubles inductores de la muerte. El tratamiento convencional por radioterapia, quimioterapia y cirugía es a día de hoy en gran medida ineficaz contra los carcinomas asociados a HPV y se necesitan urgentemente nuevas estrategias terapéuticas. El reciente lanzamiento de vacunas profilácticas, a pesar de proporcionar la esperanza de conseguir una prevención eficaz de la infección mediante la vacunación, requerirá varias décadas antes de traducirse en un descenso de la incidencia del cáncer cervicouterino.

El adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, por sus siglas en inglés) es una de las neoplasias malignas gastrointestinales más letales. El PDAC es la cuarta causa más frecuente de mortalidad relacionada con el cáncer en Norteamérica, la sexta en Europa y la quinta en RU. La enfermedad es muy resistente a los tratamientos disponibles en la actualidad. La resección quirúrgica proporciona la mejor posibilidad de supervivencia a largo plazo, pero únicamente es practicable en una minoría de pacientes y no está exenta de riesgos. En la enfermedad avanzada, donde la cirugía no es una opción, la quimioterapia entra en juego, utilizando en concreto gemcitabina o 5-FU (5-fluorouracilo), aunque los efectos son todavía modestos y siempre acompañados por una toxicidad general elevada. La gemcitabina ha sido aprobada por la FDA como terapia de elección para los pacientes con cáncer pancreático localmente avanzado o metastásico. Este fármaco es un análogo de desoxicitidina dependiente del ciclo celular de la clase de antimetabolitos, que es transportado al interior de las células mediante transportadores de nucleósidos equilibrativos humanos (hENT, por sus siglas en inglés) y es fosforilado en su forma trifosfato activa por la desoxicitidina-cinasa (dCK, por sus siglas en inglés). Una preocupación importante en la terapia con gemcitabina reside en el desarrollo de resistencia hacia este agente quimioterapéutico. Esta resistencia puede deberse al importe/fosforilación reducidos del fármaco y/o a la salida potenciada desde la célula mediante los miembros de la familia de transportadores ABC MDR y MRP1/2, lo que conlleva un agotamiento de la reserva intracelular de gemcitabina activada. Se están explorando combinaciones de gemcitabina con otras pautas terapéuticas para mejorar el efecto anticanceroso erradicando las variantes resistentes o para permitir la reducción de las dosis quimioterapéuticas y de la toxicidad subsiguiente.

Varios miembros del grupo parvovirus de los roedores, incluido el parvovirus de rata H-1 PV y el virus diminuto de los ratones (MVM, por sus siglas en inglés), su homólogo en ratones, han atraído una gran atención por su potencial anticanceroso. Efectivamente, estos virus no son patógenos en humanos y poseen propiedades oncolíticas y oncosupresoras intrínsecas. Además, el hecho de que la población humana no se haya visto expuesta previamente a la infección por H-1 PV indica que el problema de una inmunidad antivírica preexistente, una razón común para la baja eficacia de los tratamientos basados en virus, no existe en el caso de H-1 PV. Por lo tanto, el sistema inmunitario del paciente no elimina el virus inmediatamente tras la administración, lo que aumenta el tiempo de eficacia del tratamiento.

El genoma del parvovirus está constituido por una única hebra de ADN de aproximadamente 5100 bases que contiene dos promotores, P4 y P38, que regulan la expresión de las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y de la cápside (VP1 y VP2) respectivamente. Los parvovirus de roedores han demostrado que activan varias rutas de muerte celular. En particular, dependiendo del tipo celular y de las condiciones de crecimiento, H-1 PV es capaz de inducir la apoptosis, necrosis o muerte celular dependiente de la catepsina B.

La replicación y oncolisis de los parvovirus están estimuladas por cambios celulares asociados con la transformación neoplásica. Se podría mostrar que H-1 PV presenta de manera natural actividad antineoplásica contra líneas celulares derivadas de carcinomas cervicouterinos humanos tanto en cultivos celulares como en modelos en animales. Estos resultados subrayan el potencial terapéutico de H-1 PV contra los carcinomas. Sin embargo, debería señalarse también que los parvovirus fallan, en algunos casos, en erradicar el tumor completamente o en detener su crecimiento. A menudo se desarrollan células resistentes, lo que lleva a la posibilidad de recidiva del tumor. Además, aunque el virus se replica preferentemente en células tumorales, también es capaz de entrar en células normales, lo que reduce la cantidad de virus adecuada para el tratamiento. Por lo tanto, supondría una gran ventaja el reforzar su actividad oncolítica y el encontrar otros agentes que pudieran actuar de manera concertada con los parvovirus en la destrucción de las células cancerosas.

En resumen, desafortunadamente, los virus oncolíticos estudiados en seres humanos cuando se utilizan en los protocolos de monoterapia han mostrado un éxito limitado en la inducción por sí solos de la erradicación completa y permanente del tumor. Una fracción de las células tumorales escapa al tratamiento vírico lo que incrementa el riesgo de una recidiva del tumor. El hecho de que se hayan aislado parvovirus de los tumores en crecimiento indica que estos virus solos no son siempre lo suficientemente potentes para detener el crecimiento o provocar la regresión completa de las lesiones neoplásicas. Por lo tanto, es sumamente deseable encontrar fármacos que puedan actuar con el virus para destruir eficazmente las células cancerosas sin efectos secundarios dañinos adicionales. Estos agentes podrían mejorar el resultado del tratamiento al (i) destruir por otros medios las células resistentes a parvovirus, (ii) convertir las células cancerosas en más susceptibles a la citotoxicidad de parvovirus, para permitir de esta manera la reducción de la dosis vírica necesaria para lograr la eficacia y/o (iii) hacer posible que los fármacos se utilicen en concentraciones más bajas, mejorando de esta manera su seguridad.

El documento WO 2007/07165 divulga una terapia combinada que conlleva un virus tóxico selectivo para el tumor y uno o más agentes terapéuticos que reducen la formación de vasos sanguíneos tumorales o dañan el sistema vascular tumoral, para utilizar en el tratamiento de las neoplasias (remítase a la página 1, líneas 2-6). El virus selectivo para el tumor puede ser un parvovirus (remítase a la página 8, líneas 20-26) y el agente terapéutico puede ser un inhibidor de la histona-desacetilasa (remítase a la página 14, línea 9-página 15, línea 14 y las reivindicaciones 3, 6 y 7). Entre las neoplasias que se van a tratar se divulga el cáncer de páncreas (remítase a la página 6, líneas 19-24).

Por lo tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar medios para una terapia a base de parvovirus mejorada.

