

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 808**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76** (2015.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61P 13/08** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)  
**A61K 31/76** (2006.01)  
**A61K 9/19** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2009 E 09814609 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2345415**

54 Título: **Agente terapéutico/profiláctico para cáncer de próstata**

30 Prioridad:

**16.09.2008 JP 2008237102**

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

**31.03.2015**

73 Titular/es:

**GENOMIDEA INC. (100.0%)  
3-15, Edobori 1-chome, Nishi-ku, Osaka-shi  
Osaka 550-0002, JP**

72 Inventor/es:

**KANEDA, YASUFUMI;  
KAWAGUCHI, YOSHIFUMI y  
ITAI, TOSHIMITSU**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 532 808 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

Agente terapéutico/profiláctico para cáncer de próstata

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un nuevo producto farmacéutico que exhibe una acción antitumoral in vivo (para el tratamiento de cáncer). Más en detalle, la presente invención se refiere a un agente terapéutico/profiláctico para el tratamiento de cánceres prostáticos, que tienen una envoltura viral, particularmente la envoltura (denominada a veces en lo sucesivo HVJ-E) de virus Sendai inactivado (Hemagglutinating Virus of Japan, denominado en lo sucesivo a veces HVJ), como un ingrediente activo. La presente invención se refiere también a un agente terapéutico/profiláctico para melanoma que tiene la envoltura viral Sendai inactivada como único ingrediente activo.

**10 Antecedentes de la técnica**

Han sido desarrollados muchos métodos virales y métodos no virales con el fin de introducir un gen en células cultivadas y tejidos vivos para análisis funcionales de genes y terapia de genes (documentos no patentes 1 y 2). Para la introducción de un gen en una célula, generalmente es eficaz un método viral. Sin embargo, el método que usa un vector viral tiene un problema de seguridad debido a la posibilidad de la introducción de genes derivados de virus parentales y su expresión, inmunogenicidad, y la posibilidad de modificación de la estructura del genoma hospedante. Por otra parte, muchos de los métodos no virales que usan un liposoma y similar muestran una citotoxicidad inferior y una inmunogenicidad inferior que los métodos virales. Sin embargo, la eficacia de la introducción de genes en células cultivadas y tejidos vivos tiende a ser inferior que con los vectores virales.

20 El "virus Sendai" es un virus perteneciente al género Paramyxovirus en los Paramyxoviridae, que poseen acción de fusión celular. El virión de este virus tiene en su superficie una envoltura que contiene hemaglutinina y neuraminidasa, que exhibe polimorfismo con un diámetro de 150 a 300 nm. También el virus Sendai tiene un RNA de cadena menor de aproximadamente 15500 bases de longitud como genoma, tiene RNA-polimerasa, es inestable al calor, aglutina casi todos los tipos de eritrocitos y exhibe naturaleza hemolítica. Mediante la inactivación de este virus, se obtiene un vector de envoltura viral Sendai que ha resultado deficiente en replicación.

25 El HVJ indujo atención para fusionar células tumorales Ehrlich (documento no patente 3), y se ha emprendido un análisis de la actividad de fusión de membrana celular (en lo sucesivo actividad de fusión) y se ha estudiado su uso como un vector transgénico. Sin embargo, el HVJ tiene una elevada inmunogenicidad y se conoce que induce CTL, particularmente cuando se produce proteína NP en una gran cantidad (Cole G. A. et al. Journal of Immunology 158, 4301-4309, 1997). Además, se teme la inhibición de la síntesis de proteína por un hospedante. Por tanto, se concibió un método para preparar partículas fusionadas (HVJ-liposoma) fusionando un liposoma que incluye un gen o una proteína con HVJ inactivado mediante irradiación ultravioleta por adelantado, mediante el cual se hizo posible la introducción génica no invasiva en una célula u organismo vivo (documento de patente 1 y documentos no patentes 4 y 5).

35 Los presentes inventores desarrollaron previamente un nuevo vector de transfección híbrido combinando un virus que tiene una capacidad de suministrar eficazmente genes (altamente eficaz) y un vector no viral con citotoxicidad e inmunogenicidad (de baja toxicidad) y construyeron un liposoma viral formador de fusión que tiene una envoltura formadora de fusión derivada del virus hemaglutinante de Japón (HVJ; virus Sendai) (Kaneda, 1998; Kaneda et al., 1999). En este sistema de suministro, un liposoma de llenado de DNA es fusionado con un virus Sendai inactivado por UV para formar virus Sendai-liposoma (400 a 500 nm de ancho) que es un virus-liposoma formador de fusión. Una ventaja del sistema mediado por fusión consiste en que el DNA transfectado está protegido contra la lisis de endosomas y lisis de lisosomas en células receptoras. Por ejemplo, el DNA incorporado en el virus Sendai-liposoma puede ser suministrado de forma segura a células de mamíferos (documento de patente 2). Pueden ser introducidos también RNA, oligonucleótidos y fármacos en células in vitro e in vivo de forma eficaz. Además, los presentes inventores inventaron un vector de transfección que tiene un gen extraño incluido en el mismo liofilizando la envoltura viral Sendai o mezclando la misma con un tensioactivo, como un vector de transfección que posee una elevada actividad de transfección que está basada en una envoltura viral, que es seguro y estable y que hace posible la transfección a una amplia gama de tejidos biológicos (documento de patente 3). Es posible también introducir eficazmente una sustancia en el cerebro o el sistema nervioso central usando la envoltura viral Sendai (documento de patente 4). Además, los presentes inventores encontraron también un método en el que un agente de quimioterapia como un agente anticancerígeno es incluido en la envoltura viral Sendai y transferido a células o un organismo vivo y encontraron también que se obtiene un efecto adyuvante inmune (documento de patente 4, documento de patente 5, documento de patente 6).

55 De este modo, ha sido desarrollada una diversidad de métodos terapéuticos del cáncer. Los tratamientos de cánceres generales, particularmente tumores sólidos, incluyen un método en el que un fármaco eficaz es transferido al tejido canceroso para destruir las células cancerígenas. También, se ha desarrollado no solamente quimioterapia o terapia de modificación que implica administración de un agente de quimioterapia que consiste en un compuesto de bajo peso molecular, sino también una diversidad de terapias como radioterapia, inmunoterapia y terapia endocrina. Sin embargo, la presente situación sigue siendo tal que no se puede concluir que los tumores sólidos

sean enfermedades completamente readmisibles. Entre los tumores sólidos, los cánceres prostáticos, en particular, se desarrollan como células de la próstata que pierden su función de proliferación celular normal y se auto-propagan ordenadamente. En los últimos años, la incidencia y las tasas de mortalidad para los pacientes de cáncer prostático en Japón han aumentado constantemente.

5 El documento EP 1.731.609 se refiere a un método de transferencia génica que usa un vector de envoltura viral (por ejemplo, del virus Sendai) que hace posible una terapia génica más segura y más eficaz. El documento WO 2005/094878 expone una envoltura viral entendida como una membrana que queda después de separar RNA o DNA de un virus y se utiliza normalmente para la transfección de un gen, polinucleótido, oligonucleótido, plásmido y similar encapsulados en la misma. El documento JP 2007 020494 se dirige al uso de un vector viral para el uso del  
10 tratamiento de cáncer de próstata.

En el caso de un cáncer localizado en la próstata, está indicada una prostatectomía radical; sin embargo, en los últimos años, los pacientes con cánceres tempranos que se estimaban quirúrgicamente extirpables han crecido con la extensión de la selección que usa el marcador de antígeno específico de la próstata (PSA). Sin embargo, la frecuencia de la recurrencia después de una extirpación quirúrgica se informa que es generalmente de 20 a 57%,  
15 planteando un problema la recurrencia todavía elevada.

Generalmente, para casos recurrentes y cánceres prostáticos con avances apreciados fuera de la próstata, la irradiación por radiación tópica, terapia endocrina y similares se escogen como terapias de rescate, pero la probabilidad de obtener una curación radical es generalmente baja. Por tanto, se realiza una terapia neoadyuvante en la que se realiza una terapia endocrina antes de la cirugía, con la finalidad de aumentar la probabilidad de una extirpación completa, pero los resultados obtenidos no son satisfactorios.  
20

Particularmente en la terapia endocrina, a menudo surgen células de cáncer prostático que han adquirido refractoriedad hormonal, dando lugar a resultados terapéuticos escasos. Por esta razón, como la situación permanece, hay expectativas para el desarrollo de un método terapéutico de cáncer prostático más eficaz que sustituya la terapia endocrina preoperatoria y un método para tratar eficazmente el cáncer prostático refractario a hormonas.  
25

Referencias de la técnica anterior

Documentos patentes

Documento Patente 1: US-B-5.631.237

Documento Patente 2: WO 2001/057204

30 Documento Patente 3: JP-A-2002-065278

Documento Patente 4: WO 2005/095613

Documento Patente 5: WO 2004/039406

Documento Patente 6: WO 2005/094878

Documentos no Patentes

35 Documento no Patente 1: Mulligan, Science, 260, 926-932, 1993

Documento no Patente 2: Ledley, Human Gene Therapy, vol. 6, 1129-1144, 1995

Documento no Patente 3: Cole G. A. et al. Journal of Immunology 158, 4301-4309, 1997

Documento no Patente 4: Dzau et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 11421-11425, 1996

Documento no Patente 5: Kaneda et al., Molecular Medicine Today, 5, 298-303, 1999

40 **Sumario de la Invención**

Problemas a resolver mediante la invención

Es un problema para ser resuelto mediante la presente invención proporcionar un nuevo agente terapéutico/profiláctico y un método terapéutico/profiláctico para cánceres prostáticos. Más específicamente, proporcionar un agente terapéutico/profiláctico y un método terapéutico/profiláctico para cánceres prostáticos,  
45 particularmente, para cánceres prostáticos que se han hecho refractarios a hormonas debido a una terapia endocrina. Es otro problema para ser resuelto mediante la presente invención proporcionar un nuevo agente terapéutico/profiláctico para melanoma.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores realizaron investigaciones intensivas para resolver los problemas anteriormente descritos y encontraron que la propia envoltura viral Sendai induce apoptosis para células tumorales (células de cáncer prostático) hasta exhibir un efecto antitumoral, demostrando así que la propia envoltura viral Sendai puede ser utilizada como un agente terapéutico/profiláctico para cánceres protáticos. Los presentes inventores encontraron también que la propia envoltura viral Sendai puede ser utilizada como un agente terapéutico/profiláctico para melanoma. Consecuentemente, la presente invención se expresa en las reivindicaciones 1-3.

Se proporciona también un método para tratar/prevenir melanoma, que comprende administrar una cantidad eficaz de la envoltura viral Sendai (HVJ-E) como el único ingrediente activo para tratar/prevenir melanoma a un paciente de melanoma o una persona en riesgo de contraer melanoma;

una composición farmacéutica que comprende la envoltura viral Sendai (HVJ-E) como el único ingrediente activo para ser usado en el tratamiento/prevenición de melanoma;

un uso de una composición farmacéutica que comprende la envoltura viral Sendai (HVJ-E) como el único ingrediente activo para producir un agente terapéutico/profiláctico para melanoma, y similares.

Efecto de la invención

Se proporciona mediante la presente invención un nuevo agente terapéutico/profiláctico para cánceres prostáticos. El agente terapéutico/profiláctico de cáncer prostático proporcionado por la presente invención contiene una envoltura viral, particularmente la envoltura viral Sendai como un ingrediente activo del mismo. El agente terapéutico/profiláctico de la presente invención exhibe un excelente efecto terapéutico particularmente sobre cánceres prostáticos refractarios a hormonas.

En el tratamiento de cánceres prostáticos, están actualmente disponibles la selección PSA, extirpación quirúrgica, terapia endocrina, radioterapia y similares, pero el tratamiento radical del mismo continúa siendo un problema principal. Usando experimentos in vivo, la presente invención ha mostrado que la envoltura viral Sendai disminuye considerablemente un cáncer prostático cuando es administrada directamente al cáncer.

También se proporciona mediante la presente invención un nuevo agente terapéutico/profiláctico para melanoma. El agente terapéutico/profiláctico exhibe un efecto de regresión de melanoma a dosis bajas.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 presenta datos que muestran la capacidad de la envoltura viral Sendai para destruir células de cáncer prostático (célula de cáncer prostático no refractario a hormonas LNCap, células de cáncer prostático refractario a hormonas PC3 y DU145) o células epiteliales prostáticas humanas normales (PNT2). (A) muestra las tasas de supervivencia de células cáncer prostático o células epiteliales prostáticas humanas normales en comparación con testigos (EGy) frente al número de viriones de la envoltura viral Sendai (EGx); (B) muestra sus morfologías representativas (velocidad de aumento x40). Cada flecha indica una célula fusionada con la envoltura viral Sendai.

La Fig. 2 presenta datos que muestran la capacidad de la envoltura viral Sendai para adherirse a células de cáncer prostático refractario a hormonas (PC3, DU145), células de cáncer prostático no refractario a hormonas (células LNCap) o células epiteliales prostáticas humanas normales (PNT2). La envoltura viral Sendai marcada con PKH26 fue administrada a células de cáncer prostático refractario a hormonas, células de cáncer prostático no refractarias a hormonas o células epiteliales prostáticas normales humanas y se examinó si se producía la fusión celular (velocidad de aumento con focal x200). La tinción de DAPI indica un núcleo de célula.

La Fig. 3 presenta datos que muestran la capacidad de la envoltura viral Sendai para inducir apoptosis para células de cáncer prostático refractario a hormonas (PC3). Se muestran imágenes teñidas con TUNEL de células de cáncer prostático después de ser tratadas con la envoltura viral Sendai (MOI 10<sup>4</sup>) o cuando no son tratadas (testigos) (velocidad de aumento con focal x200). La tinción de DAPI indica un núcleo de célula.

La Fig. 4 presenta datos que muestran la capacidad potencial de la envoltura viral Sendai para inducir apoptosis para células de cáncer prostático refractario a hormonas PC3. (A) compara células de cáncer prostático refractario a hormonas positivas a anexina V entre un grupo de tratamiento de envoltura viral Sendai y un grupo sin tratamiento (testigo). (B) muestra la expresión de proteínas de caspasa en células tumorales a las 12 y 24 horas después del tratamiento con la envoltura viral Sendai.

La Fig. 5 presenta datos que muestran la capacidad potencial de la envoltura viral Sendai para inducir interferones tipo I a células de cáncer prostático refractario a hormonas PC3. La Fig. 5(A) es una representación gráfica que muestra cambios a lo largo del tiempo en las cantidades expresadas de interferones tipo I (INF- $\alpha$ ,  $\beta$ ) producidos por PC3 en el medio (EGy) frente al número de viriones de la envoltura viral Sendai (EGx). Los gráficos muestran datos estadísticamente tratados sobre los resultados de los tres ensayos. La Fig. 5(B) es una imagen de análisis por transferencia Western que muestra las acciones de la envoltura viral Sendai y un anticuerpo receptor anti-INF sobre

la expresión de RIG-I. Se uso  $\beta$ -actina como testigo interno.

La Fig. 6 presenta datos que muestran el mecanismo relativo a la inducción de apoptosis para células de cáncer prostático refractario a hormonas PC3 por la envoltura viral Sendai. (A) compara la expresión de pSTAT1 y proteínas de caspasa en células de cáncer prostático refractario a hormonas PC3 tratadas con la envoltura viral Sendai entre un grupo de pretratamiento de inhibidor JAK y un grupo sin tratamiento. Como testigo interno se usó  $\beta$ -actina. (B) muestra imágenes de análisis por transferencia Western que comparan la expresión de proteínas pSTAT1, caspasa-3 y caspasa-8 en células de cáncer prostático refractario a hormonas PC3 tratadas con la envoltura viral Sendai entre la presencia y ausencia de pretratamiento inhibidor JAK y pretratamiento de anticuerpos receptor anti-INF. Se usó  $\beta$ -actina como testigo interno. (C) compara células de cáncer prostático refractario a hormonas positivas a anexina V tratadas con la envoltura viral Sendai entre el grupo de pretratamiento de inhibidor JAK y el grupo sin tratamiento.

La Fig. 7 presenta datos que muestran la acción de disminución de células de cáncer prostático refractario a hormonas de la envoltura viral Sendai in vivo. (A) muestra que la administración directa de la envoltura viral Sendai a células de cáncer prostático refractario a hormonas trasplantadas a ratones SCID favorece la disminución de células de cáncer prostático refractario a hormonas. ■: grupo de administración de envoltura viral Sendai (5.000 HAU) (n=3); ●: grupo de administración de PBS (n=3). (B) muestra fotografías representativas de ratones SCID en el grupo de administración de PBS o el grupo de administración de envoltura viral Sendai a los 41 días después del trasplante de células de cáncer prostático refractario a hormonas. Estos descubrimientos demostraron que la envoltura viral Sendai exhibía un efecto supresor de tumores sobre las células de cáncer prostático refractario a hormonas trasplantadas a ratones SCID. (C) muestra que la administración directa de la envoltura viral Sendai a células de cáncer prostático refractario a hormonas trasplantadas a ratones SCID desprovistos de células NK con un anticuerpo GM-1 anti-acialo favorece la disminución de células de cáncer prostático refractario a hormonas. ■: grupo de administración de envoltura viral Sendai (5.000 HAU) (n=3); ●: grupo de administración de PBS (n=3); ▲: grupo de administración de envoltura viral Sendai (5.000 HAU) + anticuerpo GM-1 anti-acialo (n=4). Los datos estadísticos se expresan como media  $\pm$  s.e.m. Las comparaciones de grupo a grupo se realizaron mediante el ensayo de Student. Un nivel significativo de  $P < 0,01$  se estimó que indicaba un efecto.

