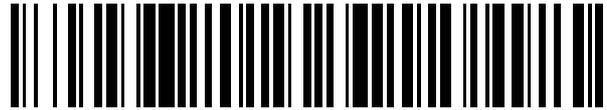


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 306**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

A61N 5/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2007 E 07701775 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 1984007**

54 Título: **Uso de inmunosupresión local de baja dosis para potenciar una terapia viral oncolítica**

30 Prioridad:

13.02.2006 US 773068 P

03.04.2006 US 788898 P

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

17.11.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**COFFEY, MATTHEW, C. y
THOMPSON, BRADLEY, G.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 551 306 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

Uso de inmunosupresión local de baja dosis para potenciar una terapia viral oncolítica

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a la inmunosupresión local en un sujeto que también recibe terapia viral oncolítica para potenciar la eficacia de la terapia.

Antecedentes

10 El cáncer se diagnostica en más de un millón de personas cada año solo en los EE.UU. A pesar de los numerosos avances en la investigación médica, el cáncer sigue siendo la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos. En los países industrializados, aproximadamente una de cada cinco personas morirá de cáncer. En la búsqueda de nuevas estrategias, la terapia con virus oncolíticos ha surgido recientemente como un enfoque viable para matar específicamente a las células tumorales. A diferencia de la terapia génica convencional, ésta utiliza la replicación de virus competentes que son capaces de difundirse a través del tejido tumoral en virtud de la replicación viral y la lisis celular concomitante, proporcionando un tratamiento alternativo para el cáncer. Los virus han sido modificados genéticamente para replicarse selectivamente y matar a las células cancerosas.

15 Los virus oncolíticos pueden utilizar múltiples mecanismos de acción para matar células cancerosas - lisis celular, apoptosis celular, antiangiogénesis y necrosis celular. El virus infecta la célula tumoral y luego comienza a replicarse. El virus continúa replicándose hasta causar la lisis la membrana de la célula huésped (reventar) de modo que la célula tumoral ya no puede contener el virus. La célula tumoral es destruida y los virus recientemente creados se esparcen hacia las células cancerosas vecinas para continuar el ciclo. Los virus oncolíticos están destinados a replicarse sólo en las células cancerosas y para pasar a través del tejido normal sin causar daño. Por lo tanto, una vez que se erradican todas las células tumorales, el virus oncolítico ya no tiene la capacidad de replicarse y el sistema inmune lo elimina del cuerpo.

20 En los últimos años, los nuevos conocimientos sobre los mecanismos moleculares de la citotoxicidad viral han proporcionado la justificación científica para diseñar virus oncolíticos más eficaces. Los recientes avances en biología molecular han permitido el diseño de varios virus modificados genéticamente, tales como los adenovirus y el virus del herpes simple que se replican específicamente en, y matan, las células tumorales. Por otra parte, los virus con capacidad oncolítica intrínseca también se están evaluando para fines terapéuticos. Aunque la eficacia de la terapia con virus oncolíticos, se ha demostrado en general en estudios preclínicos, la eficacia terapéutica en ensayos clínicos todavía no es óptima. Por lo tanto, se evalúan estrategias que podría mejorar aún más el potencial terapéutico de los virus de replicación condicional.

25 El documento WO 03/094939 se refiere a métodos para tratar o aliviar un tumor con una combinación de virus oncolíticos y radioterapia.

Resumen

35 En este documento se proporciona un virus oncolítico para el uso en un método para tratar o producir mejoría de un tumor sólido en un sujeto, cuyo método comprende:

(a) la inyección de una cantidad efectiva de un virus oncolítico dentro o cerca del tumor sólido, en donde el virus oncolítico es capaz de matar selectivamente a las células del tumor sólido, en donde el virus oncolítico es un reovirus; y

(b) la supresión de las respuestas inmunes locales en o cerca del tumor sólido irradiando el tumor sólido con una cantidad efectiva de un agente de irradiación, en donde la cantidad del agente de irradiación es de 1 a 25 Gy.

40 En ciertas realizaciones de la presente invención, el agente de irradiación se selecciona del grupo que consiste en electrones, rayos X y rayos gamma.

En ciertas realizaciones de la presente invención, la cantidad del agente de irradiación es 5 Gy.

En ciertas realizaciones de la presente invención, el agente de irradiación se administra en una dosis o fraccionada a través del tiempo.

45 En ciertas realizaciones de la presente invención, el reovirus es un reovirus de mamífero o un reovirus humano. En ciertas realizaciones, el reovirus humano se selecciona del grupo que consiste de reovirus serotipo 1, reovirus serotipo 2 y reovirus serotipo 3. En ciertas realizaciones, el reovirus serotipo 3 humano es reovirus.

En ciertas realizaciones de la presente invención, el sujeto se selecciona del grupo que consiste en perros, gatos, roedores, ovejas, cabras, vacas, caballos, cerdos, primates humanos y no humanos.

En ciertas realizaciones de la presente invención, la etapa (a) se realiza antes de la etapa (b).

Descripción de los dibujos

5 La Figura 1 muestra que tan poco como 5 gray (Gy) de radiación intensifican la citotoxicidad del reovirus.

La Figura 2 muestra que la administración de radiación y reovirus reduce el volumen del tumor *in vivo* en modelos animales inmunocompetentes e inmunodeficientes.

La Figura 3 muestra que la radiación impide la inducción de anticuerpos antivirales neutralizantes.

Descripción detallada

10 Los términos utilizados en esta solicitud se definen como se expone a continuación a menos que se indique lo contrario. Téngase en cuenta que los títulos utilizados en este documento son sólo para fines de organización y no están destinados a limitar la descripción proporcionada en este documento o las reivindicaciones adjuntas.

Definiciones

15 Una "célula neoplásica", "célula tumoral" o "célula con un trastorno proliferativo" se refiere a una célula que prolifera a una tasa anormalmente alta. Un nuevo crecimiento que comprende células neoplásicas es un neoplasma, también conocido como un "tumor". Un tumor es un crecimiento anormal de tejido, generalmente formando una masa distinta, que crece por proliferación celular más rápidamente que el crecimiento normal del tejido. Un tumor puede mostrar una falta parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. Tal como se usa en el presente documento, un tumor pretende abarcar tanto tumores hematopoyéticos como tumores sólidos.

20 Un tumor puede ser benigno (tumor benigno) o maligno (tumor maligno o cáncer). Los tumores malignos se pueden clasificar en tres tipos principales. Los tumores malignos que surgen de estructuras epiteliales se denominan carcinomas; los tumores malignos que se originan en los tejidos conectivos tales como músculo, cartílago, grasa, o hueso se llaman sarcomas; y los tumores malignos que afectan a estructuras hematopoyéticas (estructuras que pertenecen a la formación de células sanguíneas) incluyendo a los componentes del sistema inmune se llaman leucemias y linfomas. Otros tumores incluyen, pero no se limitan a, neurofibromatosis.

25 Una "lesión" es un daño, herida, o un área que es estructuralmente anormal. En el contexto de un sujeto que tiene un tumor, una lesión es una masa tumoral a menos que se describa lo contrario.

30 "Células neoplásicas activadas por Ras" o "células neoplásicas mediadas por ras" se refieren a células que proliferan a una tasa anormalmente alta debido a, al menos en parte, la activación de la vía de ras. La vía de ras puede ser activada por medio de la mutación del gen ras, nivel elevado de la expresión del gen ras, elevada estabilidad del mensaje del gen ras, o cualquier mutación u otro mecanismo que conduzca a la activación de ras o un factor o factores secuencia abajo o secuencia arriba de ras en la vía de ras, aumentando así la actividad de la vía de ras. Por ejemplo, la activación de un receptor de EGF, receptor de PDGF o SOS resulta en la activación de la vía de ras. Las células neoplásicas mediadas por Ras incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas mediadas por ras, que son células que proliferan de una forma maligna debido a la activación de la vía de ras.

35 "La infección por el virus" se refiere a la entrada y replicación del virus en una célula. Del mismo modo, "infección de un tumor por el virus" se refiere a la entrada y replicación del virus en las células del tumor.

40 "Reovirus" se refiere a cualquier virus clasificado en el género reovirus, tanto si se produce de forma natural, modificada o recombinante. Los reovirus son virus con un genoma segmentado de ARN bicatenario. Los viriones miden 60-80 nm de diámetro y poseen dos caparazones concéntricos de la cápside, cada una de los cuales es icosaédrica. El genoma consta de ARN bicatenario en 10-12 segmentos discretos con un tamaño total del genoma de 16-27 kpb. Los segmentos individuales de ARN varían en tamaño. Tres tipos distintos pero relacionados de reovirus han sido recuperados de muchas especies. Los tres tipos comparten un antígeno común de fijación del complemento.