De acuerdo con la invención, esto se logra mediante la materia definida en las reivindicaciones. La presente invención se basa en los hallazgos del solicitante de que mediante el tratamiento combinado con un parvovirus y un inhibidor de la histona-desacetilasa (HDACI) se puede mejorar de manera sinérgica la eficacia terapéutica. Los HDACI son un grupo estructuralmente heterogéneo de moléculas. Se observó que dosis subletales de HDACI, concretamente butirato de sodio (NaB), tricostatina A (TSA), ácido valproico (VPA) y el ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA) potencian la actividad antineoplásica de los parvovirus de manera sinérgica en distintos tipos de cáncer, p. ej., células HeLa (que contienen ADN de HPV-18), CaSki y SiHa (que contienen ADN de HPV-16) derivadas de carcinoma cervicouterino y células de carcinoma cervicouterino primario así como en líneas celulares Capan-1 y AsPC-1 derivadas de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC). Los HDACI reactivan la transcripción de múltiples genes que están silenciados en el cáncer y por este medio son capaces de inducir la inhibición del crecimiento, la diferenciación y la apoptosis de las células cancerosas. Las células de carcinoma cervicouterino tratadas con HDACI así como las células de adenocarcinoma ductal pancreático experimentan apoptosis mediante un proceso mediado por E2F que se correlaciona con la fuerte inducción de las isoformas proapoptóticas de p73, gen diana de E2F, pero que no depende de la reactivación de p53. Además, la proteína no estructural (NS-1, por sus siglas en inglés) de parvovirus es acetilada por los HDACI y, por consiguiente, se mejoran notablemente la replicación y las actividades de destrucción de células cancerosas del parvovirus.

Por lo tanto, los parvovirus tienen un enorme potencial terapéutico para tratar diferentes tipos de cáncer, p. ej., tumores de próstata, carcinomas broncopulmonares, tumores renales, tumores hepáticos, linfoma, tumores de mama, hepatoma o melanoma y, en particular, tumores cerebrales, carcinoma cervicouterino o carcinoma pancreático, combinados con un inhibidor de HDCA, preferentemente en un protocolo de dos pasos.

En resumen, se podría demostrar que el parvovirus H-1 PV y los inhibidores de HDAC actúan sinérgicamente en la destrucción de los distintos tipos de cáncer, p. ej., líneas celulares derivadas de carcinoma cervicouterino (HeLa, CaSki, SiHa) y células de tumores primarios así como líneas celulares derivadas de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) (AsPC-1 y Capan-1). La cooperación entre los dos agentes tiene lugar utilizando dosis subletales de inhibidores de HDAC, lo que reduce el riesgo de efectos secundarios no deseados para los tejidos normales. La terapia combinada podría permitir el uso de H-1 PV (y otros parvovirus oncolíticos) con concentraciones menores sin afectar su eficacia.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: H-1 PV y los inhibidores de HDAC destruyen las líneas celulares derivadas de carcinoma cervicouterino en un modo sinérgico

Se infectaron células HeLa (línea celular que contenía ADN de HPV 18) y SiHa (que contenía ADN de HPV 16) con H-1 PV con las MOI (siglas en inglés de multiplicidad de infección) indicadas y se cultivaron posteriormente en presencia (barra negra) o ausencia (barra gris) de HDACI. Los HDACI estudiados fueron NaB (1 mM), TSA (50 nM) y SAHA (50 nM) para células HeLa y NaB (2 mM), TSA (100 nM) y SAHA (500 nM) para células SiHa. Tras la incubación se evaluó la lisis celular midiendo la liberación de lactato-deshidrogenasa (LDH). Los valores por encima de barras (expresados en %) indican los efectos sinérgicos obtenidos. Se muestran los resultados de un experimento representativo.

Figura 2: H-1 PV y los inhibidores de HDAC destruyen las células derivadas de carcinoma cervicouterino en un modo sinérgico

5 Se infectaron células de cáncer cervicouterino primario con H-1 PV con las MOI indicadas y se cultivaron posteriormente en presencia (barra negra) o ausencia (barra gris) de HDACI. Los HDACI estudiados fueron NaB (1 mM), TSA (100 nM) y SAHA (200 nM). Tras la incubación, se evaluó la lisis celular midiendo la liberación de lactato-deshidrogenasa (LDH). Los valores (%) indican los efectos sinérgicos obtenidos. Se muestran los resultados de un experimento representativo.

Figura 3: Los inhibidores de HDAC potencian la citotoxicidad de H-1 PV

10 **(A)** Células HeLa sometidas a un tratamiento simulado o infectadas con H-1 PV (MOI: 1 pfu/célula) se cultivaron en presencia o ausencia de NaB (1 mM). Tras 48 h, se recogieron las células para el análisis de la población celular sub-G1 por citometría de flujo. El tratamiento conjunto con NaB incrementa la población celular sub-G1 inducida por H-1 PV, lo que indica que el compuesto actúa sinérgicamente con el virus en la destrucción de las células cancerosas.

15 **(B)** Se presenta un resumen de tres experimentos independientes, llevado a cabo cada uno por triplicado. Las barras representan valores promedio +/-desviaciones estándar relativas. Se indican pruebas de la t de Student emparejadas, P < 0.05 (\*\*\*)

Figura 4: El tratamiento conjunto H-1 PV/inhibidores de HDAC aumenta la fracción de células que experimenta apoptosis

20 El aumento de la población celular sub-G1, marcada como una línea azul e indicada por números, indica que los inhibidores de HDAC potencian las propiedades citotóxicas de H-1 PV.

Figura 5: H-1 PV y los inhibidores de HDAC destruyen líneas celulares derivadas de carcinoma cervicouterino en un modo sinérgico

25 Las líneas celulares derivadas de cáncer cervicouterino (HeLa, CaSki, SiHa) y cultivos celulares de cáncer cervicouterino no establecido (CxCa) se infectaron con H-1 PV con las MOI (pfu/célula) indicadas y se cultivaron durante 72 h en presencia (barras grises) o ausencia (barras blancas) de VPA (1 mM). Tras la incubación, se evaluó la lisis celular midiendo la liberación de lactato-deshidrogenasa (LDH). Las barras con sombreado diagonal de la parte derecha de cada gráfica muestran la dosis mínima de H-1 PV capaz de destruir un 90-100% de las células cancerosas como monoterapia. Se obtuvo una citotoxicidad similar con MOI víricas inferiores, combinando H-1 PV con una dosis subletal de VPA (1 mM), lo que indica que ambos agentes cooperan de manera sinérgica para destruir las células cancerosas.

Figura 6: El tratamiento conjunto H-1 PV/VPA conlleva una regresión completa de tumores establecidos HeLa

35 Se inyectaron subcutáneamente  $5 \times 10^6$  células HeLa en el costado derecho de ratas hembra atímicas de 5 semanas de edad. Tras 5 días (cuando el tumor alcanzó un volumen de 200-400 mm<sup>3</sup>), los animales portadores del tumor se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos (n=8). Los grupos se trataron con DMEM (control), VPA (100 mg/kg), H-LPV (dosis total de 1.25 10<sup>9</sup> pfu/animal, fraccionada en cuatro administraciones intratumorales 5, 9, 16 y 23 días después del implante) o con una combinación de ambos agentes. Se midió el volumen tumoral con un compás calibrador digital en los días indicados y se calculó de acuerdo con la fórmula: volumen (cm<sup>3</sup>) = L x W x H (longitud L, cm; anchura W, cm; altura H, cm). Los datos mostrados representan los valores promedios con las barras de desviación estándar.

