

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 559 684**

51 Int. Cl.:

A01N 43/04 (2006.01)

A01N 63/00 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2008 E 08732358 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2015 EP 2136633**

54 Título: **Terapia del cáncer del virus de la vacuna oncolítica**

30 Prioridad:

15.03.2007 US 894932 P

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

15.02.2016

73 Titular/es:

**SILLAJEN BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)
450 Sansome Street, Suite 650
San Francisco, CA 94111, US**

72 Inventor/es:

KIRN, DAVID

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 559 684 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia del cáncer del virus de la vacuna oncolítica

Antecedentes de la invención**I. Campo de la invención**

- 5 La presente invención se refiere en general a los campos de la oncología y la virología. Más particularmente se refiere a los poxvirus, específicamente incluyendo los virus de vacunas oncolíticas adecuadas para el tratamiento del cáncer.

II. Antecedentes

10 La homeostasis del tejido normal es un proceso muy regulado de la proliferación celular y la muerte celular. Un desequilibrio tanto de la proliferación celular como de la muerte celular puede convertirse en un estado canceroso (Solyanik *et al.*, 1995; Stokke *et al.*, 1997; Mumby y Walter, 1991; Stokke *et al.*, 1998; Magi-Galluzzi *et al.*, 1998). Por ejemplo, el cáncer de cuello uterino, de riñón, de pulmón, de páncreas, colorectal, y de cerebro son sólo algunos ejemplos de los muchos tipos de cáncer que pueden producirse (Erlandsson, 1998; Kolmel, 1998; Mangray y King, 1998; Mougín *et al.*, 1998). De hecho, la aparición del cáncer es tan alta que más de 500.000 muertes al año se atribuyen al cáncer en los Estados Unidos solamente.

15 El mantenimiento de la proliferación celular y la muerte celular es al menos parcialmente regulado por protooncogenes y supresores tumorales. Un protooncogen o supresor tumoral puede codificar proteínas que inducen la proliferación celular (por ejemplo, sis, erbB, src, ras y myc), proteínas que inhiben la proliferación celular (por ejemplo, Rb, p16, p19, p21, p53, NF1 y WT1) o proteínas que regulan la muerte celular programada (por ejemplo, bc1-2) (Ochi *et al.*, 1998; Johnson y Hamdy, 1998; Mougín *et al.*, 1998). Sin embargo, los reordenamientos genéticos o mutaciones de estos protooncogenes y supresores tumorales causan la conversión de un protooncogén en un potente oncogén que causa cáncer o de un supresor tumoral en un polipéptido inactivo. A menudo, una única mutación puntual es suficiente para lograr la transformación. Por ejemplo, una mutación puntual en la proteína supresora tumoral p53 causa la pérdida completa de la función de la p53 de tipo silvestre (Vogelstein y Kinzler, 1992).

20 Actualmente, hay pocas opciones eficaces para el tratamiento de muchos tipos comunes de cáncer. El curso de tratamiento para un individuo dado depende del diagnóstico, la etapa que la enfermedad ha alcanzado y de factores tales como la edad, sexo, y salud general del paciente. Las opciones más convencionales de tratamiento del cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. La cirugía juega un papel central en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Típicamente, se requiere un enfoque quirúrgico para la biopsia y para la eliminación del crecimiento canceroso. Sin embargo, si el cáncer se ha metastasizado y está muy extendido, es poco probable que la cirugía resulte en una cura y debe tomarse un enfoque alternativo.

25 La radioterapia y la quimioterapia son las alternativas más comunes al tratamiento quirúrgico del cáncer (Mayer, 1998; Ohara, 1998; Mougín *et al.*, 1998). La radioterapia implica una radiación de alta energía dirigida con mucha precisión a fin de destruir las células cancerosas y al igual que la cirugía es sobre todo eficaz en el tratamiento de células cancerosas localizadas no metastasizadas. Los efectos secundarios de la radioterapia incluyen irritación de la piel, dificultad para tragar, boca seca, náuseas, diarrea, pérdida de cabello, y pérdida de energía (Curran, 1998; Brizel, 1998). La quimioterapia, el tratamiento del cáncer con fármacos contra el cáncer, es otra forma de terapia del cáncer, y la mayoría de los enfoques de quimioterapia incluyen la combinación de más de un fármaco contra el cáncer, lo que se ha demostrado aumenta la tasa de respuesta en una amplia variedad de cánceres (documentos de patente de Estados Unidos 5.824.348; 5.633.016 y 5.798.339). Sin embargo, un efecto secundario importante de los fármacos de quimioterapia es que también afectan a las células normales de los tejidos, donde las células con más probabilidad de verse afectadas son en algunos casos las que se dividen rápidamente (por ejemplo, las de la médula ósea, tracto gastrointestinal, sistema reproductivo y folículos pilosos). Otros efectos secundarios tóxicos de los fármacos de quimioterapia pueden incluir llagas en la boca, dificultad para tragar, boca seca, náuseas, diarrea, vómitos, fatiga, sangrado, pérdida del cabello, e infecciones.

30 Los virus oncolíticos de replicación selectiva son prometedores en el tratamiento del cáncer (Kirn *et al.*, 2001). Estos virus pueden causar la muerte de las células tumorales a través de efectos oncolíticos directos dependientes de la replicación y/o dependientes de la expresión de genes víricos (Kirn *et al.*, 2001). Además, los virus son capaces de mejorar la inducción de la inmunidad antitumoral mediada por células dentro del huésped (Todo *et al.*, 2001; Sinkovics *et al.*, 2000). Estos virus también pueden ser manipulados para expresar transgenes terapéuticos dentro del tumor a fin de aumentar la eficacia antitumoral (Hermiston, 2000). Sin embargo también hay limitaciones importantes con este enfoque terapéutico.

35 Mastrangelo *et al.*, 1998, Cancer Gene Ther., Vol. 6, páginas 409-422 revela que a siete pacientes inmunocompetentes, revacunados, con melanoma cutáneo incurable por cirugía se les trató las metástasis dérmicas y subcutáneas con inyecciones intratumorales dos veces a la semana de un máximo de 2×10^7 pfu por lesión de un

virus de vaccinia recombinante oncolítico deficiente en TK que codificaba GM-CSF humano. Se observaron respuestas parciales y completas.

Por lo tanto, se necesitan más terapias adicionales para el tratamiento del cáncer. El uso de virus oncolíticos presenta un área potencial de desarrollo.

5 Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un vector de virus vaccinia que es capaz de replicación que es deficiente en timidina quinasa (TK) y expresa GM-CSF para uso en un método de inducción de oncolisis de un tumor en un ser humano, en donde el método comprende administrar a dicho ser humano al menos 1×10^9 pfu de un vector de virus vaccinia por medio de la inyección dentro de la masa tumoral o de la vasculatura del tumor. Los métodos incluyen inducir la oncolisis o colapso de la vasculatura tumoral en el sujeto que tiene el tumor lo que comprende administrar a dicho sujeto al menos 1×10^9 partículas víricas de un vector de virus vaccinia deficiente en TK, que expresa GM-CSF, capaz de replicación, suficiente para inducir la oncolisis de las células en el tumor. En un aspecto adicional de la invención, los métodos pueden excluir el pre-tratamiento de un sujeto con una vacuna de vaccinia, es decir no se necesita que el sujeto se vacune 1, 2, 3, 4, 5, o más días, semanas, meses, o años antes de administrar la terapia descrita en este documento. En algunos aspectos, tumores o cánceres no inyectados se infectarán con el virus terapéutico, tratando de este modo al paciente tanto por la administración local como por la diseminación sistémica.

En ciertos aspectos, se administra al sujeto al menos 1×10^9 , 2×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} , 1×10^{12} , 5×10^{12} o más partículas víricas o unidades formadoras de placa (pfu), incluyendo los valores diversos e intervalos entre ellos. La dosis vírica se puede administrar en 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más mililitros, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos. En un aspecto, la dosis es suficiente para generar un nivel detectable de GM-CSF en el suero del paciente, por ejemplo, al menos aproximadamente, como máximo aproximadamente o aproximadamente 5, 10, 40, 50, 100, 200, 500, 1,000, 5,000, 10,000, 15,000 a 20,000 pg/ml, incluyendo todos los valores e intervalos entre ellos. Se contempla que una sola dosis de virus se refiere a la cantidad administrada a un sujeto o un tumor en un periodo de 1, 2, 5, 10, 15, 20, o 24 horas. La dosis se puede extender a través del tiempo o por inyección separada. Típicamente, se administran dosis múltiples a la misma región diana general, tal como en la proximidad de un tumor o en el caso de administración intravenosa en un punto de entrada en particular en el torrente sanguíneo o sistema linfático de un sujeto. En ciertos aspectos, la dosis vírica se administra con un aparato de inyección que comprende una aguja que proporciona múltiples puertos en una sola aguja o múltiples dientes acoplados a una jeringa, o una combinación de los mismos. En un aspecto adicional, el vector del virus vaccinia se administra 2, 3, 4, 5, o más veces. En todavía un aspecto adicional, el virus vaccinia se administra durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días o semanas.

El sujeto es un ser humano afligido con un cáncer y/o un tumor. En ciertas formas de realización el tumor puede ser no resecable antes del tratamiento y resecable después del tratamiento. En ciertos aspectos el tumor está localizado sobre o en el hígado. En otros aspectos, el tumor puede ser un tumor de cáncer de cerebro, un tumor de cáncer de cabeza y cuello, un tumor de cáncer de esófago, un tumor de cáncer de piel, un tumor de cáncer de pulmón, un tumor de cáncer del timo, un tumor de cáncer de estómago, un tumor de cáncer de colon, un tumor de cáncer de hígado, un tumor de cáncer de ovario, un tumor de cáncer uterino, un tumor de cáncer de la vejiga, un tumor de cáncer testicular, un tumor de cáncer del recto, un tumor de cáncer de mama, o un tumor de cáncer pancreático. En otras formas de realización el tumor es un tumor de la vejiga. En todavía otras formas de realización el tumor es un melanoma. El tumor puede ser un tumor recurrente, primario, metastásico, y/o resistente a múltiples fármacos. En ciertas formas de realización, el tumor es un tumor hepatocelular o un tumor metastasizado originado en otro tejido o ubicación. En ciertos aspectos el tumor está en el hígado.

En ciertos aspectos, el método comprende además administrar al sujeto una segunda terapia del cáncer. La segunda terapia del cáncer puede ser quimioterapia, terapia biológica, radioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia anti-vascular, crioterapia, terapia con toxinas y/o cirugía, incluyendo combinaciones de las mismas. En un aspecto adicional, la quimioterapia puede ser taxol o sorafenib. En todavía un aspecto adicional, la cirugía incluye la quimioembolización transarterial (procedimiento TACE, véase Vogl *et al.*, European Radiology 16(6):1393, 2005). El método puede comprender además una segunda administración del vector de virus vaccinia. Los métodos pueden comprender además evaluar la viabilidad de las células tumorales antes, durante, después del tratamiento, o una combinación de los mismos. En ciertas formas de realización el virus se administra por vía intravascular, intratumoral, o una combinación de las mismas. En un aspecto adicional la administración es por inyección en la masa tumoral. En todavía una forma de realización adicional, la administración es por inyección en o en la región de la vasculatura del tumor. En todavía una forma de realización adicional, la administración es por inyección en el sistema linfático o vasculatura regional a dicho tumor. En ciertos aspectos el método incluye la formación de imágenes del tumor antes de o durante la administración. En ciertos aspectos, un paciente es o no es inmunizado anteriormente con una vacuna de virus vaccinia. En un aspecto adicional, el sujeto puede ser inmunocomprometido, ya sea naturalmente o clínicamente.

En ciertos aspectos, el virus se administra en una cantidad suficiente para inducir la oncolisis en al menos 20% de las células de un tumor inyectado, en al menos 30% de las células de un tumor inyectado, en al menos 30% de las células de un tumor inyectado, en al menos 40% de las células de un tumor inyectado, en al menos 50% de las

células de un tumor inyectado, en al menos 60% de las células de un tumor inyectado, en al menos 70% de las células de un tumor inyectado, en al menos 80% de las células de un tumor inyectado, o en al menos 90% de las células de un tumor inyectado.

5 En ciertas formas de realización, el virus vaccinia comprende más de un gen vírico modificado. Los genes víricos modificados pueden comprender uno o más de (a) un polipéptido modulador de interferón; (b) un polipéptido de control de complemento; (c) un polipéptido modulador de quimioquinas o TNF; (d) un inhibidor de la serina proteasa; (e) un polipéptido modulador de IL-1 β ; (f) un polipéptido en la forma EEV no infeccioso; (g) un polipéptido vírico que actúa inhibiendo la liberación de virus infeccioso de las células (forma de polipéptido de virus antiinfeccioso) o combinaciones de los mismos.

10 Las formas de realización de la invención se dirigen a los caminos críticos del cáncer comunes. La orientación hacia estos caminos consiste en la modulación de varios mecanismos celulares (por ejemplo, los niveles de timidina quinasa celular: sensible a E2F; activación de la vía EGF-R; santuario inmunológico: respuesta anti-vírica IFN (ras, p53); tamaño de poro vascular inducido por VEGF: deposición IV) que conducen a múltiples mecanismos de eficacia, tales como la oncolisis: necrosis, apagado vascular, inducción de ataque de CTL, sistémica: IT, IV; CTLs específicas del tumor.

15 Las formas de realización de la invención se basan en ensayos clínicos de Fase I que demuestran la seguridad y eficacia del virus vaccinia como un tratamiento para el cáncer. Se llevó a cabo un ensayo clínico de melanoma metastásico con la incorporación de siete pacientes con una mediana de esperanza de vida < 6 meses usando inyecciones intratumorales en un estudio con aumento de la dosis bisemanal. El ensayo indicó que el virus vaccinia fue seguro, bien tolerado y dio lugar a respuestas del tumor en 5 pacientes (71%) con dos supervivientes a largo plazo sin enfermedad.

20 Los resultados iniciales de los ensayos de Fase I/II han demostrado también la seguridad continua de JX-594. Se observaron síntomas de tipo gripe durante de 5-8 días. Se observó también una disminución transitoria de las plaquetas (plt), los ganglios, recuento absoluto de neutrófilos (ANC) (típicamente Grl-2). Hubo una muerte en el estudio en el día 8, pero no se determinó que estuviera relacionada con el tratamiento. En general, la viremia de JX-594 fue tolerada bien con una post-inyección inmediata (15-30 minutos): máximo de 3×10^8 genomas totales en la sangre y un pico de replicación (día 5-8): máximo de 10^{10} genomas totales en la sangre.

Otras formas de realización de la invención se describen a lo largo de esta solicitud. Cualquier forma de realización descrita con respecto a un aspecto de la invención se aplica a otros aspectos de la invención también y vice versa.

30 Los términos "que inhiben," "que reducen," o "que previenen," o cualquier variación de estos términos, cuando se usan en las reivindicaciones y/o la solicitud incluyen cualquier disminución medible o inhibición completa para lograr un resultado deseado.

35 El uso de la palabra "un" o "una" cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o la solicitud puede significar "uno," pero también es consistente con el significado de "uno o más," "al menos uno," y "uno o más de uno."

El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique expresamente para referirse a alternativas solamente o las alternativas son mutuamente excluyentes, aunque la solicitud apoya una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o."

40 Como se usa en esta solicitud y reivindicación(es), las palabras "que comprenden" (y cualquier forma de que comprenden, tales como "comprende" y "comprenden"), "que tiene" (y cualquier forma de que tiene, tal como "tienen" y "tiene"), "que incluye" (y cualquier forma de que incluye, tales como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de que contiene, tales como "contiene" y "contienen") son incluidas de forma abierta y no se excluyen elementos adicionales, no citados o etapas del método.

45 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención serán aparentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican formas de realización específicas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente.

Descripción de los dibujos

50 Los siguientes dibujos forman parte de la presente solicitud y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede entender mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las formas de realización específicas presentadas en esta solicitud.

FIG. 1. Diseño de estudio del ensayo clínico para tumores hepáticos usando JX-594 por inyección intratumoral.

FIG. 2. Diseño de estudio del ensayo clínico para melanoma usando JX-594 por inyección intratumoral.

FIG. 3. Terapia vírica oncolítica dirigida que tiene múltiples mecanismos novedosos, para la erradicación del cáncer.

- 5 FIG. 4. Supervivientes a largo plazo sin enfermedad después del ensayo clínico de Fase I de JX-594 de melanoma metastásico. Paciente 1, parte superior, una mujer de 32 años de edad: Refractario:DTIC, IL-2; tumores inyectados: CR; metástasis no-inyectadas: dérmica: CR; mama: CR con cirugía. Viva, 1,5+ años sin enfermedad. Paciente 2, parte inferior, un hombre de 75 años de edad: múltiples lugares de metástasis (n=24); tumores inyectados: CR; metástasis no inyectadas:-CR; vivo, 3+ años sin enfermedad.
- FIG. 5. Respuestas al ensayo clínico de Fase I de JX-594 tanto en tumores inyectados como no inyectados.
- FIG. 6. JX594-IT-hep001 - Datos demográficos del paciente y estado de tratamiento - cohorte 1 y 2.
- FIG. 7. JX594-IT-hep001 - Datos demográficos del paciente y estado de tratamiento - cohorte 3.
- 10 FIG. 8. Difusión intravenosa de JX-594 en el torrente sanguíneo: la fuga temprana desde el tumor se corresponde con la dosis, mayormente eliminada a las 6 horas.
- FIG. 9. Viremia de replicación de JX-594 evidente en 80% de los pacientes: la onda secundaria de JX-594 en la sangre se demuestra en los ciclos 1-7. (+) después de que la dosis de entrada se eliminó, (-) nivel por debajo del límite de detección, cuadrados = pacientes fuera del estudio, y (p) = datos pendientes. Límite de detección = 700 genomas/ml.
- 15 FIG. 10. Viremia de replicación de JX-594 evidente en 80% de los pacientes: la onda secundaria de JX-594 en la sangre se demuestra en los ciclos 1-7, días 3 - 22.
- FIG. 11. Necrosis avascular inducida por el tratamiento agudo de cerrado vascular asociada con la replicación de JX-594 (pt. 1, cáncer gástrico).
- 20 FIG. 12. Enfermedad estable a largo plazo con control de carcinoma de células escamosas con JX-594 (pulmón - cohorte 2).
- FIG. 13. Respuesta metabólica (PET) de la respuesta del tumor de melanoma inyectado con JX-594 después de 2 ciclos de JX-594(cohorte 3).
- FIG. 14. Respuesta metabólica (PET) del control a largo plazo del carcinoma del hígado inyectado con JX-594 (cohorte 2) durante 9+ meses.
- 25 FIG. 15. Respuesta de los marcadores tumorales: 99,9% disminución en la destrucción del cáncer de hígado por la prueba de AFP Rapid demostrada por los marcadores tumorales.
- FIG. 16. La ganancia de peso corporal con JX-594, 10% de aumento (6 kg; 14 libras) demuestra la tolerabilidad, y eficacia.
- 30 FIG. 17. Viremia sistémica y respuesta tumoral: viremia asociada con JX-594, eficacia sistémica resultante (HCC-cohorte 2) - disminución de AFP 40%.
- FIG. 18. Entrega sistémica de JX-594 a los tumores y respuesta: eficacia en los tumores distantes no inyectados después de inyección met al hígado. Respuesta metabólica PET en dos tumores no inyectados después de 2 ciclos (paciente 304, cohorte 3).
- 35 FIG. 19. Datos de tratamiento, eficacia y supervivencia: respuestas del tumor mediante CT y PET, supervivientes a largo plazo.
- FIG. 20. Perfil del ensayo.
- FIGs. 21A-21B. Pruebas hematológicas y de función de hígado claves (barras de error, error estándar de la media). (A) El aumento de ANC se correlaciona con un aumento de la dosis de JX-594 y un aumento de la expresión de hGM-CSF. Barras rellenas: ANC; barras abiertas: GM-CSF. Eje x: N° de identificación del paciente. (B) Niveles de ALT de los pacientes en las cohortes 3 y 4 en el primer ciclo. La mayoría de los pacientes no experimentaron cambios significativos en los niveles de ALT con el tiempo; se observó también una leve transaminitis transitoria.
- 40 FIGs. 22A-22C. Cambios en las pruebas hematológicas. (A) Trombocitopenia dependiente de la dosis. (B) La magnitud de la trombocitopenia es independiente del ciclo. (C) La magnitud de los cambios en ANC, eosinófilos, y monocitos fue más significativa en el ciclo 1 en comparación con los ciclos posteriores. Barras blancas: ANC; barras grises: eosinófilos; barras negras: monocitos. Las barras de error representan el error estándar de la media.
- 45 FIGs. 23A-23F. Farmacocinética, difusión transmitida por la sangre e infección del tumor distante por JX-594. (A) Concentraciones agudas del genoma en circulación. Los genomas de JX-594 se detectaron tan pronto como 15 minutos después de la inyección. En las cohortes 1 a 3, las tasas de aclaramiento agudo fueron consistentes entre las cohortes. (B) Se muestran las concentraciones de genoma de JX-594 de las cohortes 1 y 3 en el ciclo 1. Las concentraciones de genoma de JX-594, incluyendo los niveles de los picos secundarios de viremia, estuvieron
- 50

relacionadas con la dosis. LOQ: límite de cuantificación. Las barras de error representan el error estándar de la media. (C) Concentraciones representativas de genoma de JX-594 en el ciclo 1. (D) Recuperación de JX-594 y expresión de hGM-CSF de un paciente de melanoma (cohorte 3). Se detectaron niveles altos de genoma de JX-594 y de GM-CSF en la circulación así como en los fluidos corporales malignos (cohorte 3, paciente de melanoma).
 5 Asterisco: no detectable; PE: derrame pleural. (E) La presencia infecciosa de JX-594 se demostró por la expresión de lac-Z (azul) de las células en un derrame pleural maligno. (F) Muestra de biopsia de metástasis de cáncer de hígado no inyectado (cuello) que muestra la tinción del virus vaccinia B5R (flechas; marrón).