45 El reovirus humano se compone de tres serotipos: tipo 1 (cepa Lang o TLL), tipo 2 (cepa Jones, T2J), y tipo 3 (cepa Dearing o cepa Abney, T3D). Los tres serotipos son fácilmente identificables con base en ensayos de neutralización de inhibición de la hemaglutinina (véase, por ejemplo, Fields, BN y colaboradores, 1996).

El reovirus puede ser de origen natural o modificado. El reovirus es de "origen natural" cuando puede ser aislado de una

fuerza en la naturaleza y no ha sido modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio. Por ejemplo, el reovirus puede ser de una "fuente de campo", es decir, de un ser humano que ha sido infectado con el reovirus. El reovirus también puede ser seleccionado o sometido a mutagénesis para una actividad oncolítica mejorada.

5 El reovirus puede ser modificado pero aún ser capaz de infectar lícitamente una célula de mamífero que tiene una ruta ras activa. El reovirus puede ser tratado previamente química o bioquímicamente (por ejemplo, por tratamiento con una proteasa, tal como quimotripsina o tripsina) antes de la administración a las células en proliferación. El pretratamiento con una proteasa elimina la capa externa o cápside del virus y puede aumentar la infectividad del virus. El reovirus puede ser recubierto en un liposoma o micela (Chandran y Nibert, 1998). Por ejemplo, el virión puede ser tratado con quimotripsina en presencia de concentraciones formadoras de micelas de detergentes de sulfato de alquilo para generar una nueva partícula infecciosa de subvirión (ISVP).

15 El reovirus puede ser un reovirus recombinante resultante de la recombinación/redistribución de los segmentos genómicos a partir de dos o más reovirus genéticamente distintos. La recombinación/redistribución de los segmentos genómicos de reovirus puede ocurrir en la naturaleza tras la infección de un organismo huésped con al menos dos reovirus genéticamente distintos. Los viriones recombinantes también pueden generarse en cultivo celular, por ejemplo, por coinfección de células huésped permisivas con reovirus genéticamente distintos (Nibert y colaboradores, 1995).

20 Por consiguiente, la invención contempla el uso de un reovirus recombinante resultante de la redistribución de los segmentos del genoma de dos o más reovirus genéticamente distintos, incluyendo, pero no limitándose a, reovirus humano, tal como el tipo 1 (por ejemplo, cepa Lang), el tipo 2 (por ejemplo, cepa Jones), y el tipo 3 (por ejemplo, cepa Dearing o cepa Abney); reovirus de mamíferos no humanos; o reovirus aviar. La invención contempla además el uso de reovirus recombinantes resultantes de la redistribución de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente distintos en donde al menos un virus parental está genéticamente modificado, comprende uno o más segmentos genómicos químicamente sintetizados, ha sido tratado con mutágenos químicos o físicos, o es en sí mismo el resultado de un evento de recombinación. La invención contempla además el uso del reovirus recombinante que ha sufrido recombinación en presencia de mutágenos químicos, incluyendo, pero no limitándose a, sulfato de dimetilo y bromuro de etidio, o mutágenos físicos, incluyendo, pero no limitándose a, luz ultravioleta y otras formas de radiación.

25 La invención contempla además el uso de reovirus recombinantes que comprenden supresiones o duplicaciones en uno o más segmentos de genoma, que comprenden información genética adicional como resultado de la recombinación con un genoma de la célula huésped, o que comprende genes sintéticos.

30 El reovirus puede ser modificado por incorporación de proteínas de recubrimiento mutadas, tales como por ejemplo, en la cápside externa del virión. Las proteínas pueden mutarse mediante reemplazo, inserción o supresión. El reemplazo incluye la inserción de diferentes aminoácidos en lugar de los aminoácidos nativos. Las inserciones incluyen la inserción de residuos de aminoácidos adicionales en la proteína en uno o más lugares. Las supresiones incluyen la supresión de uno o más residuos de aminoácidos en la proteína. Tales mutaciones pueden ser generadas por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio de oligonucleótidos del gen que codifica para una de las proteínas de la cubierta podría resultar en la generación de la proteína de la cubierta mutante deseada. La expresión de la proteína mutada en células de mamífero infectadas *in vitro* con el retrovirus, tales como células COS 1, dará lugar a la incorporación de la proteína mutada en la partícula del virión del reovirus (Turner y Duncan, 1992; Duncan y colaboradores, 1991; Mah y colaboradores, 1990).

40 El reovirus es preferiblemente un reovirus modificado para reducir o eliminar una reacción inmune con el reovirus. Tal reovirus modificado se denomina "reovirus inmunoprotegido". Tales modificaciones podrían incluir el empaquetado del reovirus en un liposoma, una micela u otro vehículo para enmascarar el reovirus del sistema inmunitario. Alternativamente, la cápside externa de la partícula del virión del reovirus puede ser removida ya que las proteínas presentes en la cápside externa son el determinante principal de las respuestas humorales y celulares del huésped.

45 "Sensibilización" de una célula neoplásica a la radiación, como se usa aquí, se refiere al acto de aumentar la sensibilidad de una célula neoplásica a la radiación.

"Sensibilidad" de una célula neoplásica a la radiación es la susceptibilidad de la célula neoplásica al efecto inhibitorio de la radiación. Por ejemplo, la sensibilidad de una célula neoplásica a la radiación puede estar indicada por la reducción en la tasa de crecimiento de la célula en respuesta a la radiación. La sensibilidad también puede ser demostrada por una reducción de los síntomas causados por las células neoplásicas.

50 Una célula neoplásica que es "resistente" a la radiación es una célula neoplásica que o mató la radiación o que no se inhibió el crecimiento por la radiación. Para determinar si una célula neoplásica es inhibida en su crecimiento, se puede determinar la tasa de crecimiento de la célula en presencia o en ausencia de radiación por métodos establecidos en la técnica, tales como el recuento de células. La célula neoplásica no es inhibida en su crecimiento por la radiación, si la tasa de crecimiento no es significativamente diferente, con o sin radiación.

5 Un tumor que es "resistente" a la radiación es un tumor cuya tasa de aumento de tamaño o aumento de peso no cambia en presencia de radiación. Alternativamente, si el sujeto que tiene el tumor muestra síntomas o indicadores similares del tumor si el sujeto recibe radiación o no, el tumor es resistente a la radiación. Por ejemplo, el recuento de glóbulos blancos se utiliza comúnmente como un indicador de leucemia. Si el recuento de glóbulos blancos de un paciente con leucemia no cambia significativamente después de recibir la radiación, la leucemia de este paciente es resistente a la radiación.

10 La "administración" de un virus a un sujeto se refiere al acto de administrar el virus a un sujeto en una forma tal que el virus haga contacto con las células neoplásicas objetivo. La ruta por la cual se administra el virus, así como la formulación, el excipiente o el vehículo, dependerán de la localización así como del tipo de las células objetivo. Una amplia variedad de rutas de administración se pueden emplear y se discuten a continuación con más detalle.

15 Un "virus oncolítico" es un virus que se replica preferentemente en, y que mata, las células neoplásicas. Un virus oncolítico puede ser un virus de origen natural o un virus modificado genéticamente. Los virus oncolíticos también abarcan virus inmunoprotegidos y redistribuidos como se describe en detalle para el reovirus. El virus es de "origen natural" cuando puede ser aislado de una fuente en la naturaleza y no ha sido modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio. Por ejemplo, el virus puede ser de una "fuente de campo", es decir, de un animal infectado. El virus es "modificado genéticamente" cuando ha sido modificado por intervención humana.

Un "tumor metastásico" es un tumor que ha hecho metástasis a partir de un tumor localizado en otro lugar en el mismo animal.

20 Una "cantidad efectiva" es una cantidad de un agente de irradiación o reovirus que es suficiente para dar como resultado el efecto deseado. Para un agente de irradiación utilizado para tratar o mejorar un tumor, una cantidad efectiva es una cantidad del agente de irradiación suficiente para aliviar o eliminar los síntomas del tumor o para hacer más lento el progreso del tumor.

25 Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", "que trata" o "que mejora" se refieren a un método para reducir los efectos de una enfermedad o afección o condición o síntoma de la enfermedad o condición. Por lo tanto, en el método divulgado, tratamiento se puede referir a un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de reducción o alivio en la severidad de una enfermedad o condición o síntoma establecido de la enfermedad o condición. Por ejemplo, el método para tratar el cáncer se considera que es un tratamiento si hay una reducción del 10% en uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto en comparación con el control. Por lo tanto, la reducción puede ser un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% o cualquier porcentaje de reducción entre 10 y 100 en comparación con los niveles nativos o de control. Se entiende que el tratamiento no necesariamente se refiere a una cura o ablación completa de la enfermedad, condición o síntomas de la enfermedad o condición.