La Fig. 8 es un dibujo que muestra el mecanismo relativo a la apoptosis a través de interferones para células de cáncer prostático refractario a hormonas mediante la envoltura viral Sendai.

La Fig. 9(A) muestra el efecto supresor del crecimiento tumoral de un total de 3 veces de administración de GEN0101 a intervalos de 4 días en un modelo de ratón de trasplante de una línea celular PC3 humana. (B) muestra los cambios a lo largo del tiempo en la velocidad de cambio de peso corporal después del comienzo de la administración de GEN0101 en el modelo de ratones de trasplante de la línea celular PC3 humana.

La Fig. 10(A) muestra el crecimiento tumoral que suprime el efecto de un total de 2 veces de administración GEN0101 a intervalos de 7 días en un modelo de ratón de trasplante de línea celular PC3 humana. (B) muestra los cambios a lo largo del tiempo en el ritmo de cambio de peso corporal en el modelo de ratón de trasplante de la línea celular PC3 humana después del comienzo de la administración de GEN0101.

La Fig. 11 muestra los cambios en el volumen tumoral en cada grupo después de la administración de HVJ-E en tumores. ♦<sup>A</sup>: Grupo A (grupo testigo de administración 3 veces), ♦<sup>B</sup>: Grupo B (grupo de 40 HAU de administración 3 veces), ♦<sup>C</sup>: Grupo C (grupo de 400 HAU de administración 3 veces), ■<sup>D</sup>: Grupo D (grupo testigo de administración 6 veces), ■<sup>E</sup>: Grupo E (grupo de 40 HAU de administración 6 veces), ■<sup>F</sup>: Grupo F (grupo de 400 HAU de administración 6 veces), media  $\pm$  desviación típica para 6 a 9 animales, \*\*:  $p < 0,01$ , ensayo de comparación múltiple de Dunnett a los 20 días después del trasplante de células tumorales.

La Fig. 12 muestra las curvas de supervivencia para diversos grupos después de la administración de HVJ-E en tumores. A: Curvas de supervivencia para los grupos que reciben una administración 3 veces. B: Curvas de supervivencia para los grupos que reciben una administración 6 veces. ♦<sup>A</sup>: Grupo A (grupo testigo de administración 3 veces), ♦<sup>B</sup>: Grupo B (grupo de 40 HAU de administración 3 veces), ♦<sup>C</sup>: Grupo C (grupo de 400 HAU de administración 3 veces), ■<sup>D</sup>: Grupo D (grupo testigo de administración 6 veces), ■<sup>E</sup>: Grupo E (grupo de 40 HAU de administración 6 veces), ■<sup>F</sup>: Grupo F (grupo de 400 HAU de administración 6 veces).

La Fig. 13 muestra los ritmos de cambio de peso corporal en grupos desde el día 15 hasta el día 36. ♦<sup>A</sup>: Grupo A (grupo testigo de administración 3 veces), ♦<sup>B</sup>: Grupo B (grupo de 40 HAU de administración 3 veces), ♦<sup>C</sup>: Grupo C (grupo de 400 HAU de administración 3 veces), ■<sup>D</sup>: Grupo D (grupo testigo de administración 6 veces), ■<sup>E</sup>: Grupo E (grupo de 40 HAU de administración 6 veces), ■<sup>F</sup>: Grupo F (grupo de 400 HAU de administración 6 veces); los datos se muestran como la media  $\pm$  desviación típica del ritmo del cambio (%) con el peso corporal en el día 4 como referencia.

## Modos de realizar la invención

La presente invención se describe en detalle en lo que sigue.

La presente invención proporciona un agente terapéutico/profiláctico para cáncer prostático que contiene una

envoltura viral como un ingrediente activo.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, "una envoltura viral" significa una estructura membranosa ubicada en la parte más exterior de un virus. En el virus, la envoltura normalmente cubre el genoma viral y proteínas de la cápside. La envoltura viral normalmente es capaz de portar una diversidad de sustancias en la íntima de la misma, y posee la actividad de fusionarse con la membrana celular y transferir las sustancias contenidas en la íntima en las células. Por esta razón, incluyendo en la íntima de la envoltura viral una sustancia deseada [un gen (por ejemplo DNA, RNA y similares), proteína (o péptido), compuesto (agente anticancerígeno, agente antibacteriano, promotor de la inmunidad y similares)], y administrando esto a un individuo, es posible suministrar la sustancia deseada a una diversidad de tejidos y células. Por tanto, pueden ser usadas las envolturas virales como vectores de una diversidad de sustancias. La envoltura viral usada en la presente invención puede tener una sustancia destinada a ser introducida en un organismo vivo o una célula, incluida o no incluida en la íntima de la misma. Como se muestra en el ejemplo siguiente, la propia envoltura viral tiene un efecto para destruir células de cáncer prostático, por lo que en una realización preferida, una sustancia destinada a ser introducida en un organismo vivo o célula no está sustancialmente incluida en la envoltura viral.

El virus usado para preparar la envoltura viral de la presente invención puede ser cualquier virus que tenga una envoltura, ya sea un virus de DNA o un virus de RNA. El virus de la presente invención puede ser un virus de tipo salvaje o un virus de tipo recombinante.

Estos virus incluyen, pero sin limitación, *Poxyiridae*, *Herpesviridae*, *Hepadnaviridae* y *Baculoviridae*, que pertenecen a los virus de DNA, y *Retroviridae*, *Togaviridae*, *Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Paramyxoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Arenaviridae* y *Filoviridae* y similares, que pertenecen a los virus de RNA. En la presente invención, de los virus anteriormente mencionados, se usan preferentemente virus pertenecientes a *Paramyxoviridae*.

Ejemplos específicos de virus preferidos incluyen virus Sendai, Retrovirus, virus adeno-asociados, virus de herpes, virus de vacunas, virus de la viruela, virus influenza y similares; lo más preferentemente se usa el virus Sendai.

Los virus Sendai usados en la presente invención, por ejemplo, VR-105, VR-907 y similares, pueden ser adquiridos en la entidad American Type Culture Collection (ATCC; dirección: P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA, TEL [1]-703-365-2700).  
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=VR-105&Template=animalVirology>

Se describen envolturas virales más en detalle, por ejemplo, en los documentos JP2001-286282A (documento WO 01/57204), JP2002-065278A, WO 03/014338 y similares y se pueden preparar específicamente de acuerdo, por ejemplo, con el ejemplo 8 del documento JP-A-2001-286282 y similares. Alternativamente, la envoltura del virus Sendai puede ser preparada también mediante proliferación de virus Sendai y aislando y purificando la envoltura a partir del virus recuperado, según métodos descritos en los ejemplos posteriores de la presente memoria descriptiva.

La envoltura viral usada en la presente invención puede ser un virus inactivado. Como se indicó, los virus pueden ser obtenidos tratando por inactivación un genoma viral. Ejemplos de tratamiento de inactivación incluyen tratamiento UV y tratamiento de alquilación. Este tratamiento de inactivación del genoma viral provoca que el DNA o RNA genómico resulte desnaturalizado o fragmentado en la envoltura viral. Específicamente, la envoltura viral Sendai puede ser inactivada también según un método descrito en un ejemplo posterior.

La envoltura viral usada en la presente invención puede ser una que haya sido aislada y purificada. "Aislada y purificada" significa que ha sido realizada una operación para suprimir ingredientes distintos del producto deseado (genoma viral, proteína del cápside y similares).

En la presente memoria descriptiva, "cánceres prostáticos" abarcan cánceres que se han desarrollado en la próstata y están localizados en la próstata, cánceres que se han desarrollado en la próstata y se han infiltrado fuera de la próstata y cánceres metastáticos/recurrentes derivados de cánceres que se han desarrollado en la próstata.

Como los cánceres prostáticos crecen inicialmente de forma dependiente de andrógenos después de la aparición, a menudo es eficaz una terapia endocrina (terapia de hormonas) en la que las cantidades de andrógenos secretados en el cuerpo y las acciones de los andrógenos son suprimidas mediante la extirpación de tejidos secretores de andrógenos (testículos, adrenales y similares), es a menudo eficaz la administración de un inhibidor que antagonice andrógenos y similares. Ejemplos de "andrógenos" incluyen testosterona, dihidrotestosterona, deshidroepiandrosterona, androsterona, androstenodiona y similares. En la presente memoria descriptiva, "terapia endocrina (terapia de hormonas)" se refiere a un método terapéutico para suprimir la proliferación de células de cáncer prostático suprimiendo la secreción y funcionamiento de andrógenos. Medios específicos de terapia endocrina (terapia de hormonas) incluyen orquiectomía (cirugía de castración) y terapias de fármacos; las terapias de fármacos incluyen la administración de agonistas LH-RH, agentes de hormonas anti-masculinas (agentes anti-andrógenos) o agentes de hormonas femeninas (agentes de estrógenos) y similares. Sin embargo, es conocido que la continuación de esta terapia reduce la susceptibilidad a los andrógenos de las células de cáncer prostático, lo que a su vez hace que las células sean capaces de proliferar de forma no dependiente de andrógenos. Como

consecuencia, se debilita la eficacia de la terapia endocrina (terapia de hormonas) para cánceres prostáticos. El agente terapéutico/profiláctico de la presente invención es particularmente eficaz sobre cánceres prostáticos cuya susceptibilidad a los andrógenos ha sido parcial o completamente reducida de esta forma. “Susceptibilidad a los andrógenos” significa un grado de favorecimiento de la proliferación de células de cánceres prostáticos mediante estimulación con andrógenos. “Una reducción completa en la susceptibilidad de andrógenos” significa que el crecimiento de cáncer prostático no está favorecido en absoluto por la estimulación con andrógenos. “Una reducción parcial en la susceptibilidad a andrógenos” significa que aunque el crecimiento del cáncer prostático es favorecido debido a la estimulación con andrógenos, el grado es inferior al inicialmente obtenido después de la aparición del cáncer prostático. También, el agente terapéutico/profiláctico de la presente invención es eficaz particularmente sobre cánceres prostáticos refractarios a hormonas. “Refractario a hormonas” se refiere a un estado de cáncer prostático en el que la terapia endocrina (o terapia de hormonas) se ha hecho parcial o completamente ineficaz debido a una reducción en la susceptibilidad a andrógenos, que abarca también cánceres prostáticos refractarios a andrógenos. “La terapia endocrina es parcialmente ineficaz” se refiere a un estado en el que el crecimiento del cáncer prostático es parcialmente suprimido, pero el crecimiento no está completamente terminado por medio de una terapia endocrina. “La terapia endocrina es completamente ineficaz” se refiere a un estado en el que el crecimiento del cáncer prostático no es suprimido en absoluto mediante una terapia endocrina.

Aunque continúa siendo desconocido el motivo por el que las envolturas virales son eficaces particularmente sobre cánceres prostáticos en los que la susceptibilidad a andrógenos ha sido parcial o completamente reducida y cánceres prostáticos refractarios a hormonas, una razón parece ser que las envolturas virales son capaces de fusionarse específicamente con células de cánceres prostáticos que poseen estas características.

En la presente memoria descriptiva, “tratamiento” se refiere a retrasar el progreso del cáncer diana, o la contracción o desaparición del tejido cancerígeno. Por tanto, está abarcado no solamente suprimir o retrasar de forma parcial o completa la proliferación de células cancerígenas. “Prevención” puede abarcar también la supresión de la aparición de un cáncer prostático por adelantado mediante la administración a un paciente en riesgo de contraer un cáncer prostático, y la prevención de la recurrencia/metástasis de un cáncer mediante la administración a un paciente después del tratamiento del cáncer prostático.

Aunque continúa sin estar completamente claro el mecanismo mediante el cual la envoltura viral usada en la presente invención previene o trata cánceres prostáticos, se cree que combinando las acciones de las envolturas virales descritas a continuación, la envoltura viral exhibe su excelente efecto terapéutico/profiláctico sobre cánceres prostáticos.

#### Inducción de apoptosis

Las envolturas virales son capaces de actuar directamente sobre las células de cáncer prostático para inducir apoptosis. Consecuentemente, el agente terapéutico/profiláctico de la presente invención es útil como un inductor de apoptosis para células de cáncer prostático. La apoptosis se refiere a la muerte celular genéticamente controlada, definida mediante dos cambios bioquímicos: cambios morfológicos celulares y fragmentación de DNA en unidades de nucleosomas.

#### Inducción o producción de interferón $\alpha$ o $\beta$

Las envolturas virales inducen la producción de interferones de citoquinas  $\alpha$  y/o  $\beta$  para células de cáncer prostático. Los interferones  $\alpha$  y  $\beta$  se conoce que poseen un potente efecto antitumoral, activan células NK, actúan directamente sobre células tumorales y suprimen su proliferación.

#### Activación de células NK

Como se muestra en el ejemplo siguiente, en un ratón que carece de células NK debido a un tratamiento con anticuerpos GM1 anti-acialo, el efecto terapéutico de las envolturas virales sobre cánceres prostáticos se debilitó. Por tanto, al menos parte de los efectos antitumorales de las envolturas virales se cree que se han conseguido a medida que la envoltura viral activa células NK (células acialo GM1-positivas) directa o indirectamente.

#### Activación de células T citotóxicas

Las envolturas virales activan células T citotóxicas (CTL). Por lo tanto, las envolturas virales son capaces de exhibir no solamente un efecto citotóxico, sino también un efecto antitumoral a través de la inmunidad antitumoral.

El agente terapéutico/profiláctico de la presente invención puede ser administrado a través de una vía opcionalmente escogida. Sin embargo, las envolturas virales son capaces de actuar directamente sobre células de cáncer prostático para inducir su apoptosis, como se estableció anteriormente; por lo tanto, puede ser obtenido un efecto terapéutico incluso superior administrando el agente terapéutico/profiláctico de la presente invención de una forma tal que se permita que la envoltura viral entre en contacto con las células de cáncer prostático de forma tan eficaz como sea posible. Desde este punto de vista, es deseable que el agente terapéutico/profiláctico de la presente invención sea administrado por vía subcutánea o administrado directamente al tejido de cáncer prostático y/o sus proximidades. En la presente memoria descriptiva, la “administración directa” se puede realizar en la medida en que

5 el fármaco administrado es suministrado al tejido canceroso; la administración directa es posible por inyección, revestimiento, pulverización o dirección a diana en combinación con un sistema de suministro de fármacos y similares. Por tanto, la administración directa permite que el fármaco actúe por vía tópica sobre el tejido canceroso que está siendo tratado. Para hacer máximo el efecto terapéutico/profiláctico de la envoltura viral, el agente terapéutico/profiláctico de la presente invención es inyectado preferentemente de forma directa en el tejido de cáncer prostático.

10 En una realización, el agente terapéutico/profiláctico de cáncer prostático de la presente invención contiene una envoltura viral que no tiene sustancialmente nada incluida en la misma artificialmente como un ingrediente activo. En algunos casos, es posible formular el agente en forma de una preparación única junto con uno o más tipos de ingredientes que sean eficaces en el tratamiento/prevenición del cáncer, pero estos ingredientes activos no son artificialmente incluidos en la envoltura.

15 Cualquiera que sea su forma de dosificación, el agente terapéutico/profiláctico del cáncer en la presente invención incluye composiciones farmacéuticas como inyecciones, ungüentos y pulverizaciones. Preferentemente, la forma de dosificación es una inyección. Adicionalmente, en la actualidad, están siendo desarrolladas técnicas de dirección a diana para el suministro de una sustancia (un fármaco y similar) preferente o específicamente a una diversidad de tejidos cancerígenos o se espera que se desarrollen en el futuro. El agente terapéutico/profiláctico de la presente invención puede ser usado también junto con estas técnicas de dirección a diana y formulados de forma que sea dirigido a diana a un tejido cancerígeno.

20 Los expertos en la técnica son capaces de formular el agente terapéutico/profiláctico para el cáncer de la presente invención en forma de una composición farmacéutica según el método de administración del mismo.

En la medida requerida en la preparación farmacéutica, se formula un vehículo apropiado farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un excipiente, un aglutinante, un lubricante, un disolvente, un disgregante, un solubilizante, un agente suspensor, un emulsionante, un agente de isotonicidad, un estabilizador, un agente calmante, un antiséptico, un antioxidante, un correctivo, un agente colorante y similares.