FIGs. 24A-24B. Eficacia antitumoral. (A) Exploraciones CT representativas y mediciones del tumor de un tumor diana de cáncer de pulmón de células grandes. Círculos: tumores. Flecha: tiempo en que se inició la administración de JX-594. Nótese los cambios en el área de la sección transversal del tumor con el tiempo. (B) Resultados de imágenes representativas del examen físico, de CT y PET-CT que demuestran la respuesta objetiva del tumor (después de 4 ciclos) de un tumor metastásico en el cuello, inyectado después de la inducción de anticuerpos neutralizantes de alto título a JX-594.
 10

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere al tema expresado en la reivindicación 1. El poxvirus que expresa GM-CSF puede ser manipulado para ser más eficaz o más eficiente para matar a las células cancerosas y/o ser menos tóxico o perjudicial para las células no cancerosas, por mutación o modificación de los productos génicos de tal manera que las alteraciones hagan a los virus más capaces de infectar al huésped, menos tóxico para las células huésped, y/o
 20 más capaces de infectar las células cancerosas. Una modificación obligatoria es hacer al virus deficiente en la función de la timidina quinasa (TK).

I. POXVIRUS

Los poxvirus se conocen desde hace siglos, y las marcas características de la viruela producidas por el virus variola (viruela) dan a esta familia su nombre. Parece que la viruela apareció por primera vez en China y el lejano Oriente hace más de 2000 años. Afortunadamente, este virus a menudo fatal ha sido ahora erradicado, el último brote natural ocurrió en 1977 en Somalia.
 25

La partícula vírica de poxvirus es ovalada o en forma de ladrillo, midiendo de unos 200-400 nm de largo. La superficie externa está surcada en filas paralelas, a veces dispuestas en forma helicoidal. Las partículas son extremadamente complejas, y contienen más de 100 proteínas distintas. Las formas extracelulares contienen dos membranas (EEV - viriones envueltos extracelularmente), mientras que las partículas intracelulares solo tienen una membrana interna (IMV - viriones maduros intracelulares). La superficie exterior se compone de lípidos y proteínas que rodean el núcleo, que está compuesto de una nucleoproteína fuertemente comprimida. Antigénicamente, los poxvirus son también muy complejos, induciendo anticuerpos tanto específicos como de reacción cruzada. Hay al menos diez enzimas presentes en la partícula, principalmente involucrados con el metabolismo del ácido nucleico/replicación del genoma.
 30

El genoma del poxvirus es ADN lineal de doble cadena de 130-300 Kbp. Los extremos del genoma tienen un bucle de horquilla terminal con varias secuencias de repetición en tándem. Se han secuenciado varios genomas de poxvirus, y la mayoría de los genes esenciales están situados en la parte central del genoma, mientras que los genes no esenciales se encuentran en los extremos. Hay aproximadamente 250 genes en el genoma del poxvirus.
 35

La replicación tiene lugar en el citoplasma, ya que el virus es suficientemente complejo para haber adquirido todas las funciones necesarias para la replicación del genoma. Hay una cierta contribución de la célula, pero la naturaleza de esta contribución no está clara. Sin embargo, a pesar de que la expresión génica y la replicación del genoma del poxvirus se producen en células anucleadas, la maduración está bloqueada, lo que indica algún papel de la célula.
 40

Los receptores para los poxvirus no son generalmente conocidos, pero probablemente son múltiples en número y en diferentes tipos de células. Para vaccinia, uno de los posibles receptores es el receptor de EGF (McFadden, 2005). La penetración puede también implicar más de un mecanismo. La pérdida de la cubierta ocurre en dos etapas: (a) eliminación de la membrana externa cuando la partícula entra en la célula y en el citoplasma, y (b) la partícula es adicionalmente desnudada y el núcleo pasa dentro del citoplasma.
 45

Una vez en el citoplasma celular, la expresión génica se lleva a cabo por enzimas víricas asociadas con el núcleo. La expresión se divide en 2 fases: primeros genes: los cuales representan aproximadamente el 50% del genoma, y se expresan antes de la replicación del genoma, y genes tardíos, que se expresan después de la replicación del genoma. El control temporal de la expresión es proporcionado por los promotores tardíos, que son dependientes de la replicación del ADN para su actividad. Se cree que la replicación del genoma envuelve autocebado, lo que conduce a la formación de concatémeros de alto peso molecular, que son posteriormente cortados y reparados para hacer genomas víricos. El ensamblaje vírico se produce en el citoesqueleto y probablemente involucra interacciones con las proteínas del citoesqueleto (por ejemplo, proteínas de unión a actina). Se forman inclusiones en el citoplasma que maduran como partículas víricas. La propagación de célula a célula puede proporcionar un mecanismo alternativo para la propagación de la infección. En general, la replicación de este virus grande y complejo es bastante rápida, tardando como promedio sólo 12 horas.
 50
 55

Al menos nueve poxvirus diferentes causan enfermedades en los seres humanos, pero el virus variólico y el vaccinia son los más conocidos. Las cepas variola se dividen en variola mayor (25-30% de muertes) y variola menor (mismos síntomas pero menos de 1% de tasa mortal). La infección con ambos virus se produce naturalmente por la vía respiratoria y es sistémica, produciendo una variedad de síntomas, pero sobre todo con las características pústulas variólicas y la cicatrización de la piel.

A. Virus vaccinia

El virus vaccinia es un virus grande, complejo, con envoltura que tiene un genoma lineal de doble cadena de ADN de aproximadamente 190 kbp y que codifica aproximadamente a 250 genes. El vaccinia es bien conocido por su papel como la vacuna que erradicó la viruela. Después de la erradicación de la viruela, los científicos han estado explorando el uso de vaccinia como una herramienta para la entrega de genes en tejidos biológicos (terapia génica e ingeniería genética). El virus vaccinia es único entre los virus de ADN, ya que sólo se replica en el citoplasma de la célula huésped. Por lo tanto, se requiere un genoma grande para codificar varias enzimas y proteínas necesarias para la replicación del ADN vírico. Durante la replicación, vaccinia produce varias formas infecciosas que difieren en sus membranas exteriores: el virión maduro intracelular (IMV), el virión intracelular envuelto (IEV), el virión envuelto asociado con la célula (CEV) y el virión envuelto extracelular (EEV). IMV es la forma infecciosa más abundante y se piensa que es responsable de la difusión entre huéspedes. Por otro lado, se cree que CEV juega un papel en la difusión de célula a célula entre huéspedes. Por otro lado, se cree que EEV juega un papel en la difusión de célula a célula y se cree que EEV es importante para la difusión a largo plazo dentro del organismo huésped.

Vaccinia codifica varias proteínas que proporcionan la resistencia de los virus a los interferones. K3L es una proteína que tiene homología con F-2 α . La proteína K3L inhibe la acción de PKR, un activador de los interferones. E3L es otra proteína de vaccinia que también inhibe la activación de PKR y que también es capaz de unirse al ARN de doble cadena.

El virus vaccinia está estrechamente relacionado con el virus que causa la viruela de la vaca. El origen exacto de vaccinia es desconocido, pero la opinión más común es que el virus vaccinia, virus cowpox, y virus variola (el agente causante de la viruela) se derivan todos de un virus ancestral común. También se especula que el virus vaccinia fue originariamente aislado de los caballos. Una infección por virus de vaccinia es leve y normalmente asintomática en individuos sanos, pero puede causar una erupción leve y fiebre, con una muy baja tasa de mortalidad. Una respuesta inmune generada contra una infección de virus de vaccinia protege a esa persona contra una infección de la viruela letal. Por esta razón, el virus vaccinia se utilizó como vacuna de virus vivo contra la viruela. La vacuna del virus vaccinia es segura, ya que no contiene el virus de la viruela, pero en ocasiones ciertas complicaciones y/o efectos adversos de la vacuna pueden surgir, especialmente si la vacuna es inmunocomprometida.

Como se discutió anteriormente, los virus vaccinia han sido diseñados para expresar un número de proteínas extranjeras. Una de estas proteínas es el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos, o GM-CSF. GM-CSF es una proteína secretada por los macrófagos estimulante de células madre para producir granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, y basófilos) y macrófagos. El GM-CSF humano está glicosilado en los residuos de los aminoácidos 23 (leucina), 27 (asparagina), y 39 (ácido glutámico) (véase el documento de patente de los Estados Unidos 5.073.627). GM-CSF es también conocido como molgramostin o, cuando la proteína se expresa en células de levadura, sargramostin (marca registrada Leukine®), que se usa como un medicamento para estimular la producción de células blancas de la sangre, especialmente granulocitos y macrófagos, después de la quimioterapia. Previamente se ha informado de un virus vaccinia que expresa GM-CSF. Sin embargo, no fue entregado como un agente oncolítico, sino meramente como un vector de administración para GM-CSF. Como tal, ha sido administrado a pacientes a dosis por debajo de las que se puede alcanzar oncolisis significativa. En este documento se describe el uso de un virus vaccinia que expresa GM-CSF que, en algunas formas de realización, se administra a concentraciones superiores a 1×10^8 pfu o partículas.

B. Poxvirus modificados

Los virus son inactivados, inhibidos, o eliminados con frecuencia por moléculas inmunomoduladoras tales como los interferones ($-\alpha$, $-\beta$, $-\gamma$) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Moss, 1996). Los tejidos del huésped y células inflamatorias/inmunológicas con frecuencia secretan estas moléculas en respuesta a la infección vírica. Estas moléculas pueden tener efectos antivíricos directos y/o efectos indirectos a través del reclutamiento y/o activación de células inflamatorias y linfocitos. Dada la importancia de estos mecanismos de eliminación inmunológica, los virus han evolucionado para expresar productos génicos que inhiben la inducción y/o función de estas citoquinas/quimioquinas e interferones. Por ejemplo, el virus vaccinia (VV, y algún otro poxvirus) codifica la proteína secretada vCKBP (B29R) que une e inhibe las quimioquinas CC (por ejemplo RANTES, eotaxina, MIP-1-alfa) (Alcami *et al.*, 1998). Algunas cepas de VV también expresan una proteína vírica secretada que se une e inactiva TNF (por ejemplo, Lister A53R) (Alcami *et al.*, 1999). La mayoría de las cepas de poxvirus tienen genes que codifican las proteínas secretadas que se unen e inhiben la función de los interferones- α/β (por ejemplo, B18R) o interferón (B8R). vC12L es una proteína que se une a IL-18 que previene que IL-18 induzca IFN- γ y la activación de células NK/células T citotóxicas.

La mayoría de las investigaciones sobre la virulencia de los poxvirus se ha llevado a cabo en ratones. Muchas, pero no todas, de estas proteínas son activas en ratones (B18R, por ejemplo, no lo es). En las situaciones en que estas proteínas son activas frente a versiones en el ratón de la citoquina diana, la delección de estos genes conduce a una virulencia reducida y a una seguridad aumentada con mutantes VV con delecciones de o mutaciones funcionales en estos genes. Además, la respuesta inflamatoria/inmune a y el aclaramiento vírico de estos mutantes se incrementa a menudo en comparación con la cepa parental del virus que expresa la proteína inhibitoria. Por ejemplo, la supresión de la familia T1/35kDa de las proteínas secretadas de poxvirus (quimioquinas de unión/proteínas de inhibición) puede conducir a un aumento marcado de la infiltración de leucocitos en los tejidos infectados por el virus (Graham *et al.*, 1997). La supresión del gen vC12L en VV conduce a la reducción de la titulación vírica/toxicidad después de la administración intranasal en ratones; además, la actividad de las células NK y la actividad de los linfocitos T citotóxicos se aumenta junto con la inducción de IFN- γ (Smith *et al.*, 2000). La supresión del gen T7 del virus Myxoma (capaz de unirse a IFN- γ y a una amplia gama de quimioquinas) origina una virulencia reducida y una inflamación/infiltración del tejido aumentada significativamente en un modelo de toxicidad (Upton *et al.*, 1992; Mossman *et al.*, 1996). La delección del gen M-T2 del virus myxoma también originó una virulencia reducida en un modelo en conejo (Upton *et al.* 1991). La supresión del producto del gen B18R anti-interferon- α - β también conduce a una sensibilidad vírica aumentada al aclaramiento mediado por IFN, titulaciones reducidas en tejidos normales y virulencia reducida (Symons *et al.*, 1995; Colamonici *et al.*, 1995; Alcami *et al.*, 2000). En resumen, estos productos génicos virales funcionan para disminuir la respuesta inmune antivírica y la infiltración de células inflamatorias en los tejidos infectados por el virus. La pérdida de la función de la proteína a través de supresión/mutación conduce a una disminución de la virulencia y/o aumento de propiedades proinflamatorias del virus dentro de los tejidos del huésped.

Citoquinas y quimiocinas pueden tener efectos antitumorales potentes (Vicari *et al.*, 2002; Homey *et al.*, 2002). Estos efectos pueden ser sobre las células tumorales mismas directamente (por ejemplo, TNF) o pueden ser indirectos a través de efectos sobre las células no cancerosas. Un ejemplo de esto último es TNF, que puede tener efectos antitumorales por causar toxicidad a los vasos sanguíneos asociados al tumor; esto conduce a una pérdida del flujo de sangre al tumor seguida de necrosis tumoral. Además, las quimioquinas pueden actuar para reclutar (y en algunos casos activar) las células efectoras inmunes tales como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y/o linfocitos. Estas células efectoras inmunes pueden causar la destrucción del tumor por un número de mecanismos. Estos mecanismos incluyen la expresión de citoquinas antitumorales (por ejemplo, TNF), la expresión del ligando fas, la expresión de perforina y granzima, el reclutamiento de células asesinas naturales, etc. La respuesta inflamatoria puede eventualmente conducir a una inducción de la inmunidad específica del tumor sistémica. Finalmente, muchas de estas citoquinas (por ejemplo, TNF) o quimioquinas pueden actuar sinérgicamente con la quimioterapia o radioterapia para destruir los tumores.

La administración sistémica clínicamente eficaz de versiones recombinantes de estas proteínas inmunoestimulantes no es factible debido a (1) inducción de toxicidad grave con la administración sistémica y (2) se necesita la expresión local dentro del tejido tumoral para estimular la infiltración local y los efectos antitumorales. Se necesitan enfoques para lograr altas concentraciones locales de estas moléculas dentro de las masas tumorales mientras que se minimizan los niveles en la circulación sistémica. Los virus pueden modificarse por ingeniería genética para expresar genes de citoquinas o quimioquinas en un intento de mejorar su eficacia. La expresión de estos genes a partir de vectores de replicación selectiva tiene ventajas potenciales sobre la expresión a partir de vectores no replicantes. La expresión de la replicación de los virus puede dar lugar a concentraciones locales más altas dentro de las masas tumorales; además, la replicación de los virus puede ayudar a inducir una inmunidad antitumoral a través de la destrucción/oncolisis de la célula tumoral y la liberación de antígenos tumorales en un ambiente proinflamatorio. Sin embargo, hay varias limitaciones a este enfoque. Serias preocupaciones de seguridad surgen de la posibilidad de una liberación en el medio ambiente de un virus capaz de replicarse (aunque selectivo del tumor) con un gen que puede ser tóxico si se expresa en altas concentraciones locales. Los virus que expresan genes proinflamatorios potentes de su genoma, por tanto, pueden plantear riesgos de seguridad para el paciente tratado y el público en general. Incluso con virus de replicación selectiva con la focalización en el tumor, que expresen estos genes, la expresión génica puede producirse en los tejidos normales originando toxicidad. Además, las limitaciones de tamaño previenen la expresión de múltiples y/o grandes genes de virus tales como los adenovirus; estas moléculas definitivamente actuarán más eficazmente en combinación. Por último, muchos de los virus oncolíticos en uso expresan proteínas antiinflamatorias y por lo tanto estos virus contrarrestarán la inducción de un medio proinflamatorio dentro de la masa tumoral infectada. El resultado será inhibir la inducción de la inmunidad antitumoral, efectos antivascuales y la sensibilización a la quimioterapia/radioterapia.

C. Virus vaccinia modificado

55 1. Polipéptidos que modulan al interferón

El interferon- α - β bloquea la replicación vírica a través de varios mecanismos. El interferón- γ tiene efectos inhibidores víricos directos más débiles, pero es un potente inductor de la inmunidad mediada por células a través de varios mecanismos. Los virus han evolucionado para expresar productos génicos secretados que son capaces de contrarrestar los efectos antivíricos de los interferones. Por ejemplo, el virus vaccinia (y otros poxvirus) codifican las proteínas secretadas B8R y B18R que se unen al interferón- γ y - α - β , respectivamente (Smith *et al.*, 1997; Symons *et al.*, 1995; Alcami *et al.*, 2000). Un ejemplo adicional de un producto génico de vaccinia que reduce la inducción de interferón es el inhibidor B13R de la caspasa-1 que inhibe la activación del factor IL-18 que induce al interferón- γ .