Figura 7: H-1 PV y los inhibidores de HDAC destruyen células derivadas de PDAC en un modo sinérgico

40 Las células APC-1 y Capan-1 se colocaron en placas de 96 pocillos (2000 células/pocillo). Tras 16 horas, se infectaron las células con H-1 PV con las MOI indicadas y se cultivaron en presencia o ausencia de VPA durante 72 horas más. Se midió la lisis celular mediante el ensayo de la LDH.

45 La presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene (a) un parvovirus y (b) un inhibidor de HDCA, preferentemente como entidades separadas, p. ej., en recipientes separados.

50 Preferentemente, en dicha composición farmacéutica el parvovirus y el inhibidor de HDCA están presentes en una dosis eficaz y combinados con un portador farmacéuticamente aceptable. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se pretende que englobe cualquier portador que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos y que sea atóxico para el paciente al cual se le administra. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Tales portadores se pueden formular mediante métodos convencionales y se pueden administrar al sujeto en

una dosis eficaz.

5 El término "parvovirus" tal como se emplea en la presente comprende al tipo natural o a derivados de estos modificados competentes para la replicación así como virus o vectores relacionados basados en tales virus o derivados. Los parvovirus, derivados, etc., adecuados, así como las células que se pueden utilizar para producir activamente dichos parvovirus y que son útiles para la terapia, pueden ser determinados fácilmente por los expertos en la técnica basándose en la divulgación de la presente, sin un esfuerzo empírico excesivo.

10 Una "dosis eficaz" se refiere a las cantidades de los principios activos que son suficientes para afectar el curso y la gravedad de la enfermedad, y que conduce a la reducción o remisión de tal patología. Se puede determinar una "dosis eficaz" útil para tratar y/o prevenir estas enfermedades o trastornos utilizando métodos conocidos por el experto en la técnica (remítase, por ejemplo, a Fingl *et al.*, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, Goodman y Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., Nueva York, págs. 1-46 ((1975)).

Los portadores compatibles farmacéuticamente adicionales pueden incluir geles, materiales de matrices bioabsorbibles, elementos de implante que contienen el agente terapéutico o cualquier otro vehículo, medio o material o materiales de suministro o dispensación adecuados.

15 La administración de los compuestos se puede efectuar de maneras diferentes, p. ej., por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La vía de administración, por supuesto, depende del tipo de terapia y del tipo de compuestos contenidos en la composición farmacéutica. Una vía de administración preferida es la administración intravenosa. La pauta posológica del parvovirus y del HDACI es fácilmente determinable por los expertos en la técnica, por el médico especialista en función de los datos del paciente, observaciones y otros factores clínicos, incluidos, por ejemplo, el tamaño del paciente, el área superficial corporal, edad, sexo, HDACI, parvovirus, etc. concretos que se van a administrar, el tiempo y vía de administración, el tipo y características del tumor, la salud general del paciente y otras terapias farmacológicas a las que el paciente esté siendo sometido.

25 Si el parvovirus en la combinación de HDACI de acuerdo con la invención comprende partículas víricas infecciosas con la capacidad de penetrar a través de la barrera hematoencefálica, el tratamiento se puede realizar, o al menos iniciar, por inyección intravenosa del virus H1. Una vía de administración preferida es la administración intratumoral.

30 Debido a que el tratamiento intravenoso a largo plazo es susceptible de volverse ineficaz como resultado de la formación de anticuerpos que neutralizan el virus, se pueden adoptar diferentes modos de administración tras una pauta inicial de administración vírica intravenosa, o las diferentes técnicas de administración de este tipo, p. ej., administración del virus por vía intracraneal o intratumoral, se pueden utilizar como alternativa a lo largo de la duración completa del tratamiento parvovírico.

35 Como otra técnica de administración específica, el parvovirus (virus, vector y/o agente celular) se puede administrar al paciente a partir de una fuente implantada en el paciente. Por ejemplo, un catéter, p. ej., de silicona o de otro material biocompatible, se puede conectar a un depósito subcutáneo pequeño (depósito de Rickham) instalado en el paciente durante la extirpación del tumor o mediante un procedimiento separado, para permitir que la composición del parvovirus se inyecte localmente en diversos momentos sin una intervención quirúrgica adicional. El parvovirus o los vectores derivados también se pueden inyectar en el tumor mediante técnicas quirúrgicas estereotácticas o mediante técnicas de direccionamiento por neuronavegación.

40 La administración del parvovirus también se puede realizar por la infusión continua de partículas víricas o fluidos que contienen partículas víricas mediante catéteres implantados con caudales bajos utilizando sistemas de bombeo adecuados, p. ej., bombas de infusión peristáltica o bombas de suministro potenciado por convección (CED, por sus siglas en inglés).

45 Otro método más de administración de la composición de parvovirus es a partir de un artículo implantado construido y dispuesto para dispensar el parvovirus al tejido canceroso deseado. Por ejemplo, se pueden emplear obleas que han sido impregnadas con el parvovirus H1, donde la oblea se une a los bordes de la cavidad de resección al concluir la extirpación quirúrgica del tumor. Se pueden emplear múltiples obleas en una intervención terapéutica de este tipo. Las células que producen activamente el parvovirus H1, o vectores H1, se pueden inyectar en el tumor o en la cavidad tumoral tras la extirpación del tumor.

50 La terapia combinada de acuerdo con la invención es útil para el tratamiento terapéutico del carcinoma cervicouterino o carcinoma pancreático y puede mejorar significativamente el pronóstico de dichas enfermedades. La infección por el parvovirus H1 da lugar a la destrucción de células tumorales pero no daña las células normales.

La presente invención también se refiere a la utilización de (a) un parvovirus y (b) un HDACI para la preparación de una o más composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer donde, preferentemente, (a) y (b) se administren secuencialmente (o por separado).

El parvovirus de la composición incluye el parvovirus H1 (H-1 PV).

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

- 5 Los HDACI útiles para los propósitos de la presente invención incluyen todos los HDACI que son eficaces para inhibir el crecimiento tumoral. La administración de un HDACI se puede lograr de diversas maneras (remítase a lo ya descrito) incluida la sistémica por las rutas parenteral y enteral. Preferentemente, el parvovirus y los HDACI se administran como compuestos separados. El periodo temporal preferido entre la administración del HDACI y el parvovirus está comprendido entre -30 (administración de HDACI antes del tratamiento con el parvovirus) y 60 días tras el tratamiento con el parvovirus. También es posible el tratamiento concomitante con los dos agentes.

Algunos ejemplos particulares de HDACI adecuados para la terapia combinada incluyen butirato de sodio (NaB), tricostatina A (TSA), ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA) o ácido valproico (VPA).

Los siguientes ejemplos explican la invención más detalladamente.

### Ejemplo 1

#### 15 **Materiales y métodos**

##### (A) Inhibidores de HDAC

Se adquirieron butirato de sodio (NaB) y tricostatina A (TSA) de SIGMA-Aldrich (Munich, Alemania), ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA) y ácido valproico (VPA) de Alexis Biochemicals (Enzo Life Science, Lörrach, Alemania).