25 Como el excipiente, se pueden mencionar excipientes orgánicos como sacáridos como lactosa, glucosa y D-manitol, almidones y celulosas como celulosa cristalina, excipientes inorgánicos como carbonato de calcio y caolín y similares; como el aglutinante, se pueden mencionar almidón gelatinizado, gelatina, goma arábiga, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, celulosa cristalina, D-manitol, trehalosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico) y similares; como el lubricante, se pueden mencionar ácido esteárico, sales de ácidos grasos como estearatos, talco, silicatos y similares; como el disolvente, se pueden mencionar agua purificada, solución salina fisiológica y similares; como el disgregante, se pueden mencionar hidroxipropilcelulosa con baja sustitución, celulosa químicamente modificada y almidones y similares; como el solubilizante, se pueden mencionar polietilenglicol, propilenglicol, trehalosa, benzoato de bencilo, etanol, carbonato de sodio, citrato de sodio, salicilato de sodio, acetato de sodio y similares; como el agente suspensor o emulsionante se pueden mencionar lauril-sulfato de sodio, goma arábiga, gelatina, lecitina, glicerol, monoesteárico, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, células como carboximetilcelulosa de sodio, polisorbatos, aceite de ricino endurecido con polioxietileno y similares; como el agente de isotonicidad se pueden mencionar cloruro de sodio, cloruro de potasio, sacáridos, glicerina, urea y similares; como el estabilizador se pueden mencionar polietilenglicol, dextrano-sulfato de sodio, otros aminoácidos y similares; como el agente corrector se pueden mencionar glucosa, gluconato de calcio, hidrocloreuro de procaína y similares; como el antiséptico se pueden mencionar paraoxibenzoatos, clorobutanol, alcohol bencílico, alcohol fenetílico, ácido deshidroacético, ácido sórbico y similares; como el antioxidante se pueden mencionar sulfitos, ácido ascórbico y similares; como el corrector se pueden mencionar edulcorantes, agentes para dar sabor y similares de uso común en el sector farmacéutico; como el agente colorante se pueden mencionar agentes colorantes de uso común en el sector farmacéutico.

45 En lo relativo a la dosis del agente terapéutico, profiláctico para el cáncer de la presente invención, el agente puede ser administrado en una cantidad terapéutica/profilácticamente eficaz. Una dosis específica puede ser determinada según el estado del paciente mediante un facultativo general o persona competente en el ajuste clínico. Variando según la edad del paciente receptor, el peso corporal y el estado patológico, el método de administración y similares, el agente es administrado normalmente en una cantidad de 100 a 40.000 HAU, preferentemente 500 a 20.000 HAU, más preferentemente 1.000 a 10.000 HAU, de forma particularmente preferentemente 5.000 HAU o menos, para un adulto, basado en la envoltura viral Sendai.

50 La frecuencia de administración puede ser determinada también según el estado del paciente por un facultativo general o persona competente en el ajuste clínico. Generalmente se prefiere una administración de dosis múltiples, pero esto no está concebido como limitación.

55 Por ejemplo, es factible un método de administración en el que se administre una inyección directamente al tejido cancerígeno en 3 veces o la inyección directa a intervalos de 3 días.

El agente terapéutico, profiláctico para el cáncer de la presente invención puede ser usado solo en una cantidad terapéutica/profilácticamente eficaz. Alternativamente, después de que se realiza un tratamiento con el agente



terapéutico para el cáncer prostático de la presente invención, o durante una administración continuada, el cáncer puede ser extirpado parcial o completamente mediante tratamiento quirúrgico. Además, el agente terapéutico para el cáncer prostático de la presente invención puede ser administrado también en combinación con otro fármaco, por ejemplo, un agente de quimioterapia. En este caso, el fármaco terapéutico para el cáncer prostático de la presente invención y el otro fármaco pueden ser administrados de forma simultánea o secuencial en un orden opcionalmente escogido.

Además, el agente terapéutico/profiláctico para el cáncer prostático de la presente invención puede ser usado también en combinación con cualquier otro método terapéutico para el cáncer. Otros métodos terapéuticos para el cáncer incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, extirpación quirúrgica, terapia endocrina, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y similares. El agente terapéutico/profiláctico de la presente invención puede ser administrado antes o después o de forma simultánea con estos otros métodos terapéuticos. Por tanto, el agente terapéutico/profiláctico de la presente invención puede ser administrado a i) pacientes de cáncer prostático que no han estado nunca en otro método terapéutico, ii) pacientes de cáncer prostático que están en tratamiento mediante otro método terapéutico o iii) pacientes de cáncer prostático que han sido programados para recibir otro método terapéutico. En la presente memoria descriptiva, "terapia endocrina" es como se describió anteriormente. También "radioterapia" se refiere irradiar una radiación para los fines de controlar un tumor mediante la acción de disociación electrolítica de la radiación. Como se usa en la presente memoria descriptiva, "quimioterapia" se refiere a realizar un tratamiento del cáncer usando un agente anticancerígeno. Como se usa en la presente memoria descriptiva, "inmunoterapia" indica un método terapéutico para tratar un cáncer, o retrasar su progreso, mejorando la función inmune en el cuerpo del paciente. Generalmente, se pueden mencionar terapia de vacunas, inmunoterapia adoptiva celular, terapia de citoquinas, terapia BRM y similares. Como se estableció anteriormente, la envoltura viral de la presente invención es eficaz particularmente sobre cánceres prostáticos cuya susceptibilidad a andrógenos ha sido parcial o completamente reducida y cánceres prostáticos refractarios a hormonas. Por lo tanto, usando el agente terapéutico/profiláctico de la presente invención en combinación con una terapia endocrina, se pueden suprimir células de cáncer prostático no refractario a hormonas así como células de cáncer prostático refractario a hormonas. En una realización preferida, el agente terapéutico/profiláctico de la presente invención es administrado a un paciente de cáncer prostático que tiene un historial de recibir terapia endocrina. El paciente de cáncer prostático que tiene un historial de recibir terapia endocrina porta a veces un cáncer prostático cuya susceptibilidad a andrógenos ha sido parcial o completamente reducida o un cáncer prostático refractario a hormonas como resultado de una terapia endocrina; en estos casos, el agente terapéutico/profiláctico de la presente invención es particularmente ventajoso.

El agente terapéutico de cáncer prostático de la presente invención suprime el aumento en el volumen del tejido canceroso. Específicamente, el agente terapéutico de cáncer prostático de la presente invención es capaz de reducir el aumento de volumen en un 30% o más, preferentemente 50% o más, más preferentemente 60% o más, de forma particularmente preferente 70% o más, en comparación el tejido de cáncer prostático que no experimenta tratamiento. Como se describe en un ejemplo posterior, mediante 3 veces de administración directa a un tejido canceroso mediante inyección a intervalos de 3 días, el aumento del volumen del tejido canceroso después de la administración puede ser suprimido en 90% o más, o 95% o más, durante 30 días o más después de la administración final. Este efecto enorme de la envoltura viral Sendai fue descubierto por primera vez mediante la presente invención. El agente terapéutico de cáncer prostático de la presente invención se caracteriza por la presencia de un ingrediente activo que consiste sustancialmente en la envoltura viral Sendai. Por tanto, están ausentes las reacciones adversas (náuseas, pérdida de cabello y similares) debidas a los agentes quimioterapéuticos convencionales.

El mecanismo tras el efecto antitumoral de la envoltura viral inactivada de la presente invención es estimado como se describe a continuación, pero no debe ser concebido como una limitación. Los receptores de la envoltura viral Sendai en la membrana celular son una clase de gangliósidos; GD1a, en particular, es un receptor principal. Este gangliósido está casi ausente en el epitelio prostático normal, pero es intensivamente expresado en cánceres prostáticos refractarios a hormonas. Por lo tanto, cuando la envoltura viral Sendai se pone en contacto con células de cáncer prostático refractario a hormonas, provoca eficazmente una fusión celular para inhibir la proliferación celular. Al mismo tiempo, el RNA de doble cadena derivado de virus se une al receptor de genoma viral intracelular RIG-I, y la transducción de la señal resultante estimula las células cancerígenas para secretar interferón- $\alpha$  y  $\beta$  y las células cancerígenas activan caspasa 3 y 8 para provocar apoptosis con los interferones secretados por las mismas. Sin embargo, las células de próstata normales no se ven influenciadas sin interferones secretados por la acción de la envoltura viral Sendai. Además, la envoltura viral Sendai favorece también la mejora de la expresión de RIG-I y aumenta su efecto de inducción de apoptosis específica para células cancerígenas. En un modelo de tumor en ratones, además de este efecto, como se encontró por los presentes inventores en un modelo en ratón de cáncer renal, se encontró que las células NK capaces de atacar tumores también fueron desactivadas, mejorando así adicionalmente el efecto antitumoral. Aunque la verificación no se puede conseguir en un modelo en ratón de cáncer prostático humano, está anticipado que las células D que son citotóxicas para tumores también serán activadas, como ya ha sido informado en un experimento de tratamiento de cáncer colorrectal; además del efecto de destrucción de tumor directo, se espera que la administración de la envoltura viral Sendai a los focos de cáncer localizados suprima no solamente los focos primarios, sino también las metástasis remotas y prevenga las recurrencias, incluso en cánceres refractarios al tratamiento, como resultado de la activación de inmunidad del

hospedante a tumores.

Además, la envoltura viral Sendai de la presente invención sola exhibe un efecto de regresión tumoral sobre melanoma también. Consecuentemente, la presente invención proporciona un agente terapéutico/profiláctico para melanoma que contiene la envoltura viral Sendai como el único ingrediente activo. Como se menciona con respecto a melanoma, "tratamiento" o "prevención" tienen la misma definición que anteriormente mencionados "tratamiento" o "prevención" con respecto a cánceres prostáticos.

El contenido de la envoltura viral Sendai como el único ingrediente activo se refiere al hecho de que uno cualquiera o más tipos de ingredientes que tengan un efecto antitumoral no están incluidos en la envoltura, o no están contenidos en el agente terapéutico/profiláctico. También, en la presente memoria descriptiva, "melanoma" abarca también cánceres que se han desarrollado en la piel, tejido orbital, epitelio mucosal oral y similares y están localizados en estos sitios de aparición, cánceres que se han desarrollado en la piel, tejido orbital, epitelio mucosal oral y similares y que se han infiltrado fuera de estos sitios de aparición y cánceres metastáticos/recurrentes derivados de cánceres que se han desarrollado en la piel, tejido orbital, epitelio mucosal oral y similares.

Cualquiera que sea la forma de la dosis, el agente terapéutico/profiláctico para melanoma de la presente invención incluye composiciones farmacéuticas como inyecciones, ungüentos y pulverizaciones. Preferentemente, la forma de dosificación es una inyección. Además, actualmente, están siendo desarrolladas técnicas de dirección a diana para suministrar una sustancia (un fármaco y similares) de forma preferente o específica a una diversidad de tejidos cancerosos, o se espera que se desarrollen en el futuro. El agente terapéutico/profiláctico para melanoma de la presente invención puede ser usado también con estas técnicas de dirección a diana y formulados de forma tal que sea dirigido a diana a un tejido canceroso. Los expertos en la técnica serán capaces de formular el agente terapéutico/profiláctico para melanoma de la presente invención en forma de una composición farmacéutica según el método de administración de la misma; en la medida necesaria para la preparación farmacéutica, pueden ser usados vehículos farmacéuticamente aceptables y similares utilizados en el agente terapéutico/profiláctico para cáncer prostático anteriormente mencionado en la medida apropiada.

En lo que se refiere a la dosis del agente terapéutico/profiláctico para melanoma de la presente invención, el agente puede ser administrado en una cantidad terapéutica/profilácticamente eficaz. Una dosis específica puede ser determinada según el estado del paciente por un facultativo general o una persona competente en el ajuste clínico. Variando dependiendo de la edad del paciente receptor, peso corporal y estado patológico, el método de administración y similares, el agente es administrado normalmente en una cantidad de 10 a 10.000 HAU, preferentemente 40 a 400 HAU para un adulto, basado la envoltura viral Sendai.

La frecuencia de administración puede ser determinada también según el estado del paciente por un facultativo general o una persona competente en el ajuste clínico. Generalmente, se prefiere una administración de dosis múltiples, pero esto no está concebido como una limitación.

Por ejemplo, es factible un método de administración en el que una inyección es administrada directamente al tejido canceroso en 1 a 10, preferentemente 3 a 6 veces de inyección directa y similares. El intervalo de tiempo de administración puede ser determinado también el estado del paciente y la inyección puede ser administrada a intervalos, por ejemplo, de 2 ó 3 días.

La presente invención se describe a continuación en detalle por medio de los siguientes ejemplos en los cuales, sin embargo, la invención no está limitada en modo alguno.

#### 40 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de envoltura viral Sendai inactivada usando tensioactivo

##### 1: Proliferación de virus Sendai

Aunque los virus Sendai proliferaron inoculando un virus de base a un huevo de pollo fertilizado son generalmente útiles, los que han proliferado utilizando un sistema para infección viral persistente de células cultivadas o tejidos cultivados de monos, seres humanos y similares (o hidrolasa como tripsina añadida al caldo de cultivo) y los que han proliferado infectando células cultivadas con un genoma viral clonado para provocar una infección persistente pueden ser todos utilizados.

En este ejemplo, la proliferación del virus Sendai se realizó como se describe a continuación. Un virus de base de virus Sendai se hizo proliferar usando un huevo fertilizado SPF (exento de agentes patógenos específicos) y se separó y purificó; el virus Sendai resultante (cepa Z) fue suministrado a un tubo de conservación de células y se conservó y preparó en nitrógeno líquido con la adición de DMSO al 10%.

Se recibieron los huevos de pollo justo después de la fertilización, se colocaron en una incubadora (SHOWA-FURANKI modelo P-03; aproximadamente 300 huevos acomodados) y se criaron bajo condiciones de 36,5 °C y una humedad de 40% o más durante 10 a 14 días. En un espacio oscuro, usando una iluminación para huevos (luz de bombilla eléctrica emitida a través de una abertura de aproximadamente 1,5 cm de diámetro), se comprobó la

5 supervivencia de embriones y la cámara de aire y la membrana corioalantoidea (un sitio escogido excepto un vaso sanguíneo grueso). El virus de base (extraído de nitrógeno líquido) se diluyó 500 veces con solución de polipeptona (polipeptona al 1% y NaCl al 0,2% combinados, ajustados a pH 7,2 con NaOH 1 M, tratada en autoclave y conservada a 4 °C) y esto se dejó en reposo a 4 °C. Los huevos se desinfectaron con Isodine y alcohol; se hizo un  
 10 pequeño orificio en el sitio de inyección de los virus usando un punzón y se inyectaron 0,1 ml de virus de base diluido en la cavidad corioalantoica usando una jeringuilla de 1 ml equipada con una aguja de calibre 26. Se colocó parafina fundida (punto de fusión 50 a 52 °C) en el orificio usando una pipeta Pasteur para cubrir el orificio. Los huevos se colocaron en una incubadora y se criaron bajo condiciones de 36,5 °C y una humedad de 40% o más durante 3 días. Seguidamente los huevos inoculados se dejaron en reposo a 4 °C durante una noche. Al día  
 15 siguiente, la parte de cámara de aire de cada huevo se cortó usando unas tenacillas y se colocó una jeringuilla de 10 ml equipada con una aguja de calibre 18 en la membrana corioalantoica y el fluido corioalantoico se recogió en una botella esterilizada mediante aspiración y se conservó a 4 °C.

## 2: Purificación de virus Sendai

15 El virus Sendai puede ser purificado usando métodos de purificación basados en centrifugación, métodos de purificación con una columna y otros métodos de purificación conocidos por sí mismos en este campo.

### 2.1: Métodos de purificación por centrifugación

20 Brevemente, se recuperó un líquido de virus proliferado mediante centrifugación a baja velocidad y los fragmentos de tejidos/células en el caldo de cultivo y fluido corioalantoico se separaron. La materia sobrenadante se purificó mediante centrifugación a velocidad elevada (27.500 xg, 30 minutos) y ultracentrifugación (62.800 xg, 90 minutos) en un gradiente de densidad de sacarosa (30 a 60% p/v). Se debe tener cuidado de manejar el virus tan suavemente como sea posible durante la purificación y conservarlo a 4 °C.

En este ejemplo, específicamente, el virus Sendai fue purificado mediante el método descrito a continuación.

25 Se colocaron aproximadamente 100 ml de fluido corioalantoico que contenía virus Sendai (fluido corioalantoico de huevo de pollo que contenía virus Sendai reunido y conservado a 4 °C) en dos tubos de centrifugación de 50 ml usando una pipeta Komagome de boca ancha (véase Saeki, Y., and Kaneda, Y: Protein modified liposomes (liposomas HVJ) para el suministro de genes, oligonucleótidos y proteínas. Cell Biology; A laboratory handbook (2nd edition), edited by J. E. Celis (Academic Press Inc., San Diego), vol. 4, 127-135, 1998), y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (freno desconectado) y se retiraron fragmentos de tejido de huevo.

30 Después de la centrifugación, la materia sobrenadante se suministró a cuatro tubos de centrifugación de 35 ml (para una centrifugación a velocidad elevada) y se centrifugaron a 27.000 xg usando un rotor angular durante 30 minutos (acelerador y freno conectados). Se retiró la materia sobrenadante, se añadieron BSS (Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), NaCl 137 mM, KCl 5,4 mM; se trató en autoclave y se conservó a 4 °C) (PBS aceptable en lugar de BSS) al precipitado a aproximadamente 5 ml por tubo y el precipitado se dejó en reposo como estaba a 4 °C durante una noche. El precipitado se esponjó mediante pipeteo suave usando una pipeta Komagome de boca ancha, se reunió  
 35 en un único tubo y se centrifugó a 27.000 xg usando un rotor angular durante 30 minutos de la forma que anteriormente. La materia sobrante se separó, se añadieron aproximadamente 10 ml de BSS al precipitado y el precipitado se dejó en reposo a 4 °C durante una noche de la misma manera que anteriormente. El precipitado se esponjó mediante pipeteo suave usando una pipeta Komagome de boca ancha, se centrifugó usando una centrifugadora a baja velocidad a 3.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (freno desconectado) y se retiraron fragmentos de tejido y masas de aglutinación que permanecían sin separar. La materia sobrenadante se colocó en un nuevo tubo esterilizado y éste se conservó como el virus purificado a 4 °C.