Los polipéptidos que modulan el interferón incluyen, pero no se limitan a, B18R, que puede denominarse B19R en otras cepas víricas, tales como, el virus vaccinia de la cepa de Copenhague; B8R; B13R; vC12L; A53R; E3L y otros polipéptidos víricos con actividades y propiedades similares. Los polipéptidos que modulan IFN pueden dividirse en las categorías no exclusivas de aquellos que modulan preferencialmente los caminos de IFN α y/o β (tales como B18R, B8R, B13R, o vC12L) y aquellos que modulan los caminos de IFN γ (por ejemplo B8R, B13R, o vC12L).

Las células cancerosas son con frecuencia resistentes a los efectos de los interferones. Una serie de mecanismos están involucrados. Estos incluyen el hecho de que la activación del camino de la traducción de la señal de ras (por ejemplo, mediante la mutación de ras, sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento corriente arriba/mutación, etc.), una característica común de las células cancerosas, conduce a la inhibición de PKR. Además los linfocitos son a menudo inhibidos en las masas tumorales por una variedad de mecanismos, que incluyen la producción de IL-10 y la expresión de fas-L por las células tumorales. Dado que los linfocitos son una fuente importante de la producción de interferón- γ , la inhibición de linfocitos conduce a una disminución en la producción de interferón- γ en los tumores. Por lo tanto, las masas tumorales tienden a ser santuarios de los efectos de los interferones. Además, los interferones ellos mismos, pueden tener efectos antitumorales. Por ejemplo, IFN- γ puede aumentar la presentación de antígenos MHC asociados de clase-1; esto permitirá la destrucción más eficiente mediada por CTL de las células del tumor. IFN- α/β , por ejemplo, puede bloquear la angiogénesis dentro de las masas tumorales y, con ello bloquear el crecimiento del tumor.

2. Polipéptidos de control del complemento

Un importante mecanismo para la eliminación de los patógenos víricos es la destrucción de las células infectadas en el huésped de los viriones dentro del organismo por mecanismos dependientes del complemento. Cuando las células infectadas mueren les es imposible continuar produciendo el virus infeccioso. Además, durante la apoptosis se liberan las enzimas intracelulares que degradan el ADN. Estas enzimas pueden conducir a la degradación del ADN vírico y a la inactivación del virus. La apoptosis puede ser inducida por numerosos mecanismos que incluyen la unión del complemento activado y el complejo de ataque a la membrana del complemento. Los poxvirus tal como vaccinia han evolucionado para expresar productos génicos que pueden contrarrestar la eliminación mediada por el complemento del virus y/o células infectadas por el virus. Estos genes de ese modo previenen la apoptosis e inhiben el aclaramiento vírico por mecanismos dependientes del complemento, permitiendo de este modo que la infección vírica proceda y que la virulencia vírica sea aumentada. Por ejemplo, las proteínas de control del complemento del virus vaccinia (VCP; por ejemplo, C21L) tienen un papel en la prevención de la muerte mediada por el complemento de las células y/o la inactivación del virus (Isaacs *et al.*, 1992). VCP también tiene efectos antiinflamatorios ya que su expresión disminuye la infiltración de los leucocitos en los tejidos infectados por el virus. Polipéptidos de control del complemento incluyen, pero no se limitan, a VCP, también conocido como C3L o C21L.

Las células cancerosas a menudo sobreexpresan proteínas anticomplemento celulares; esto permite que las células cancerosas sobrevivan el ataque del complemento. Por lo tanto los agentes que se dirigen preferentemente a las células tumorales debido a su resistencia inherente a la muerte mediada por el complemento tendrían selectividad y eficacia potencial en una amplia gama de cánceres humanos (Durrant *et al.*, 2001). Además, una de las características de las células cancerosas es una pérdida de los mecanismos apoptóticos normales (Gross *et al.*, 1999). La resistencia a la apoptosis promueve la carcinogénesis, así como la resistencia a los agentes antitumorales incluyendo los agentes inmunológicos, quimioterapéuticos y radioterapéuticos (Eliopoulos *et al.*, 1995). La inhibición de la apoptosis puede estar mediada por una pérdida de la función proapoptótica de la molécula (por ejemplo, bax), un aumento en los niveles/función de las moléculas antiapoptóticas (por ejemplo, bcl-2) y finalmente una pérdida de la sensibilidad del complemento.

3. Polipéptidos moduladores de TNF

Uno de los varios mecanismos para la liquidación de patógenos víricos es la muerte de la célula infectadas en el huésped por la inducción de la apoptosis, como se describió anteriormente. La apoptosis puede ser inducida por numerosos mecanismos incluyendo la unión de TNF y la linfoxina-alfa (LT α) a los receptores de TNF celulares, lo que desencadena las cascadas de señalización intracelulares. La activación de la función de los receptores TNF en la regulación de las respuestas inmunes e inflamatorias, así como la inducción de la muerte celular apoptótica (Wallach *et al.*, 1999)

Varias cepas de poxvirus, incluyendo algunas cepas de virus vaccinia, han evolucionado para expresar productos génicos que son capaces de contrarrestar el aclaramiento mediado por TNF de virus y/o células infectadas por virus. Las proteínas codificadas por estos genes soslayan las actividades proinflamatorias y la inducción de la apoptosis de TNF mediante la unión y secuestro del TNF extracelular, lo que origina la inhibición de la eliminación del virus. Dado que los virus no se eliminan, la infección vírica prosigue, y así, la virulencia vírica aumenta. Varios miembros de la familia poxvirus expresan receptores de TNF víricos secretados (vTNFR). Por ejemplo, varios poxvirus codifican vTNFRs, tales como myxoma (proteína T2), cepas de cowpox y vaccinia, tales como Lister, pueden codificar una o más de las proteínas CrmB, CrmC (A53R), CrmD, CrmE, B28R y/o equivalentes de las mismas. Estos vTNFRs tienen un papel en la prevención de la muerte celular mediada por TNF y/o la inactivación del virus (Saraiva y Alcami, 2001). Los polipéptidos moduladores de TNF incluyen, pero no se limitan a, A53R, B28R (esta proteína está

presente, pero puede estar inactiva en la cepa Copenhagen del virus vaccinia) y otros polipéptidos con actividades o propiedades similares.

5 Una de las características de las células cancerosas es la expresión génica aberrante, lo que puede conducir a una pérdida de sensibilidad para un número de mecanismos moleculares para la modulación del crecimiento, tales como la sensibilidad a las actividades anticancerosas del TNF. Por lo tanto, los mecanismos inmunomoduladores víricos pueden no ser necesarios para la propagación del virus en el microambiente tumoral.

4. Inhibidores de la serina proteasa

10 Un mecanismo importante para la eliminación de los patógenos víricos es la inducción de la apoptosis en las células infectadas dentro del huésped. Cuando las células infectadas mueren les es imposible continuar produciendo el virus infeccioso. Además, durante la apoptosis se liberan enzimas intracelulares que degradan el ADN. Estas enzimas pueden conducir a la degradación del ADN vírico y a la inactivación del virus. La apoptosis puede ser inducida por numerosos mecanismos que incluyen la unión de citoquinas (por ejemplo, el factor de necrosis tumoral), la producción de granzyma por linfocitos T citotóxicos o la unión al ligando Fas; la activación de las caspasas es una parte crítica del camino final común de la apoptosis. Los virus han evolucionado para expresar productos génicos que son capaces de contrarrestar la cascada de señalización intracelular inducida por tales moléculas que incluyen el ligando de fas o el factor de necrosis tumoral (TNF)/moléculas relacionadas con TNF (por ejemplo, genes de adenovirus E3 10.4/14.5, 14.7 (Wold *et al.*, 1994); E1B-19kD de adenovirus (Boyd *et al.*, 1994); crmA de cowpoxvirus; B13R de virus vaccinia) (Dobbelstein *et al.*, 1996; Kettle *et al.*, 1997)). Estos productos génicos previenen la apoptosis por moléculas inductoras de apoptosis y así permiten que continúe la replicación vírica a pesar de la presencia de citoquinas antivíricas inductoras de la apoptosis, fas, granzyma u otros estimuladores de la apoptosis.

15 VV SPI-2/B13R es altamente homólogo para cowpox CrmA; SPI-1 (VV) es débilmente homólogo para CrmA (Dobbelstein *et al.*, 1996). Estas proteínas son serpinas (inhibidores de la serina proteasa) y ambos CrmA y SPI-2 tienen un papel en la prevención de diversas formas de apoptosis. La inhibición de la enzima convertidora de interleucina-1 β (ICE) y granzima, por ejemplo, pueden prevenir la apoptosis de la célula infectada. Estos productos génicos tienen también efectos antiinflamatorios. Estos son capaces de inhibir la activación de IL-18 que a su vez disminuiría la inducción mediada por IL-18-de IFN- γ . Los efectos inmunoestimuladores de IFN- γ sobre la inmunidad mediada por células son de este modo inhibidos (Kettle *et al.*, 1997). SPIs incluyen, pero no se limita a, B13R, B22R, y otros polipéptidos con actividades o propiedades similares.

20 Una de las características importantes de las células cancerosas es una pérdida de los mecanismos apoptóticos normales (Gross *et al.*, 1999). La resistencia a la apoptosis promueve la carcinogénesis, así como la resistencia a los agentes antitumorales incluyendo los agentes inmunológicos, quimioterapéuticos y radioterapéuticos (Eliopoulos *et al.*, 1995). La inhibición de la apoptosis puede ser mediada por una pérdida de la función de la molécula proapoptótica (por ejemplo, bax) o un aumento en los niveles/función de las moléculas antiapoptóticas (por ejemplo, bcl-2).

5. Polipéptidos que modulan IL-1 β

30 IL-1 β es un factor biológicamente activo que actúa a nivel local y también sistémicamente. Se han descrito sólo unas pocas diferencias funcionales entre IL-1 β e IL-1 α . Las numerosas actividades biológicas de IL-1 β se ejemplifican por los muchos acrónimos diferentes con los que IL-1 se ha descrito. IL-1 no muestra especificidad de especies con la excepción de IL-1 β humana que es inactivo en las células de porcino. Algunas de las actividades biológicas de IL-1 están mediadas indirectamente por la inducción de la síntesis de otros mediadores incluyendo ACTH (corticotropina), PGE2 (prostaglandina E2), PF4 (factor de plaquetas 4), CSF (factor estimulador de colonias), IL-6, e IL-8. La síntesis de IL-1 puede ser inducida por otras citoquinas incluyendo TNF- α , IFN- α , IFN- β e IFN- γ y también por endotoxinas bacterianas, virus, mitógenos, y antígenos. La principal actividad biológica de IL-1 es la estimulación de las células T auxiliares, que son inducidas para secretar IL-2 y expresar receptores de IL-2. Los macrófagos infectados por el virus producen grandes cantidades de un inhibidor de IL-1 lo que puede apoyar las infecciones oportunistas y la transformación de células en pacientes con defectos de maduración de células T. IL-1 actúa directamente sobre las células B, promoviendo su proliferación y la síntesis de inmunoglobulinas. IL-1 también funciona como uno de los factores de cebado que hace que las células B respondan a IL-5. IL-1 estimula la proliferación y activación de las células NK y los fibroblastos, timocitos, y células de glioblastoma.

35 El bloqueo de la síntesis de IL-1 β por la proteína vírica se considera como una estrategia vírica que permite que reacciones sistémicas antivíricas provocadas por IL-1 sean suprimidas o disminuidas. Se ha encontrado que proteínas de unión que efectivamente bloquean las funciones de IL-1 con actividad similar a B1 5R también son codificadas por genes del virus de la viruela. El virus vaccinia también codifica otra proteína, designada B8R, que se comporta como un receptor de citoquinas (Alcami y Smith, 1992; Spriggs *et al.*, 1992). Los polipéptidos moduladores de IL-1 incluyen, pero no están limitados a, B13R, B15R, y otros polipéptidos con actividades o propiedades similares.

Una de las características importantes de las células cancerosas es la expresión génica aberrante, lo que puede conducir a una pérdida de sensibilidad a un número de mecanismos moleculares para la modulación del crecimiento, tal como la sensibilidad a las actividades anticancerosas de IL-1. Por lo tanto, los mecanismos inmunomoduladores víricos pueden no ser necesarios para la propagación de un virus en el microambiente tumoral.

5 6. Forma EEV

La diseminación vírica a los lugares tumorales metastáticos, e incluso la diseminación dentro de una masa tumoral sólida infectada, es en general ineficiente (Heise *et al.*, 1999). La administración intravenosa típicamente resulta en la eliminación del virus o la inactivación por anticuerpos (por ejemplo, adenovirus) (Kay *et al.*, 1997) y/o el sistema de complemento (por ejemplo, HSV) (Ikeda *et al.*, 1999). Además de estos mecanismos mediados por la inmunidad, la biodistribución de estos virus hace que en su gran mayoría los virus intravenosos se depositen en los tejidos normales en vez de en las masas tumorales. El adenovirus intravenoso, por ejemplo, principalmente acaba en el hígado y el bazo; menos de 0,1% de los virus de entrada se depositan dentro de los tumores, incluso en ratones inmunodeficientes (Heise *et al.*, 1999). Por lo tanto, aunque puede demostrarse alguna eficacia modesta antitumoral con dosis relativamente extremadamente altas en modelos de tumores de ratones inmunodeficientes, la administración intravenosa es extremadamente ineficiente y limita significativamente la eficacia.

El virus vaccinia tiene la capacidad de replicarse dentro de los tumores sólidos y causa necrosis. Además, mutantes de delección de timidina quinasa pueden infectar a las masas tumorales y tejido ovárico y expresar genes marcadores preferentemente en sistemas modelo de tumor en ratones (Gnant *et al.*, 1999). Sin embargo, puesto que estos estudios generalmente determinan la focalización del tumor basado en la expresión de genes marcadores después de 5 días, no está claro si el virus preferentemente se deposita en, expresa genes en o se replica en el tejido tumoral/ovárico (Puhlmann *et al.*, 2000). Independientemente del mecanismo, la eficacia anti-tumoral de este virus sin transgenes adicionales no fue estadísticamente significativa (Gnant *et al.*, 1999). Por contraste, la inyección intratumoral del virus tuvo eficacia anti-tumoral significativa (McCart *et al.* 2000). Por lo tanto, la eficacia i.v. se podría mejorar si se mejorara la entrega i.v. al tumor.

El virus vaccinia se replica en las células y produce tanto virus intracelular (IMV, virus intracelular maduro; IEV, virus intracelular envuelto) como virus extracelular (REV, virus extracelular envuelto; CEV, virus extracelular asociado a las células) (Smith *et al.*, 1998). IMV representa aproximadamente el 99% de rendimiento del virus después de la replicación por cepas de vaccinia virus de tipo silvestre. Esta forma de virus es relativamente estable en el medio ambiente, y por lo tanto es el principal responsable de propagación entre los individuos; por el contrario, este virus no se propaga eficientemente en el huésped infectado debido a la liberación ineficaz de las células y la sensibilidad a la neutralización por el complemento y/o los anticuerpos. Por el contrario, EEV se libera en el medio extracelular y típicamente representa solo aproximadamente 1% de rendimiento del virus (Smith *et al.*, 1998). EEV es responsable de la propagación vírica en el huésped infectado y es relativamente fácilmente degradado fuera del huésped. Notablemente, EEV ha desarrollado varios mecanismos para inhibir su neutralización dentro del torrente sanguíneo. Primero, EEV es relativamente resistente al complemento (Vanderplasschen *et al.*, 1998); esta característica se debe a la incorporación de inhibidores del complemento de la célula huésped en su cubierta de la membrana externa además de la secreción de la proteína de control de complemento del virus vaccinia (VCP) en el medio local extracelular. Segundo, EEV es relativamente resistente a los efectos de los anticuerpos neutralizantes en comparación con IMV (Smith *et al.*, 1997). EEV también se libera en momentos anteriores después de la infección (por ejemplo 4-6 horas) a lo que lo hace IMV (que solo se libera durante/después de la muerte celular), y por lo tanto la propagación de la forma EEV es más rápida (Blasco *et al.*, 1993).

Desafortunadamente, sin embargo, las cepas de vaccinia de tipo silvestre hacen solo muy pequeñas cantidades de EEV, relativamente. Además, el tratamiento con el virus vaccinia (es decir, la dosis de entrada del virus) se ha limitado a las formas del virus intracelulares hasta la fecha. Los procedimientos estándar de fabricación y purificación del virus vaccinia (VV) conducen a la inactivación de EEV (Smith *et al.*, 1998), y líneas celulares no humanas se usan frecuentemente para fabricar el virus; EEV procedente de células no humanas no estará protegido de la eliminación mediada por el complemento (las proteínas inhibidoras del complemento adquiridas de la célula por EEV tienen efectos restringidos a las especies). Por lo tanto la eficacia del virus vaccinia se ha visto limitada por la relativa sensibilidad de la forma IMV a la neutralización y por su ineficiente diseminación dentro de la masa del tumor sólido; esta diseminación es típicamente de célula a célula adyacente. La diseminación de IMV a masas de tumores distantes, ya sea a través del torrente sanguíneo o linfático, es también ineficiente.

Por lo tanto, la forma rara EEV del virus vaccinia ha adquirido naturalmente características que le hace superior a la forma del virus vaccinia usada en pacientes hasta la fecha (IMV); EEV está optimizado para la propagación rápida y eficiente a través de los tumores sólidos a nivel local y a los lugares tumorales regionales o distantes. Ya que EEV es relativamente resistente a los efectos del complemento, cuando se cultiva en un tipo de célula de la misma especie, esta forma de virus tendrá una estabilidad mejorada y mantendrá su actividad más tiempo en la sangre después de la administración intravascular que las preparaciones estándar del virus vaccinia (que contienen exclusivamente IMV) (Smith *et al.*, 1998). Puesto que EEV es resistente a la neutralización mediada por anticuerpos, esta forma de virus mantendrá su actividad más tiempo en la sangre después de la administración intravascular que las preparaciones estándar de virus vaccinia (que contienen casi exclusivamente IMV) (Vanderplasschen *et al.*, 1998). Esta característica será particularmente importante para la administración repetida una vez que los niveles de

anticuerpos neutralizantes se hayan incrementado; todas las terapias contra el cáncer aprobadas requieren administración repetida. Por lo tanto, la forma EEV de vaccinia, y otros poxvirus, dará lugar a una entrega superior de virus terapéuticos y de su carga genética a tumores a través del torrente sanguíneo. Esto dará lugar a una eficacia sistémica mejorada comparada con las preparaciones estándar de poxvirus. Por último, el riesgo de transmisión al público en general debería reducirse significativamente puesto que EEV es extremadamente inestable fuera del cuerpo. Los polipéptidos involucrados en la modulación de la forma EEV de un virus incluyen, pero no se limitan a, A34R, B5R, y varias otras proteínas que influyen en la producción de la forma EEV de los poxvirus. Una mutación en el codón 151 de A34R de una lisina a ácido aspártico (mutación K151D) hace a la proteína A34R menos capaz de atar a la forma EEV a la membrana celular. B5R es un EEV polipéptido unido a la membrana que puede unirse al complemento. La supresión total de A43R puede llevar a una liberación mayor de EEV, pero reduce marcadamente la infectividad de los virus, mientras que la mutación K151D aumenta la liberación de EEV mientras que mantiene la infectividad de los virus liberados. B5R tiene homología de secuencia con VCP (anti-complemento), pero la inhibición del complemento no se ha probado todavía.