35 Tal como se utiliza aquí, el término "sujeto" puede ser un vertebrado, más específicamente un mamífero (por ejemplo, un ser humano, caballo, cerdo, conejo, perro, oveja, cabra, primate no humano, vaca, gato, conejillo de indias o un roedor), un pez, un ave o un reptil o un anfibio. El término no denota una edad o sexo particular. Por lo tanto, se pretende cubrir sujetos adultos y recién nacidos, así como fetos, ya sean machos o hembras. Como se usa aquí, paciente o sujeto se pueden usar de forma intercambiable y pueden referirse a un sujeto aquejado con una enfermedad o trastorno. El término paciente o sujeto incluye sujetos humanos y veterinarios.

40 Al matar células tumorales mediante la replicación de virus oncolíticos se debe proporcionar una fuente abundante de antígenos tumorales para el cebado cruzado de células inmunitarias del huésped. Sin embargo, también se inducen respuestas inmunes antivirales. Por lo tanto, no está claro si la muerte local de los tumores por los virus oncolíticos será de beneficio inmunoterapéutico, o un obstáculo, para la generación de inmunidad antitumoral eficaz.

45 Se realizaron experimentos para investigar donde está el equilibrio entre la replicación viral, la muerte de células tumorales y la reactividad inmune (tanto para el tumor como para antígenos virales) cuando los tumores están experimentando viroterapia oncolítica eficaz. Usando un modelo en el que una inyección intratumoral directa de melanomas B16 establecidos con 4 inyecciones de reovirus (5×10^8 pfu/inyección) cura aproximadamente el 50% de los ratones inmunocompetentes C57B1/6 ($n = 8 - 10$), se generaron extensas respuestas inmunes antivirales. Sin embargo, usando ELISPOT, las citoquinas intracelulares y ensayos de proliferación de células T CFSE *in vivo*, se observó que la viroterapia intratumoral puede de hecho cebar células T no modificadas contra un antígeno tumoral definido. Además, los animales curados por viroterapia también desarrollaron memoria inmunológica de largo plazo contra el tumor. Estos datos sugieren que los enfoques adicionales diseñados para aumentar la frecuencia de células T activadas contra el tumor aumentaría la eficiencia de la viroterapia oncolítica. Por lo tanto, se combinó la terapia oncolítica ya se con agotamiento de las células T reguladoras CD4+CD25+ (Treg) o con transferencia adoptiva de células T activadas específicas para un antígeno tumoral. Los resultados muestran una disminución de la eficacia de la terapia en ausencia de Treg y una eliminación más rápida de la replicación del virus en el tumor tratado. En contraste, la viroterapia local en curso aumenta la atracción de las células T activadas al sitio del tumor en más de 4 veces con respecto a los tumores de control, lo que se traduce en una mejora significativa en la terapia ya sea sobre la viroterapia o la terapia sola de

transferencia adoptiva de células T.

Por lo tanto, las intervenciones inmunológicas que prolongan la replicación viral local, y/o mejoran las frecuencias de células T específicas de tumor, deben tener impacto terapéutico significativo tanto contra el tumor inyectado local, como contra la enfermedad metastásica sistémica no accesible para inyección viral directa.

5 Por consiguiente, la presente invención proporciona un virus oncológico para uso en un método para tratar o aliviar un tumor sólido en un sujeto, que comprende inyectar una cantidad efectiva de un virus oncolítico dentro o cerca del tumor sólido, en donde el virus oncolítico es capaz de matar células de forma selectiva del tumor sólido; y la supresión de las respuestas inmunitarias locales en o cerca del sitio del tumor sólido. Las etapas de administrar el virus oncolítico y suprimir las respuestas inmunitarias locales pueden repetirse como se desee con el fin de mejorar o tratar el tumor sólido en el sujeto. Este método mejora la actividad del virus oncolítico dentro de un tumor sólido antagonizando las respuestas inmunes antivirales. La capacidad de un virus oncolítico para mediar la destrucción del tumor depende de la capacidad del virus para replicarse en toda la masa tumoral. La inmunidad antiviral en la masa tumoral anula la eficacia de la viroterapia oncolítica mediante la inhibición de la propagación del virus en el tumor. El equilibrio entre 1) la propagación viral y la lisis celular y 2) las respuestas inmunes antivirales se puede desplazar para favorecer la replicación viral y se propagan mediante la supresión de las respuestas inmunes en el tumor. Las respuestas inmunes antivirales se pueden suprimir, por ejemplo, por irradiación del tumor sólido o la administración de agentes inmunosupresores en o cerca del sitio del tumor. En el método en el que el virus oncolítico de la invención es para uso en respuestas inmunes antivirales locales, se suprimen por radiación. El agente inmunosupresor puede ser administrado bajo condiciones que retienen sustancialmente al agente inmunosupresor en el tumor sólido. El agente inmunosupresor puede ser administrado en dosis múltiples. El agente inmunosupresor puede ser un anticuerpo anti-antivirus. Preferiblemente, la supresión inmunológica es suficiente para reducir la cantidad de infiltración de leucocitos en el tumor sólido, sin comprometer el sistema inmune del mamífero. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de dosis adecuadas de radiación o agentes inmunosupresores, y/o restringiendo los agentes inmunosupresores al tumor sólido.

25 La radioterapia, también llamada terapia de radiación, es el tratamiento del cáncer y de otras enfermedades con radiación, típicamente radiación ionizante. La radioterapia puede usarse para tratar tumores sólidos localizados, tales como cánceres de la piel, lengua, laringe, cerebro, mama, o cuello uterino. También se puede utilizar para tratar la leucemia y el linfoma.

30 La cantidad de radiación utilizada en la terapia de radiación se mide en gray (Gy), y varía dependiendo del tipo y la etapa del cáncer que está siendo tratado. Para los casos curativos (radicales), la dosis típica para un tumor epitelial sólido varía de 50 a 70 Gy, mientras que los tumores de linfoma son tratados con 20 a 40 Gy. Las dosis preventivas (adyuvantes) están típicamente alrededor de 50 a 60 Gy en fracciones de 2 Gy. Por lo general, la dosis total de radiación se fracciona en el tiempo. Los programas de fraccionamiento típicos incluyen, pero no se limitan a, 1,5 a 2 Gy por día.

35 Como se describe en el presente documento, dosis bajas de radiación fueron suficientes para mejorar la actividad del virus oncolítico dentro de un tumor sólido. Específicamente, tan poco como 5 Gy de radiación fue suficiente para mejorar la actividad del virus oncolítico dentro de un tumor sólido. Dosis totales adecuadas de radiación para uso en los métodos proporcionados incluyen, pero no se limitan a, 1, 5, 10, 15, 20 y 25 Gy de radiación o cualquier dosis de radiación entre 1 y 25 Gy. La dosis de radiación se puede administrar localmente en o cerca del sitio del tumor en una dosis o se puede fraccionar con el tiempo.

45 Un tipo de radioterapia utilizada involucra en fotones (energía electromagnética). Los rayos X fueron la primera forma de radiación de fotones que se utilizó para tratar el cáncer. Dependiendo de la cantidad de energía que poseen, los rayos pueden ser utilizados para destruir las células cancerosas en la superficie de, o más profundo en el cuerpo. Los aceleradores lineales y betatrones son máquinas que producen rayos X de cada vez mayor de energía. El uso de máquinas para enfocar la radiación (tal como de los rayos X) en un sitio de cáncer se llama "radioterapia de haz externo".

50 Los rayos gamma son otra forma de fotones utilizados en radioterapia. Los rayos gamma se producen de forma espontánea a medida que ciertos elementos (tales como radio, uranio y cobalto 60) liberan radiación a medida que decaen. Cada elemento decae a una velocidad específica y emite energía en forma de rayos gamma y otras partículas. Los rayos X y los rayos gamma tienen el mismo efecto sobre las células cancerosas.

Otra técnica para suministrar radiación a las células cancerosas es colocar implantes radiactivos directamente en un tumor o en una cavidad corporal. Esto se llama "radioterapia interna", y braquiterapia, irradiación intersticial, e irradiación intracavitaria son tipos de radioterapia interna. En este tratamiento, la dosis de radiación se concentra en un área pequeña. La radioterapia interna se utiliza con frecuencia para cánceres de lengua, útero y cuello uterino.