45 Se añadieron 0,9 ml de BSS a 0,1 ml del líquido de virus, se midió la absorbancia a 540 nm usando un espectrofotómetro y el título de virus se convirtió en una actividad de aglutinación de eritrocitos (HAU). Un valor de la absorbancia de 1 a 540 nm era casi igual a 15.000 HAU. En la presente memoria descriptiva, HAU (unidad de hemaglutinación) es una unidad de la actividad para eritrocitos aglutinantes, 1 HAU de HVJ-E se refiere a la unidad mínima que provoca aglutinación cuando se mezcla el HVJ-E con eritrocitos de pollo. La HAU se cree que es casi proporcional a la actividad de fusión. La actividad de aglutinación de eritrocitos puede ser medida usando realmente un líquido de eritrocitos de pollo (0,5 %) (véase el manual Dobutsu Saibou Riyō Jitsuyōka Manual, REALIZE INC. (Uchida, Oishi, Furusawa editors) P259 to 268, 1984).

50 Además, se puede realizar en la medida necesaria una purificación del virus Sendai usando un gradiente de densidad de sacarosa. Específicamente, se dispone una suspensión de virus en un tubo de centrifugadora con soluciones de sacarosa al 60% y 30% (tratadas en autoclave) superpuestas una a otra en el mismo y se someten a una centrifugación de gradiente de densidad a 62.800 xg durante 120 minutos. Después de la centrifugación, se recupera la banda observada sobre la capa de solución de sacarosa al 60%. En la suspensión de virus recuperada  
 55 se dializa frente BSS o PBS como el fluido externo a 4 °C durante 1 noche para separar la sacarosa. Cuando la suspensión de virus no va a ser usada pronto, se añaden glicerol (tratado en autoclave) y líquido de EDTA 0,5 M (tratado en autoclave) a la suspensión de virus para obtener concentraciones finales de 10% y 2 a 10 mM, respectivamente, y la suspensión del virus se congela suavemente a -80 °C y finalmente se conserva en nitrógeno

líquido (la conservación en congelación es posible también usando DMS 10 mM en lugar de glicerol y líquido de EDTA 0,5 M).

## 2.2: Métodos de purificación usando columna y ultrafiltración

5 En lugar del método de purificación mediante centrifugación, es aplicable a la presente invención la purificación del virus Sendai usando una columna.

Brevemente, se purificó virus Sendai usando concentración mediante ultrafiltración a través de un filtro que tenía un valor de corte del peso molecular de 50.000 (aproximadamente 10 veces) y mediante elución mediante cromatografía de intercambio iónico (NaCl 0,3 M a 1 M).

10 Específicamente, en este ejemplo, se purificó virus Sendai a través de una columna usando el método descrito a continuación.

Después de la recogida se filtró fluido corioalantoico a través de filtros de membrana de 80  $\mu\text{m}$  a 10  $\mu\text{m}$ . Se añadió BPL de 0,006 a 0,008% (concentración final) al fluido corioalantoico (4 °C, 1 hora) para inactivar el virus Sendai. Incubando el fluido corioalantoico a 37 °C durante 2 horas se inactivó BPL.

15 EL fluido corioalantoico se concentró aproximadamente 10 veces mediante ultrafiltración de flujo tangencial usando un dispositivo 500KMWCO (A/G Technology, Needham, Mass.). Como solución de tampón se usó NaCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM, 2% de manitol, Tris 20 mM (pH 7,5). El ensayo de HAU produjo resultados favorables con una tasa de recuperación de virus Sendai de casi 100%.

20 Se purificó virus Sendai mediante un método de cromatografía de columna (solución de Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 0,2 a 1 M) usando un dispositivo QSepharose FF (Amersham Pharmacia Biotech K.K., Tokyo). La tasa de recuperación fue de 40 a 50%, siendo la pureza de más de 99%.

La fracción de virus Sendai se concentró mediante ultrafiltración de flujo tangencial usando un dispositivo 500KMWCO (A/G Technology).

## 3: Inactivación de virus Sendai

La inactivación del virus Sendai se realizó mediante irradiación ultravioleta como se describe a continuación.

### 25 3.1: Método de irradiación ultravioleta

Se colocó 1 ml de suspensión de virus Sendai en una placa de Petri a través de 30 mm y se expuso a 99 o 198 milijulios/cm<sup>2</sup>. El virus inactivado no tiene potencial de replicación, pero permanece la capacidad potencial para fusionarse con virus.

#### Ejemplo 2: Efecto antitumoral de envoltura viral Sendai in vitro

30 Se adquirieron células PC3, células DU145 y células LNCap de la entidad American Type Culture Collection (Rockville, Md.). Las células DU145 se cultivaron en presencia de suero bovino fetal (FBS), 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de streptomycin en medio RPMI1640 ((Nakarai Tesque, Kyoto, Japón). Las células PC3 se cultivaron en presencia de 10% de FBS, 100 /ml de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de streptomycin en medio F12 Eagle modificado de Dulbecco. Todos los cultivos celulares se realizaron bajo condiciones humidificadas de 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

35 Las células PC3 y las células DU145, que son células de cáncer prostático refractario a hormonas, y una línea celular de cáncer prostático no refractaria a hormonas de células LNCap, o células epiteliales prostáticas humanas normales (PNT2) se siembran para placas respectivas de 96 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^4$  células/pocillo; 24 horas más tarde, las células se hicieron reaccionar con la envoltura viral Sendai [multiplicidad de infección (MOI): 10 a  $10^4$ ]. Las células se cultivaron adicionalmente durante 24 horas y se examinaron las tasas de supervivencia celular mediante ensayo MTS usando un ensayo Celliter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, USA). Las tasas de supervivencia se expresan como relaciones respecto a grupos de no tratamiento con envolturas virales Sendai respectivos (testigos); se muestra una representación gráfica en la Fig. 1(A). En todos los tipos de células de cáncer prostático refractario a hormonas, el recuento de células viables disminuyó de forma dependiente con la concentración de envoltura viral Sendai; en las células tratadas con envoltura viral Sendai  $10^4$  MOI, el recuento de células viables disminuyó hasta 46% para células PC3 y hasta 35% para células DU145, en comparación con el testigo. Al mismo tiempo, en dicho intervalo de concentraciones, la envoltura viral Sendai no tuvo influencia sobre las tasas de supervivencia de las células de cáncer prostático no refractarias a hormonas y células epiteliales prostáticas normales. Las imágenes microscópicas de un tratamiento testigo y con envoltura viral Sendai  $10^4$  MOI de cada línea celular se muestran en la Fig 1(B) (tasa de aumento x40).

50 En las células de cáncer prostático no refractarias a hormonas y las células epiteliales prostáticas normales, no se apreció muerte celular debido a la envoltura viral Sendai; la envoltura viral Sendai indujo la muerte celular respectivamente para las células de cáncer (próstata) refractarias a hormonas. Esto demostró un efecto antitumoral selectivo de la envoltura viral Sendai sobre las células de cáncer prostático refractario a hormonas.

## Ejemplo 3: Adhesión celular combinada y efecto de fusión de membrana celular de la envoltura viral Sendai in vitro

Se sembraron células PC3 de línea celular de cáncer prostático refractarias a hormonas y células DU145, células de cáncer prostático no refractarias a hormonas LNCap y células epiteliales prostáticas humanas normales (PNT2) en un cubreobjetos revestido con polietileno colocado en cada placa de 6 pocillos a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo. Al día siguiente, las células se hicieron reaccionar con envoltura viral Sendai marcada con PKH26 ( $10^4$  MOI) a 37 °C durante 60 minutos, después de lo cual las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron mediante tratamiento con paraformaldehído (15 minutos, 4 °C). Después el núcleo celular se sometió contra-tinción con DAPI y las células se examinaron un microscopio con focal (tasa de aumento x 200).

Estos descubrimientos demostraron que la envoltura viral Sendai exhibe una capacidad potencial de adhesión y capacidad potencial de fusión de membrana para células de cáncer prostático refractario a hormonas (Fig. 2).

## Ejemplo 4: Ensayo TUNEL in vitro

Se sembraron células PC3 en cubreobjetos revestidos con polietileno colocados en una placa de 6 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo. Al día siguiente, las células se hicieron reaccionar con la envoltura viral Sendai ( $10^4$  MOI) y se cultivaron adicionalmente durante 24 horas, después de lo cual las células se lavaron dos veces con PBS y se fijaron mediante tratamiento con paraformaldehído al 4% (15 MINUTOS, 4 °C). Usando un estuche de ensayo de detección de apoptosis (TAKARA Bio.), según los procedimientos proporcionados en el manual de instrucciones, las células de apoptosis fueron determinadas mediante tinción de muesca final dUTP mediada por desoxinucleótido transferasa (TdT) (TUNEL). Los resultados del examen microscópico con focal (pasa de aumento x200) se muestran en la Fig. 3. Estos descubrimientos demostraron un aumento en las células positivas a TUNEL en el grupo de administración de envoltura viral Sendai.

## Ejemplo 5: Efecto de inducción de muerte celular de envoltura viral Sendai in vitro

Usando un estuche de ensayo de detección de apoptosis V-FITC de anexina (BD Bioscience, CA, USA), se examinaron las diferencias en la relación de células de apoptosis después de un tratamiento con envoltura viral Sendai. Se sembraron células PC3 para una placa de 6 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo; 24 horas después las células se hicieron reaccionar con la envoltura viral Sendai ( $10^4$  MOI). Las células se cultivaron adicionalmente durante 24 horas, se lavaron dos veces con PBS, se volvieron a poner en suspensión en una solución de tinción que contenía anexina V (5  $\mu$ l) y yoduro de propidio (PI) (2  $\mu$ l) y se trataron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos. La anexina V y el yoduro de propidio fueron adquiridos de la entidad BD Pharmingen (San Diego, CA). Las células se analizaron usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson) con un programa de ordenador Cell Quest. Los resultados se muestran en la Fig. 4(A). En el grupo de células tratadas con  $10^4$  MOI de la envoltura viral Sendai, en comparación con el grupo no tratado con la envoltura viral Sendai, se apreció un aumento de más de 2 veces en las células positivas a anexina V. Seguidamente, se sembraron células PC3 para una placa de 6 pocillos a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo; 24 horas después, las células se hicieron reaccionar con la envoltura viral Sendai ( $10^4$  MOI). Las células se cultivaron adicionalmente durante 12 o 24 horas y se lavaron dos veces con PBS, después de lo cual las células se recuperaron y se lisaron con tampón de lisis. Después de que se había añadido una cantidad igual de tampón de muestra, el lisado celular se llevó a ebullición durante 10 minutos. Para cada muestra, se aplicaron 10  $\mu$ g de la proteína A gel de dodecil-sulfato de sodio-poliacrilamida al 4-20% y se analizó mediante electroforesis. Después de la migración, la muestra se transfirió a una membrana de poli(fluoruro de vinilideno); la membrana se bloqueó con leche desnatada al 5% y se trató con una mezcla de reacción de anticuerpo primario al 0,1% y leche desnatada al 5% a 4 °C durante una noche. Posteriormente, la membrana se lavó y se hizo reaccionar con anticuerpo anti-caspasa 3 marcado con HRP (PC-020: TREVIGEN, MD, USA), anticuerpo anti-caspasa 8 (H-134: Santa Cruz, CA, USA) y anticuerpo anti-caspasa 9 (H-83: Santa Cruz, CA, USA) a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. Se realizó una detección mediante quimioluminiscencia mediante el protocolo descrito en la guía de usuario ECL (Amersham). Los resultados se muestran en la Fig. 4(B). En las células tratadas con  $10^4$  MOI de la envoltura viral Sendai, se apreciaron aumentos en la expresión de caspasa 3 y 8 en comparación con el testigo. Se usó como grupo testigo positivo una muestra expuesta a radiación (RT50Gy). Estos resultados demostraron que la envoltura viral Sendai exhibe una capacidad potencial para inducir apoptosis para células de cáncer prostático refractario a hormonas.

Ejemplo 6: Efecto inductor de expresión INF  $\alpha$  y  $\beta$  de envoltura viral Sendai in vitro

Se sembraron células PC3 para una placa de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/pocillo; 24 horas después, las células se hicieron reaccionar con la envoltura viral Sendai ( $10^2$  a  $10^4$  MOI) y se hicieron reaccionar adicionalmente durante 24 horas. La materia sobrenadante del cultivo se recuperó y se midió la expresión de interferones de tipo I (INF- $\alpha$  y INF- $\beta$ ) mediante un ensayo ELISA usando un reactivo disponible en el comercio (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, NJ, USA). Los resultados se muestran en la Fig. 5(A). Se apreciaron elevaciones de la expresión de INF  $\alpha$  y  $\beta$  de una forma dependiente con la dosis de envoltura viral Sendai. Seguidamente, se examinaron las influencias de la envoltura viral Sendai y el anticuerpo receptor anti-INF sobre la expresión de gen I inducible por ácido retinoico (RIG-I) de RNA helicasa. Se sembraron células PC3 para una placa de 96 pocillos a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/pocillo; 24 horas después, las células se dividieron mediante la presencia o ausencia de pretratamiento con un anticuerpo receptor anti-INF (20  $\mu$ g/ml); después de que se realizó

un pretratamiento de 3 horas, las células se hicieron reaccionar adicionalmente con la envoltura viral sendai durante 24 horas ( $10^4$  MOI). Los resultados se muestran en la Fig. 5(B). Este descubrimiento demostró que el tratamiento con la envoltura viral Sendai aumentó la expresión de RIG-I, mientras que esta acción se redujo mediante el tratamiento con el anticuerpo receptor anti-INF.

#### 5 Ejemplo 7: Importancia de JAK en la inducción de la muerte celular mediante envoltura viral Sendai in vitro

Se sembraron células PC3 para una placa de 6 pocillos a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/pocillo; 24 horas después, las células se dividieron mediante la presencia o ausencia de pretratamiento de 1 hora con un inhibidor JAK ( $1 \mu\text{M}$ ) (Calbiochem, USA) y se hicieron reaccionar con la envoltura viral Sendai ( $10^4$  MOI). Las células se cultivaron adicionalmente durante 24 horas y se lavaron dos veces PBS, después de lo cual las células se recuperaron y se lisaron con tampón de lisis. Después de que se añadió igual de tampón de muestra, el lisado celular se llevó a ebullición durante 10 minutos. Esta muestra fue analizada en cuanto a la expresión de las proteínas pSTAT1 (Ser727: Santa Cruz, CA, USA), caspasa 3 y 8 y  $\beta$ -actina (IMG-5142A: IMAGENEX, CA, USA) usando el mismo método de SDS-PAGE y transferencia Western que en los del ejemplo. Los resultados se muestran en la Fig. 6(A). En el grupo tratado con  $10^4$  MOI de la envoltura viral Sendai, se anotaron y compararon la fosforilación de STAT1 y la activación de caspasa 3 y 8 con el grupo testigo no tratado con la envoltura viral Sendai.

Para examinar la influencia de la señal de un receptor INF, se realizó el experimento descrito a continuación. Se sembraron células PC3 para una placa de 6 pocillos a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/pocillo; 24 horas después, las células se dividieron en tres grupos: los que recibieron la envoltura viral Sendai sola ( $10^4$  MOI), los que recibieron la envoltura viral Sendai y un inhibidor JAK ( $1 \mu\text{M}$ ) y los que recibieron la envoltura viral Sendai y un anticuerpo receptor anti-INF ( $20 \mu\text{g/ml}$ ); en primer lugar, se realizó un pretratamiento con el inhibidor JAK y el anticuerpo receptor anti-INF durante 3 horas, después de lo cual las células se hicieron reaccionar adicionalmente con la envoltura viral Sendai durante 24 horas ( $10^4$  MOI). Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS y las células se recuperaron y se lisaron con un tampón de lisis. Después de que se añadió una cantidad igual de un tampón de muestra, el lisado celular se llevó a ebullición durante 10 minutos. Esta muestra se analizó en cuanto a la expresión de las proteínas pSTAT1 (Ser727: Santa Cruz, CA, USA), caspasa 3 y 8 y  $\beta$ -actina (IMG-5142A: IMAGENEX, CA, USA) usando el mismo método de SDS-PAGE y transferencia Western que los del ejemplo. Los resultados se muestran en la Fig. 6(B). Cuando se trató un inhibidor JAK antes de la administración de la envoltura viral Sendai, la fosforilación de STAT1 desapareció y también desapareció la expresión de caspasa 3 y 8. Cuando se trató con el anticuerpo receptor anti-INF antes de la administración de la envoltura viral Sendai, la fosforilación de STAT1 desapareció y desapareció también la expresión de caspasa 3 y 8.

Seguidamente se sembraron células PC3 para una placa de 6 pocillos a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^5$  células/pocillo; 24 horas después, las células se dividieron mediante la presencia o ausencia de pretratamiento de 1 hora con un inhibidor JAK ( $1 \mu\text{M}$ ) y se hicieron reaccionar con la envoltura viral Sendai ( $10^4$  MOI). Las células se cultivaron adicionalmente durante 24 horas, se lavaron dos veces con PBS, se volvieron a poner en suspensión en solución de tinción que contenía anexina V ( $5 \mu\text{l}$ ) y yoduro de propidio (PI) ( $2 \mu\text{l}$ ), se trataron a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos y se analizaron usando un citómetro de flujo. Los resultados se muestran en la Fig. 6(C). Las células positivas a anexina V, que habían aumentado con la administración de la envoltura viral Sendai, disminuyeron como consecuencia pretratamiento con el inhibidor JAK. Estos descubrimientos demostraron que la envoltura viral Sendai activaba la trayectoria de JAK-STAT para activar caspasa e inducir apoptosis.