Brevemente, un método para la identificación de una forma EEV fortificada es como sigue. EEV se diluye en MEM enfriado con hielo y se mezcla (1:1 en volumen) con suero activo o inactivado por el calor (56° C, 30 minutos, control) diluido con MEM enfriado con hielo (dilución final del suero 1/10, 1/20, o 1/30). Después de la incubación 75 minutos a 7° C, las muestras se enfrían con hielo y se añade mAb 5B4/2F2 a muestras frescas de EEV para neutralizar cualquier contaminante (IMV y EEV roto). Los viriones se unen entonces a células RK13 durante una hora en hielo, el complemento y los viriones no unidos se eliminan por lavado, y el número de placas se cuentan dos días más tarde. Cuanto mayor es el número de placas mayor es la resistencia al complemento (Vanderplasschen *et al.*, 1998). Métodos ejemplarizantes describiendo el aislamiento de formas de EEV del virus vaccinia pueden encontrarse en Blasco *et al.*, 1992.

7. Otros polipéptidos

Otros polipéptidos víricos inmunomoduladores pueden incluir polipéptidos que se unen a otros mediadores de la respuesta inmune y/o modulan caminos moleculares asociadas con la respuesta inmune. Por ejemplo, polipéptidos que se unen a la quimioquina tales como B29R (esta proteína está presente, pero puede ser inactiva en la cepa de Copenhague del virus vaccinia), C23L, vCKBP, A41L y polipéptidos con actividades o propiedades similares. Otras proteínas del virus vaccinia tales como el factor de crecimiento del virus vaccinia (es decir, C11L), que es un factor de crecimiento vírico tipo EGF, pueden ser también el objetivo de alteración en algunas formas de realización de la invención. Otros polipéptidos que pueden clasificarse como factores inmunomoduladores víricos incluyen, pero no están limitados a B7R, NIL, u otros polipéptidos cuyas actividades o propiedades aumentan la virulencia de un poxvirus.

8. Fusión celular inducida por el virus vaccinia

En ciertas formas de realización de la invención una alteración, delección, o mutación de A56R o K2L que codifican genes nucleicos puede conducir a la fusión de célula-célula o formación sincitial inducida por la infección con VV. La fusión celular inducida por el virus vaccinia típicamente aumentará la eficacia antitumoral de VV debido a la propagación vírica intratumoral. La propagación vírica intratumoral por fusión celular típicamente permitirá al virus evitar los anticuerpos neutralizantes y las respuestas inmunes. El matar e infectar las células adyacentes no infectadas (es decir, un "efecto espectador") puede ser más eficiente en el VV con mutaciones en uno o ambos de estos genes, lo que puede dar lugar a mejores efectos antitumorales locales.

D. Otros Poxvirus

El virus vaccinia es un miembro de la familia Poxviridae, la subfamilia Chordopoxvirinae y el género Orthopoxvirus. El género Orthopoxvirus es relativamente más homogéneo que otros miembros de la subfamilia Chordopoxvirinae e incluye 11 especies distintas, pero estrechamente relacionadas, que incluyen las especies del virus vaccinia, virus variola (agente causante de la viruela), virus de la viruela vacuna, virus de la viruela del búfalo, virus de la viruela de los monos, virus de la viruela del ratón y virus del caballo así como otros (véase Moss, 1996). Un género de la familia de poxvirus se define generalmente por medios serológicos incluyendo la neutralización y reactividad cruzada en animales de laboratorio. Varios miembros del género Orthopoxvirus, así como otros miembros de la subfamilia Chordovirinae utilizan moléculas inmunomoduladoras, ejemplos de las cuales se proporcionan en este documento, para contrarrestar las respuestas inmunes de un organismo huésped.

E. Propagación del virus

El virus vaccinia puede propagarse usando los métodos descritos por Earl y Moss en Ausubel *et al.*, 1994.

II. Composiciones proteínicas y de ácidos nucleicos

Las enseñanzas descritas a continuación proporcionan varios protocolos, como ejemplo, de cómo implementar las composiciones para su uso según la invención, tales como métodos para generar virus mutados por medio del uso de tecnología de ADN recombinante.

La presente memoria se refiere a la generación de poxvirus que carecen de uno o más polipéptidos o proteínas funcionales y/o la generación de poxvirus que tienen la capacidad de liberar más de una forma particular del virus, tal como una forma EEV infecciosa. En otras formas de realización, la presente memoria se refiere a los poxvirus y su uso en combinación con una composición proteínica como parte de una formulación farmacéuticamente aceptable.

Como se usa en este documento, una "proteína" o un "polipéptido" se refieren a una molécula que comprende al menos un resto de aminoácido. En formas de realización de la invención, una proteína vírica o un polipéptido vírico está ausente o alterado de modo que haga al virus más útil en el tratamiento de células cancerosas o del cáncer en un paciente. Los términos descritos anteriormente se pueden usar de manera intercambiable en el presente documento. Una "proteína modificada" o "polipéptido modificado" se refiere a una proteína o polipéptido cuya estructura química se altera con respecto a la proteína o polipéptido de tipo silvestre. En algunas formas de realización, una proteína o polipéptido modificados tiene al menos una actividad o función modificada (reconociendo que las proteínas o polipéptidos pueden tener múltiples actividades o funciones). La actividad o función modificada puede ser reducida, disminuida, eliminada, aumentada, mejorada, o alterada de alguna otra forma (tal como la especificidad) con respecto a la actividad o función en una proteína o polipéptido de tipo silvestre. Se contempla específicamente que una proteína o polipéptido modificados se pueden alterar con respecto a una actividad o función y todavía retener la actividad o función de tipo silvestre en otros aspectos. Alternativamente, una proteína modificada puede ser completamente no funcional o su secuencia de ácido nucleico cognato puede haber sido alterada de modo que el polipéptido ya no se expresa en absoluto, está truncado, o expresa una secuencia de aminoácidos diferente como resultado de un desplazamiento del marco.

En ciertas formas de realización el tamaño de una proteína o polipéptido mutados puede comprender, pero no está limitado a, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500 o más restos de moléculas de aminoácidos, y cualquier rango derivable de los mismos. Se contempla que los polipéptidos pueden ser mutados por truncamiento, haciéndoles más cortos que su forma correspondiente de tipo silvestre.

Como se usa en este documento, una "molécula de amino" se refiere a cualquier aminoácido, derivado de aminoácido o mimético de aminoácido como sería conocido por un experto normal en la técnica. En ciertas formas de realización, los restos de la molécula proteínica son secuenciales, sin ninguna molécula sin amino que interrumpa la secuencia de restos de molécula de amino. En otras formas de realización, la secuencia puede comprender uno o más restos de molécula sin amino. En formas de realización particulares, la secuencia de restos de la molécula proteínica puede estar interrumpida por uno o más restos de molécula sin amino.

Por consiguiente, el término "composición proteínica" abarca secuencias de molécula de amino que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes en las proteínas sintetizadas naturalmente, o al menos un aminoácido modificado o inusual.

Las composiciones proteínicas pueden prepararse por cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas estándar de biología molecular, el aislamiento de compuestos proteínicos a partir de fuentes naturales, o la síntesis química de materiales proteínicos. Las secuencias de nucleótidos y proteínas, polipéptidos y péptidos para varios genes se han descrito previamente, y pueden encontrarse en bases de datos informatizadas conocidas por los expertos en la técnica. Una de estas bases de datos es el National Center for Biotechnology Information's Genbank and GenPept databases (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones codificantes para estos genes conocidos pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas reveladas en este documento o como sería conocido por los expertos en la técnica.

A. Aspectos funcionales

Cuando la presente solicitud se refiere a la función o actividad de las proteínas o polipéptidos víricos, se entiende que se refiere a la actividad o función de dicha proteína o polipéptido vírico en condiciones fisiológicas, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, un polipéptido modulador de interferón se refiere a un polipéptido que afecta a al menos un interferón y su actividad, ya sea directa o indirectamente. El polipéptido puede inducir, mejorar, levantar, aumentar, disminuir, debilitar, reducir, inhibir, o enmascarar la actividad de un interferón, directa o indirectamente. Un ejemplo de afectar directamente a un interferón implica, en algunas formas de realización, un polipéptido modulador de interferón que se une específicamente al interferón. La determinación de cuales moléculas poseen esta actividad se puede lograr usando pruebas conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la transferencia de genes que codifican productos que modulan al interferón, o variantes de los mismos, en células que son inducidas para la actividad de interferón en comparación con las células con dicha transferencia de genes puede identificar, en virtud de diferentes niveles de una respuesta de interferón, aquellas moléculas que tengan una función moduladora de interferón.

Se contempla específicamente que un modulador puede ser una molécula que afecta la expresión de composiciones proteínicas implicadas en el camino de la molécula objetivo, tal como mediante la unión con un interferón que codifica una transcripción. La determinación de cuales moléculas son moduladores adecuados de interferón, IL-1 β , TNF, u otras moléculas con beneficios terapéuticos puede conseguirse usando pruebas conocidas por los expertos en la técnica - algunas de las cuales se divulgan en esta solicitud - y pueden incluir, por ejemplo, el uso de proteínas víricas nativas y/o recombinantes.

B. Variantes de polipéptidos víricos

Las variantes de las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos divulgados en este documento pueden ser variantes de sustitución, de inserción o de delección. Una mutación en un gen que codifica un polipéptidos vírico puede afectar a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más aminoácidos no contiguos o contiguos del polipéptido, en comparación con el tipo silvestre. Pueden identificarse varios polipéptidos codificados por el virus vaccinia con las referencias de Rosel *et al.*, 1986, Goebel *et al.*, 1990 y GenBank N° de acceso NC001559.

Las variantes de delección carecen de uno o más restos de la proteína nativa o de tipo silvestre. Se pueden eliminar restos individuales o la totalidad o parte de un dominio (tal como un dominio catalítico o de unión). Puede introducirse un codón de parada (por sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico que codifica para generar una proteína truncada. Los mutantes de inserción implican típicamente la adición de material en un punto no terminal en el polipéptido. Esto puede incluir la inserción de un epítipo inmunorreactivo o simplemente uno o más restos. También se pueden generar adiciones terminales, llamadas proteínas de fusión.

Las variantes de sustitución típicamente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades. Las sustituciones pueden ser conservadoras, es decir, un aminoácido se sustituye con uno de forma y carga similar. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina. Alternativamente, las sustituciones pueden ser no conservadoras de tal manera que una función o actividad del polipéptido se vea afectada. Los cambios no conservadores típicamente implican la sustitución de un resto con otro que es químicamente diferente, tal como un aminoácido polar o cargado por un aminoácido no polar o sin carga, y *vice versa*.

El término " codón funcionalmente equivalente" se usa en este documento para referirse a codones que codifican al mismo aminoácido (véase la Tabla 1, a continuación).

Tabla 1: Tabla de codones

Aminoácidos			Codones
Alanina	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cisteína	Cys	C	UGC UGU
Ácido aspártico	Asp	D	GAC GAU
Ácido glutámico	Glu	E	GAA GAG
Fenilalanina	Phe	F	UUC UUU
Glicina	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidina	His	H	CAC CAU
Isoleucina	Ile	I	AUA AUC AUU

Aminoácidos			Codones
Lisina	Lys	K	AAA AAG
Leucina	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Metionina	Met	M	AUG
Asparagina	Asn	N	AAC AAU
Prolina	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA CAG
Arginina	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serina	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Treonina	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valina	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Triptófano	Trp	W	UGG
Tirosina	Tyr	Y	UAC UAU

- 5 También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos pueden incluir restos adicionales, tales como aminoácidos adicionales N- o C-terminales o secuencias 5' o 3', y sin embargo todavía ser esencialmente como se establece en una de las secuencias divulgadas en este documento, siempre que la secuencia cumpla los criterios establecidos anteriormente, incluyendo el mantenimiento de la actividad biológica de la proteína en lo que se refiere a la expresión de la proteína. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácidos nucleicos que pueden, por ejemplo, incluir varias secuencias no codificantes flanqueando cualquiera de las porciones 5' o 3' de la región de codificación o pueden incluir varias secuencias internas, es decir, intrones, que se sabe se producen dentro de los genes.
- 10 Lo siguiente es una discusión basada en el cambio de los aminoácidos de una proteína para crear una molécula de segunda generación equivalente, o incluso mejorada. Por ejemplo, ciertos aminoácidos pueden ser sustituidos por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígenos de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Puesto que es la capacidad interactiva y la naturaleza de la proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, pueden hacerse ciertas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteína, y en su secuencia de codificación de ADN subyacente, y sin embargo producir una proteína con propiedades similares.
- 15 Por lo tanto se contempla por los inventores que pueden hacerse varios cambios en las secuencias de ADN de los genes sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológicas, como se discute a continuación. La tabla 1 muestra los codones que codifican aminoácidos particulares.
- 20 Al hacer tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir la función biológica interactiva en una proteína se entiende en general en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos, y similares.
- 25 También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede realizarse eficazmente sobre la base de la hidrofiliidad. El documento de patente de Estados Unidos 4.554.101 afirma que la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, que se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en el documento de patente de Estados Unidos 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a restos de aminoácido: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0±1); glutamato (+3,0±1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4);
- 30

prolina (-0,5±1); alanina (-0,5); histidina *(-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

5 Se entiende que un aminoácido puede ser sustituido por otro que tiene un valor de hidrofiliidad similar y aún producir una proteína biológicamente equivalente e inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ±2, los que están dentro de ±1 son particularmente preferidos, y los que están dentro de ±0,5 son incluso más particularmente preferidos.

10 Como se ha indicado anteriormente, las sustituciones de aminoácidos generalmente se basan en la similaridad relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño, y similares. Los ejemplos de sustituciones que toman en consideración las diversas características anteriores son bien conocidos en la técnica e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

III. Moléculas de ácido nucleico

A. Polinucleótidos que codifican las proteínas nativas o las proteínas modificadas

15 La presente divulgación se refiere a polinucleótidos, aislables de las células, que son capaces de expresar todo o parte de una proteína o polipéptido. Se refiere a un genoma vírico que se ha mutado específicamente para generar un virus que carece de ciertos polipéptidos funcionales víricos. Los polinucleótidos pueden codificar un péptido o polipéptido que contiene todo o parte de una secuencia de aminoácidos víricos o modificarse por ingeniería genética para que no codifiquen tal polipéptido vírico o codifiquen un polipéptido vírico que tenga al menos una función o actividad reducida, disminuida, o ausente. Las proteínas recombinantes se pueden purificar a partir de células que 20 las expresan para dar proteínas activas. El genoma, así como la definición de las regiones codificantes del virus vaccinia se pueden encontrar en Rosel *et al.*, 1986; Goebel *et al.*, 1990; y/o GenBank N° de Acceso NC_001559.

25 Tal como se usa en este documento, el término "segmento de ADN" se refiere a una molécula de ADN que ha sido aislada libre del ADN genómico total de una especie particular. Por lo tanto, un segmento de ADN que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias codificadoras de polipéptidos de tipo silvestre, polimórfico o mutante pero que está aislado lejos de, o purificado libre de ADN genómico de mamífero o humano en su totalidad. Se Incluyen dentro del término "segmento de ADN" un polipéptido o polipéptidos, segmentos de ADN más pequeños que un polipéptido, y vectores recombinantes, incluyendo, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus, y similares.

30 Tal como se utiliza en esta solicitud, el término "polinucleótido de poxvirus" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de poxvirus que se ha aislado libre de ácido nucleico genómico total. Del mismo modo, un "polinucleótido de virus vaccinia" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de poxvirus que se ha aislado libre de ácido nucleico genómico total. Un "genoma de poxvirus" o un "genoma de virus vaccinia" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se puede proporcionar a una célula huésped para producir una partícula vírica, en presencia o ausencia de un virus ayudante. El genoma puede o no puede haber sido mutado 35 recombinantemente, en comparación con el virus de tipo silvestre.

El término "ADNc" se pretende que se refiera a un ADN preparado utilizando ARN mensajero (ARNm) como plantilla. La ventaja de usar un ADNc, a diferencia de ADN genómico o ADN polimerizado a partir de una plantilla de ARN genómico no procesada o parcialmente procesada, es que el ADNc contiene principalmente secuencias de codificación de la proteína correspondiente. Puede haber ocasiones en que se prefiera la secuencia genómica completa o parcial, tal como cuando se requieren las regiones no codificantes para la expresión óptima o cuando las regiones no codificantes, tales como los intrones son para ser dirigidas en una estrategia antisentido.

También se contempla que un polipéptido particular de una especie dada pueda estar representado por variantes naturales que tienen ligeramente diferentes secuencias de ácidos nucleicos, pero, sin embargo, codifican la misma proteína (véase la Tabla 1 anterior).

45 Del mismo modo, un polinucleótido que comprende un gen de polipéptido mutante o de tipo silvestre purificado o aislado se refiere a un segmento de ADN que incluye el polipéptido mutante o de tipo silvestre que codifica secuencias y, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente fuera de otros genes de origen natural o secuencias que codifican proteínas. A este respecto, el término "gen" se utiliza por simplicidad para referirse a una unidad funcional de proteína, polipéptido o unidad codificadora de péptido (incluyendo cualquier 50 secuencia requerida para la transcripción adecuada, modificación post traducción o localización). Como se comprenderá por aquellos con conocimiento de la técnica, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc, y segmentos de gen manipulados por ingeniería genética más pequeños que expresan, o pueden ser adaptados para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión, y mutantes. Un ácido nucleico que codifica toda o una parte de un polipéptido nativo o modificado puede contener una secuencia de ácido nucleico contigua que codifique todo o una porción de dicho polipéptido de las longitudes siguientes: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720,

730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000, 1010, 1020, 1030, 1040, 1050, 1060, 1070, 1080, 1090, 1095, 1100, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 9000, 10000, o más nucleótidos, nucleósidos, o pares de bases.

5 En formas de realización particulares, la invención se refiere a segmentos aislados de ADN y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican polipéptidos o péptidos de poxvirus mutante o de tipo silvestre que incluyen dentro de su secuencia de aminoácidos una secuencia de aminoácidos contigua según, o esencialmente que corresponde a un polipéptido nativo. Por lo tanto, un segmento de ADN aislado o vector que contiene un segmento de ADN puede codificar, por ejemplo, un modulador INF o polipéptido modulador de TNF que
10 puede inhibir o reducir la actividad INF. El término "recombinante" puede usarse en conjunción con un polipéptido o el nombre de un polipéptido específico, y esto generalmente se refiere a un polipéptido producido de una molécula de ácido nucleico que ha sido manipulada in vitro o que es el producto replicado de dicha molécula.