55 Se están evaluando varios enfoques nuevos para la terapia de radiación, para determinar su eficacia en el tratamiento

de cáncer. Una de tales técnicas es la irradiación intraoperatoria, en la que se dirige una gran dosis de radiación externa al tumor y el tejido circundante durante la cirugía. Otro enfoque investigativo es la radioterapia de haz de partículas. Este tipo de terapia se diferencia de la radioterapia de fotones en que implica el uso de partículas subatómicas de movimiento rápido para tratar cánceres localizados. Se necesita una máquina muy sofisticada para producir y acelerar las partículas requeridas para este procedimiento. Algunas partículas (neutrones, piones, y iones pesados) depositan más energía a lo largo de la ruta que toman a través del tejido de que lo hacen los rayos X o rayos gamma, causando por lo tanto daño a las células que impactan. Este tipo de radiación se denomina a veces como radiación de transferencia lineal de alta energía (LET alta). Otra investigación reciente de radioterapia se ha centrado en el uso de anticuerpos marcados radioactivamente para suministrar dosis de radiación directamente al sitio del cáncer (radioinmunoterapia).

Se han buscado activamente métodos para aumentar la eficacia de la terapia de radiación. Se están estudiando dos tipos de fármacos para investigación por sus efectos sobre las células sometidas a radiación. Los radiosensibilizadores hacen que las células tumorales sean más propensas a sufrir daños, y los radioprotectores protegen los tejidos normales de los efectos de la radiación. La hipertermia, el uso de calor, también está siendo estudiado por su eficacia en la sensibilización de los tejidos a la radiación. Se contempla que cualquier radiosensibilizador o radioprotector conocido en la técnica se pueden utilizar junto con la presente invención de una manera que sea consistente con la presente invención.

El agente de irradiación útil en el método del virus oncolítico de la invención es para uso y puede ser cualquier agente de irradiación conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitándose a, rayos X, rayos gamma (por ejemplo, los rayos gamma producidos por radio, uranio, o cobalto 60), y haces de partículas (por ejemplo, electrones, neutrones, piones y iones pesados). La irradiación puede ser en la forma de radioterapia externa o radioterapia interna (incluyendo la braquiterapia, radiación intersticial, y la irradiación intracavitaria). Los agentes de irradiación pueden estar unidos a un anticuerpo, como en radioinmunoterapia, o emplearse durante una cirugía, como en la radioterapia intraoperatoria.

La invención involucra al menos un reovirus como el virus oncolítico. Los virus oncolíticos incluyen, pero no están limitados a, virus oncolíticos que son un miembro de la familia de myoviridae, siphoviridae, podpviridae, tecoviridae, corticoviridae, plasmaviridae, lipothrixviridae, fuselloviridae, poxyviridae, iridoviridae, phycodnaviridae, baculoviridae, herpesviridae, adenoviridae, papovaviridae, polydnviridae, inoviridae, microviridae, geminiviridae, circoviridae, parvoviridae, hepadnaviridae, retroviridae, cyctoviridae, reoviridae, birnaviridae, paramyxoviridae, rhabdoviridae, filoviridae, orthomyxoviridae, bunyaviridae, arenaviridae, leviviridae, picornaviridae, sequiviridae, comoviridae, potyvriidae, caliciviridae, astroviridae, nodaviridae, tetraviridae, tombusviridae, coronaviridae, glaviviridae, togaviridae y barnaviridae. Los virus inmunoprotegidos o redistribuidos de otros virus oncolíticos también están incluidos. Además, se puede emplear también una combinación de al menos dos virus oncolíticos para practicar el método del virus oncolítico de la invención para el cual se utiliza. Unos pocos virus oncolíticos se discuten a continuación, y una persona con experiencia ordinaria en la técnica pueden practicar el método usando también virus oncolíticos adicionales de acuerdo con la presente divulgación y los conocimientos disponibles en la técnica.

Normalmente, cuando un virus entra en una célula, se activa la ARN quinasa bicatenaria (PKR) y bloquea la síntesis de proteínas, y el virus no puede replicarse en esta célula. Algunos virus han desarrollado un sistema para inhibir la PKR y facilitar la síntesis de proteínas virales así como la replicación viral. Por ejemplo, un adenovirus elabora una gran cantidad de un ARN pequeño, ARN VA1. El ARN VA1 tiene amplias estructuras secundarias y se une a PKR en competencia con el ARN bicatenario (ARNbc) que normalmente activa la PKR. Ya que requiere una longitud mínima de ARNbc para activar la PKR, ARN VA1 no activa la PKR. En vez de eso, secuestra la PKR en virtud de su gran cantidad. En consecuencia, no se bloquea la síntesis de proteína y el adenovirus se puede replicar en la célula.

Las células neoplásicas activadas por ras no están sujetas a la inhibición de la síntesis de proteína por PKR ya que ras inactiva la PKR. Estas células son por lo tanto susceptibles a infección viral incluso si el virus no tiene un sistema inhibidor de la PKR. En consecuencia, si los inhibidores de la PKR en adenovirus, virus vacuna, virus del herpes simple, o virus parapoxvirus orf están mutados a fin de no bloquear más la función de la PKR, los virus resultantes no infectan células normales debido a la inhibición de la síntesis de proteína por la PKR, pero se replican en células neoplásicas activadas por ras que carecen de las actividades de la PKR.

Por consiguiente, un virus que está modificado o mutado de tal forma que no inhibe la función de la PKR se replica selectivamente en células neoplásicas activadas por ras mientras que las células normales son resistentes. Preferiblemente, el virus es un adenovirus mutado en la región VA1, un virus vacuna mutado en la región K3L y/o E3L, un virus parapoxvirus orf mutado en el gen 0V20.0L, o un virus de la gripe mutado en el gen NS-1. El virus preferiblemente no es un virus herpes mutado en el gen γ 134.5.

Los virus se pueden modificar o mutar de acuerdo con la conocida relación estructura-función de los inhibidores de la PKR viral. Por ejemplo, ya que la región amino terminal de la proteína E3 interactúa con el dominio de la región carboxi terminal de la PKR, la supresión o mutación puntual de este dominio evita la función de anti-PKR (Chang y colaboradores, 1992, 1993, 1995; Sharp y colaboradores, 1998; Romano y colaboradores, 1998). El gen K3L del virus vacuna codifica PK3, un pseudosustrato de PKR. Hay una mutación con pérdida de función dentro de K3L. Los

truncamientos o mutaciones puntuales dentro de la porción del terminal C de la proteína K3L que es homóloga a los residuos 79 a 83 en eIF-2 para la abolición de la actividad inhibidora de PKR (Kawagishi-Kobayashi y colaboradores, 1997).

Otro ejemplo es el virus Delta24, que es un adenovirus mutante que porta una supresión de 24 pares de bases en la región E1A (Fueyo y colaboradores, 2000). Esta región es responsable de la unión al supresor del tumor celular Rb y la inhibición de la función de Rb, permitiendo de esta manera la maquinaria proliferativa celular, y por lo tanto la replicación del virus, para proceder de forma incontrolada. Delta24 tiene una supresión en la región de unión de Rb y no se une a Rb. Por lo tanto, la replicación del virus mutante se inhibe por Rb en una célula normal. Sin embargo, si se inactiva Rb y la célula se convierte en neoplásica, ya no se inhibe Delta24. En cambio, el virus mutante se replica eficientemente y lisa la célula deficiente en Rb.

Además, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) mata selectivamente las células neoplásicas (y se puede añadir opcionalmente interferón). Se demostró que un mutante del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) que es defectuoso en la expresión de la ribonucleótido reductasa, hrR3, se replica en células de carcinoma de colon, pero no en células normales del hígado (Yoon y colaboradores, 2000). El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) se replica preferentemente en las células malignas, y la cepa más comúnmente utilizada es 73-T (Reichard y colaboradores, 1992; Zorn y colaboradores, 1994; Bar-Eli y colaboradores, 1996). El virus vacuna se propaga en varias líneas de células tumorales malignas. El virus de la encefalitis ha demostrado tener un efecto oncolítico en un tumor tipo sarcoma de ratón, pero puede requerirse atenuación para reducir su infectividad en células normales. La regresión del tumor ha sido descrita en pacientes con tumores infectados con herpes zoster, virus de la hepatitis, influenza, varicela y virus del sarampión (para una revisión, véase Nemunaitis, 1999).

El virus Sindbis (SIN) se puede utilizar en los métodos descritos en el presente documento. El virus Sindbis es un miembro del género alfavirus de la familia togaviridae. El genoma del virus Sindbis es un ARN monocatenario de 11703 nucleótidos, rematado en el terminal 5' y poliadenilado en el terminal 3'. El genoma consta de una región no traducida 49S (UT), proteínas no estructurales nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4 seguido por un promotor. El promotor es seguido por una UT 26S, proteínas estructurales C, E3, E2, 6K, y E1 y finalmente una UT 3' y un terminal poliadenilado. El ARN genómico 49S es de sentido positivo, es infeccioso, y sirve como ARNm en la célula infectada.