#### 40 Ejemplo 8: Análisis usando una micromatriz de inducción de expresión génica mediante envoltura viral Sendai

Se sembraron células PC3 para platos de 10 cm a una densidad de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por plato; 24 horas después, las células se hicieron reaccionar con la envoltura viral Sendai ( $10^4$  MOI). El cultivo se continúa adicionalmente durante 12 horas, se realizó la extracción de RNA usando el estuche de ensayo RNeasy Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japón) según el protocolo adjunto al estuche. Se realizó un análisis de micromatriz usando BIO MATRIX RESEARCH INC. (Chiba, Japón). Como resultado, los 20 genes de mayor valoración en el grado de elevación de la expresión se muestran en la tabla 1. En la tabla, cada gen subrayado indica un gen inductor de INF.

Tabla 1

Nombre del gen	Número de acceso	Nombre del código del gen	Tasa de aumento
<b><u>Tipo 2',5'-oligoadenilato sintetasa</u></b>	NM_003733	OASL	46,146305
<b><u>Proteína inducida por interferón con 1 repetición de tetratricopéptido</u></b>	NM_001548	IFIT1	29,140244
<b><u>2',5'-oligoadenilato sintetasa 1</u></b>	NM_002534	OAS1	28,13778
<b><u>myxovirus (virus de influenza) resistencia 1</u></b>	NM_002462	MX1	24,609573
<b><u>Dedo de zinc tipo CCCH</u></b>	NM_020119	ZC3HAV1	21,645533
<b><u>2',5'-oligoadenilato sintetasa 1</u></b>	NM_016816	OAS1	20,149218
<b><u>Proteína hipotética FLJ20035</u></b>	NM_017631	FLJ20035	19,94105
<b><u>Interferon inducido con dominio 1 de helicasa C</u></b>	NM_022168	IFIH1	17,397228
<b><u>Caja de polipéptido 58 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)</u></b>	NM_014314	DDX58	13,773271
<b><u>Miembro 2 de deshidrogenasa/reductasa (familia SDR)</u></b>	NM_005794	DHRS2	12,704678
<b><u>Proteína 44 inducida por interferón</u></b>	NM_006417	IFI44	11,367937
<b><u>Dominio que contiene 9 restos alfa estériles</u></b>	NM_017654	SAMD9	11,180847
<b><u>Proteína inducida por interferón con 3 repeticiones de tetratricopéptido</u></b>	NM_001549	IFIT3	10,32524
<b><u>Dominio con hect y RLD 5</u></b>	NM_016323	HERC5	9,883629
<b><u>2',5'-oligoadenilato sintetasa 2</u></b>	NM_016817	OAS2	9,332132
<b><u>Factor 3 de transcripción estimulado por interferon</u></b>	NM_006084	ISGF3G	8,624724
<b><u>Proteína 1 de transmembrana inducida por interferon</u></b>	NM_003641	IFITM1	8,122226
<b><u>Interferon, proteína 6 alfa-inducible</u></b>	NM_022873	IFI6	6,6947846
<b><u>Dominio con hect y RLD 6</u></b>	NM_017912	HERC6	6,359301
<b><u>2',5'- oligoadenilato sintetasa 3</u></b>	NM_006187	OAS3	5,908166

## Ejemplo 9: Proliferación de células cancerígenas in vivo

5 Los animales usados fueron ratones machos de 5 a 6 semanas de edad C.B-17/IcrCrj-SCID de los laboratorios Charles River Inc. (Yokohama, Japón). Se volvieron a poner en suspensión células PC3 ( $5 \times 10^6$  células) en 100  $\mu$ l de PBS y se administraron al dorso de cada ratón macho de 5 a 6 semanas de edad C.B-17/IcrCrj-SCID mediante inyección intradérmica. Cuando el cáncer creció hasta un diámetro de aproximadamente 4-6 mm, a los 10, 13 y 16 días después de la cirugía, se inyectó la envoltura viral Sendai (5.000 HAU en un volumen total de 100  $\mu$ l) o 100  $\mu$ l de PBS en el tumor. Se midieron los volúmenes de cáncer mediante ensayo a ciegas usando calibradores y se hicieron cálculos usando la siguiente fórmula: volumen tumoral ( $\text{mm}^3$ ) = longitud x (anchura)<sup>2</sup>/2. Los resultados se muestran en la Fig. 7(A). El crecimiento tumoral fue considerablemente inhibido en el grupo de envoltura viral Sendai; en el grupo de PBS testigo, sin embargo, no se apreció este efecto. Las fotografías del grupo de tratamiento con envoltura viral Sendai y el grupo de tratamiento con PBS a los 41 días después del trasplante del tumor se muestran en la Fig. 7(B). Estos descubrimientos demostraron que la envoltura viral Sendai tenía un efecto supresor del tumor sobre las células de cáncer prostático refractario a hormonas trasplantadas al ratón SCID.

15 En un modelo deficiente en células NK generado mediante administración de un anticuerpo GM-1 anti-acialo, se examinó el efecto de la envoltura viral Sendai. Se inyectaron células PC3 por vía intradérmica al dorso de un ratón SCID singéico, y la envoltura viral Sendai sola, o la envoltura viral Sendai y 40  $\mu$ l de anticuerpo GM1 anti-acialo fueron inyectados en tumores 3 veces a intervalos de 3 días (días 10, 13 y 16). Los resultados de este experimento

se muestran en la Fig. 7(C). En el grupo tratado con la envoltura viral Sendai y el anticuerpo GM1 anti-acialo, se observó una reducción en el efecto supresor del tumor.

Una indicación del mecanismo relativo a la inducción de apoptosis para células de cáncer prostático no refractarias a hormonas por la envoltura viral Sendai, estimado a partir de lo que antecede, se muestra en la Fig. 8. Ya se conocía que el gangliósido GD1a (Rocheleau J. V. et al., Biosci Rep. 20, 139-55, 2000, Wybenga L. E et al., Biochemistry 35, 9513-8, 1996), que sirve como un receptor de la envoltura viral Sendai, es altamente expresado en células PC3 y células DU145, pero no es expresado en células LNCap (Ravindranath M. H et al., Int J Cancer. 116, 368-77. 2005).

Ejemplo 10: Efecto supresor del crecimiento tumoral de GEN0101 en modelo de ratón de trasplante de línea celular PC3 humana

Se realizó un experimento usando una preparación liofilizada de la envoltura viral Sendai preparada con células humanas (HEK293) como hospedante (GEN0101). El método fue básicamente el mismo que el método que usa huevos de pollo, con la excepción de que usaron células humanas (HEK293) como el hospedante en lugar de huevos de pollo. Después de una purificación, la preparación de purificada, se usó la preparación liofilizada obtenida mediante un método convencional. Para esta preparación se usó la actividad de neuraminidasa (mNAU) como la unidad de medición para la envoltura viral Sendai (la conversión HAU y mNAU fue aproximadamente HAU/mNAU = 5 a 3).

Se investigaron los efectores supresores del crecimiento tumoral sobre un modelo de animal que porta cáncer mediante trasplante intradérmico de una línea celular de cáncer prostático humano refractaria a hormonas (PC3) a un ratón SCID bajo dos condiciones: GEN0101 (1.000 mNAU) administrado en tumores un total de 3 veces a intervalos de 4 días (ensayo a) y administrado en un total de 2 veces a intervalos de 7 días (ensayo b). En el día de comienzo del experimento (día 0), células PC3 humanas en la fase de crecimiento logarítmico fueron tripsinizadas y lavadas con RPMI1640 (Invitrogen Japan K.K.), después de lo cual las células se dispersaron en un líquido mezclado 2:1 de RPMI1640 y Matrigel (Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.) para preparar una suspensión celular para trasplante. A 26 ratones C.B-17/lcr-scid/scid Jcl machos de 6 semanas de edad (CLEA Japan, Inc.) bajo anestesia de Nembutal (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) se les afeitó el pelo del dorso derecho con una maquinilla y se trasplantaron  $2,0 \times 10^6$  células por animal por vía intradérmica. 4 días después del trasplante celular (día 4) se seleccionaron 20 animales divididos en cuatro grupos mediante toma de muestras estratificadas al azar de forma que el volumen tumoral medio resultara aproximadamente uniforme entre los grupos, y se adjudicaron adicionalmente al azar a grupos de medicación en ensayo a y b (GEN0101) y un grupo testigo (grupo de dosificación de disolvente) (n=5). La administración de 1.000 mNAU de GEN0101 o un disolvente (solución de trehalosa al 5%) tuvo lugar un total de tres veces en el día 4, día 8 y día 12 para el ensayo A y un total de dos veces en el día 4 y día 11 después del trasplante celular para el ensayo B. En cada de administración, los animales se colocaron en una caja de anestesia rellena con Forane (ABBOTT JAPAN Co., Ltd.) vaporizado usando un vaporizador anestésico durante un tiempo especificado. Se administraron 0,1 ml de GEN0101 o el disolvente solo en el tumor de cada animal justo después de ser sacado de la caja de anestesia, usando una jeringuilla de 1 ml (Terumo Corporation) y una aguja de inyección 30G (Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.). Entre el día de comienzo de la medicación y el día final del experimento (día 48), se verificaron los volúmenes de tumor y las velocidades de cambio del peso corporal.

Los volúmenes de tumor y las velocidades de cambio del peso corporal se calcularon usando la ecuación siguiente.

$$\text{Volumen de tumor (mm}^3\text{)} = [\text{diámetro menor (mm)}]^2 \times \text{diámetro mayor (mm)} / 2$$

Velocidad de cambio del peso corporal (%) =  $100 \times [\text{peso corporal en cada día de medición} / \text{peso corporal en el momento de agrupación} - 1]$

El parámetro para la evaluación del efecto del fármaco fue el volumen de tumor en el día 48; las diferencias entre el grupo testigo y el grupo de medicación se ensayaron estadísticamente. En los ensayos a y b, en primer lugar, se ensayó la homocedasticidad mediante el ensayo F; en el caso de varianzas iguales, se realizó el ensayo de Student t y en el caso de varianzas desiguales, se realizó el ensayo de Welch. Todos los ensayos se realizaron como un ensayo de dos colas, siendo ajustado el nivel de significación a  $\alpha = 0,05$  o  $\alpha = 0,01$ .

Los cambios a lo largo del tiempo desde el día de partida de la medicación (día 4) hasta el día 48 en las medias y errores estándar del volumen tumoral y la velocidad de cambio del peso corporal se muestran en el grupo de ensayo en la Fig. 9 para el ensayo a y Fig. 10 para el ensayo b. En el ensayo a y el ensayo b, después del día 19, el volumen de tumor medio aumentó considerablemente en el grupo testigo, mientras que en el grupo de medicación, no se observó una tendencia de aumento claro y el volumen fue bajo durante todo el periodo de observación (Fig. 9A, Fig. 10A). Como en el día de la compleción del examen (día 48), se observaron algunos individuos en los que el tumor no era fácilmente identificable mediante inspección visual en el grupo de medicación (datos no mostrados). El volumen de tumor medio para el grupo de medicación en el día 48 era 8,0%, en comparación con el grupo testigo para el ensayo a y 9,5% en comparación con el grupo testigo para el ensayo b; en ambos ensayos, la diferencia entre el grupo testigo y el grupo de administración era estadísticamente significativa ( $p < 0,05$  [ensayo a],  $p < 0,01$  [ensayo b]). En todos los ensayos, durante todo el periodo de observación, no se observó casi ninguna influencia de la medicación sobre la ganancia de peso corporal (Fig. 9B, Fig. 10B).



Estos descubrimientos demostraron un efecto significativo del fármaco en ambos regímenes: 1.000 mNAU de GEN0101 administrado en tumores un total de 3 veces a un intervalo de 4 días a partir de 4 días después del trasplante tumoral (día 4) y administrados en tumores un total de 2 veces a intervalos de 7 días desde el día 4. Se demostró también que no se observó casi ninguna influencia de la medicación sobre la ganancia del peso corporal.

#### 5 Ejemplo 11: Efecto supresor del crecimiento de tumor de HVJ-E en modelo de ratón de trasplante de melanoma de ratón en línea celular B16/BL6

##### (1) Sustancia de ensayo y sustancia testigo

Se usó como sustancia de ensayo una preparación liofilizada de HVJ-E (Genomidea Inc., número de lote: CC7-13). En la administración, la preparación liofilizada se disolvió en agua para inyección (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., número de lote: K7C75) a 40.000 HAU/ml, después de lo cual la solución se diluyó con solución de trehalosa al 5% (Genomidea Inc., número de lote: GP29) para obtener una concentración final de 400 HAU/ml o 4.000 HAU/ml, y éstos se designaron DFD-40 y DFD-400, respectivamente. La sustancia del ensayo se preparó en el día de administración y se almacenó en hielo, después de lo cual se introdujo en una jeringuilla de inyección y se dejó en reposo a temperatura normal durante 1 minuto hasta la administración. Como sustancia testigo se usó una solución de trahalosa al 5% (Genomidea Inc., número de lote: GP29). En lo que sigue, la solución de trehalosa al 5% se indica como TS.

##### (2) Animales

Se adquirieron setenta ratones C57BL/6J hembras de 6 semanas de edad como animales para el trasplante de la línea celular B16/BL6 en la entidad Charles River Japan Inc., y se identificaron individualmente mediante el método de punción en la oreja. Se escribieron en las etiquetas de los criaderos el día de recepción del animal, cepa, sexo y número de identificación individual antes de la agrupación, y número de estudio, el día de recepción del animal, cepa, sexo, grupo de ensayo, número de animal y número de identificación animal después de la agrupación. El periodo de aclimatación fue de 8 días de duración desde el día de recepción del animal; durante el periodo de aclimatación, todos los individuos fueron examinados en cuanto a descubrimientos macroscópicos (presencia o ausencia de anomalías externas, datos de consumo de alimentos/consumo de agua y similares). Se colocó un lecho esterilizado con autoclave (Iwakura Corporation) en las jaulas de los ratones de policarbonato (CLEA Japan, Inc., 13,6 de largo ×20,8 de ancho ×11,5 cm de altura), y se albergó un ratón por jaula durante el periodo de aclimatación así como durante el periodo experimental. El recinto de cría se mantuvo a una temperatura de  $23 \pm 2$  °C, una humedad de  $55 \pm 10\%$ , una frecuencia de ventilación de 10 a 15 veces/hora (sistema de aire totalmente fresco) y un tiempo de iluminación de 7:00 a 19:00. Las rejillas que albergaban las jaulas se limpiaron con una solución desinfectante (una dilución de 300 veces de PURELOX (hipoclorito de sodio al 6%, OYALOX Co., Ltd.)) cada día excepto los sábados, domingos y fiestas oficiales y el suelo se limpió con la solución desinfectante después de la limpieza. La alimentación alimento sólido (CRF-1, Oriental Yeast Co., Ltd.), y el agua de bebida fue agua corriente municipal de Ritto City. Los restantes animales se apartaron del estudio y fueron eutanizados con dietil-éter.

##### (3) Cultivo de línea de células tumorales y preparación de suspensión celular

Se adquirió B16/BL6 (línea de melanoma de ratón, ID: TKG0598, número de lote: 12-6-02) de la empresa Cell Research Center for Biomedical Research, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, y se usaron dentro de 1 mes después de 1 semana del comienzo del cultivo de resurgimiento. Usando RPMI1640 (Invitrogen Japan K.K.) que contenía 10% de suero bovino fetal (JRH Biosciences Company) como el medio de paso, las células fueron cultivadas en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. En el caso de un paso a intervalos de 2 días, se sembraron  $1,5 \times 10^6$  células para un plato de cultivo de 10 cm. En el caso de un paso a intervalos de 3 días, se sembraron  $1,0 \times 10^6$  células para un plato de cultivo de 10 cm. En la tarde del día de comienzo del experimento (día 0), las células en la fase de crecimiento logarítmico fueron tripsinizadas y puestas en suspensión en solución salina fisiológica tamponada con fosfato (PBS(-), Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) a  $5,0 \times 10^6$  células/ml ( $5,0 \times 10^5$  células/0,1 ml/ratón). El líquido obtenido se usó como la suspensión celular para el trasplante, que se recogió en una jeringuilla de inyección de 1 ml (Terumo Corporation) equipada con una aguja de inyección 30G (Becton Dickinson Company), y fue trasplantado. Después de ser preparada, la suspensión celular se colocó en hielo y el trasplante se completó en 60 minutos con agitación vigorosa proporcionada mediante una operación pipeteo cuando fuera apropiado.

##### (4) Trasplante de células tumorales

Se diluyó pentobarbital de sodio (Nembutal Injection, Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.) con solución salina fisiológica (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.) para obtener una solución de 6 mg/ml. Cada ratón fue anestesiado administrando por vía intraperitoneal esta solución a una dosis de 60 mg/kg de pentobarbital de sodio. El pelo en el sitio de trasplante fue afeitado con maquinillas, después de lo cual se trasplantó por vía intradermal 0,1 ml de suspensión celular al dorso derecho.