##### 20 (B) Ensayo de la lactato-deshidrogenasa (LDH)

Se midió la citotoxicidad del parvovirus evaluando la liberación de lactato deshidrogenasa en el medio utilizando el kit CytoTox 96 de Promega (Mannheim, Alemania). El día anterior a la infección, se sembraron 2000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos en 50 µL de medio de cultivo. Tras 24 horas, se infectaron las células con 50 µL de medio exento de suero que contenía H-1 PV o tratadas con inhibidores de HDAC en 7 réplicas por condición. El día de la medida, 3 de los 7 pocillos se incubaron durante 30 minutos con tampón de lisis para estimar la liberación de LDH máxima en las condiciones de un 100% de lisis. Posteriormente, se centrifugó la placa y se mezclaron 50 µL del sobrenadante con la mezcla de sustrato. La enzima LDH cataliza una reacción colorimétrica que es indicativa de la cantidad de enzima liberada en el medio. Después de 30 minutos, se detuvo la reacción y se analizó utilizando el lector de Elisa MultiScan a 492 nm.

##### 30 (C) Determinación de la población celular sub-G1

Las células infectadas por virus o tratadas con fármacos se recolectaron de las placas de cultivo con una solución de tripsina-EDTA al 0.05%, se recogieron en un tubo Falcon y a continuación se lavaron dos veces con PBS. A continuación se resuspendieron las células en 260 µL de PBS, se fijaron con 700 µL de etanol al 100% frío añadido gota a gota a la vez que se sometía a agitación vorticial y se almacenaron a 4 °C durante toda la noche. Tras dos lavados en PBS, se resuspendió el sedimento celular en una solución de PBS que contenía 20 µg/mL de ribonucleasa y 10 µg/mL de yoduro de propidio (Sigma). La suspensión celular se filtró y se analizó por citometría de flujo FACSsort (Becton-Dickinson). Se adquirieron como mínimo 20 000 eventos y a continuación se analizaron con el software CellQuest (Becton-Dickinson) (San José, California).

### Ejemplo 2

#### 40 **El parvovirus H-1 PV y los inhibidores de HDAC actúan sinérgicamente en la destrucción de líneas celulares derivadas del carcinoma cervicouterino (HeLa, CaSki, SiHa) y células de tumor primario.**

Se observó que dosis subletales de HDACI, en concreto butirato de sodio (NaB), tricostatina A (TSA) y ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA), aumentan la citotoxicidad del PV en un modo sinérgico en células HeLa (que contienen ADN de HPV-18), CaSki y SiHa (que contienen ADN de HPV-16) derivadas de carcinoma cervicouterino y células de carcinoma cervicouterino primario.

La Figura 1 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de LDH en células HeLa y SiHa utilizando diversas multiplicidades de infección (MOI=pfu/célula) de H-1 PV combinado con los tres HDACI estudiados. También se obtuvieron resultados similares en células CaSki (datos que no se muestran) y células de cáncer cervicouterino primario (CxCa) (Figura 2) donde se logró un efecto sinérgico de hasta un 94% que dio como resultado aproximadamente un 80% de muerte celular combinando SAHA (200 nM) con H-1 PV (MOI=100 pfu/célula). Los efectos sinérgicos en la destrucción de las células cancerosas mencionados anteriormente, también se observaron

utilizando un parvovirus combinado con otro HDACI, concretamente VPA (datos que no se muestran).

El efecto sinérgico en la destrucción de células cancerosas entre H-1 PV y HDACI se confirmó por citometría de flujo en células HeLa y CxCa, analizando la fracción de células que tenían un contenido de ADN inferior a 2N (población celular sub-G1), como un marcador de la fragmentación de ADN, un rasgo común de las células que están experimentando apoptosis. La Figura 3 muestra los resultados obtenidos en las células HeLa. La infección por H-1 PV se asocia con un incremento de la población celular sub-G1 apoptótica que aumenta aún más por la adición de NaB (desde un 18% hasta un 32%).

La Figura 4 muestra los resultados obtenidos en células de cáncer cervicouterino primario. El H-1 PV y los inhibidores de HDAC actúan sinérgicamente destruyendo las células CxCa como lo demuestra el incremento de la apoptosis (desde un 26 hasta un 37%). Las condiciones, en las que las combinaciones H-1 PV/HDACI proporcionan el efecto sinérgico más elevado destruyendo células derivadas de carcinoma cervicouterino se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1**

<b>Condiciones en las que las combinaciones de H-1 PV y HDACI muestran el efecto sinérgico más elevado destruyendo células de cáncer cervicouterino</b>									
Línea celular	H-1 PV + [NaB]			H-1 PV + [TSA]			H-1 PV + [SAHA]		
	MOI	mM	% de sinergia (% de células destruidas)	MOI	nM	% de sinergia (% de células destruidas)	MOI	nM	% de sinergia (% de células destruidas)
HeLa	5	1	<b>71 (97)</b>	10	20	<b>50 (80)</b>	10	100	<b>26 (60)</b>
SiHa	25	2	<b>68 (80)</b>	50	20	<b>75 (83)</b>	10	100	<b>38 (57)</b>
Células de cáncer cervicouterino primario	100	1	<b>87 (85)</b>	50	100	<b>47(52)</b>	100	200	<b>94 (72)</b>

### 15 Ejemplo 3

**El parvovirus H-1 PV y los inhibidores de HDAC actúan sinérgicamente *in vitro* (a) e *in vivo* (b) destruyendo líneas celulares derivadas de carcinoma cervicouterino y células de tumor primario.**

#### (a) Sinergia *in vitro*

Se ha observado que dosis subletales de HDACI, en concreto el ácido valproico (VPA), butirato de sodio (NaB), tricostatina A (TSA) y ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA) potencian la citotoxicidad de H-1 PV en un modo sinérgico en líneas celulares de carcinoma cervicouterino HeLa, que contienen ADN de HPV-18, CaSki y SiHa, transformadas con HPV-16 y cultivos celulares de carcinoma cervicouterino con pocos pasajes.

La Fig. 5 muestra los resultados obtenidos en los ensayos LDH (que mide la liberación de lactato-deshidrogenasa en el medio, como un indicador de la lisis celular) utilizando H-1 PV con varias multiplicidades de infección (MOI, expresado como unidades formadoras de placas [pfu] por célula) combinado con VPA 1 mM. Cuando se aplicó solo, VPA no tuvo ningún efecto significativo en el crecimiento celular con la concentración utilizada, mientras que el parvovirus destruyó todos los cultivos celulares de carcinoma cervicouterino de manera dependiente de la MOI. La dosis subletal de VPA estimuló la destrucción celular inducida por parvovirus en un modo sinérgico, que aumentó en hasta un 50-100%. La confirmación de estos resultados se obtuvo por determinación citométrica de flujo de la población celular sub-G1 apoptótica (datos que no se muestran). También se obtuvieron resultados similares combinando H-1 PV con NaB, TSA o SaHa (Tabla 2).