En otras realizaciones, la invención se refiere a segmentos aislados de ADN y vectores recombinantes que incorporan secuencias de ADN que codifican un polipéptido o péptido que incluye dentro de su secuencia de
15 aminoácidos una secuencia de aminoácidos contigua según, o esencialmente correspondiente al polipéptido.

Los segmentos de ácido nucleico usados, independientemente de la longitud de la propia secuencia codificante, puede ser combinados con otra secuencia de ácido nucleico, tal como promotores, señales de poliadenilación, lugares de restricción de enzima adicionales, lugares de clonación múltiple, otros segmentos de codificación, y semejantes, tal que su tamaño total puede variar considerablemente. Por lo tanto se contempla que se puede
20 emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, con la longitud total preferiblemente estando limitada por la facilidad de preparación y uso pretendido en el protocolo del ADN recombinante.

Se contempla que las construcciones de ácido nucleico de la presente invención pueden codificar polipéptidos de longitud completa de cualquier fuente o codificar una versión truncada del polipéptido, por ejemplo un polipéptido de virus vaccinia truncado, tal que la transcripción de la región de codificación representa la versión truncada. La transcripción truncada puede entonces ser traducida a una proteína truncada. Alternativamente, una secuencia de ácido nucleico puede codificar una secuencia de polipéptido de longitud completa con secuencias codificantes heterólogas adicionales, por ejemplo para permitir la purificación del polipéptido, el transporte, la secreción, la modificación post translacional, o para beneficios terapéuticos tales como la orientación o la eficacia. Como se
25 discutió anteriormente, una etiqueta u otro polipéptido heterólogo pueden ser añadidos a la secuencia que codifica un polipéptido modificado, en el que "heterólogo" se refiere a un polipéptido que no es el mismo que el polipéptido modificado.

En un ejemplo no limitativo, se pueden preparar una o más construcciones de ácido nucleico que incluyen un tramo contiguo de nucleótidos idénticos o complementarios al de un gen particular, tal como el gen B18R. Una construcción de ácido nucleico puede ser de al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150,
35 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 15.000, 20.000, 30.000, 50.000, 100.000, 250.000, 500.000, 750.000, a al menos 1.000.000 de nucleótidos en longitud, así como construcciones de mayor tamaño, hasta e incluyendo los tamaños cromosómicos (incluyendo todas las longitudes intermedias e intervalos intermedios), dada la llegada de construcciones de ácidos nucleicos tales como un cromosoma artificial de levadura que son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Se entenderá fácilmente que "longitudes intermedias" e "intervalos intermedios," como se usa en este documento, significa cualquier longitud o intervalo incluido en o entre los valores citados (es decir, incluyendo todos los números enteros y entre dichos valores).

Los segmentos de ADN usados abarcan polipéptidos y péptidos modificados equivalentes funcionalmente y biológicamente, por ejemplo, una toxina de gelonina modificada. Tales secuencias pueden surgir como consecuencia de redundancia de codón y equivalencia funcional que se sabe que se producen naturalmente dentro de las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas así codificadas. Alternativamente, las proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes pueden crearse mediante la aplicación de tecnologías de ADN recombinante, en que los cambios en la estructura de la proteína pueden diseñarse, en base a las consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se intercambian. Los cambios diseñados por los seres humanos pueden introducirse mediante
50 la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio, por ejemplo, para introducir mejoras en la antigenicidad de la proteína, para reducir los efectos de la toxicidad de la proteína in vivo a un sujeto al que se ha dado la proteína, o para aumentar la eficacia de cualquier tratamiento que implique a la proteína.

En ciertas otras formas de realización, la invención se refiere a segmentos aislados de ADN y vectores recombinantes para uso según la invención que incluyen dentro de su secuencia una secuencia de ácido nucleico contigua a la mostrada en las secuencias identificadas en este documento. Tales secuencias, sin embargo, pueden mutarse para producir un producto de proteína cuya actividad está alterada con respecto a la de tipo silvestre.
55

También se entenderá que esta invención no se limita a las secuencias de los ácidos nucleicos y aminoácidos particulares de estas secuencias identificadas. Los vectores recombinantes y los segmentos de ADN aislados por lo tanto, pueden incluir variadamente las regiones mismas que codifican el poxvirus, regiones de codificación que

llevan alteraciones o modificaciones seleccionadas en la región de codificación básica, o pueden codificar polipéptidos más grandes que, sin embargo, incluyen regiones de codificación de poxvirus o pueden codificar proteínas equivalentes biológicamente funcionales o péptidos que tienen variantes de secuencias de aminoácidos.

5 Los segmentos de ADN abarcan proteínas y péptidos de poxvirus equivalentes funcionalmente biológicamente. Tales secuencias pueden surgir como consecuencia de redundancia de codón y equivalencia funcional que se sabe que se produce naturalmente dentro de las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas así codificados. Alternativamente, pueden crearse proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes mediante la aplicación de tecnologías de ADN recombinante, con las que los cambios en la estructura de la proteína pueden diseñarse, en base a consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que se intercambian. Los cambios designados por el hombre pueden ser introducidos mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis dirigida al sitio, por ejemplo, para introducir mejoras en la antigenicidad de la proteína.

B. Mutagénesis de polinucleótidos de poxvirus

15 En diversas formas de realización, el polinucleótido de poxvirus puede ser alterado o cambiado por mutagénesis. Las alteraciones o mutaciones pueden inducir inserciones, deleciones, mutaciones puntuales, inversiones, y similares y pueden originar la modulación, activación y/o inactivación de ciertos caminos o mecanismos moleculares, así como la alteración de la función, ubicación, o la expresión de un producto génico, en particular, produciendo un producto génico no funcional. Donde se emplea, la mutagénesis de un polinucleótido que codifica todo o parte de un poxvirus puede llevarse a cabo por una variedad de procedimientos estándar mutagénicos (Sambrook *et al.*, 1989). La mutación es el procedimiento por el cual se producen cambios en la cantidad o estructura del organismo. La mutación puede implicar la modificación de la secuencia de los nucleótidos de un solo gen, bloques de genes o de todo el cromosoma. Los cambios en los genes individuales pueden ser la consecuencia de mutaciones puntuales que implican la eliminación, adición o sustitución de una sola base de nucleótidos dentro de una secuencia de ADN, o pueden ser la consecuencia de los cambios que implican la inserción o supresión de un gran número de nucleótidos.

25 Las mutaciones pueden ser inducidas después de la exposición a mutágenos químicos o físicos. Tales agentes inductores de mutación incluyen la radiación ionizante, luz ultravioleta y una diversa gama de productos químicos tales como agentes alquilantes y los hidrocarburos aromáticos policíclicos todos los cuales son capaces de interactuar directa o indirectamente (por lo general siguiendo algunas biotransformaciones metabólicas) con ácidos nucleicos. El daño del ADN inducido por tales agentes puede conducir a modificaciones de secuencia de bases cuando el ADN afectado se replica o se repara y por lo tanto a una mutación. La mutación también puede ser dirigida al sitio mediante el uso de métodos de focalización particulares.

C. Vectores

35 Para generar mutaciones en el genoma del poxvirus, los polipéptidos nativos y modificados pueden ser codificados por una molécula de ácido nucleico comprendido en un vector. El término "vector" se usa para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que una secuencia de ácido nucleico exógeno puede ser insertada para la introducción en una célula donde puede ser replicada. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena," lo que significa que es extraña a la célula en la que se está introduciendo el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia en la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la que la secuencia normalmente no se encuentra. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales, y virus de plantas), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YACs). Un experto en la técnica estaría bien equipado para construir el vector a través de técnicas recombinantes estándar, que se describen en Sambrook *et al.*, (1989) y Ausubel *et al.*, 1994. Además de que codifique un polipéptido modificado tal como gelonina modificada, un vector puede codificar secuencias no modificadas de polipéptido tal como una etiqueta o molécula de orientación. Los vectores útiles que codifican tales proteínas de fusión incluyen vectores pIN (Inouye *et al.*, 1985), vectores que codifican un tramo de histidinas, y vectores pGEX, para su uso en la generación de proteínas de fusión solubles de glutatión S-transferasa (GST) para posterior purificación y separación o escisión. Una molécula diana es una que dirige al polipéptido modificado a un órgano, tejido, célula, específicos o a otro lugar en el cuerpo del sujeto.

50 El término "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico capaz de ser transcrito. En algunos casos, las moléculas de ARN se traducen en una proteína, polipéptido o péptido. En otros casos, estas secuencias no se traducen, por ejemplo, en la producción de moléculas antisentido o ribozimas. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de "secuencias de control", que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente para la traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que sirven también otras funciones y se describen a continuación.

1. Promotores y potenciadores

Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que la iniciación y tasa de transcripción están controladas. Puede contener elementos genéticos a los que las proteínas y

moléculas reguladoras pueden unirse tal como ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Las frases "operativamente posicionado," "operativamente unido," "bajo control," y "bajo control transcripcional" significan que un promotor está en una ubicación funcional y/o en la orientación correcta en relación con una secuencia de ácido nucleico para controlar la iniciación y/o expresión de la transcripción de esa secuencia. Un promotor puede o no puede ser usado en conjunción con un "potenciador," que se refiere a una secuencia reguladora que actúa en cis involucrada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

Un promotor puede ser uno asociado naturalmente con un gen o secuencia, como puede obtenerse por el aislamiento de la secuencia 5' no codificadora situada corriente arriba del segmento de codificación y/o exón. Un promotor de este tipo puede ser referido como "endógeno." Del mismo modo, un potenciador puede ser uno naturalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico, ya sea situado aguas abajo o aguas arriba de esa secuencia. Alternativamente, se obtendrán ciertas ventajas mediante el posicionamiento del segmento de ácido nucleico que codifica bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, lo que se refiere a un promotor que no está normalmente asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un potenciador recombinante o heterólogo se refiere también a un potenciador no asociado normalmente con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Tales promotores o potenciadores pueden incluir promotores o potenciadores de otros genes, y promotores o potenciadores aislados de cualquier otra célula procariota, vírica o eucariota, y promotores o potenciadores que no son "de origen natural," es decir, que contienen diferentes elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción, y/o mutaciones que alteran la expresión. Además de producir secuencias de ácido nucleico de promotores y potenciadores sintéticamente, las secuencias pueden ser producidas utilizando la clonación recombinante y/o tecnología de amplificación de ácido nucleico, incluyendo PCR™, en conexión con las composiciones descritas en el presente documento (véanse los documentos de patente de los Estados Unidos 4.683.202, 5.928.906). Además se contempla que también se pueden emplear las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias dentro de orgánulos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos, y similares.

Naturalmente, puede ser importante emplear un promotor y/o potenciador que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el tipo de células, orgánulos, y organismo elegido para la expresión. Los expertos en la técnica de la biología molecular generalmente conocen el uso de promotores, potenciadores, y combinaciones de tipos de células para la expresión de la proteína, por ejemplo, véase *see Sambrook et al.* (1989). Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles, y/o útiles bajo las condiciones apropiadas para dirigir la expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, tal como sea ventajoso en la producción del gen a gran escala de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

La identidad de los promotores o elementos específicos del tejido, así como los ensayos para la caracterización de su actividad, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de tales regiones incluyen al gen LIMK2 humano (Nomoto *et al.* 1999), el gen del receptor de somatostatina 2 (Kraus *et al.*, 1998), el gen de unión al ácido retinoico epididimico murino (Lareyre *et al.*, 1999), CD4 humano (Zhao-Emonet *et al.*, 1998), colágeno $\alpha 2$ (XI) de ratón (Tsumaki, *et al.*, 1998), gen del receptor de dopamina D1A (Lee, *et al.*, 1997), factor de crecimiento II similar a la insulina (Wu *et al.*, 1997), molécula-1 de adhesión de células endoteliales de plaquetas humanas (Almendro *et al.*, 1996), y el promotor SM22 α .

2. Señales de iniciación y sitios de unión internos del ribosoma

Una señal de iniciación específica también puede ser necesaria para la traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales de control de traducción exógenas, incluyendo el codón de iniciación ATG. Un experto en la técnica sería fácilmente capaz de determinar esto y proporcionar las señales necesarias. Es bien conocido que el codón de iniciación debe estar "en-marco" con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada para asegurar la traducción del inserto completo. Las señales de control de la traducción exógenas y codones de iniciación pueden ser naturales o sintéticos. La eficiencia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados.

En ciertas formas de realización de la invención, el uso de elementos de sitios de entrada de ribosomas internos (IRES) se utiliza para crear mensajes multigen o policistronicos. Los elementos IRES son capaces de eludir el modelo de exploración del ribosoma de la traducción dependiente de Cap 5'-metilado y comenzar la traducción en los sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Los elementos IRES de dos miembros de la familia picornavirus (polio y encefalomiocarditis) han sido descritos (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como también IRES de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Los elementos IRES pueden estar vinculados a las llamas heterólogas de lectura abierta. Múltiples marcos de lectura abierta se pueden transcribir juntos, cada uno separado por un IRES, creando mensajes policistronicos. En virtud del elemento IRES, cada marco de lectura abierta es accesible a los ribosomas para la traducción eficaz. Múltiples genes pueden ser eficientemente expresados utilizando un único promotor/potenciador para transcribir un único mensaje (véase los documentos de patente de los Estados Unidos 5.925.565 y 5.935.819).

3. Sitios de clonación múltiple

Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (NCS), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzimas de restricción, cualquiera de las cuales puede ser utilizado en conjunción con tecnología recombinante estándar para digerir al vector. (Véase Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998, y Cocea, 1997). La "digestión de la enzima de restricción" se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona sólo en lugares específicos en una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles comercialmente. El uso de tales enzimas está ampliamente comprendido por los expertos en la técnica. Con frecuencia un vector se lineariza o fragmenta utilizando una enzima de restricción que corta dentro del MCS para permitir que secuencias endógenas sean ligadas al vector. "Ligación" se refiere al procedimiento de formar enlaces de fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden o no estar contiguos uno al otro. Las técnicas que envuelven enzimas de restricción y reacciones de ligación son bien conocidas por aquellos con conocimientos de la técnica recombinante.

4. Sitios de empalme

La mayoría de las moléculas de ARN transcritas eucariotas sufrirán empalme de ARN para remover intrones de las transcripciones primarias. Los vectores que contienen secuencias genómicas eucariotas pueden requerir sitios donantes y/o aceptor de corte y empalme para asegurar el procesamiento adecuado de la transcripción para la expresión de proteínas (véase Chandler *et al.*, 1997).

5. Señales de terminación

Los vectores o construcciones de la presente invención comprenderán generalmente al menos una señal de terminación. "señal de terminación" o "terminador" está comprendida de las secuencias de ADN implicadas en la terminación específica de una transcripción de ARN por una ARN polimerasa. Por lo tanto, se contempla en ciertas formas de realización una señal de terminación que finaliza la producción de una transcripción de ARN. Un terminador puede ser necesario *in vivo* para lograr niveles deseables de mensaje.

En los sistemas eucarióticos, la región terminadora puede también comprender secuencias específicas de ADN que permiten la escisión específica de un lugar de la nueva transcripción para exponer un sitio de poliadenilación. Esto señala a una polimerasa especializada endógena que añade un tramo de aproximadamente 200 residuos A (poliA) al extremo 3' de la transcripción. Las moléculas de ARN modificadas con esta cola de poli A parecen más estables y son traducidas más eficientemente. Por lo tanto, en otras formas de realización que involucran a eucariotas, se prefiere que el terminador comprenda una señal para la escisión del ARN, y es más preferido que la señal del terminador promueva la poliadenilación del mensaje. El terminador y/o los elementos del sitio de poliadenilación pueden servir para mejorar los niveles del mensaje y/o minimizar la lectura a través de la cassette de otras secuencias.

Los terminadores contemplados para uso en la invención incluyen cualquier terminador de transcripción descrito en este documento o conocido por los expertos en la técnica, incluyendo pero no limitado a, por ejemplo, las secuencias de terminación de genes, tales como por ejemplo la secuencia del terminador de la hormona de crecimiento bovina o secuencias de terminación víricas, tales como por ejemplo el terminador SV40. En ciertas formas de realización, la señal de terminación puede ser la falta de la secuencia transcribible o traducible, tal como debido a un truncamiento de la secuencia.

6. Señales de poliadenilación

En la expresión, particularmente en la expresión eucariota, se incluirá típicamente una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación apropiada de la transcripción. No se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación sea crucial para la práctica exitosa de la invención, y/o se puede emplear cualquier secuencia. Las formas de realización preferidas incluyen la señal de poliadenilación de SV40 y/o la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, convenientes y/o que se sabe funcionan bien con varias células diana. La poliadenilación puede aumentar la estabilidad de la transcripción o puede facilitar el transporte citoplasmático.

7. Orígenes de la replicación

Con el fin de propagar un vector en una célula huésped, puede contener uno o más orígenes de sitios de replicación (a menudo denominados "ori"), que es una secuencia específica de ácido nucleico en la que se inicia la replicación. Alternativamente se puede emplear una secuencia de replicación autónoma (ARS) si la célula huésped es una levadura.

8. Marcadores seleccionables y cribables

Las células que contienen una construcción de ácido nucleico para uso según la presente invención pueden ser identificadas *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en el vector de expresión. Tales marcadores conferirían un cambio identificable a la célula permitiendo una fácil identificación de las células que contienen el vector de expresión. Generalmente, un marcador seleccionable es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador seleccionable positivo es uno en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que

un marcador seleccionable negativo es uno en el que su presencia evita su selección. Un ejemplo de un marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia a los fármacos.

Por lo general la inclusión de un marcador de selección de fármacos ayuda en la clonación e identificación de los transformantes, por ejemplo, los genes que confieren resistencia a la neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol son marcadores seleccionables útiles. Además de los marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de los transformantes basado en la implementación de condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores incluyendo marcadores cribables tales como GFP, cuya base es un análisis colorimétrico. Alternativamente, pueden utilizarse enzimas cribables tales como la timidina quinasa del virus del herpes simplex (tk) o la acetiltransferasa de cloranfenicol (CAT). Un experto en la técnica también sabría cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con análisis FACS. No se cree que el marcador usado sea importante, siempre que sea capaz de ser expresado simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. Otros ejemplos de marcadores seleccionables y rastreables son bien conocidos para un experto en la técnica.

D. Células huésped

Como se usa en este documento, los términos "célula," "línea celular," y "cultivo celular" se pueden utilizar indistintamente. Todos estos términos incluyen también su progenie, que es cualquiera de y todas las generaciones posteriores. Se entiende que toda la progenie puede no ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. En el contexto de expresar una secuencia de ácido nucleico heteróloga, "célula huésped" se refiere a una célula procarionta o eucariota, e incluye cualquier organismo transformable que sea capaz de replicar un vector y/o expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula huésped puede ser, y ha sido, usada como un recipiente para vectores o virus (que no califican como vectores si no expresan polipéptidos exógenos). Una célula huésped puede ser "transfectada" o "transformada," lo que se refiere a un proceso por el cual ácido nucleico exógeno, tal como una secuencia de codificación de proteína modificada, se transfiere o introduce en la célula huésped. Una célula transformada incluye la célula sujeto primaria y su progenie.