(5) Agrupación

5 Cuatro días después del trasplante de células tumorales (día 4), se midieron los diámetros de los tumores. Los individuos con un volumen de tumor de 70 mm<sup>3</sup> o más, los individuos con pérdida de la suspensión celular producida en el momento del trasplante de células tumorales, los individuos con una mancha negra aparecida bajo la piel en las proximidades del sitio de trasplante de células tumores y los individuos con eritema en el sitio de trasplante de células tumores fueron apartados; se calcularon la media y la desviación típica (SD) del volumen de tumor para todos los individuos restantes. Seguidamente, se determinaron 50 animales que cumplían el requisito de un volumen tumoral dentro de la media ± 2 SD. Estos individuos se dividieron en seis grupos por volumen de tumor mediante toma de muestras al azar estratificadas de forma que el volumen de tumor medio resultara uniforme entre los grupos. Además, los animales fueron ubicados adicionalmente al azar para diversos grupos de ensayo de 9 animales usando tarjetas.

15 Once días después del trasplante de células tumores (día 11), se apreció una desviación insignificante de volumen tumoral entre los grupos; antes de la administración en el día 11, sobre la base del volumen tumoral del día 11, se realizó nuevamente la agrupación. Dieciocho animales individuales que recibieron la misma sustancia (grupos de ensayo 1 y 4, grupos de ensayo 2 y 5, grupos de ensayo 3 y 6) se dividieron en dos grupos por volumen tumoral mediante toma de muestras al azar estratificadas de forma que el volumen medio resultara casi uniforme y los animales en cada uno de los dos grupos se ubicaron adicionalmente al azar hasta seis grupos para una administración de 3 veces o una administración de 6 veces, usando tarjetas. Los datos particulares de la agrupación se muestran en la tabla 2.

20 Tabla 2

Grupo	Descripción	Sustancia administrada	Dosis (HAU/ratón)	Frecuencia de dosificación (veces)	Vía de administración	Número de animales
A	Grupo testigo de administración 3 veces	TS	—	3	Intratumoral	9
B	Grupo 40 HAU de administración 3 veces	DFD-40	40	3	Intratumoral	9
C	Grupo 400 HAU de administración 3 veces	DFD-400	400	3	Intratumoral	9
D	Grupo testigo de administración 6 veces	TS	—	6	Intratumoral	9
E	Grupo 40 HAU de administración 6 veces	DFD-40	40	6	Intratumoral	9
F	Grupo 400 HAU de administración 6 veces	DFD-400	400	6	Intratumoral	9

(6) Administración de sustancia del ensayo y sustancia testigo

25 A los 4 días (día 4), 6 días (día 6), 8 días (día 8), 11 días (día 11), 13 días (día 13) y 15 días (día 15) después del trasplante de células tumorales, se administraron la sustancia de ensayo o la sustancia testigo. A los 11 días (día 11), 13 días (día 13) y 15 días (día 15) la administración tuvo lugar el grupo D, grupo E y grupo F. Los animales se colocaron en una caja de anestesia en la que se mantuvo 2 a 3% de isoflurano (Forane, ABBOTT JAPAN Co., Ltd.) usando un vaporizador (TK-5, NeuroScience, Inc.), y se anestesiaron mediante inhalación durante 6 minutos. Justo después cada animal fue sacado de la caja de anestesia, se administraron 0,1 ml de sustancia del ensayo o sustancia testigo en el tumor de cada animal. En la administración se clavó una aguja de inyección bajo la piel en las proximidades de la masa tumoral y se confirmó el alcance de la punta de la aguja para el tumor por debajo de la piel, después de lo cual la aguja se clavó adicionalmente en el centro del tumor. La sustancia del ensayo o la sustancia testigo se administraron lentamente mientras encontraban resistencia hasta el final de la administración. Sin embargo, en individuos en los que el diámetro sobrepasaba 160 mm<sup>3</sup> después de la administración en el día 11 (4ª vez), la sustancia de ensayo o la sustancia testigo se administró a la parte marginal del tumor, en la que el tejido

tumoral probablemente iba a sobrevivir.

(7) Medición de volúmenes tumorales

En los días 4, 8, 11, 13, 15, 18, 20, 24, 28, 32 y 36, el diámetro menor y el diámetro mayor del tumor se midieron usando calibradores digitales (Mitutoyo Corporation, CD-15). En la medición de los diámetros tumorales, se siguieron los criterios de tres aspectos mostrados a continuación. (1) la mancha negra o nodo negro en el sitio de trasplante de células tumorales debe ser medida. (2) si se observa una corteza o similar, el sitio si es negro y está en contacto con el foco primario, debe ser incluido en el intervalo de medición. (3) si el foco primario ya no es negro, el tumor se debe estimar que ha desaparecido. El volumen tumoral de cada animal en cada grupo se calculó usando la siguiente ecuación de cálculo.

10 
$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = [\text{diámetro menor (mm)}]^2 \times \text{diámetro principal (mm)} / 2$$

Se realizó un análisis estadístico sobre el volumen tumoral en el día 20. El día 20 se ajustó como el límite superior para el periodo en que el tumor no tenía influencia sobre el peso corporal. El análisis estadístico tuvo lugar usando el programa GraphPad PRISM 4 (GraphPad Software Company). Los resultados obtenidos en el día 20 se analizaron mediante frecuencia de dosificación usando un ensayo de comparación múltiple Dunnett. Específicamente, los resultados para el grupo B (grupo de 40 HAU de administración 3 veces) y grupo C (grupo de 400 HAU de administración 3 veces) frente a los resultados para el grupo A (grupo testigo de administración 3 veces) y los resultados para el grupo E (grupo de 40 HAU de administración 6 veces) y grupo F (grupo de 400 HAU de administración 6 veces) frente a los resultados para el grupo D (grupo testigo de administración 6 veces) fueron ensayados respectivamente. Si el ensayo era significativo, las diferencias relacionadas con la frecuencia y dosificación fueron analizadas mediante un ensayo de comparación múltiple de Holm para las combinaciones de grupo A y grupo D, grupo B y grupo E y grupo C y grupo F. También, las diferencias relacionadas a la dosis fueron analizadas mediante un ensayo de comparación múltiple de Holm para las combinaciones de grupo B y grupo C y grupo E y grupo F. Los volúmenes tumorales después de la administración intratumoral de HVJ-E se muestran en la Fig. 11. En la totalidad de grupo B, grupo C, grupo E y grupo F, los volúmenes tumorales fueron inferiores que en los grupos testigos con las correspondientes frecuencias dosificadoras; a los 20 días después del trasplante de células tumorales, los volúmenes tumorales eran significativamente inferiores que en los grupos testigos con las correspondientes frecuencias dosificadoras. Al mismo tiempo, con la administración de 3 veces así como con la administración de 6 veces, no se apreció ninguna diferencia entre el grupo de 40 HAU y el grupo de 400 HAU. A las dosis tanto 40 HAU como de 400 HAU, no se apreció ninguna diferencia entre el grupo de administración de 3 veces y el grupo de administración de 6 veces. Los resultados de los ensayos se proporcionan conjuntamente en la Tabla 3.

Tabla 3

Comparación de administración 3 veces y administración 6 veces		Comparación de 40 HAU y 400 HAU	
Grupo A y Grupo D	NS		
Grupo B y Grupo E	NS	Grupo B y Grupo C	NS
Grupo C y Grupo F	NS	Grupo E y Grupo F	NS

NS: No Significativa, ensayo de comparación múltiple de Holm sobre el volumen tumoral a los 20 días después del trasplante de células tumorales

35 (8) Cálculo de tasas de supervivencia

Para cada grupo, la tasa de supervivencia hasta el día de compleción del experimento se calculó usando la siguiente ecuación de cálculo. En lo que se refiere a las fechas de muerte, las muertes antes de mediodía se consideró que se producían en el día y las muertes posteriores se consideró que se producían al siguiente día. Para un análisis estadístico, se generaron gráficas de la tasa de supervivencia mediante el método Kaplan-Meier, después de lo cual los datos se analizaron mediante frecuencia y dosificación usando el ensayo de Logrank. Se realizaron múltiples correcciones según el método de Holm. Las tasas de supervivencia se calcularon según la ecuación siguiente.

Tasa de supervivencia (%) = 100 x (número de animales supervivientes en cada grupo) / (número de animales en cada grupo en el día 11)

En el grupo D solamente, dos individuos en 1 día después de la 5ª administración. Aunque las causas de estas muertes no pudieron ser identificadas, es posible que la tensión debida a la administración del líquido de fármaco en el tumor expandido pueda provocar una reacción letal como un choque. Los datos sobre los dos individuos muertos fueron excluidos del análisis. Las curvas de supervivencia después de la administración intratumoral de HVJ-E se muestran en la Fig. 12. Con la administración de 3 veces, en el grupo C (grupo de 400 HAU), en comparación con el grupo testigo, no se apreció extensión del periodo de supervivencia y en el grupo B (grupo de 40 HAU) se apreció

una extensión significativa del periodo de supervivencia. Al mismo tiempo, con el grupo de administración de 6 veces, en el grupo E (grupo de 40 HAU) así como en el grupo F (grupo de 400 HAU), se apreció una extensión significativa del periodo de supervivencia en comparación con el grupo testigo. Los resultados del ensayo de orden logarítmicos se muestran en la tabla 4.

5 Tabla 4

Administración de 3 veces	
Grupo B (40 HAU)	*
Grupo C (400 HAU)	NS
Administración de 6 veces	
Grupo E (40 HAU)	*
Grupo F (400 HAU)	**

NS: No Significativo, \*: p< 0,05, \*\*: p< 0,01

Ensayo de orden logarítmico frente a grupo testigo en el momento en que todos los animales en el grupo testigo habían muerto

10 Estimando a partir de lo que antecede, el periodo de supervivencia se extendió en todos los grupos. En este ejemplo, no se apreció ninguna diferencia significativa en el grupo de administración de 3 veces 400 HAU (grupo C), pero en los demás grupos se apreció una diferencia significativa.

(9) Peso corporal

15 Cada animal fue pesado usando una balanza electrónica ((Kensei Co., Ltd.), GX-2000) en el día después de la recepción del animal (día 7), el día de trasplante de las células tumorales (día 0) y el día de la medición del volumen tumoral (días 4, 8, 11, 15, 18, 20, 24, 28, 32 y 36). Los resultados medidos se imprimieron usando una impresora (A & D Co., Ltd., AD-8121). Para cada grupo, se calcularon las velocidades de cambio del peso corporal para animales individuales después del día 4 usando la siguiente ecuación de cálculo.

20 Velocidad de cambio del peso corporal (%)= 100x (peso corporal en cada día de medición-peso corporal en día 4)/ (peso corporal en el día 4)

En lo que respecta a las velocidades de cambio del peso corporal desde el día 4 (agrupación inicial) hasta el día 11, todos los grupos tenían algunos individuos que experimentaban una pérdida de peso corporal transitoria; sin embargo, estimando a partir de la velocidad del cambio de peso corporal media, no se observó ninguna ganancia o pérdida apreciable del peso corporal como una tendencia global, ni hubo diferencias apreciables entre los grupos.

25 En cuanto a las velocidades de cambio del peso corporal después del día 12, no se apreció ningún aumento o disminución considerable del peso corporal hasta el día 20 ni hubo ninguna diferencia apreciable entre los grupos. Después del día 20, en todos los grupos, la velocidad media de cambio del peso corporal aumentó y se observó una tendencia a una ganancia del peso corporal a lo largo del periodo experimental. En la Fig. 13 se muestran las velocidades de cambio del peso corporal desde el día 15 hasta el día 36 en los respectivos grupos.

30 Aplicación industrial

35 En el tratamiento de cánceres prostáticos están actualmente disponibles selección de PSA, extirpación quirúrgica, terapia endocrina, radioterapia y similares, pero continúa siendo un problema su tratamiento radical. El agente terapéutico/profiláctico para el cáncer que contiene una envoltura viral, particularmente la envoltura viral Sendai como ingrediente activo, proporcionado por la presente invención, exhibe un excelente efecto terapéutico/profiláctico sobre cánceres prostáticos refractarios a hormonas y es terapéuticamente en particular sobre cánceres prostáticos recurrentes después de una terapia endocrina. El agente terapéutico/profiláctico para el cáncer de la presente invención que contiene la envoltura viral Sendai sola exhibe un efecto de regresión sobre melanoma a dosis bajas y se espera que sea un nuevo fármaco terapéutico que contribuya a reducir la carga sobre el paciente.

**REIVINDICACIONES**

1. Una envoltura viral Sendai (HVJ-E), para ser usada en el tratamiento/profilaxis de cáncer prostático.
2. Una envoltura viral Sendai (HVJ-E), para ser usada en la inducción de apoptosis de cáncer prostático.
- 5 3. La envoltura viral Sendai para ser usada según la reivindicación 1 ó 2, en la que una sustancia destinada a ser introducida en un organismo vivo o célula no está incluida en la envoltura viral.
4. La envoltura viral Sendai para ser usada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es inactiva, deficiente en replicación y de tipo salvaje.
5. La envoltura viral Sendai para ser usada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la susceptibilidad a andrógenos del cáncer prostático ha sido parcial o completamente reducida.
- 10 6. La envoltura viral Sendai para ser usada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el cáncer prostático es refractario a hormonas.
7. La envoltura viral Sendai para ser usada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que es adecuada para una administración directamente al cáncer prostático.
- 15 8. La envoltura viral Sendai para ser usada según la reivindicación 7, que es adecuada para una inyección directamente al cáncer prostático.
9. La envoltura viral Sendai para ser usada según la reivindicación 8, que es adecuada para una administración a un paciente de cáncer prostático que tiene un historial de recibir terapia endocrina.
- 20 10. La envoltura viral Sendai para ser usada según la reivindicación 9, en la que el paciente de cáncer prostático que tiene un historial de recibir terapia endocrina porta un cáncer prostático cuya susceptibilidad a andrógenos ha sido parcial o completamente reducida.
11. La envoltura viral Sendai para ser usada según la reivindicación 9, en la que el paciente de cáncer prostático que tiene un historial de recibir terapia endocrina porta un cáncer prostático refractario a hormonas.
- 25 12. Una envoltura viral Sendai (HVJ-E), para ser usada en el tratamiento/profilaxis de melanoma.
13. Una composición farmacéutica, que comprende la envoltura viral Sendai (HVJ-E) como el único ingrediente activo para ser usado en el tratamiento/prevención de melanoma.