**Tabla 2: Condiciones en las que combinaciones de H-1 PV y HDACI muestran el efecto sinérgico más elevado en la destrucción de células de cáncer cervicouterino**

Líneas celulares	[NaB] +H-1 PV			[SAHA] +H-1 PV			[TSA] +H-1 PV		
	mM	MOI	Sinergia*	nM	MOI	Sinergia*	nM	MOI	Sinergia*
HeLa	1	1	78 (51)	50	3	63 (34)	50	3	46 (51)
	1	3	68 (79)	50	5	45 (37)	50	5	37 (56)
	1	5	71 (97)	50	10	27 (60)	50	10	45 (88)
CaSki	0.5	2	43 (54)	100	5	43 (61)	50	2	75 (45)
	0.5	5	48 (77)	100	10	39 (85)	50	5	77 (73)
	0.5	10	49 (91)	100	20	49 (100)	50	10	82 (96)
SiHa	2	10	94 (59)	N.A.			100	10	46 (40)
	2	25	48 (67)	N.A.			100	25	92 (76)
	2	50	47 (89)	N.A.			100	50	89 (82)
CxCa	1	10	50 (55)	200	10	105 (26)	100	10	107 (28)
	1	25	61 (70)	200	25	90 (53)	100	25	77 (36)
	1	50	111 (100)	200	50	95 (73)	100	50	47 (53)

\*: La sinergia se expresa como el % del incremento en la destrucción inducida por el virus. Los números entre paréntesis indican los porcentajes de células destruidas. Con la concentración utilizada, los HDACI no tuvieron efecto, o este fue pequeño, sobre el crecimiento de las células tumorales cuando se aplicaron solos.

**(b) Sinergia *in vivo***

5 Con el fin de validar la sinergia H-1 PV/HDACI *in vivo*, se utilizó un modelo en ratas atímicas de un xenoinjerto de células HeLa. H-1 PV en solitario fue capaz de lograr la regresión completa de los tumores establecidos cuando se administró una dosis vírica elevada ( $2.5 \times 10^9$  pfu/animal, fraccionado en 4 administraciones intratumorales con intervalos semanales (datos que no se muestran). Con una dosis vírica más baja de  $1.25 \times 10^9$  (pfu/animal, fraccionado como anteriormente) se ralentizó el crecimiento tumoral pero no tuvo lugar la regresión, lo que indica que se requiere una dosis crítica del virus con el fin de tener un efecto terapéutico. Con la concentración de 100 mg/kg, VPA fracasó a la hora de afectar el crecimiento tumoral que fue comparable al de los controles con un tratamiento simulado (se sacrificaron las ratas cuando los tumores alcanzaron el tamaño tolerable máximo de  $5 \text{ cm}^3$ ). En cambio, el crecimiento tumoral se redujo de modo impresionante y finalmente se detuvo con un tamaño de 1-3.2  $\text{cm}^3$ , si los animales inyectados con la dosis vírica más baja se trataron conjuntamente con VPA. Más notablemente, esta estabilización estuvo seguida por una rápida regresión que condujo a una desaparición completa de los tumores preexistentes en todos los animales tratados de manera conjunta (Fig. 6). No se documentó la pérdida de peso ni otros efectos secundarios adversos en ninguno de los animales tratados. Estos resultados refuerzan adicionalmente el concepto de combinar H-1 PV y HDACI para el tratamiento de los carcinomas cervicouterinos.

**20 Ejemplo 4**

**El parvovirus H-1 PV y los inhibidores de HDAC actúan sinérgicamente para destruir las líneas celulares derivadas de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) (APC-1 y Capan-1).**

**Sinergia *in vitro***

25 Se observó que dosis subletales de HDACI, en concreto ácido valproico (VPA), incrementan la citotoxicidad del PV en un modo sinérgico en las líneas celulares AP-1 y Capan-1 derivadas de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC).

30 La Figura 7 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de LDH en líneas celulares AP-1 y Capan-1, de las que se ha descrito que son bastante resistentes a la citotoxicidad del PV (Dempe *et al.*, 2010). Se sembraron las células en placas de 96 pocillos y a continuación se infectaron con diversas concentraciones de H-1 PV en presencia o ausencia del HDACI ácido valproico (VPA). Tras 72 horas se midió la lisis celular mediante el ensayo de LDH. Tal como se muestra en la Fig. 7, con las concentraciones utilizadas para los experimentos, el tratamiento único con VPA no tuvo efecto sobre el crecimiento de ninguna de las dos líneas celulares. Coherente con los resultados anteriores, H-1 PV mostró únicamente una citotoxicidad limitada contra estos cultivos, incluso tras la infección con

multiplicidades elevadas. VPA potenció de manera impresionante la actividad citotóxica de H-1 PV. Estos resultados apoyan adicionalmente la combinación de los HDACI y H-1 PV para el tratamiento de diversas entidades tumorales.

Lista de referencias:

- 5
- Dempe S, Stroh-Dege AY, Schwarz E, Rommelaere J, Dinsart C. (2010) SMAD4: a predictive marker of PDAC cell permissiveness for oncolytic infection with parvovirus H-1 PV. *Int J Cancer* 126: 2914-27.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Composición farmacéutica que contiene (a) un parvovirus H-1 (H-1 PV) y (b) un inhibidor de la histona-desacetilasa (HDACI) para su uso en un método para tratar el carcinoma cervicouterino o carcinoma pancreático.
- 5 2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene (a) un parvovirus H-1 (H-1 PV) y (b) un HDCAI como entidades separadas.
3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho HDACI es butirato de sodio (NaB), tricostatina A (TSA), ácido valproico (VPA) o ácido suberoilánilida hidroxámico (SAHA).
4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde (a) el parvovirus H-1 (H-1 PV) y (b) el HDACI se administran secuencialmente.
- 10 5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el parvovirus H-1 (H-1 PV) (a) se administra antes del HDACI (b).
6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho parvovirus H-1 (H-1 PV) se administra mediante administración intratumoral.
- 15 7. El uso de un parvovirus H-1 (H-1 PV) y un inhibidor de la histona-desacetilasa (HDACI) para la preparación de una o más composiciones para el tratamiento del carcinoma cervicouterino o carcinoma pancreático.