Las células huésped se pueden derivar de células procariotas o eucariotas, incluyendo células de levadura, células de insectos, y células de mamíferos, dependiendo de si el resultado deseado es la replicación del vector o la expresión de una parte o la totalidad de las secuencias de ácido nucleico codificadas por el vector. Numerosas líneas celulares y cultivos están disponibles para su uso como una célula huésped, y se pueden obtener a través de la American Type Culture Collection (ATCC), que es una organización que sirve como un archivo para cultivos vivos y materiales genéticos (www.atcc.org). Un huésped apropiado puede ser determinado por un experto en la técnica basado en el esqueleto del vector y el resultado deseado. Un plásmido o un cósmido, por ejemplo, pueden ser introducidos en una célula huésped procariota para la replicación de muchos vectores. Células bacterianas usadas como células huésped para la replicación y/o expresión de vectores incluyen DH5 α , JM109, y KC8, así como un número de huéspedes bacterianos disponibles comercialmente tales como SURE $\text{\textcircled{R}}$ Competent Cells y SOLOPACK TM Gold Cells (STRATAGENE $\text{\textcircled{R}}$, La Jolla, Calif.). Alternativamente, células bacterianas tales como *E. coli* LE392 podrían usarse como células huésped para los virus de fago. Células de levadura apropiadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*.

Ejemplos de células huésped eucariotas para la replicación y/o expresión de un vector incluyen HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos, y PC12. Muchas células huésped de diferentes tipos de células y organismos están disponibles y serían conocidas para un experto en la técnica. Del mismo modo, un vector vírico puede ser usado en conjunción ya sea con una célula huésped eucariota o procariota, particularmente una que es permisiva para la replicación o expresión del vector.

Algunos vectores pueden emplear secuencias de control que les permiten replicarse y/o expresarse en células tanto procariotas como eucariotas. Un experto en la técnica entenderá aún más las condiciones a las que incubar todas las células huésped descritas anteriormente para mantenerlas y para permitir la replicación de un vector. También son conocidas y entendidas las técnicas y condiciones que permitirían la producción a gran escala de los vectores, así como la producción de los ácidos nucleicos codificados por vectores y sus polipéptidos, proteínas, o péptidos afines.

E. Métodos de transferencia génica

Se cree que los métodos adecuados para la entrega de ácidos nucleicos para efectuar la expresión de las composiciones para uso según la presente invención incluyen virtualmente cualquier método mediante el cual se puede introducir un ácido nucleico (es decir, ADN, incluyendo vectores víricos y no víricos) en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en este documento o como sería conocido por un experto en la técnica. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, la entrega directa de ADN tal como por inyección (documentos de patente de Estados Unidos 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), incluyendo microinyección (Harland y Weintraub, 1985; documentos de patente de Estados Unidos 5.789.215); por electroporación (documento de patente de Estados Unidos N $\text{\textcircled{O}}$ 5.384.253); por precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); por la carga sónica directa (Fechheimer *et al.*, 1987); por

transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991); por bombardeo con microproyectiles (Solicitud PCT N° WO 94/09699 y 95/06128; documentos de patente de Estados Unidos 5.610.042; 5.322.783, 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppler *et al.*, 1990; documentos de patente de Estados Unidos 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (documentos de patente de Estados Unidos 5.591.616 y 5.563.055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh *et al.*, 1993; documentos de patente de Estados Unidos 4.684.611 y 4.952.500); por la captación de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus *et al.*, 1985). A través de la aplicación de técnicas tales como éstas, los orgánulo(s), célula(s), tejido(s) u organismo(s) pueden ser transformados de manera estable o transitoria.

10 F. Componentes y restos lípidos

En ciertas formas de realización, la presente invención se refiere a composiciones para uso según la presente invención que comprenden uno o más lípidos asociados con un ácido nucleico, una molécula de aminoácido, tal como un péptido, u otro compuesto de molécula pequeña. En cualquiera de las formas de realización discutidas en este documento, la molécula puede ser o bien un polipéptido de poxvirus o un modulador de polipéptido de poxvirus, por ejemplo un ácido nucleico que codifica la totalidad o parte de o un polipéptido de poxvirus, o alternativamente, una molécula de aminoácido que codifica todo o parte del modulador de polipéptido de poxvirus. Un lípido es una sustancia que es característicamente insoluble en agua y extraíble con un disolvente orgánico. Compuestos distintos de aquellos específicamente descritos en este documento son entendidos por alguien experto en la técnica como lípidos, y son abarcados por las composiciones para uso según la presente invención. Un componente lípido y uno no lípido pueden estar unidos el uno al otro, ya sea de forma covalente o no covalente.

Un lípido puede ser de origen natural o sintético (es decir, diseñado o producido por el hombre). Sin embargo, un lípido es normalmente una sustancia biológica. Los lípidos biológicos son bien conocidos en la técnica, e incluyen por ejemplo, grasas neutras, fosfolípidos, fosfoglicéridos, esteroides, terpenos, lisolípidos, glicosfingolípidos, glucolípidos, sulfátidos, lípidos con ácidos grasos unidos por enlace éter y éster y lípidos polimerizables, y combinaciones de los mismos.

Una molécula de ácido nucleico o molécula de aminoácido, tal como un péptido, asociada con un lípido puede dispersarse en una solución que contiene un lípido, disolverse en un lípido, emulsificarse con un lípido, mezclarse con un lípido, combinarse con un lípido, unirse covalentemente a un lípido, estar contenida como una suspensión en un lípido o de otra forma asociarse con un lípido. Una composición lípida o composición lípida/asociada con poxvirus para uso según la presente invención no está limitada a ninguna estructura particular. Por ejemplo, pueden también simplemente estar intercaladas en una solución, posiblemente formando agregados que no son uniformes ya sea en tamaño o forma. En otro ejemplo, pueden estar presentes en una estructura bicapa, como micelas, o con una estructura "colapsada". En otro ejemplo no limitativo, también se contempla un complejo de lipofectamina-poxvirus (Gibco BRL) o complejo de poxvirus de Superfect (Qiagen).

En ciertas formas de realización, una composición de lípidos puede comprender 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100%, o cualquier intervalo derivable dentro del mismo, de un lípido particular, tipo de lípido o componente no lípido tal como un fármaco, proteína, azúcar, ácidos nucleicos u otros materiales divulgados en este documento o como serían conocidos por los expertos en la técnica. En un ejemplo no limitativo, una composición lípida puede comprender de 10% a 20% de lípidos neutros, y de 33% a 34% de un cerebrósido, y 1% de colesterol. En otro ejemplo no limitativo, un liposoma puede comprender de 4% a aproximadamente 12% de terpenos, en donde aproximadamente 1% de la micela es específicamente licopeno, dejando aproximadamente de 3% a 11% del liposoma que comprende otros terpenos; y de 10% a 35% de fosfatidil colina, y aproximadamente 1% de un fármaco. Por lo tanto, se contempla que las composiciones lípidas para uso según la presente invención pueden comprender cualquiera de los lípidos, tipos de lípidos u otros componentes en cualquier combinación o intervalo de porcentaje.

50 IV. Formulaciones farmacéuticas, entrega y tratamiento

Regímenes

Los ejemplos de cáncer contemplados para el tratamiento incluyen el cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de huesos, cáncer testicular, cáncer cervical, cáncer gastrointestinal, linfomas, lesiones pre-neoplásicas en el pulmón, cáncer de colon, melanoma, cáncer de vejiga y cualquier otro cáncer o tumor que pueda ser tratado.

Una cantidad eficaz de la composición farmacéutica se define en este documento como la cantidad suficiente para inducir la oncolisis, la disrupción o lisis de una célula cancerosa, así como la desaceleración, inhibición o reducción del crecimiento o tamaño de un tumor e incluye la erradicación del tumor en ciertos casos. Una cantidad eficaz

también puede abarcar una cantidad que da lugar a la diseminación sistémica del virus terapéutico a los tumores indirectamente, es decir, la infección de los tumores no inyectados.

Preferiblemente, los pacientes tendrán una función adecuada de la médula ósea (definida como un recuento absoluto de granulocitos periféricos de $> 2.000/\text{mm}^3$ y un recuento de plaquetas de $100.000/\text{mm}^3$), función hepática adecuada (bilirrubina $< 1,5 \text{ mg/dl}$) y función renal adecuada (creatinina $< 1,5 \text{ mg/dl}$).

A. Administración

Para inducir la oncolisis, usando los métodos y composiciones de la presente invención, se pondría en contacto un tumor con el poxvirus que expresa GM-CSF. La vía de administración se selecciona de la inyección dentro de la masa tumoral o la vasculatura tumoral.

La inyección intratumoral, o inyectada directamente dentro de la vasculatura tumoral se contempla específicamente para tumores discretos, sólidos, accesibles. La administración local, regional o sistémica también puede ser apropiada. Para los tumores de $> 4 \text{ cm}$, el volumen a ser administrado será aproximadamente de 4-10 ml (preferiblemente 10 ml), mientras que para tumores de $< 4 \text{ cm}$, se usará un volumen de aproximadamente 1-3 ml (preferiblemente 3 ml). Las inyecciones múltiples administradas como una dosis única comprenden volúmenes de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 ml. Las partículas víricas pueden ser ventajosamente contactadas mediante la administración de inyecciones múltiples en el tumor, espaciadas a intervalos de aproximadamente 1 cm. En el caso de intervención quirúrgica, la presente invención se puede usar antes de la operación, para hacer que un tumor inoperable pueda ser sometido a la resección. La administración continua también puede aplicarse cuando sea apropiado, por ejemplo, mediante la implantación de un catéter dentro de un tumor o dentro de la vasculatura del tumor. Tal perfusión continua puede tener lugar durante un periodo de aproximadamente 1-2 horas, a aproximadamente 2-6 horas, a aproximadamente 6-12 horas, a aproximadamente 12-24 horas, a aproximadamente 1-2 días, a aproximadamente 1-2 semanas o mayor después del inicio del tratamiento. Generalmente, la dosis de la composición terapéutica a través de la perfusión continua será equivalente a la dada por una sola o múltiples inyecciones, ajustada durante un periodo de tiempo durante el que se produce la perfusión. Se contempla además que la perfusión del miembro puede ser usada para administrar composiciones terapéuticas de la presente invención, particularmente en el tratamiento de melanomas y sarcomas.

Los regímenes de tratamiento pueden también variar, y a menudo dependen del tipo de tumor, localización del tumor, progresión de la enfermedad, y salud y edad del paciente. Obviamente, ciertos tipos de tumores requerirán un tratamiento más agresivo, mientras que al mismo tiempo, ciertos pacientes no pueden tolerar más protocolos muy demandantes. El médico será el más adecuado para tomar tales decisiones en base a la eficacia y toxicidad (si la hay) conocidas de las formulaciones terapéuticas.

En ciertas formas de realización, el tumor que se está tratando no puede, al menos inicialmente ser resecable. Los tratamientos con construcciones terapéuticas víricas pueden aumentar la resecabilidad del tumor debido a la contracción en los márgenes o por eliminación de ciertas porciones particularmente invasivas. Después de los tratamientos, la resección puede ser posible. Los tratamientos adicionales posteriores a la resección servirán para eliminar la enfermedad microscópica residual en el sitio del tumor.

Los tratamientos pueden incluir varias "dosis unitarias." Dosis unitaria se define como la que contiene una cantidad predeterminada de la composición terapéutica. La cantidad a administrar, y la ruta y formulación particular, están dentro de la habilidad de los expertos en la técnica clínica. Una dosis unitaria no necesita ser administrada como una inyección única sino que puede comprender una infusión continua durante un periodo de tiempo establecido. La unidad de dosis de la presente invención puede ser descrita convenientemente en términos de unidades formadoras de placas (pfu) para una construcción vírica. Las dosis unitarias van desde 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} pfu y mayores. Alternativamente, dependiendo del tipo de virus y del título alcanzable, se entregará al menos 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , o 1×10^{15} o más partículas víricas infecciosas (vp), incluyendo todos los valores en intervalos entre ellos, al tumor o sitio del tumor.

B. Composiciones y formulaciones inyectables

El método preferido para la entrega de una construcción de expresión o virus que codifica la totalidad o parte de un genoma de poxvirus a las células cancerosas o tumorales en la presente invención es a través de la inyección intratumoral.

La inyección de construcciones de ácido nucleico puede suministrarse mediante una jeringuilla o cualquier otro método usado para la inyección de una solución, siempre y cuando la construcción de expresión pueda pasar a través del calibre particular de la aguja requerida para la inyección. Un nuevo sistema de inyección sin aguja ha sido recientemente descrito (documento de patente de Estados Unidos 5.846.233) que tiene una boquilla que define una cámara de la ampolla para almacenar la solución y un dispositivo de energía para empujar la solución fuera de la boquilla al sitio de entrega. También se ha descrito un sistema de jeringa para su uso en terapia génica que permite múltiples inyecciones de cantidades predeterminadas de una solución con precisión a cualquier profundidad (documento de patente de Estados Unidos 5.846.225).

Las soluciones de los compuestos activos como bases libres o sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, tal como la hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, glicoles de polietileno líquidos, y mezclas de los mismos y aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones estériles inyectables (documento de patente de Estados Unidos 5.466.68). En todos los casos la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe ser preservada contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (es decir, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, con el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y con el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debería ser tamponada adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido hecho primero isotónico con solución salina o glucosa suficiente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral e intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden emplearse serán conocidos por aquellos con conocimiento de la técnica a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y ya sea añadirse a 1000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectada en el sitio propuesto de infusión, (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación ocurrirá necesariamente dependiendo del estado del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración en cualquier caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Por otra parte, para la administración humana, las preparaciones deberían cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza como se requiere por la Oficina de la FDA de estándares biológicos.

Las soluciones estériles inyectables se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente filtrada estéril del mismo.

Las composiciones descritas en el presente documento se pueden formular en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxílico libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de dosificación y en tal cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones son fácilmente administradas en una variedad de formas de dosificación tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación del fármaco y similares.

Como se usa en este documento, "portador" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardadores de la absorción, tampones, soluciones de transporte, suspensiones, coloides, y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. Ingredientes activos suplementarios también pueden incorporarse en las composiciones.

La frase "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa o similar cuando se administra a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo es bien entendida en la técnica. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, bien como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para disolución en, o suspensión en, un líquido antes de la inyección.

C. Tratamientos de combinación

Los compuestos y métodos de la presente invención se pueden utilizar en el contexto de las enfermedades/condiciones hiperproliferativas, incluyendo el cáncer. Con el fin de aumentar la eficacia de un tratamiento con las composiciones de la presente invención, tales como un virus vaccinia que expresa GM-CSF, puede ser deseable combinar esas composiciones con otros agentes eficaces en el tratamiento de aquellas enfermedades y condiciones. Por ejemplo, el tratamiento del cáncer puede ser implementado con compuestos terapéuticos de la presente invención y otras terapias anticancerosas, tal como agentes anticancerosos o cirugía.

Se pueden emplear varias combinaciones; por ejemplo, un poxvirus, tal como el virus vaccinia, es "A" y la terapia anticancerosa secundaria es "B":

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

La administración de los vectores poxvirus/vaccina de la presente invención a un paciente seguirá protocolos generales para la administración de esta terapia secundaria particular, teniendo en cuenta la toxicidad, si algo, del tratamiento de poxvirus. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitieran según fuese necesario. También está contemplado que varias terapias estándar, así como la intervención quirúrgica, puedan ser aplicadas en combinación con la terapia celular del tumor o cáncer descrita.

Un agente "anti-canceroso" es capaz de afectar negativamente al cáncer en un sujeto, por ejemplo, matando las células cancerosas, induciendo apoptosis en las células cancerosas, reduciendo la tasa de crecimiento de las células cancerosas, reduciendo la incidencia del número de metástasis, reduciendo el tamaño del tumor, inhibiendo el crecimiento del tumor, reduciendo el suministro de sangre al tumor o a las células cancerosas, promoviendo una respuesta inmune contra las células cancerosas o tumor, previniendo o inhibiendo la progresión del cáncer, o aumentando la esperanza de vida de un sujeto con cáncer. Los agentes anticancerosos incluyen agentes biológicos (bioterapia), agentes quimioterapéuticos, y agentes de radioterapia. Más generalmente, estas otras composiciones se proporcionarían en una cantidad combinada eficaz para matar o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede envolver poner en contacto las células con la construcción de expresión y el agente(s) o factor(es) múltiples al mismo tiempo. Esto puede conseguirse poniendo en contacto la célula con una sola composición o formulación farmacológica que incluya ambos agentes, o poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formulaciones distintas, al mismo tiempo, en donde una composición incluye la construcción de expresión y el otro incluye el segundo agente(s).

La resistencia de las células tumorales a los agentes de quimioterapia y radioterapia representa un problema importante en la oncología clínica. Uno de los objetivos de la investigación del cáncer actual es encontrar formas de mejorar la eficacia de la quimio y la radioterapia mediante la combinación con la terapia génica. Por ejemplo, el gen herpes simplex-timina quinasa (HS-tK), cuando se entrega a tumores cerebrales mediante un sistema de vector retroviral, indujo con éxito la susceptibilidad al agente antivírico ganciclovir (Culver *et al.*, 1992). En el contexto de la presente invención, se contempla que la terapia de poxvirus podría utilizarse de manera similar en conjunción con quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia u otra intervención biológica, en adición a otros agentes proapoptóticos o de regulación del ciclo celular.

Alternativamente, la terapia poxvímica puede preceder o seguir al otro tratamiento con el agente por intervalos que van de minutos a semanas. En realizaciones en las que el otro agente y poxvirus se aplican separadamente a la célula, se podría asegurar generalmente que un periodo de tiempo significativo no expire entre el tiempo de cada entrega, de tal manera que el agente y poxvirus todavía serían capaces de ejercer un efecto combinado ventajosamente sobre la célula. En tales casos, se contempla que uno puede ponerse en contacto con la célula con ambas modalidades dentro de aproximadamente 12-24 horas uno del otro y, más preferiblemente, dentro de aproximadamente 6-12 horas del otro. En algunas situaciones, sin embargo, puede ser deseable extender el periodo de tiempo para el tratamiento significativamente, desde varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) a varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) de lapso entre las respectivas administraciones.

1. Quimioterapia

Las terapias del cáncer también incluyen una variedad de terapias de combinación con ambos tratamientos basados en las sustancias químicas y tratamientos basados en la radiación. Las quimioterapias de combinación incluyen, por ejemplo, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucil, busulfán, nitrosourea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógenos, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesil-proteína transferasa, transplatinum, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), o cualquier variante, análogo o derivado de los anteriores. La combinación de quimioterapia con terapia biológica se conoce como bioquimioterapia.

2. Radioterapia

Otros factores que causan daño en el ADN y se han utilizado ampliamente incluyen lo que se conoce comúnmente como rayos gamma, rayos X, y/o la administración dirigida de radioisótopos a las células tumorales. Otras formas de factores que dañan al ADN también se contemplan tales como microondas y radiación UV. Lo más probable es que todos estos factores efectúen una amplia gama de daño sobre el ADN, sobre los precursores del ADN, sobre la replicación y reparación del ADN, y en el montaje y mantenimiento de los cromosomas. Los intervalos de dosificación para rayos X van desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens por periodos prolongados de tiempo (3 a 4 semanas), a dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los intervalos de dosificación para los radioisótopos varían ampliamente, y dependen de la semivida del isótopo, la fuerza y el tipo de la radiación emitida, y la captación por las células neoplásicas.