**FIG. 1**

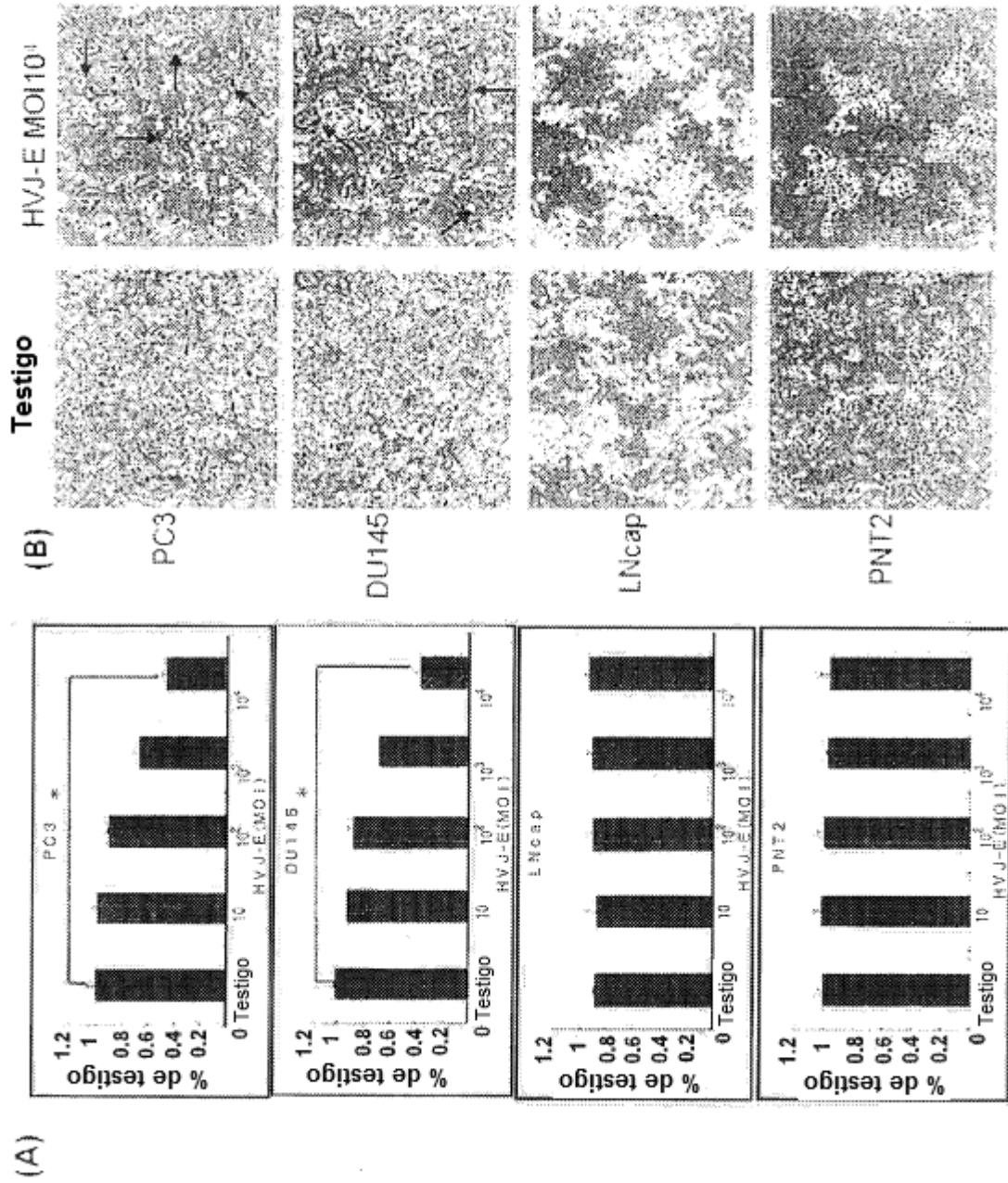


FIG. 2

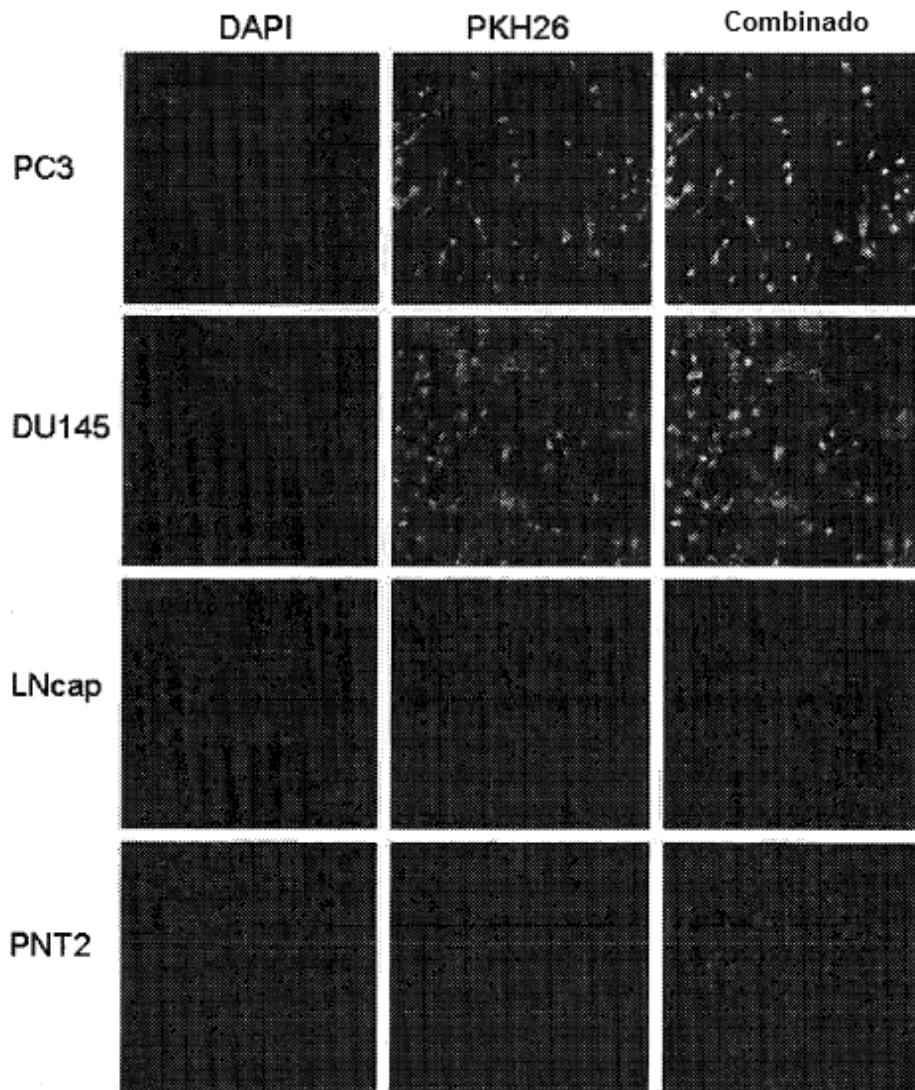


FIG. 3

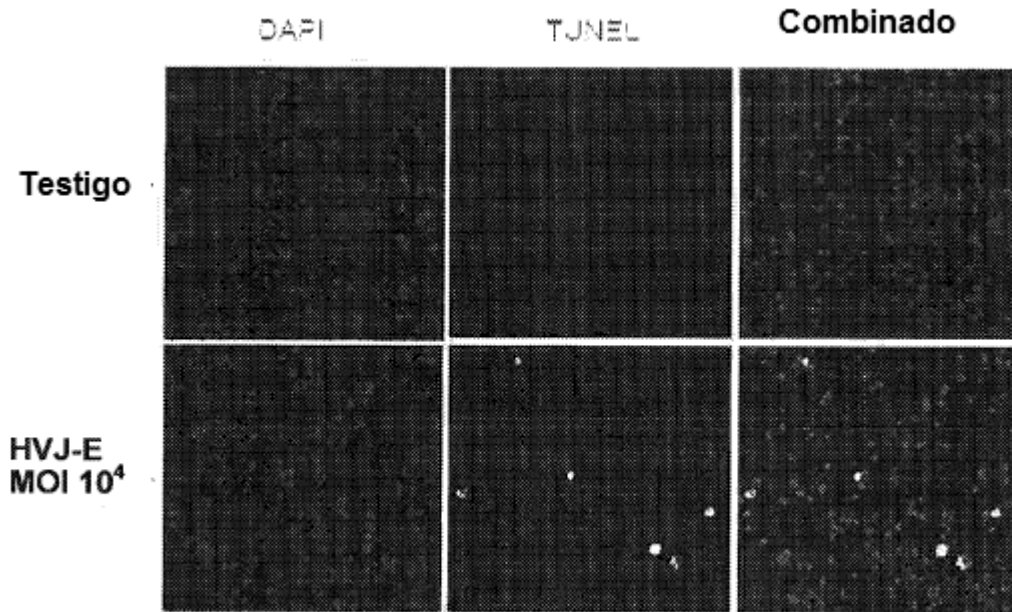




FIG. 4

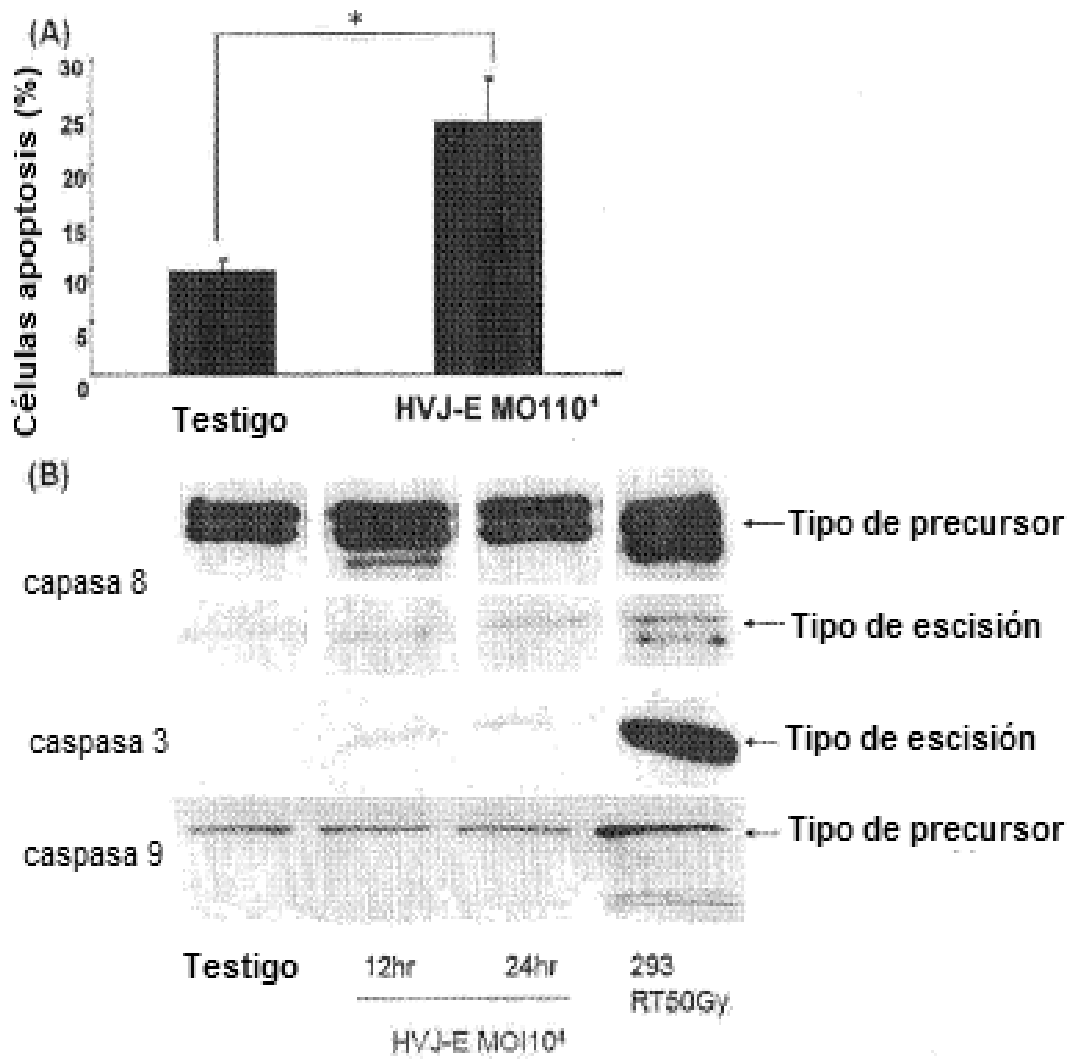
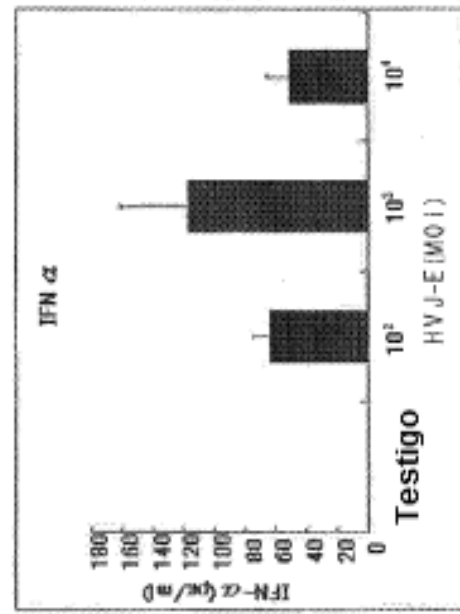
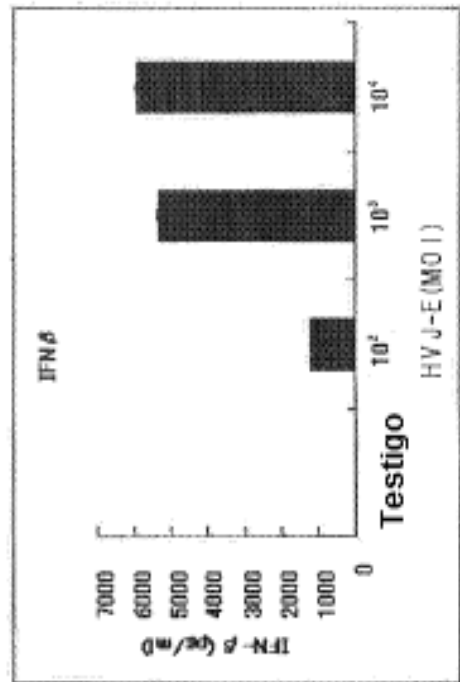


FIG. 5



(A)



(B)