Figura 1

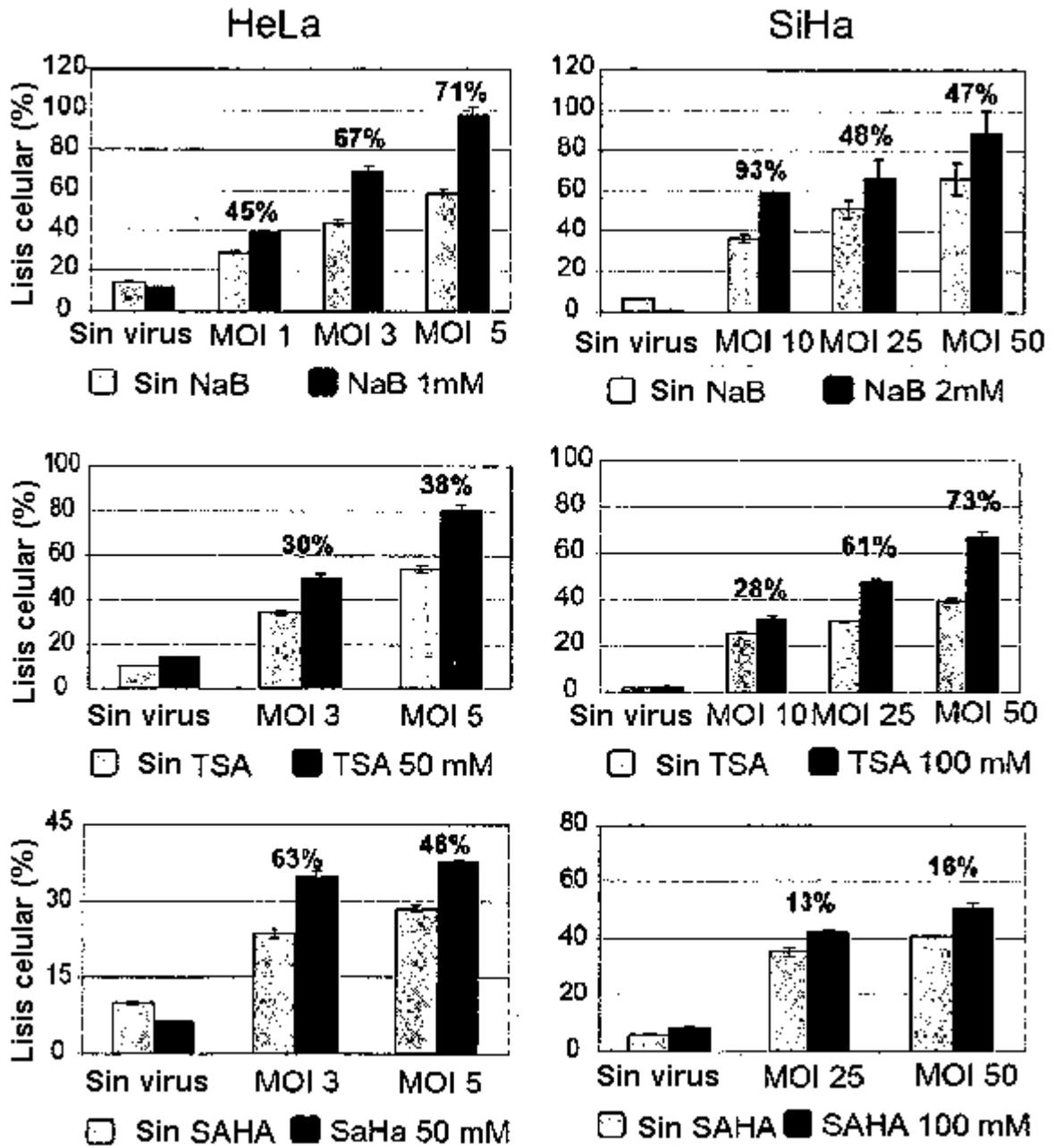


Figura 2

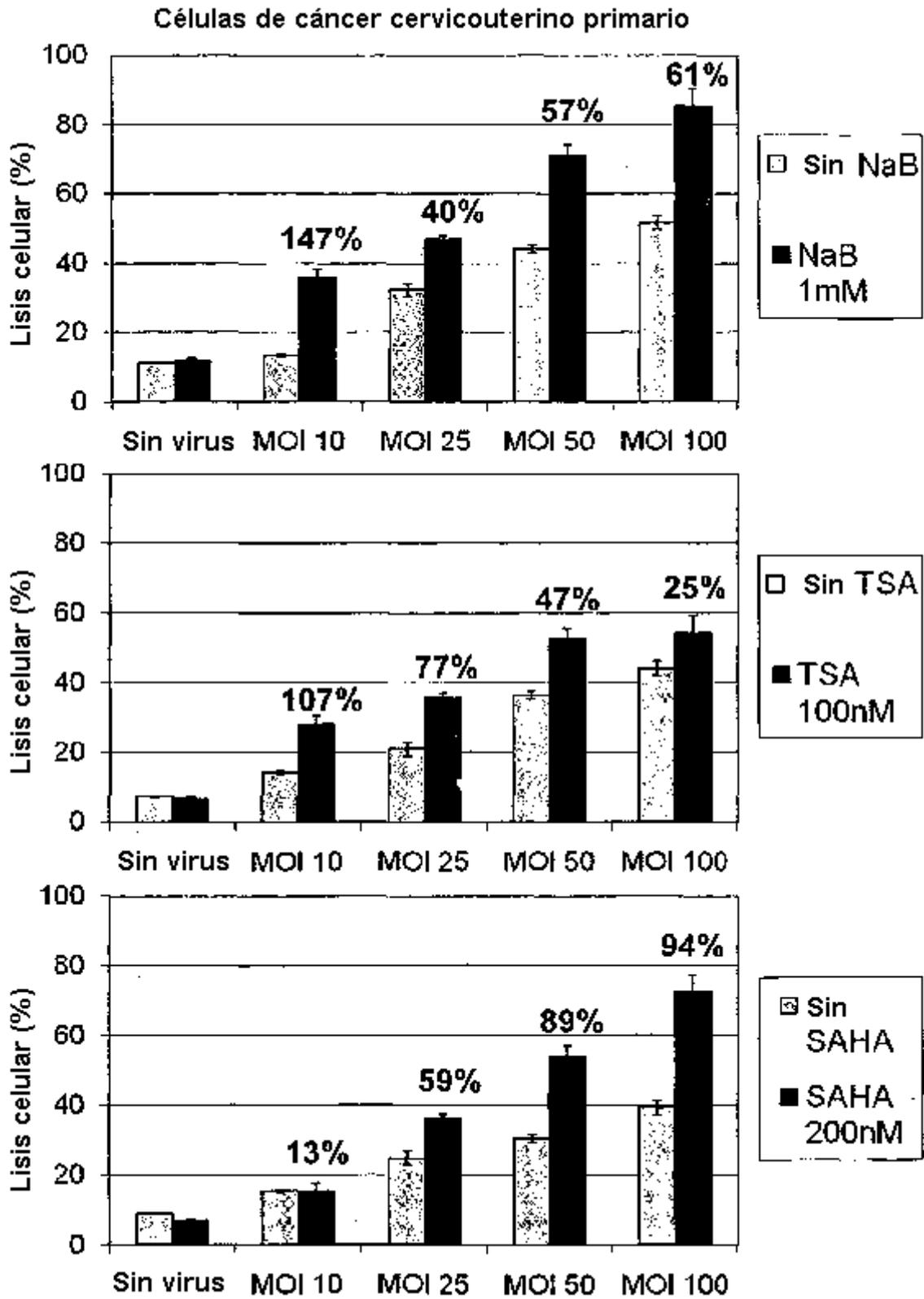


Figura 3