Los vectores Sindbis sistémica y específicamente infectan/detectan y matan tumores que han hecho metástasis *in vivo*, conduciendo a una supresión significativa del crecimiento tumoral y a una supervivencia mejorada (Hurtado y colaboradores, Rejuvenation Res. 9 (1): 36-44 de (2006)). El virus Sindbis es conocido por infectar células de mamífero usando el receptor de laminina Mr 67.000, que se eleva en el tumor en comparación con las células normales, y la expresión subregulada del receptor de laminina con ARN pequeño de interferencia reduce significativamente la infectividad de los vectores Sindbis. La sobreexpresión en el tumor del receptor de laminina puede explicar la especificidad y eficacia que los vectores Sindbis demuestran por las células tumorales *in vivo*. Sindbis no tiene que someterse a manipulación genética para dirigirse a las células cancerosas o ser inyectado directamente en los tumores. Sindbis se puede inyectar en cualquier lugar en un sujeto y viajar a través del torrente sanguíneo hacia el área objetivo (Tseng y colaboradores, Cancer Res. 64 (18): 6684 - 92 (2004)). Sindbis también puede ser modificado genéticamente para portar uno o más genes que suprimen la respuesta inmune al virus y/o genes que estimulan una respuesta inmune contra el tumor, tal como, por ejemplo, genes de citoquinas antitumorales tales como los genes para interleucina 12 y para interleucina 15.

El virus oncolítico puede ser de origen natural o modificado. El virus puede ser pretratado química o bioquímicamente (por ejemplo, por tratamiento con una proteasa, tal como quimotripsina o tripsina) antes de la administración a las células neoplásicas. El pretratamiento con una proteasa remueve la capa externa o cápside del virus y puede aumentar la infectividad del virus. El virus puede estar incluido en un liposoma o micela (Chandron y Nibert, 1998) para reducir o prevenir una respuesta inmune de un mamífero que haya desarrollado inmunidad al virus. Por ejemplo, se puede tratar al virión con quimotripsina en presencia de micelas formando concentraciones de detergentes de sulfato de alquilo para generar una nueva partícula infecciosa del subvirión. El virus oncolítico también puede ser un virus redistribuido o una ISVP.

Es preferible que el virus no sea un vehículo para el suministro de un gen para el propósito de terapia génica. Por ejemplo, los virus han sido modificados genéticamente para suministrar el gen adenoviral E1A, el gen supresor de tumores p53, genes que codifican profármaco (Chmura y colaboradores, 1999; 2001) o genes bajo un promotor inducible por radiación. Estos virus, de hecho, por lo general no se replican preferencialmente en células neoplásicas y por lo tanto no son virus oncolíticos. También es preferible que el virus no sea un adenovirus o virus del herpes modificado genéticamente, o un virus que expresa una proteína E1A funcional.

Una persona con experiencia ordinaria en la técnica puede llevar a cabo los presentes métodos utilizando cualquier virus oncolítico de acuerdo con la presente divulgación y los conocimientos disponibles en la técnica. El virus oncolítico puede ser de origen natural o modificado. El virus oncolítico es "de origen natural" cuando puede ser aislado de una fuente en la naturaleza y no ha sido modificado intencionadamente por el hombre en el laboratorio. Por ejemplo, el virus oncolítico puede ser de una "fuente de campo", es decir, de un ser humano que ha sido infectado con el virus oncolítico.

5 El virus oncolítico puede ser un virus oncolítico recombinante resultante de la recombinación/redistribución de los segmentos genómicos a partir de dos o más virus oncolíticos genéticamente distintos. La recombinación/redistribución de los segmentos genómicos de virus oncolíticos se puede producir en la naturaleza después de la infección de un organismo huésped con al menos dos virus oncolíticos genéticamente distintos. También se pueden generar viriones recombinantes en cultivo celular, por ejemplo, por coinfección de células huésped permisivas con virus oncolíticos genéticamente distintos. La invención contempla además el uso de un virus oncolítico recombinante resultante de la redistribución de los segmentos del genoma de dos o más virus oncolíticos genéticamente distintos en donde al menos un virus parental está modificado genéticamente, comprende uno o más segmentos genómicos químicamente sintetizados, ha sido tratado con mutágenos químicos o físicos, o es en sí mismo el resultado de un evento de recombinación. La invención contempla además el uso del virus oncolítico recombinante que ha sufrido recombinación en presencia de mutágenos químicos, incluyendo, pero no limitándose a, sulfato de dimetilo y bromuro de etidio, o mutágenos físicos, incluyendo, pero no limitándose a, luz ultravioleta y otras formas de radiación.

15 La invención contempla además el uso de virus recombinantes oncolíticos que comprenden supresiones o duplicaciones en uno o más segmentos del genoma, que comprenden información genética adicional como resultado de la recombinación con un genoma de la célula huésped, o que comprenden genes sintéticos tales como, por ejemplo, genes que codifican agentes que suprimen respuestas inmunes antivirales.

20 El virus oncolítico puede ser modificado mediante la incorporación de proteínas de recubrimiento mutadas, tales como por ejemplo, en la cápside externa del virión. Las proteínas pueden mutarse mediante sustitución, inserción o supresión. El reemplazo incluye la inserción de diferentes aminoácidos en lugar de los aminoácidos nativos. Las inserciones incluyen la inserción de residuos de aminoácidos adicionales en la proteína en uno o más lugares. Las supresiones incluyen supresiones de uno o más residuos de aminoácidos en la proteína. Tales mutaciones pueden ser generadas por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio del oligonucleótido del gen que codifica para una de las proteínas de recubrimiento, podría resultar en la generación de la proteína de recubrimiento mutante deseada. La expresión de la proteína mutada en el virus oncolítico infectó las células de mamífero *in vitro* de tal forma que las células COS 1 pueden dar lugar a la incorporación de la proteína mutada en la partícula del virión del virus oncolítico.

25 En los métodos proporcionados, el virus oncolítico se administra en una forma tal que en última instancia puede ponerse en contacto con el tumor o las células tumorales objetivo. El virus oncolítico no se administra sistémicamente. La ruta por la cual se administra el virus oncolítico, así como la formulación, el excipiente o vehículo, dependerán de la localización así como del tipo de las células objetivo. Se puede emplear una amplia variedad de vías de administración. Por ejemplo, para un tumor sólido que sea accesible, el virus oncolítico se puede administrar mediante inyección directamente en el tumor. Para un tumor hematopoyético, por ejemplo, se puede administrar el virus oncolítico por vía intravenosa o por vía intravascular. Para los tumores que no son fácilmente accesibles dentro del cuerpo, tales como metástasis, se administra el virus oncolítico en una forma tal que pueda ser transportado sistémicamente a través del cuerpo del mamífero y de ese modo alcanzar el tumor (por ejemplo, en forma intravenosa o intramuscular). Alternativamente, se puede administrar el virus oncolítico directamente a un solo tumor sólido, donde es llevado luego sistémicamente a través del cuerpo a las metástasis. El virus oncolítico también puede administrarse por vía subcutánea, intraperitoneal, intratecal (por ejemplo, para el tumor de cerebro), tópica (por ejemplo, para melanoma), oral (por ejemplo, para el cáncer oral o esofágico), rectal (por ejemplo, para el cáncer colorrectal), a través de la vagina (por ejemplo, para el cáncer de cuello uterino o vaginal), nasal o por medio de un atomizador para inhalación (por ejemplo, para cáncer de pulmón).

30 Por lo tanto, los virus proporcionados aquí se pueden administrar *in vitro* o *in vivo* en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por farmacéuticamente aceptable se entiende un material que no sea biológicamente o de otro modo indeseable, es decir, se puede administrar el material a un sujeto, sin causar ningún efecto biológico indeseable o interacción en una forma perjudicial con cualquiera de los otros componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo sería seleccionado naturalmente, para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo y para minimizar cualquier efecto secundario adverso en el sujeto, como sería conocido por una persona ordinariamente capacitada en la técnica.