5 Los términos "contactado" y "expuesto," cuando se aplica a una célula, se utilizan en el presente documento para describir el proceso por el cual una construcción terapéutica y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico se entregan a una célula diana o son colocados en yuxtaposición directa con la célula diana. Para lograr la muerte celular o estasis, ambos agentes son entregados a una célula en una cantidad combinada eficaz para matar a la célula o evitar que se divida.

15 3. Inmunoterapia

Los inmunoterapéuticos, en general, se basan en el uso de células y moléculas efectoras inmunes para atacar y destruir las células cancerosas. El efector inmune puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solo puede servir como un efector de terapia o puede reclutar otras células para efectuar realmente la muerte celular. El anticuerpo también puede estar conjugado a un fármaco o toxina (quimioterapéutica, radionúclido, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina pertussis, etc.) y servir simplemente como un agente de dirección. Alternativamente, el efector puede ser un linfocito que lleva una molécula de superficie que interacciona, ya sea directa o indirectamente, con una célula tumoral diana. Varias células efectoras incluyen células T citotóxicas y células NK. La combinación de modalidades terapéuticas, es decir, la actividad directa citotóxica y la inhibición o reducción de ciertos polipéptidos de poxvirus podría proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento del cáncer.

La inmunoterapia podría también ser usada como parte de una terapia combinada. A continuación se analiza el enfoque general para la terapia combinada. En un aspecto de la inmunoterapia, la célula tumoral debe tener algún marcador que es susceptible de orientación, es decir, no está presente en la mayoría de las otras células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de estos puede ser adecuado para la orientación en el contexto de la presente invención. Marcadores tumorales comunes incluyen el antígeno carcinoembrionario, antígeno específico de próstata, antígeno asociado a tumor urinario, antígeno fetal, tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, antígeno de Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, receptor de estrógeno, receptor de laminina, erb B y p155. Un aspecto alternativo de inmunoterapia es el de los efectos anticáncer con efectos estimulantes inmunes. También existen moléculas estimulantes del sistema inmune incluyendo: citoquinas tales como IL-2, IL4, IL-12, GM-CSF, IFN.gamma, quimioquinas tales como MIP-1, MCP-1, IL-8 y factores de crecimiento tales como el ligando de FLT3. Se ha mostrado que la combinación de moléculas estimulantes inmunes, ya sea como proteínas o el uso de entrega de genes en combinación con un supresor tumoral tal como mda-7 aumenta los efectos antitumorales (Ju *et al.*, 2000).

Como se señaló anteriormente, los ejemplos de inmunoterapias actualmente en investigación o en uso son los adyuvantes inmunes (por ejemplo, *Mycobacterium bovis*, *Plasmodium falciparum*, dinitroclorobenceno y compuestos aromáticos) (documento de patente de Estados Unidos N° 5.801.005; documento de patente de Estados Unidos N° 5.739.169; Hui y Hashimoto, 1998; Christodoulides *et al.*, 1998), terapia de citoquinas (por ejemplo interferones- α , - β y - γ ; IL-1, GM-CSF y TNF) (Bukowski *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1998; Hellstrand *et al.*, 1998) terapia génica (por ejemplo, TNF, IL-1, IL-2, p53) (Qin *et al.*, 1998; Austin-Ward y Villaseca, 1998; documento de patente de Estados Unidos N° 5.830.880 y documento de patente de Estados Unidos N° 5.846.945) y anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anti-gangliósido GM2, anti-HER-2, anti-p185) (Pietras *et al.*, 1998; Hanibuchi *et al.*, 1998; documento de patente de Estados Unidos N° 5.824.311). Herceptina (trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal quimérico (ratón-humano) que bloquea el receptor HER2-neu. Posee actividad antitumoral y ha sido aprobado para uso en el tratamiento de tumores malignos (Dillman, 1999). La terapia de combinación del cáncer con herceptina y quimioterapia ha demostrado ser más eficaz que las terapias individuales. Por lo tanto, se contempla que puede emplearse una o más terapias con las terapias relacionadas con el poxvirus descritas en este documento.

Inmunoterapia pasiva. Existen un número de diferentes enfoques para la inmunoterapia pasiva del cáncer. Pueden clasificarse como sigue: inyección de anticuerpos por sí solos; inyección de anticuerpos acoplados a toxinas o a agentes quimioterapéuticos; inyección de anticuerpos acoplados a isótopos radioactivos; inyección de anticuerpos anti-idiotipo; y finalmente, la purga de células tumorales en la médula ósea.

55 Preferiblemente, los anticuerpos humanos monoclonales se emplean en la inmunoterapia pasiva, ya que producen pocos o ningún efecto secundario en el paciente. Los anticuerpos humanos monoclonales humanizados y quiméricos también se emplean con éxito en la terapia del cáncer. Anticuerpos monoclonales usados en la terapéutica del cáncer incluyen edrecolomab, rituximab, trastuzumab, gemtuzumab, alemtuzumab, ibritumomab, tositumomab, cetuximab, bevacizumab, nimotuzumab, y panitumamab.

Puede ser favorable administrar más de un anticuerpo monoclonal dirigido contra dos antígenos diferentes o incluso anticuerpos con especificidad de antígeno múltiple. Los protocolos de tratamiento pueden también incluir la administración de linfolinas u otros potenciadores inmunes como se describe por Bajorin *et al.* (1988). El desarrollo de anticuerpos monoclonales humanos se describe en más detalle en otra parte de la especificación.

5 Inmunoterapia activa. En la inmunoterapia activa, se administra un péptido antigénico, polipéptido o proteína, o una composición de células tumorales autólogas o alogénicas o "vacuna", generalmente con un adyuvante bacteriano distinto (Ravindranath y Morton, 1991; Morton *et al.*, 1992; Mitchell *et al.*, 1990; Mitchell *et al.*, 1993). En la inmunoterapia del melanoma, aquellos pacientes que provocan una alta respuesta IgM a menudo sobreviven mejor que los que no provocan ningún o bajos anticuerpos IgM (Morton *et al.*, 1992). Los anticuerpos IgM son a menudo anticuerpos transitorios y la excepción a la regla parece ser anti-gangliósidos o anticuerpos anticarbohidrato.

10 Inmunoterapia adoptiva. En la inmunoterapia adoptiva, se aíslan los linfocitos que circulan del paciente, o linfocitos infiltrados tumorales *in vitro*, activados por linfocinas tales como IL-2 o transducidos con genes de necrosis tumoral, y readministrados (Rosenberg *et al.*, 1988; 1989). Para lograr esto, se debería administrar a un animal, o paciente humano, una cantidad inmunológicamente eficaz de linfocitos activados en combinación con una composición de péptido antigénico con adyuvante incorporado como se describe en este documento. Los linfocitos activados serán en lo más preferiblemente las propias células del paciente que se aislaron antes de una muestra de sangre o de tumor y se activaron (o "expandieron") *in vitro*. Esta forma de inmunoterapia ha producido varios casos de regresión de melanomas y carcinomas renales, pero el porcentaje de respondedores fue bajo en comparación con los que no respondieron.

20 4. Genes

En aún otra forma de realización, el tratamiento secundario es una terapia génica en la que se administra un polinucleótido terapéutico antes, después, o al mismo tiempo que se administra un poxvirus atenuado. La entrega de un poxvirus en conjunción con un vector que codifica uno de los siguientes productos génicos tendrá un efecto anticáncer combinado en los tejidos diana. Alternativamente, el poxvirus puede ser diseñado como un vector vírico para incluir el polinucleótido terapéutico. Una variedad de proteínas se abarcan dentro de la invención, algunas de las cuales se describen a continuación. La tabla 7 enumera varios genes que pueden ser objetivo para la terapia génica de alguna forma en combinación con la presente invención.

Inductores de la proliferación celular. Las proteínas que inducen la proliferación celular entran en varias categorías dependiendo de su función. El carácter común de todas estas proteínas es su capacidad para regular la proliferación celular. Por ejemplo, una forma de PDGF, el oncogén sis, es un factor de crecimiento secretado. Los oncogenes rara vez se derivan de genes que codifican factores de crecimiento, y en la actualidad, sis es el único factor de crecimiento oncogénico de origen natural conocido. En una forma de realización de la presente invención, se contempla que el ARNm antisentido dirigido a un inductor particular de proliferación celular se use para prevenir la expresión del inductor de proliferación celular.

35 Las proteínas FMS, ErbA, ErbB y neu son receptores de factores de crecimiento. Las mutaciones en estos receptores causan la pérdida de la función regulable. Por ejemplo, una mutación puntual que afecta el dominio transmembrana de la proteína receptora Neu produce el oncogén neu. El oncogén erbA se deriva del receptor intracelular para la hormona tiroidea. Se cree que el receptor oncogénico modificado ErbA compite con el receptor endógeno de la hormona tiroidea, causando crecimiento incontrolado.

40 La clase más grande de oncogenes incluye las proteínas transductoras de señales (por ejemplo, Src, Abl y Ras). La proteína Src es una proteína tirosina quinasa citoplasmática, y su transformación de proto-oncogén a oncogén en algunos casos, se produce por medio de mutaciones en el resto 527 de la tirosina. En contraste, la transformación de la proteína ras de proto-oncogén a oncogén, como ejemplo, se produce por una mutación de valina a glicina en el aminoácido 12 en la secuencia, reduciendo la actividad GTPasa de ras.

45 Las proteínas Jun, Fos y Myc son proteínas que ejercen directamente sus efectos sobre las funciones nucleares como factores de transcripción.

Inhibidores de la proliferación celular. Los oncogenes supresores de tumores actúan para inhibir la proliferación celular excesiva. La inactivación de estos genes destruye su actividad inhibitoria, lo que resulta en la proliferación no regulada. Los supresores de tumores p53, p16 y C-CAM se describen a continuación.

50 Además de p53, que ha sido descrito anteriormente, otro inhibidor de la proliferación celular es p16. Las principales transiciones de ciclo celular eucariota se desencadenan por quinasas dependientes de ciclina, o CDK's. Una CDK, la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4), regula la progresión a través de G₁. La actividad de esta enzima puede ser fosforilar Rb en G₁ tardío. La actividad de CDK4 se controla por una subunidad activadora, ciclina de tipo D, y por una subunidad inhibidora, la p16^{INK4} que se ha caracterizado bioquímicamente como una proteína que se une específicamente a e inhibe CDK4, y por tanto puede regular la fosforilación de Rb (Serrano *et al.*, 1993; Serrano *et al.*, 1995). Dado que la proteína p16^{INK4} es un inhibidor de CDK4 (Serrano, 1993), la delección de este gen puede aumentar la actividad de CDK4, causando la hiperfosforilación de la proteína Rb. Se sabe también que p16 regula la función de CDK6.

p16^{INK4} pertenece a una clase de proteínas inhibidoras de CDK recientemente descritas que también incluye p16^B, p19, p21, WAF1, y p27^{KIP1}. El gen p16^{INK4} se asigna a 9p21, una región del cromosoma frecuentemente eliminada en muchos tipos de tumores. Las deleciones homocigóticas y las mutaciones del gen p16^{INK4} son frecuentes en las líneas celulares tumorales humanas. Esta evidencia sugiere que el gen p16^{INK4} es un gen supresor de tumor. Esta interpretación ha sido cuestionada, sin embargo, por la observación de que la frecuencia de las alteraciones del gen p16^{INK4} es mucho menor en tumores primarios no cultivados que en líneas celulares cultivadas (Caldas *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1994; Hussussian *et al.*, 1994; Kamb *et al.*, 1994; Kamb *et al.*, 1994; Mori *et al.*, 1994; Okamoto *et al.*, 1994; Nobori *et al.*, 1994; Orlow *et al.*, 1994; Arap *et al.*, 1995). La restauración de la función de p16^{INK4} de tipo silvestre por transfección con un vector de expresión de plásmido redujo la formación de colonias en algunas líneas celulares humanas cancerosas (Okamoto, 1994; Arap, 1995).

Otros genes que pueden emplearse según la presente invención incluyen Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, WT-1, MEN-I, MEN-II, zac1 p73, VHL, MMAC1/PTEN, DBCCR-1, FCC, rsk-3, p27, fusiones de p27/p16, fusiones de p21/p27, genes antitrombóticos (por ejemplo, COX-1, TFPI), PGS, Dp, E2F, ras, myc, neu, raf erb, fms, trk, ret, gsp, hst, abl, E1A, p300, genes implicados en la angiogénesis (por ejemplo, VEGF, FGF, trombospondina, BAI-1, GDAIF, o sus receptores) y MCC.

Reguladores de la muerte celular programada. La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso esencial para el desarrollo embrionario normal, manteniendo la homeostasis en los tejidos adultos, y suprimiendo la carcinogénesis (Kerr *et al.*, 1972). La familia de proteínas Bcl-2 y proteasas tipo ICE ha demostrado ser importantes reguladores y efectores de la apoptosis en otros sistemas. La proteína Bcl-2, descubierta en asociación con el linfoma folicular, desempeña un papel destacado en el control de la apoptosis y mejora de la supervivencia celular en respuesta a diversos estímulos apoptóticos (Bakhshi *et al.*, 1985; Cleary y Sklar, 1985; Cleary *et al.*, 1986; Tsujimoto *et al.*, 1985; Tsujimoto y Croce, 1986). La proteína conservada evolutivamente Bcl-2 es reconocida ahora como un miembro de una familia de proteínas relacionadas, que pueden clasificarse como agonistas o antagonistas de la muerte.

Con posterioridad a su descubrimiento, se mostró que Bcl-2 actúa para suprimir la muerte celular provocada por una variedad de estímulos. Además, ahora es evidente que hay una familia de proteínas Bcl-2 reguladoras de la muerte celular que comparten homología estructurales y de secuencia comunes. Se ha mostrado que estos diferentes miembros de la familia o poseen funciones similares a Bcl-2 (por ejemplo, BCL_{XL}, Bcl_w, Bcl_s, Mcl-1, Al, Bfl-1) o contrarrestan la función de Bcl-2 y promueven la muerte celular (por ejemplo, Bax, Bak, Bik, Bim, Bid, Haraliri).

5. Cirugía

Aproximadamente el 60% de las personas con cáncer tendrá algún tipo de operación, lo que incluye la cirugía preventiva, diagnóstica o de puesta en escena, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento del cáncer que puede ser usado en conjunción con otras terapias, tales como el tratamiento de la presente invención, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

La cirugía curativa incluye la resección en la que todo o parte del tejido canceroso se elimina, se escisa, y/o destruye físicamente. La resección del tumor se refiere a la eliminación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección del tumor, el tratamiento por cirugía incluye la cirugía de láser, criocirugía, electrocirugía, y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). Se contempla además que la presente invención pueda ser usada en conjunción con la eliminación de los cánceres superficiales, precánceres, o cantidades incidentales de tejido normal.

Tras la escisión de parte de todas las células cancerosas, tejido, o tumor, puede formarse una cavidad en el cuerpo. El tratamiento se puede llevar a cabo por perfusión, inyección directa o la aplicación local de la zona con una terapia anticancerosa adicional. Dicho tratamiento se puede repetir, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4, y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 meses. Estos tratamientos pueden ser de dosis variables también.

6. Otros agentes

Se contempla que otros agentes pueden ser usados en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia terapéutica del tratamiento. Estos agentes adicionales incluyen agentes inmunomoduladores, agentes que afectan a la regulación al alza de los receptores de la superficie celular y uniones GAP, agentes citostáticos y de diferenciación, inhibidores de la adhesión celular, agentes que aumentan la sensibilidad de las células hiperproliferativas a los inductores de la apoptosis, u otros agentes biológicos. Los agentes inmunomoduladores incluyen el factor de necrosis tumoral; interferón- α , - β , y - γ ; IL-2 y otras citoquinas; F42K y otros análogos de citoquinas; o MIP-1, MIP-1.beta., MCP-1, RANTES, y otras quimiocinas. Se contempla además que la regulación al alza de los receptores de la superficie celular o sus ligandos tales como el ligando Fas/Fas, DR4 o DR5/TRAIL (ligando Apo-2) potenciaría las habilidades de inducción de la apoptosis de la presente invención por el establecimiento de un efecto autocrino o paracrino en las células hiperproliferativas. El aumento de la señalización intercelular por medio de la elevación del número de uniones de GAP aumentaría los efectos antihiperproliferativos en la población de células hiperproliferativas vecina. En otras formas de realización, se contempla que los agentes

citostáticos o de diferenciación pueden usarse en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia antihiperproliferativa del tratamiento con inhibidores de la adhesión celular a fin de mejorar la eficacia de la presente invención. Ejemplos de inhibidores de la adhesión celular son los inhibidores de la quinasa de adhesión focal (FAKs) y la lovastatina. Se contempla además que podrían utilizarse otros agentes que aumentan la sensibilidad de una célula hiperproliferativa a la apoptosis, tal como el anticuerpo c225, en combinación con la presente invención para mejorar la eficacia del tratamiento.

El ligando Apo2 (Apo2L, también llamado TRAIL) es un miembro de la familia de citoquinas del factor de necrosis tumoral (TNF). TRAIL activa la apoptosis rápida en muchos tipos de células cancerosas, sin embargo no es tóxico para las células normales. TRAIL ARNm se produce en una amplia variedad de tejidos. La mayoría de las células normales parecen ser resistentes a la acción citotóxica de TRAIL, lo que sugiere la existencia de mecanismos que pueden proteger contra la inducción de la apoptosis por TRAIL. El primer receptor descrito para TRAIL, llamado receptor de muerte 4 (DR4), contiene un "dominio de muerte" citoplasmático; DR4 transmite la señal de apoptosis llevada por TRAIL. Receptores adicionales han sido identificados que se unen a TRAIL. Un receptor, llamado DR5, contiene un dominio de muerte citoplasmático y señala la apoptosis al igual que DR4. Los mARN de DR4 y DR5 se expresan en muchos tejidos normales y líneas celulares tumorales. Recientemente se han identificado receptores de señuelo tales como DcR1 y DcR2 para prevenir que TRAIL induzca la apoptosis a través de DR4 y DR5. Así estos receptores señuelo representan un nuevo mecanismo para la regulación de la sensibilidad para una citolina proapoptótica en la superficie de las células. La expresión preferencial de estos receptores inhibitorios en tejidos normales sugiere que TRAIL puede ser útil como un agente anticancerígeno que induce la apoptosis en las células cancerosas sin dañar las células normales. (Marsters *et al.*, 1999).

Ha habido muchos avances en la terapia del cáncer después de la introducción de los fármacos quimioterapéuticos. Sin embargo, una de las consecuencias de la quimioterapia es el desarrollo/adquisición de fenotipos resistentes a los fármacos y el desarrollo de la resistencia a múltiples fármacos. El desarrollo de la resistencia a fármacos sigue siendo un obstáculo importante en el tratamiento de tales tumores y por lo tanto, hay una necesidad obvia de enfoques alternativos, tales como la terapia génica.