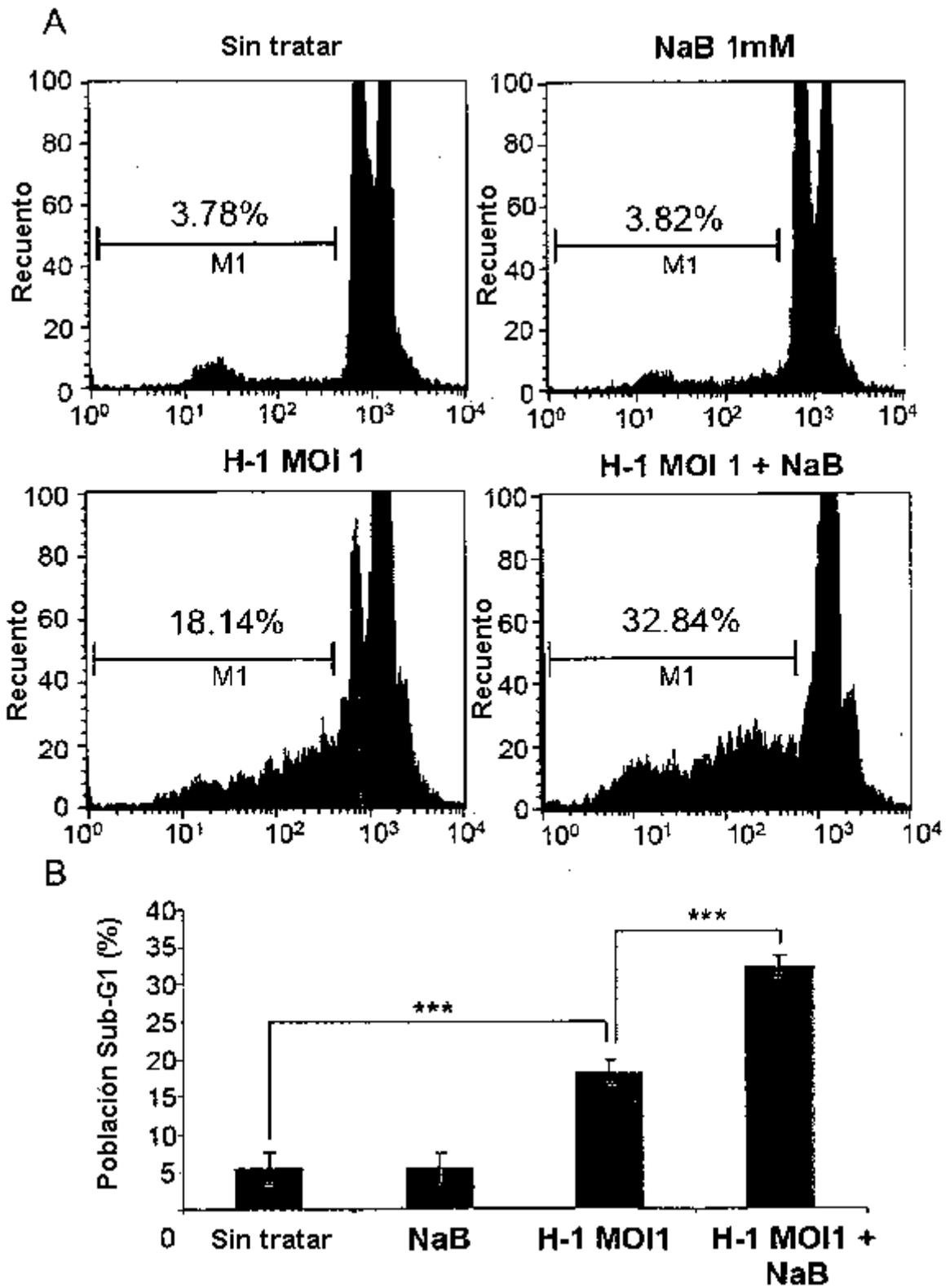


Figura 4

Población celular apoptótica Sub-G1: CxCa

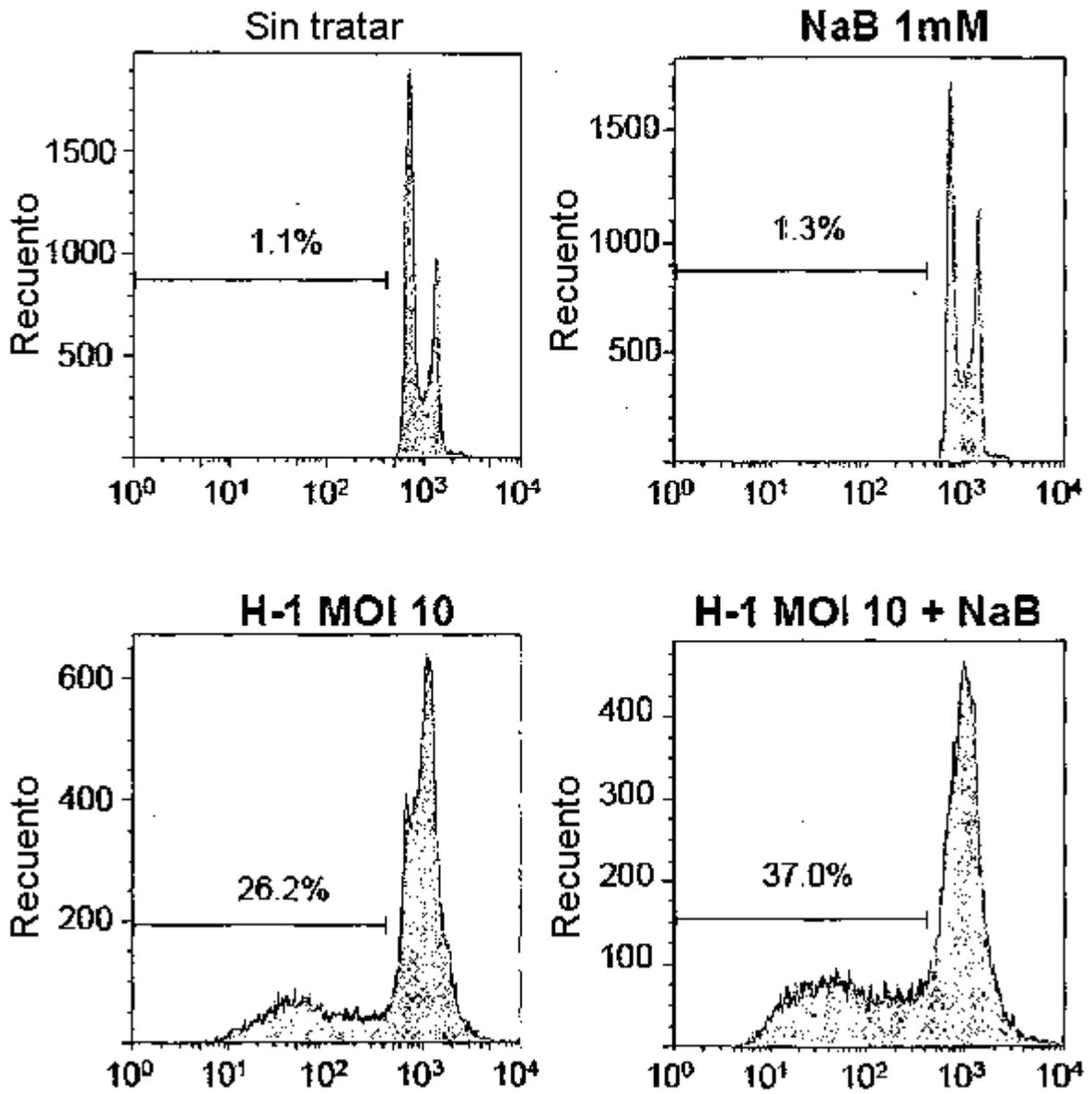