35 Por lo tanto, la invención también permite composiciones farmacéuticas que contienen virus oncolíticos y/u otros agentes activos, tales como, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, según se desee. Al elaborar las composiciones farmacéuticas, se mezclan usualmente los agentes con un excipiente, se diluyen mediante un excipiente o se incluyen dentro de un portador que puede estar en la forma de una cápsula, saquito, papel u otro contenedor. Cuando el excipiente farmacéuticamente aceptable sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido, o líquido, que actúa como vehículo, portador o medio para el ingrediente activo. Por lo tanto, las composiciones pueden estar en forma de tabletas, píldoras, polvos, pastillas, saquitos, sobres, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blandas y duras, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos empacados en forma estéril.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de

5 acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio, y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes preservantes tales como metil y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes; y agentes saborizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse de modo que proporcionen una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al sujeto empleando procedimientos conocidos en la técnica.

10 Para preparar composiciones sólidas tales como tabletas, el(los) ingrediente(s) activo(s) se mezcla(n) con un excipiente farmacéutico para formar una composición de una formulación previa sólida que contiene una mezcla homogénea del (de los) ingrediente(s) activo(s). Cuando se hace referencia a estas composiciones de formulación previa como homogéneas, se pretende que el ingrediente activo se disperse uniformemente por toda la composición de manera que la composición puede subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas.

15 Las tabletas o píldoras pueden recubrirse o bien combinarse para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o píldora puede comprender un componente de dosificación interna y uno de dosificación externa, estando este último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o que se retrase su liberación. Una variedad de materiales pueden ser utilizados para tales capas o recubrimientos entéricos, incluyendo dichos materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

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

25 Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describe en el presente documento. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes preferiblemente farmacéuticamente aceptables se pueden nebulizar mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden inhalarse directamente desde el dispositivo de nebulización o se puede fijar el dispositivo de nebulización a una mascarilla, o máquina de respiración intermitente de presión positiva. Se pueden administrar una solución, suspensión, o composiciones en polvo, preferiblemente por vía oral o nasal, desde dispositivos que suministran la formulación de una manera apropiada.

30 Otra formulación que se puede emplear en los métodos proporcionados en este documento emplea dispositivos de administración transdérmica ("parches"). Tales parches transdérmicos pueden usarse para proporcionar infusión continua o discontinua de los reovirus de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y uso de parches transdérmicos para el suministro de agentes farmacéuticos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.023.252. Tales parches pueden construirse para administración continua, pulsátil o bajo demanda de agentes farmacéuticos.

35 Otras formulaciones adecuadas para uso en la presente invención se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences. El virus oncolítico puede ser empaquetado en kits convenientes proporcionando los materiales necesarios envasados en recipientes adecuados. Se contempla que los kits también pueden incluir, agentes que mejoran una respuesta inmune a un tumor, agentes que suprimen la respuesta inmune local al virus oncolítico, agentes quimioterapéuticos y/u otros agentes farmacéuticamente activos según se desee.

40 El virus oncolítico se administra en una cantidad que es suficiente para tratar el tumor o neoplasma (por ejemplo, una "cantidad efectiva"). Esto puede resultar en una reducción en el tamaño del neoplasma, o en una eliminación completa del neoplasma. La reducción en el tamaño del neoplasma, o la eliminación del neoplasma, es causada generalmente por la lisis de las células neoplásicas ("oncólisis") por el virus oncolítico. Preferiblemente, la cantidad efectiva es de aproximadamente $1,0 \text{ pfu/kg}$ de peso corporal hasta aproximadamente 10^{15} pfu/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 10^2 pfu/kg de peso corporal hasta aproximadamente 10^{13} pfu/kg de peso corporal. Por ejemplo, para el tratamiento de un sujeto, se pueden utilizar aproximadamente 10^2 a 10^{17} unidades formadoras de placa (UFP) de virus, dependiendo del tipo, tamaño y número de tumores presentes. La cantidad efectiva se determinará sobre una base individual y puede basarse, al menos en parte, en la consideración del tipo de virus oncolítico; la ruta de administración elegida; el tamaño, la edad y el género del individuo; la severidad de los síntomas del paciente; el tamaño y otras características del neoplasma; y similares. El curso de la terapia puede durar desde varios días hasta varios meses o hasta que se logra la disminución de la enfermedad.

El virus oncolítico puede ser administrado en una sola dosis o en dosis múltiples (es decir, más de una dosis). Las dosis múltiples pueden administrarse simultáneamente, o de forma consecutiva (por ejemplo, durante un período de días o semanas). El virus oncolítico también se puede administrar a más de un neoplasma en el mismo sujeto. El virus oncolítico puede ser administrado antes de, junto con o después del inmunosupresor. El virus oncolítico puede ser suministrado por diferentes vías de administración, por ejemplo, IV, IP, etc., (secuencialmente o de manera concomitante). El virus y/o el inmunosupresor se pueden administrar una o más veces.

El virus oncolítico se formula preferiblemente en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosis desde aproximadamente 10^2 pfu hasta aproximadamente 10^{17} pfu del reovirus. El término "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del virus oncolítico calculada para producir el efecto terapéutico deseado, junto con un excipiente farmacéutico adecuado.

Las dosis eficaces de las composiciones dependen de una variedad de factores y por lo tanto pueden variar algo de un sujeto a otro. Las dosis eficaces y los horarios para la administración de las composiciones pueden ser determinadas empíricamente, y hacer tales determinaciones está dentro de las capacidades de la persona experimentada en la técnica. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a otro, dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, la gravedad de la enfermedad a tratar, el virus en particular o vector utilizado y su modo de administración. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición. Sin embargo, una cantidad apropiada puede ser determinada por una persona ordinariamente capacitada en la técnica usando sólo experimentación rutinaria teniendo en cuenta la orientación proporcionada en el presente documento.

Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son aquellos lo suficientemente grandes como para producir el efecto deseado en donde los síntomas de la enfermedad se ven afectados. La dosificación no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas y reacciones anafilácticas. La dosificación puede ser ajustada por un médico en particular en el caso de cualquier contraindicación.

Los virus oncolíticos descritos en este documento pueden ser utilizados para una variedad de propósitos. Se pueden usar en métodos para tratar trastornos proliferativos mediados por ras en un mamífero. Los virus pueden utilizarse para reducir o eliminar neoplasmas. Se pueden usar en métodos para tratar las metástasis.

Se contempla que los métodos proporcionados se pueden combinar con otras terapias tumorales tales como quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o inmunoterapia. Por lo tanto, el virus oncolítico se puede administrar junto con cirugía o la extirpación del neoplasma. Por lo tanto, se proporcionan aquí métodos para el tratamiento de un neoplasma sólido que comprende la extirpación quirúrgica del neoplasma y la administración de un virus oncolítico en, o cerca al sitio del neoplasma.

Se contempla además que el virus oncolítico se puede administrar junto con o además de los compuestos contra el cáncer o agentes quimioterapéuticos conocidos. Los agentes quimioterapéuticos son compuestos que pueden inhibir el crecimiento de tumores. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a 5-fluorouracilo, mitomicina C, metotrexato, hidroxurea, ciclofosfamida, dacarbazina, mitoxantrona, antraciclinas (Epirubicina y Doxorubicina), anticuerpos para receptores, tales como herceptina, etopósido, pregnasoma, compuestos de platino tales como carboplatino y cisplatino, taxanos tales como taxol y taxotere, terapias hormonales como el tamoxifeno y antiestrógenos, interferones, inhibidores de aromatasa, agentes progestágenos y análogos de la LHRH.

Ejemplos

Ejemplo 1. La radiación mejora la citotoxicidad del reovirus *in vitro* e *in vivo*

La vía de señalización de Ras determina la radiosensibilidad de las células tumorales. La activación de Ras promueve la supervivencia de las células tumorales después de la exposición a la radiación. La activación de Ras se asocia con mayor resistencia a la radiación *in vitro* e *in vivo*. Para determinar si el reovirus mejora la citotoxicidad del reovirus *in vitro*, se sembraron células en placa y luego fueron tratadas con 5 Gray o tratadas con Mock. Cuatro horas más tarde se administró el reovirus serotipo 3 (cepa Dearing) a las células. La supervivencia celular se cuantificó por Cristal Violeta. La Figura 1 muestra que tan poco como 5 Gy de radiación mejora la citotoxicidad del reovirus.

Para determinar los efectos de la radiación y del reovirus *in vivo*, se administró radioterapia fraccionada y reovirus (administración intratecal) a tumores de xenoinjertos HCT116 (Figura 2A) o tumores singénicos B 16 (Figura 2B) en ratones. La Figura 2 muestra que la administración de la radiación y del reovirus reduce el volumen del tumor *in vivo* en modelos animales inmunodeficientes e inmunocompetentes mejor que el reovirus o la radiación solos.