**FIG. 6**

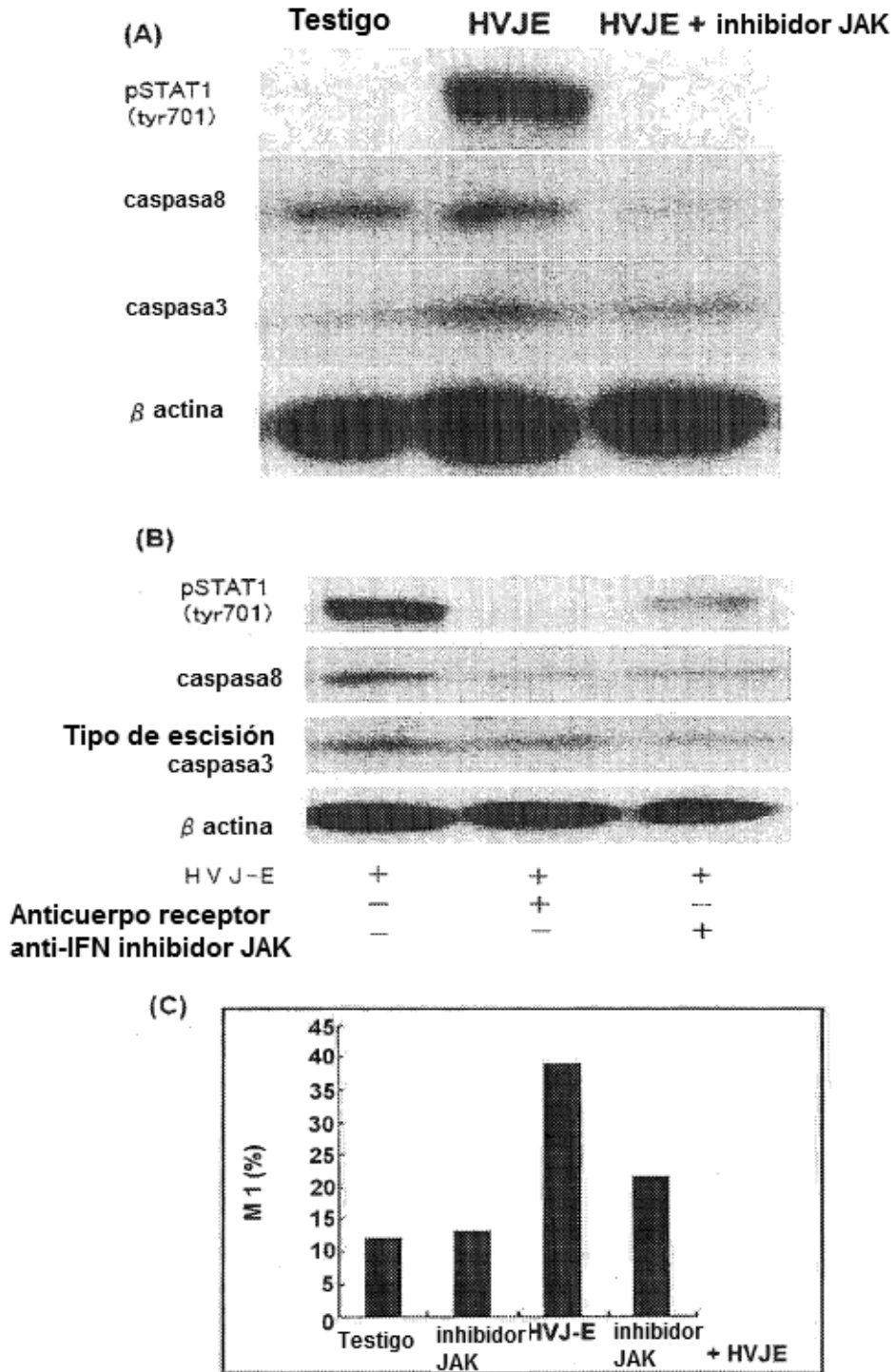


FIG. 7

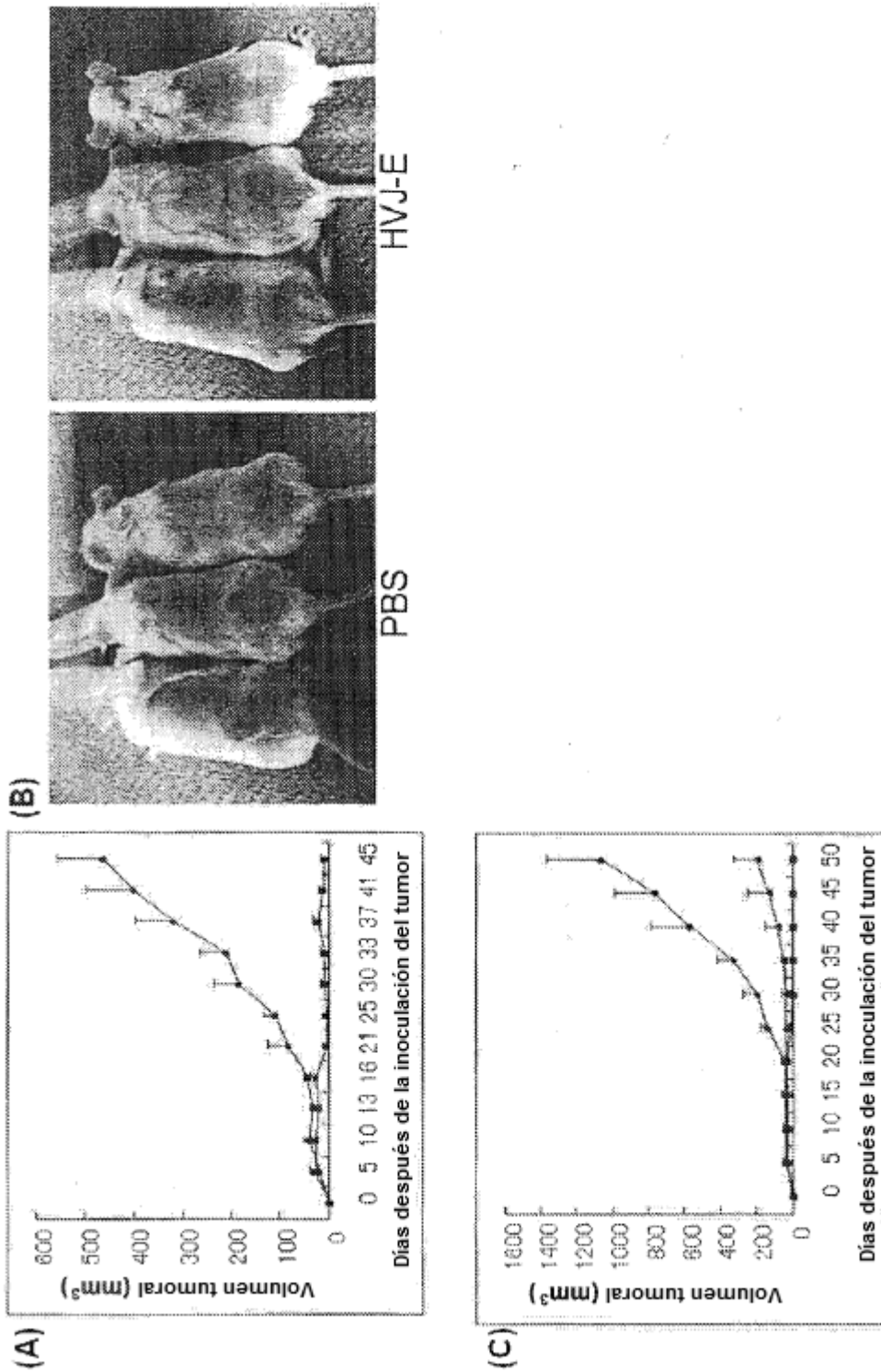


FIG.8

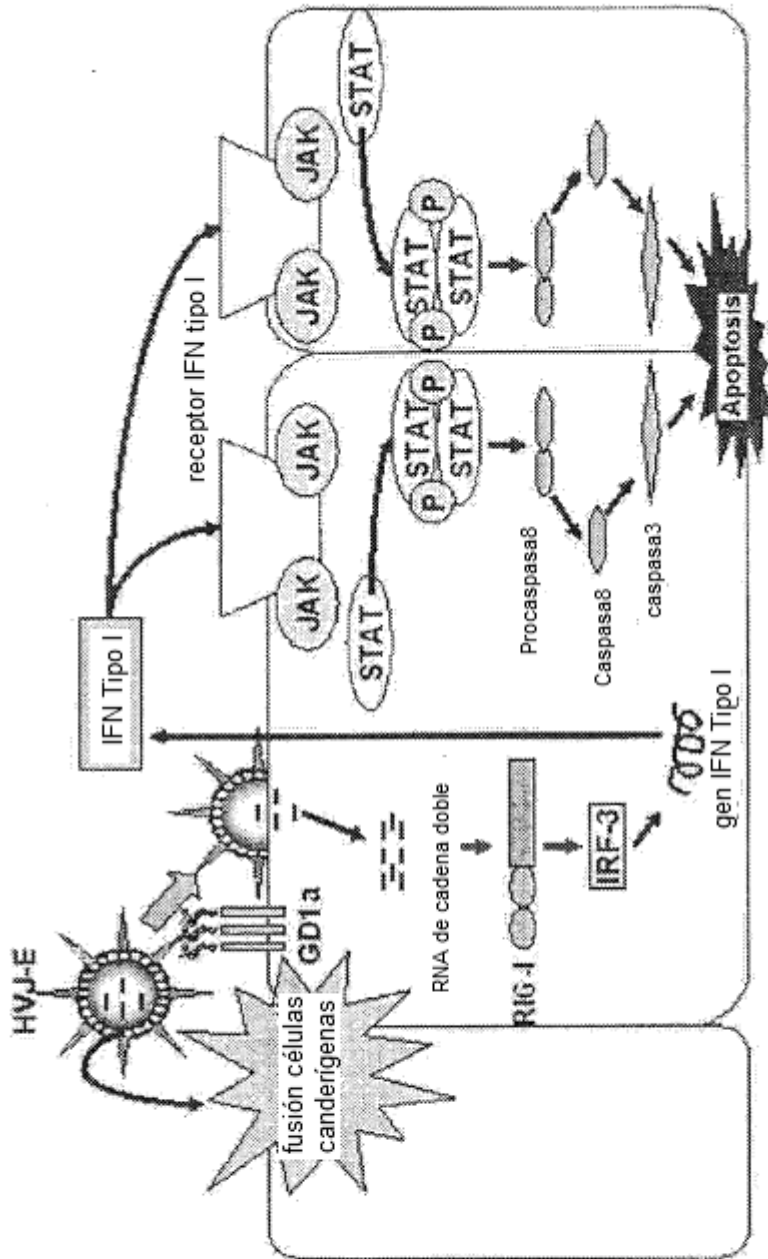


FIG. 9

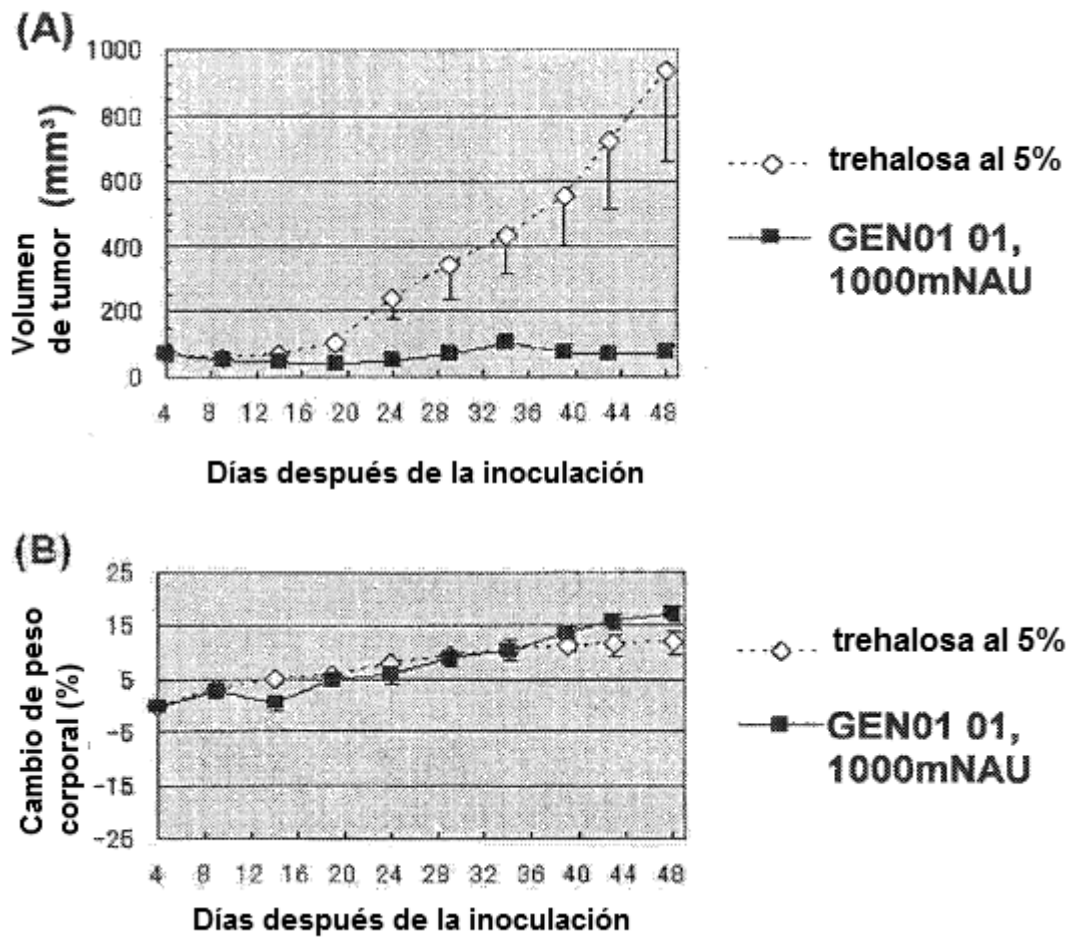


FIG. 10

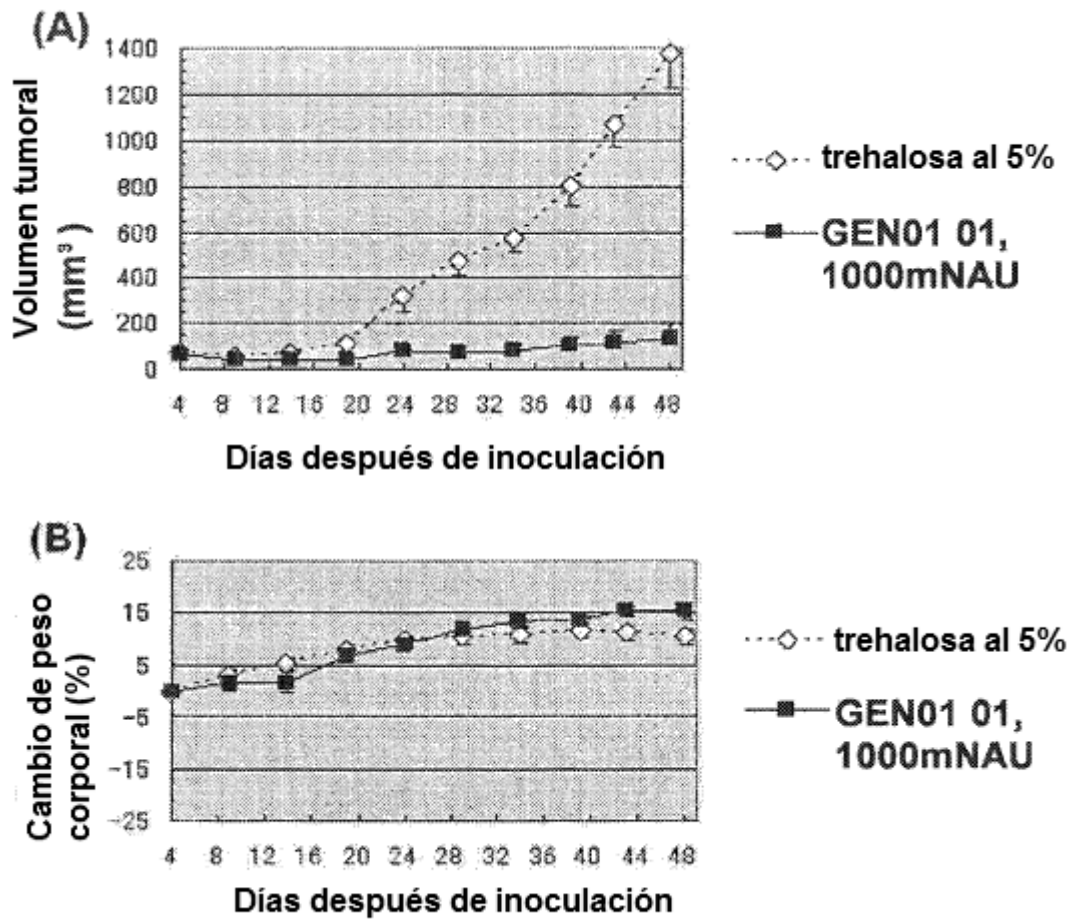


FIG. 11

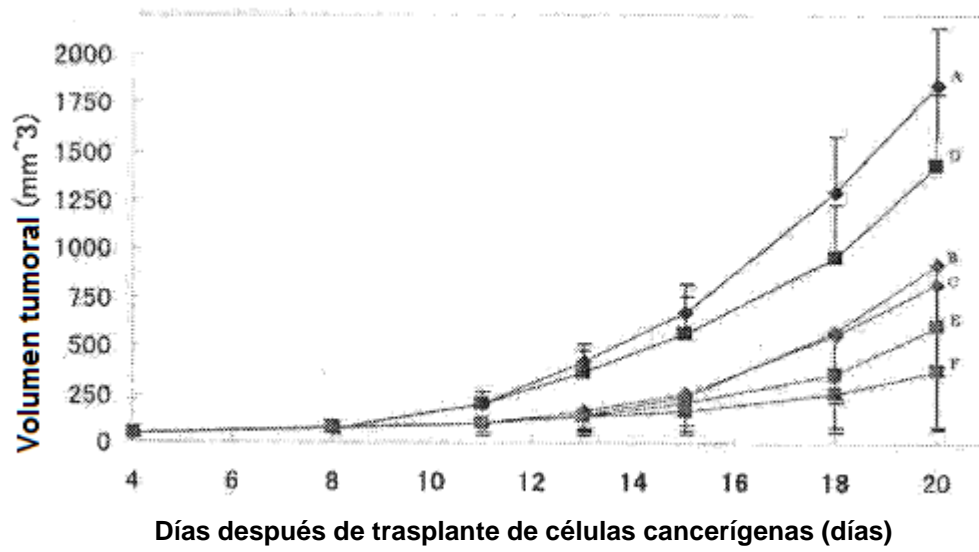




FIG. 12

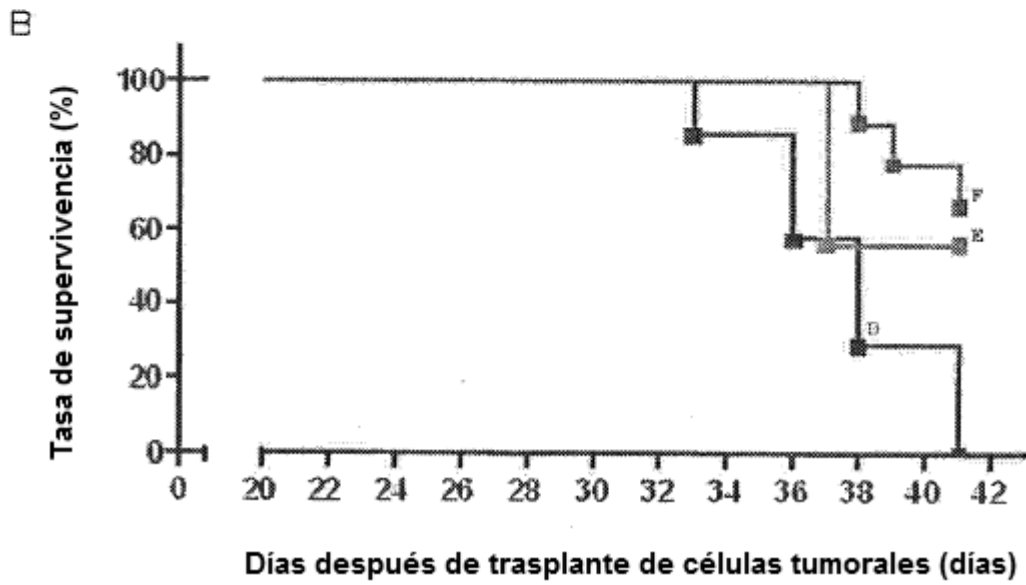
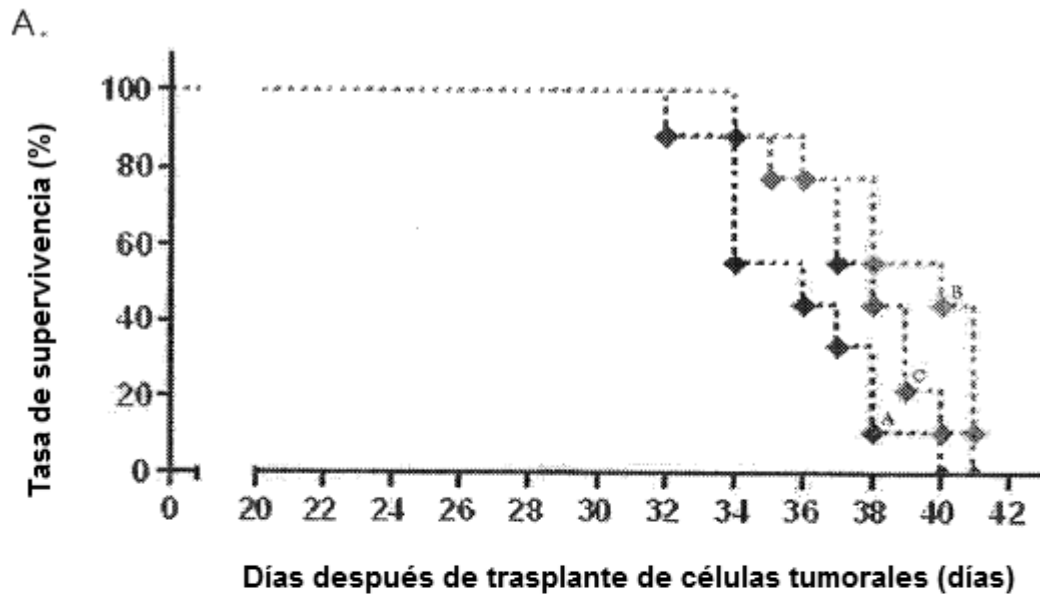


FIG. 13