Figura 5

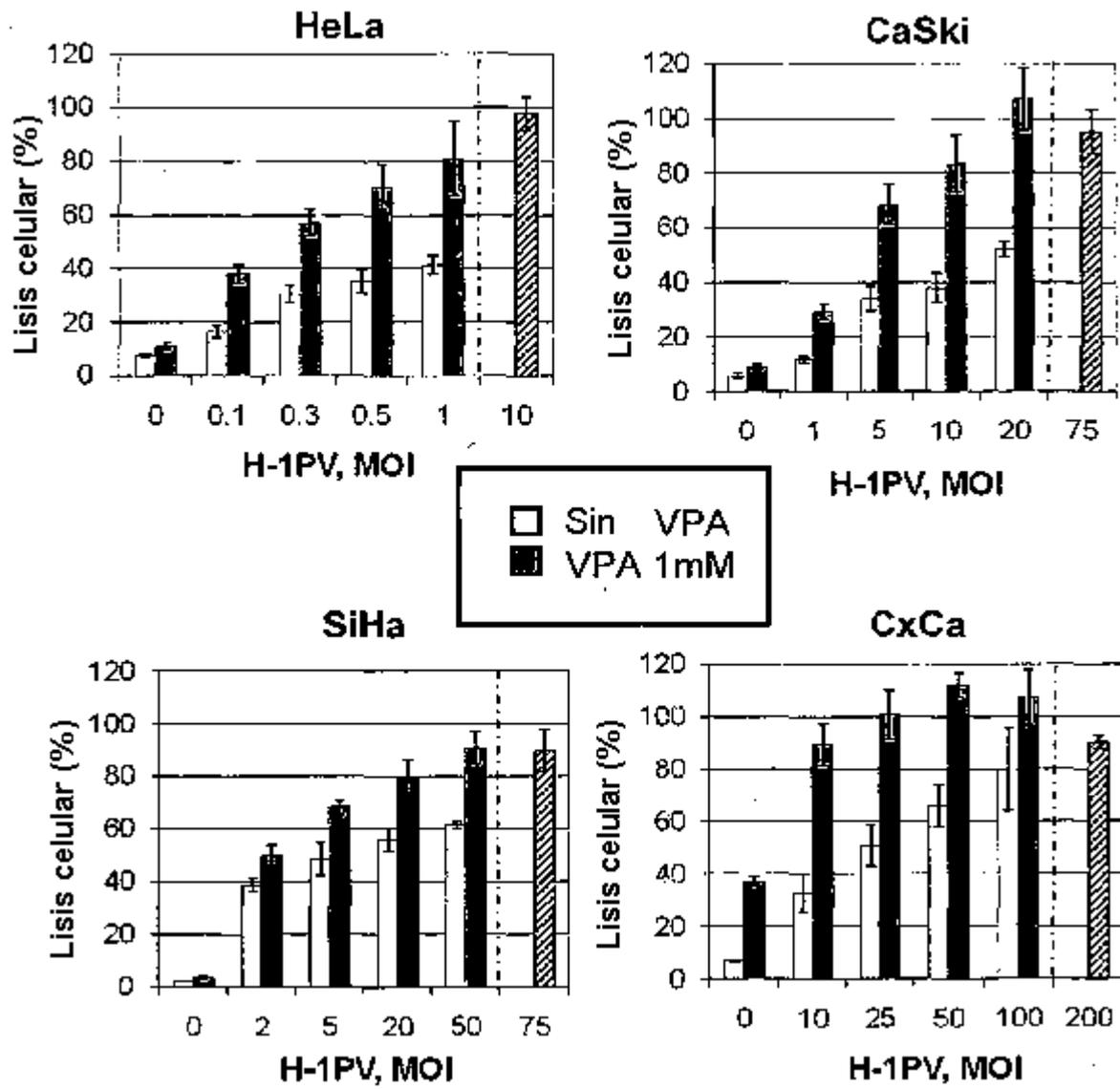


Figura 6

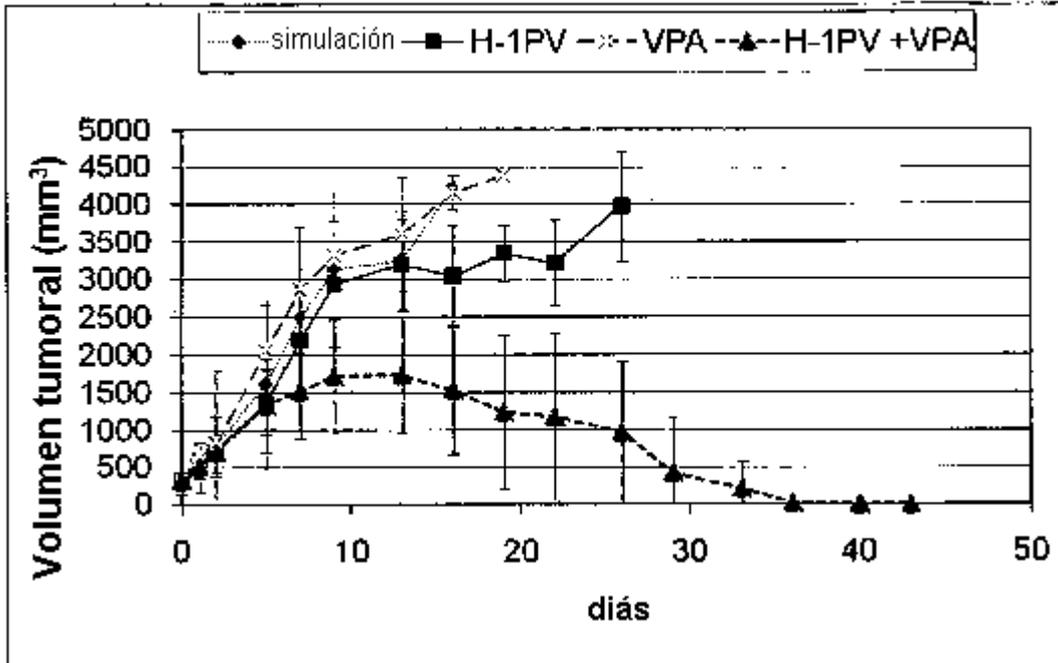


Figura 7