Estos resultados demuestran que el reovirus no se inactiva por dosis clínicamente relevantes de irradiación gamma y que la radiación aumenta la citotoxicidad del reovirus. Estos resultados también demostraron que la citotoxicidad

mejorada observada no depende del momento de la radiación. El reovirus y la radiación inducen individualmente detención del ciclo celular en G2/M y juntos causan mayores niveles de apoptosis.

Ejemplo 2. Efectos de la terapia con reovirus y radiación en humanos

5 El diseño del estudio para determinar los efectos de la terapia con reovirus y radiación en los seres humanos se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Diseño del estudio

Fase	Pacientes x Cohorte	Dosis de reolisina (TCID50)	RT (Gy)	Dosis del virus	Día de administración del virus
Ia	3	1 x 10 ⁸	20 Gy en 5F	2	2, 4
Ia	3	1 x 10 ⁹	20 Gy en 5F	2	2, 4

10 Los pacientes fueron incluidos con base en una lesión medible (lesión objetivo), la RT paliativa indicada, PS (ECOG) ≤ 2, funciones hematológica, renal y hepática adecuadas. Se excluyeron los pacientes con lesiones previamente irradiadas o pacientes con terapia inmunosupresora o con VIH, hepatitis B o infección C conocida.

La cantidad de reolisina dependía del volumen objetivo de la lesión. El volumen del tumor se calculó mediante la medición de tres diámetros ortogonales (D1, D2 y D3) y la aplicación de la fórmula $V = \pi/6 \times D1 \times D2 \times D3$. Los tumores recibieron volúmenes de inyección de entre 2 a 10 mL.

15 La radiación se suministró con electrones o rayos X con voltaje orto con base en el volumen bruto del tumor. El volumen bruto del tumor se delineó en tres dimensiones mediante examen clínico y/o radiológico. Se añadió un margen circunferencial de 1 cm para comprender el volumen objetivo planificado.

20 La toxicidad limitante de la dosis (DLT) se determinó como sigue: ANC < 0,5 x 10⁹ que dura más de cinco días o ANC < 0,5 x 10⁹ con sepsis; recuento de plaquetas < 25 x 10⁹/L; grado 2 de neurotoxicidad o cardiotoxicidad; o cualquier otro grado hematológico no relacionado con el fármaco de 3/4 de toxicidad, con las excepciones de síntomas como los gripales, náuseas y vómitos, si no se han administrado las medidas profilácticas o terapéuticas apropiadas.

El resumen de pacientes se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de pacientes

Tipo de tumor	Edad	Sexo	Lesión objetivo	Dosis del reovirus (TCID50)	Dosis de radiación
Esofágico	56	M	Nodo linfático supraclavicular	1 x 10 ⁸	20 Gy
Melanoma	58	M	Nódulo sobre la ingle	1 x 10 ⁸	20 Gy
Páncreas	67	M	Masa de la pared abdominal	1 x 10 ⁸	20 Gy
Ovario*	58	F	Nódulo sobre la espalda	1 x 10 ⁹	20 Gy
Células escamosas primarias desconocidas	41	F	Nódulo sobre la clavícula	1 x 10 ⁹	20 Gy
Células escamosas del cuero cabelludo	71	M	Parótida izquierda	1 x 10 ⁹	20 Gy

Tipo de tumor	Edad	Sexo	Lesión objetivo	Dosis del reovirus (TCID50)	Dosis de radiación
Cáncer pulmonar de células pequeñas	70	M	Nódulo sobre el brazo	1 x 10 ⁹	20 Gy
* El paciente sólo recibió una dosis de reovirus.					

5 Para medir la excreción de reovirus, se tomaron muestras de sujetos antes y después del tratamiento. Se extrajo el ARN a partir de sangre, orina, heces y esputo. El análisis mediante RT-PCR mostró que no se detectó diseminación viral en estos sujetos en ningún nivel de dosis.

Para determinar si la radiación suprime las respuestas inmunes locales, se examinaron los niveles de anticuerpos antivirales neutralizantes. La Figura 3 muestra que la radiación impide la inducción de anticuerpos antivirales neutralizantes.

La Tabla 3 muestra la actividad antitumoral del reovirus y la radiación en la lesión objetivo.

10 Tabla 3. Actividad antitumoral en la lesión objetivo

Tipo de tumor	Lesión objetivo	Respuesta a 1 mes	Respuesta a los 2 meses	Respuesta a los 3 meses
Esofágico	Nodo linfático supraclavicular	PR	PR	PR
Melanoma	Nódulo sobre la ingle	SD	-	-
Páncreas	Masa de la pared abdominal	PD	-	-
Células escamosas primarias desconocidas	Nódulo sobre la clavícula	PR	PR	PR
Células escamosas del cuero cabelludo	Parótida izquierda	SD	SD	pPR
PR-respuesta parcial; SD-enfermedad estable; PD-enfermedad progresiva; PPR- respuesta parcial patológica				

Estos resultados muestran que la combinación de reovirus intratumoral y la radiación es bien tolerada. Además, no se observaron DLT, diseminación viral, o inducción de anticuerpos neutralizantes antirreovirus.

Referencias

15 Patente de los Estados Unidos No. 6.136.307.

Patente de los Estados Unidos No. 6.100.243.

Publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 20020037576.

Bar-Eli, N., y colaboradores, "Preferential cytotoxic effect of Newcastle disease virus on lymphoma cells," J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 409-415 (1996).

20 Chandran y Nibert, "Protease cleavage of reovirus capsid protein mu1 and muC is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subviral particle," J. of Virology 72(1): 467-75 (1998).

- Chang y colaboradores, PNAS 89: 4825-4829 (1992).
- Chang, H. W. y colaboradores, Virology 194: 537-547 (1993).
- Chang y colaboradores, J. Virol. 69: 6605-6608 (1995).
- 5 Chmura y colaboradores, "Strategies for enhancing viral-based gene therapy using ionizing radiation," Radiation oncology Investigations 7: 261-269 (1999).
- Chmura y colaboradores, "Prospects for viral-based strategies enhancing the anti-tumor effects of ionizing radiation," Seminars in Radiation Oncology 11(4): 338-345 (2001).
- Cuff y colaboradores, "Enteric reovirus infection as a probe to study immunotoxicity of the gastrointestinal tract," Toxicological Sciences 42(2): 99-108 (1998).
- 10 Duncan y colaboradores, "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein," Virology 182(2): 810-9 (1991).
- Fields, B. N. y colaboradores, Fundamental Virology, 3ra Edición, Lippincott-Raven (1996).
- Fueyo, J., y colaboradores, "A Mutant Oncolytic Adenovirus Targeting the Rb Pathway Produces Anti-Glioma Effect in vivo," Oncogene 19(1): 2-12 (2000).
- 15 Harlow y colaboradores, "Antibodies. A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988.
- Kawagishi-Kobayashi, M., y colaboradores, Mol. Cell. Biology 17: 4146-4158 (1997).
- Mah y colaboradores, "The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virion-anchoring function," Virology 179(1): 95-103 (1990).
- Nemunaitis, J., Invest. New Drugs 17: 375-386 (1999).
- 20 Nibert, M. L., Schiff, L. A., y Fields, B. N., "Reoviruses and their replication," páginas 1557-96 en Fundamental Virology (Fields y colaboradores, 3ra Edición), Lippincott-Raven Press, 1996.
- Reichard, K. W., y colaboradores, "Newcastle disease virus selectively kills human tumor cells," J. of Surgical Research 52: 448-453 (1992).
- Romano y colaboradores, Mol. and Cell. Bio. 18: 7304-7316 (1998).
- 25 Sharp y colaboradores, Virol. 250: 301-315 (1998).
- Turner y Duncan, "Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma 1: evidence for a conformation-dependent receptor binding domain," Virology 186(1): 219-27 (1992).
- Yoon, S. S., y colaboradores, "An oncolytic herpes simplex virus type I selectively destroys diffuse liver metastases from colon carcinoma," FASEB J. 14: 301-311(2000).
- 30 Zorn, U. y colaboradores, "Induction of cytokines and cytotoxicity against tumor cells by newcastle disease virus," Cancer Biotherapy 9(3): 22-235 (1994).

REIVINDICACIONES

1. Un virus oncolítico para uso en un método para tratar o aliviar un tumor sólido en un sujeto, método que comprende:
 - (a) la inyección de una cantidad efectiva de un virus oncolítico dentro o cerca del tumor sólido, en donde el virus oncolítico es capaz de matar selectivamente las células del tumor sólido, en donde el virus oncolítico es un reovirus; y
 - 5 (b) la supresión de las respuestas inmunes locales en o cerca del tumor sólido irradiando el tumor sólido con una cantidad efectiva de un agente de irradiación, en donde la cantidad del agente de irradiación es de 1 a 25 Gy.
2. El virus oncolítico para el uso de la reivindicación 1, en donde el agente de irradiación se selecciona entre el grupo que consiste en electrones, rayos X y rayos gamma.
3. El virus oncolítico para el uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la cantidad del agente de irradiación es 5 Gy.
- 10 4. El virus oncolítico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el agente de irradiación se administra en una dosis o fraccionado en el tiempo.
5. El virus oncolítico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el reovirus es un reovirus de mamífero o un reovirus humano.
- 15 6. El virus oncolítico para el uso de la reivindicación 5, en donde el reovirus humano se selecciona entre el grupo que consiste del reovirus serotipo 1, el reovirus serotipo 2 y el reovirus serotipo 3.
7. El virus oncolítico para el uso de la reivindicación 6, en donde el reovirus humano es el reovirus serotipo 3.
8. El virus oncolítico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el sujeto se selecciona entre el grupo que consiste en perros, gatos, roedores, ovejas, cabras, reses, caballos, cerdos, primates humanos y no humanos.
- 20 9. El virus oncolítico para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la etapa (a) se lleva a cabo antes de la etapa (b).

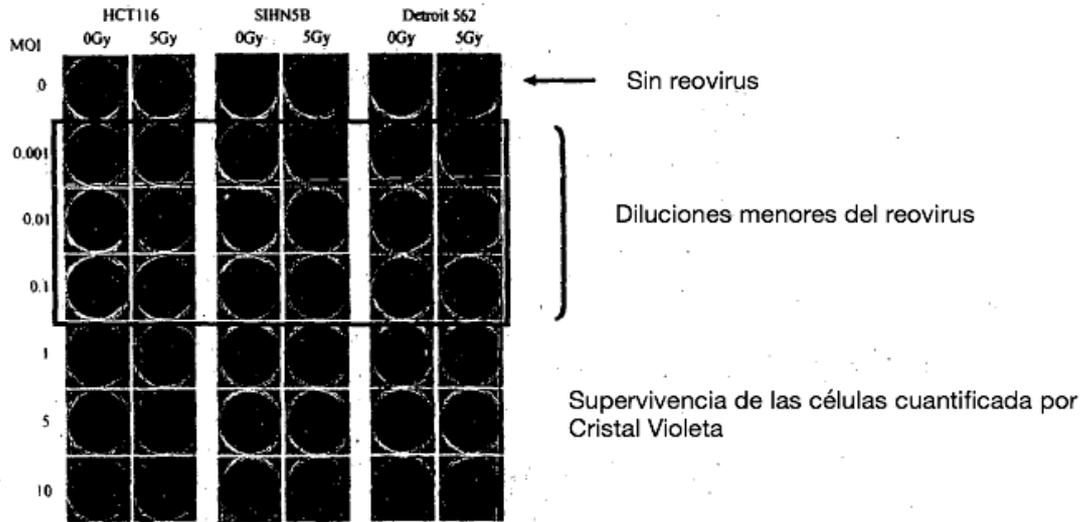


FIG. 1

Radioterapia fraccionada más reovirus i.t.:
Tumores de xenoinjerto HCT116

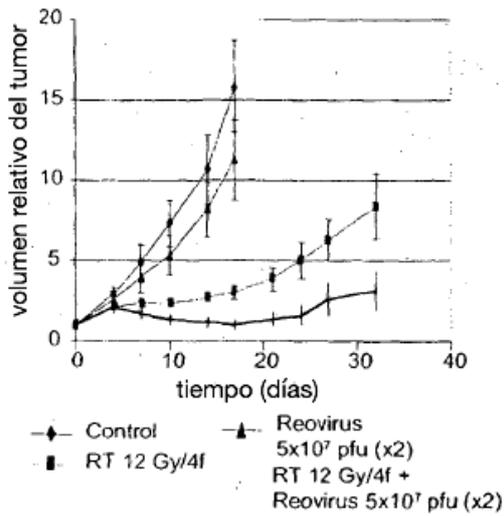


FIG. 2A

Radioterapia fraccionada más reovirus i.t.:
Tumores singénicos B 16 en ratones C57BL6

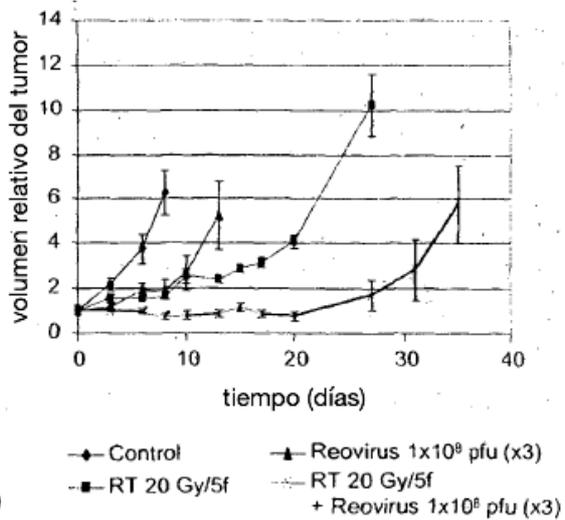


FIG. 2B

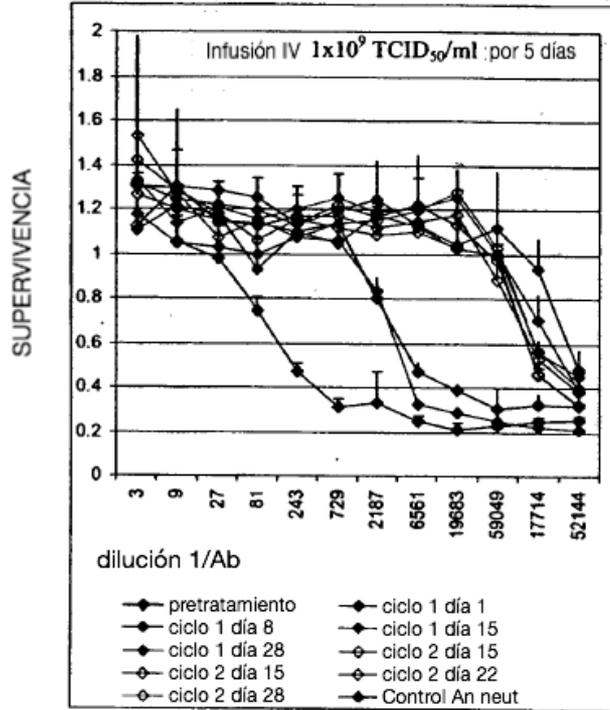


FIG. 3A

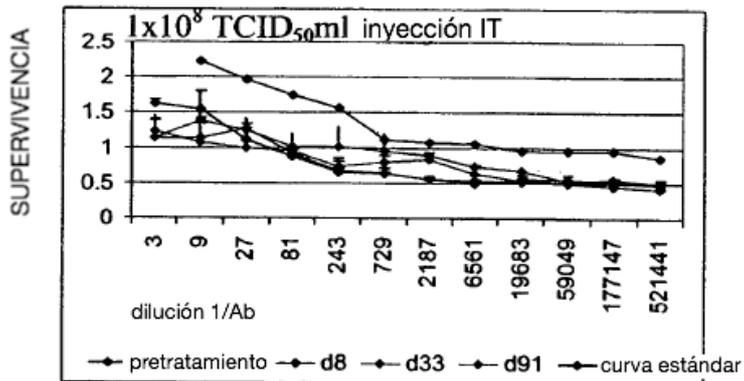


FIG. 3B

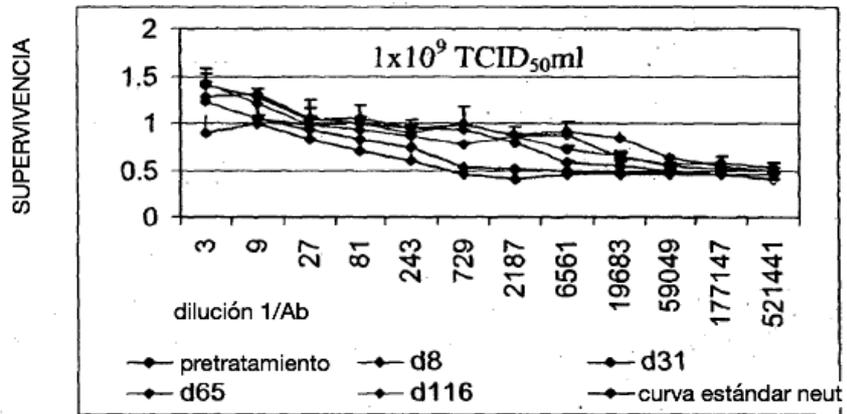


FIG. 3C