Otra forma de terapia para su uso en combinación con quimioterapia, radioterapia o terapia biológica incluye la hipertermia, que es un procedimiento en el cual el tejido de un paciente está expuesto a altas temperaturas (hasta 106° F.). Dispositivos de calefacción externos o internos pueden estar involucrados en la aplicación de la hipertermia local, regional, o de todo el cuerpo. Hipertermia local consiste en la aplicación de calor a un área pequeña, tal como un tumor. El calor puede ser generado externamente con ondas de alta frecuencia dirigidas a un tumor desde un dispositivo fuera del cuerpo. El calor interno puede implicar una sonda estéril, incluyendo, alambres delgados calientes o tubos huecos llenos de agua tibia, implantando antenas de microondas, o electrodos de radiofrecuencia.

Un órgano de un paciente o una extremidad se calienta para la terapia regional, lo cual se logra mediante dispositivos que producen alta energía, tales como imanes. Alternativamente, parte de la sangre del paciente puede ser retirada y calentada antes de ser perfundida en el área que va a ser calentada internamente. El calentamiento en todo el cuerpo también puede implementarse en los casos en que el cáncer se ha extendido a todo el cuerpo. Mantas de agua caliente, cera caliente, bobinas inductivas y cámaras térmicas pueden ser utilizadas para este propósito.

La terapia hormonal también puede ser utilizada en conjunción con la presente invención o en combinación con cualquier otra terapia contra el cáncer previamente descrita. El uso de hormonas se puede emplear en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer como el de mama, de próstata, de ovario, cáncer cervical o para bajar el nivel o bloquear los efectos de ciertas hormonas tales como la testosterona o el estrógeno. Este tratamiento se utiliza a menudo en combinación con al menos otra terapia contra el cáncer como una opción de tratamiento o para reducir el riesgo de metástasis. TABLA-US-00007 TABLA 6 Oncogenes Fuente de genes Enfermedad Humana Función Factores de crecimiento HST/KS Transfección miembro de la familia FGF promotor INT-2 MMTV miembro de la familia de inserción FGF promotor INTI/WNTI MMTV Similar al factor Inserción SIS Virus del sarcoma de simio PDGF B Receptor de tirosina quinasa ERBB/HER aviar amplificado, EGF/TGF-alfa./eritro- suprimido virus cáncer de células escamosas Anfiregulina/blastosis; Virus Hetacelulina; ALV glioblastoma receptor promotor inserción; tumores humanos amplificados ERBB-2/NEU/ Transfectado Mama amplificado, Regulado por HER-2 de rata, de ovario gástrico NDF/ glioblastomas cánceres Heregulina y factores relacionados CON EGF FMS SM felino CSF-1 receptor del virus de sarcoma KIT HZ felino MGF/Receptor del virus de sarcoma Steel Hematopoyesis TRK Transfección NGF (factor de crecimiento humano del nervio) cáncer de colon receptor MET Transfección factor de dispersión/ del receptor HGF humano osteosarcoma RET Translocaciones Esporádicas tiroide Huérfano receptor punto de cáncer; Familiar Tyr Mutaciones medular tiroide Quinasa cáncer; neoplasias endocrinas múltiples 2A y 2B ROS UR11 aviar Huérfano receptor sarcoma Virus Tyr Quinasa receptor PDGF Translocación crónica TEL(Factor de leucemia de transcripción mielomonocítica como ETS)/PDGF receptor gen Fusión.

V. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan con el propósito de ilustrar diversas formas de realización de la invención y no están destinados a limitar la presente invención de ninguna manera. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas

mencionados, así como los objetos, fines y ventajas inherentes al presente documento. Los presentes ejemplos, junto con los métodos descritos en este documento son actualmente representativos de formas de realización, son ejemplarizantes y no pretenden ser limitaciones en el alcance de la invención.

EJEMPLO 1

5 Tratamiento del carcinoma hepático

A. Objetivos

(1) Determinar la dosis máxima tolerada (MTD) y/o la dosis máxima posible (MFD) de JX-594 administrado mediante inyección intratumoral (IT), (2) Evaluar la seguridad de JX-594 administrado por inyección intratumoral, (3) Evaluar la replicación/farmacocinética de JX-594 administrado por inyección I.T., (4) Evaluar la respuesta inmune a JX-594 y a los antígenos asociados al tumor después de la inyección I.T. (infiltración inflamatoria aumentada en los sitios no inyectados e inyectados; formación de anticuerpos neutralizantes; respuestas de citoquinas; e inducción de linfocitos T específicos del virus y del tumor, (5) Evaluar la eficacia antitumoral de JX-594 administrado por inyección I.T. en los sitios inyectados y no inyectados

B. Diseño del estudio

15 Se trata de un estudio de Fase I, de etiqueta abierta, de escalada de dosis en pacientes con carcinoma hepático con nódulo(s) tumoral(es) inyectable(s) superficial(es) bajo guía de imagen. Los pacientes que tienen tumores refractarios recibirán un tratamiento de los siguientes cuatro niveles de dosis en un diseño de escalada de dosis secuencial: Cohorte 1: 1×10^8 pfu, Cohorte 2: 3×10^8 pfu, Cohorte 3: 1×10^9 pfu, Cohorte 4: 3×10^9 pfu.

20 El periodo objeto de este estudio será de 15 meses. Los pacientes inscritos recibirán 1 tratamiento por ciclo. Si un paciente recibe el tratamiento sin una toxicidad limitante de la dosis (DLT) y el tumor diana no ha progresado, el paciente va a pasar a un ciclo adicional hasta un total de 4 ciclos. Si un paciente tiene un tumor diana avanzado o se retira del estudio debido a una DLT u otras razones, el paciente realizará una visita final del estudio y entra en la fase de seguimiento. Un ciclo se define como 3 semanas. Una DLT se observará sólo en el primer ciclo.

25 Una dosis puede ser distribuida en lesiones 1-3. La suma total de los diámetros máximos de la lesión(es) a inyectar debe ser inferior a 10 cm. Tres pacientes serán tratados en cada nivel de dosis a menos que se observe una DLT. La inscripción procederá al siguiente nivel de dosis si 0 de 3 pacientes experimenta una DLT; si uno de los 3 primeros pacientes experimenta una DLT, entonces un paciente adicional será inscrito hasta que se produzca una segunda DLT (que se define como la dosis tóxica en este momento) o hasta que se ha tratado un total de seis pacientes. Si una segunda DLT no aparece en la cohorte, el paciente avanza al siguiente nivel de dosis.

30 MTD se define como la dosis inmediatamente antes de la dosis a la que 2 pacientes experimentan una DLT después del tratamiento con JX-594. MFD se define como el nivel de dosis superior cuando MTD no está definido. Cuando MTD/MFD están definidas, seis pacientes adicionales serán tratados con el fin de obtener más datos sobre la seguridad y la toxicidad en este nivel de dosis. Si MTD no se produce en la cohorte 4 y la eficacia de PR se desarrolla en más de 2/3 en la dosis cohorte anterior, el estudio clínico de 6 pacientes adicionales se llevará a cabo con esta dosis.

35 DLT se define como cualquiera de los siguientes, atribuido a JX-594: 1. Toxicidad de grado 4 en cualquier periodo 2. Toxicidad de grado 3 (excluyendo los síntomas como de gripe: fatiga, náusea, mialgia, fiebre) que dura > 5 días. Los criterios de toxicidad en los Estados Unidos comunes del The National Cancer Institute se usarán para asignar la severidad de la toxicidad que ocurre en este estudio.

40 1. Decisiones sobre tumor(es) de control (tumor(es) no-inyectados) (Ciclo 1) e inyección de JX-594 (Ciclo 2+)

45 Durante el Ciclo 1 el investigador decidirá el sitio(s) del tumor de control. El tumor(es) de control debe ser un nódulo de tumor claro localizado en lóbulos distinto de los lóbulos hepáticos del tumor(es) diana y estar fuera del drenaje linfático del tumor(es) diana. En consecuencia, el tumor(es) de control estará(n) localizado(s) separadamente en los lóbulos izquierdo y derecho del hígado. Sin embargo, si hay nódulos de tumor dentro del límite de un lado del hígado, el tumor(es) de control puede ser nódulo(s) de tumor no inyectado con JX-594; sin embargo, un tumor de control puede no ser establecido si el tumor tiene un nódulo único extenso. Este tumor de control será evaluado de manera idéntica al tumor(es) tratado(s) de JX-594. Esto permitirá una evaluación del efecto de control sobre el crecimiento tumoral y la toxicidad/actividad local.

50 Si este paciente avanza al ciclo 2, el tumor(es) de control se inyectará con JX-594 al mismo nivel de dosis que el tumor diana en el ciclo 1. Como se describió anteriormente, la dosis se distribuirá proporcionalmente entre los tumores basados en el tamaño del tumor.

2. Respuestas del tumor no objetivo (no inyectado)

Los tumores no inyectados pueden responder en este estudio; se ha informado sobre este fenómeno en un ensayo de fase I anterior de JX-594 con este tipo de pacientes. Es necesario entender el mecanismo de este efecto; las

posibilidades incluyen la propagación del virus a partir de los tumores inyectados y/o la inducción de la citotoxicidad específica del tumor (infiltración del tumor por linfocitos T (CTL) y posterior destrucción del tumor mediada por linfocitos T citotóxicos). Con el fin de comprender mejor el mecanismo(s) de este efecto, los investigadores procederán como sigue. Si un tumor(es) no inyectado responde clínicamente, se llevarán a cabo biopsias del centro o aspirados con aguja fina en los mismos puntos de tiempo de recogida que el tumor inyectado (véase el apéndice A; el total de biopsias de tumores no diana no excederán dos sitios). Los especímenes de tumores no inyectados se analizarán con el mismo método que se utilizará para los materiales que se obtengan a partir del tumor inyectado.

C. Selección de pacientes

1. Criterios de inclusión

- Por lo general, los pacientes reunirán todos los criterios siguientes: (1) mayores de 18 años de edad, (2) pacientes con carcinoma de hígado (primario o metastásico) clínica o histológicamente confirmado con tumor inyectable superficial (diámetro más largo de ≤ 10 cm) por guía de imagen, que ha progresado a pesar de las terapias estándar (es decir, refractario a las terapias estándar), (3) progreso del tumor a pesar de los tratamientos estándar como la resección quirúrgica, la quimioembolización intraarterial, la quimioterapia y la radioterapia, (4) pacientes con estado funcional de Karnofsky (KPS) de ≥ 70 , (5) pacientes con supervivencia esperada de al menos 16 semanas, (6) si los pacientes son sexualmente activos, los pacientes tienen la voluntad de utilizar un método anticonceptivo durante 3 meses después del tratamiento con JX-594, (7) pacientes con capacidad de comprender y disposición a firmar un consentimiento informado por escrito, (8) pacientes con capacidad de cumplir con los procedimientos del estudio y exámenes de seguimiento, (9) pacientes con la función de la médula ósea adecuada: WBC > 3.000 células/mm³, ANC > 1.500 células/mm³, hemoglobina > 10 g/dl, y recuento de plaquetas > 75.000 células/mm³, (10) pacientes con función renal adecuada: creatinina sérica $< 1,5$ mg/dl, (11) pacientes con función hepática adecuada: AST sérica ($\leq 2,5$ de ULN), ALT ($\leq 2,5$ de ULN), bilirrubina total ($\leq 2,0$ mg/dl); para el cáncer de pulmón primario los pacientes deberían ser clasificados en A o B por la clasificación de Child-Pugh.

2. Criterios de exclusión

- Los pacientes no deben cumplir ninguno de los siguientes criterios de exclusión: (1) embarazada o amamantando a un bebé, (2) pacientes de VIH, (3) pacientes clasificados C por la clasificación de Child-Pugh; pacientes con bilirrubina total > 2 mg/dl entre los pacientes clasificados en A o B (en el caso de cáncer hepático primario), (4) pacientes con infección activa significativa clínicamente o condición médica incontrolada (por ejemplo, respiratoria, neurológica, cardiovascular, gastrointestinal, sistema genitourinario) consideradas de alto riesgo para el tratamiento de un fármaco experimental nuevo, (5) pacientes con inmunodeficiencia significativa o miembro de la familia con la condición debida a la enfermedad subyacente y/o la medicación tomada, (6) pacientes con historia de eczema que requiera terapia sistémica, (7) pacientes con enfermedad cardíaca inestable que incluye MI, angina inestable, fallo cardíaco congestivo, miocarditis, y arritmias diagnosticadas y que requieran medicación dentro de los 6 meses antes del reclutamiento del paciente para el estudio, o cualquier otra condición significativa clínicamente de la función cardíaca, (8) pacientes que recibieron corticoides sistémicos o cualquier otro medicamento inmunosupresor dentro de las 4 semanas antes del tratamiento del fármaco del estudio, (9) pacientes que recibieron cualquier otro fármaco de investigación, radioterapia, quimioterapia o cirugía dentro de las 4 semanas antes de la inscripción del paciente en el estudio, (10) pacientes que no pueden o no quieren dar un consentimiento informado por escrito, (11) pacientes con hipersensibilidad al ingrediente(s) del fármaco en estudio.

D. Procedimientos de la visita del estudio

Un cuadro resumen de los procedimientos del estudio se presenta en la tabla de observaciones y ensayos. Por lo general, se puede permitir una ventana de ± 1 días desde el día programado, y los fines de semana y días festivos no se cuentan.

1. Visita de cribado (día -14 a 0)

- Este es un estudio clínico utilizando los virus y el estudio procederá, discutiéndolo con el paciente. Cualquier paciente que desea tomar parte tiene que proporcionar un consentimiento informado escrito. Después de firmar un consentimiento informado, con cada paciente se llevarán a cabo las siguientes evaluaciones dentro de los 14 días antes de la iniciación del estudio:

- Las evaluaciones clínicas incluyen (1) una minuciosa historia médica y quirúrgica, incluyendo los tratamientos contra el cáncer, (2) el peso y los signos vitales (temperatura, pulso y presión arterial), (3) examen físico (sistemas de todo el cuerpo), (4) puntuación del estado funcional de Karnofsky, (5) radiografías de tórax (posterior-anterior y bilateral), (6) ECG de 12 derivaciones (aceptable si se ha hecho dentro de los 3 meses anteriores a la inscripción de los pacientes en el estudio), (7) evaluación de la medicación concomitante (todo medicamento tomado dentro de los 14 días antes de la inscripción de los pacientes en el estudio).

- Las evaluaciones del laboratorio incluyen (1) análisis de sangre de rutina (incluyendo recuentos de plaquetas y recuentos diferenciados), (2) análisis químicos del suero; sodio, potasio, BUN, creatinina, ALT, AST, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, LDH, calcio, fósforo, magnesio, glucosa al azar, proteína total, albúmina y ácido úrico, (3)

- test de coagulación: (tiempo de protrombina (PT), tiempo de tromboplastina parcial (PTT), y relación normalizada internacional (INR); fibrinógeno, (4) HIV, HBV y test de alfa fetoproteína, (5) título de anticuerpos neutralizantes, (6) genomas víricos (Q-PCR), (7) análisis de orina de rutina (incluyendo examen microscópico), (8) prueba de embarazo (para mujeres en edad fértil), (9) prueba de marcadores tumorales apropiados (CA125, CEA, AFP, PSA, CA19-9, etc.) en la prueba de cribado, dependiendo del tipo de tumor; cuando se incrementan, se realizará la prueba a los 22 días de cada ciclo.
- Las evaluaciones basadas en imágenes y medición del tumor incluyen la medición de un nódulo tumoral mediante tomografía computarizada del abdomen (medición del diámetro más largo); puede ser sustituido con CT tomada en el día 1 (antes del tratamiento) (aceptable si se hace dentro de las 2 semanas antes de la inscripción del paciente en el estudio)
- Día 1 (Ciclo 1 - 4) - Se debe de tener en cuenta cuáles evaluaciones deberán llevarse a cabo antes o después de la administración de JX-594.
- Día 1; Pretratamiento -Evaluaciones clínicas: Examen físico (sistemas de todo el cuerpo), peso y signos vitales (temperatura, pulso y presión arterial), puntuación del estado funcional de Karnofsky, identificación de terapias concurrentes, prueba y valoración del (los) tumor(es) diana, medición del (los) tumor(es) diana(s) (n=1-3); medida del tumor(es) no inyectado adicional, (n=1-3), biopsia del tumor(es) diana.
- Evaluaciones de laboratorio: sangre-1. Análisis de sangre de rutina (incluyendo recuentos de plaquetas y recuentos diferenciales), 2. Ensayo de la química del suero: sodio, potasio, BUN, creatinina, ALT, AST, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, LDH, calcio, fósforo, magnesio, glucosa al azar, proteína total, albúmina y ácido úrico, 3. Prueba de coagulación: (tiempo de protrombina (PT), tiempo de tromboplastina parcial (PTT), y relación normalizada internacional (INR); fibrinógeno, 4. Citoquinas (incluyendo GM-CSF), 5. Título de anticuerpos neutralizantes, 6. Genomas víricos (Q-PCR)
- Evaluaciones de laboratorio: Otros -- 1. Examen de orina para pfu, 2. Frotis de garganta para pfu
- Administración del fármaco del estudio - 1. Administración de JX-594 como se describe en el capítulo 8
- Día 1: Post-tratamiento -- 1. Examen físico. Se tomarán los signos vitales dos veces por hora (30 minutos y 60 minutos) durante 6 horas y se tomarán de forma rutinaria después, 2. Se les extraerá sangre para el análisis de citoquinas en los siguientes puntos de tiempo: 1 hora y 3 horas post-tratamiento, 3. Se les extraerá sangre para la medición de los genomas de JX-594 circulantes en los siguientes puntos de tiempo: 10-15 minutos, 25-35 minutos y 4-6 horas después del principio de la administración, 4. Se tomarán muestras de orina y frotis de garganta para la diseminación vírica de 3-4 horas post-tratamiento, 5. Registro de efectos secundarios y enfermedades concurrentes
- Día 3 (Ciclo 1 - 4) - Evaluaciones de laboratorio: Sangre - 1. Análisis de sangre de rutina (incluyendo recuentos de plaquetas y recuentos diferenciales), 2. ensayo de la química del suero: sodio, potasio, BUN, creatinina, ALT, AST, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, LDH, calcio, fósforo, magnesio, glucosa al azar, proteína total, albúmina y ácido úrico, 3. Prueba de coagulación: tiempo de protrombina (PT), tiempo de tromboplastina parcial (PTT) y Relación Normalizada Internacional (INR); fibrinógeno, 4. Citoquinas (incluyendo GM-CSF), 5. Título de anticuerpos neutralizantes, 6. Genomas víricos (Q-PCR).
- Evaluaciones de laboratorio: Otros - 1. Examen de orina para pfu, 2. Frotis de garganta para pfu.
- Evaluaciones clínicas - Registro de efectos secundarios y enfermedades concurrentes
- Evaluaciones basadas en imágenes: tomografía computarizada del abdomen cuando se sospechan efectos secundarios durante la evaluación clínica.
- Día 5 (Ciclo 1 - 4) -- Evaluaciones clínicas - Registro de efectos secundarios y enfermedades concurrentes.
- Evaluaciones de laboratorio: Sangre - 1. Análisis de sangre de rutina (incluyendo recuentos de plaquetas y recuentos diferenciales), 2. Análisis de la química del suero: sodio, potasio, BUN, creatinina, ALT, AST, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, LDH, calcio, fósforo, magnesio, glucosa al azar, proteína total, albúmina y ácido úrico, 3. Prueba de coagulación: (tiempo de protrombina (PT), tiempo de tromboplastina parcial (PTT), y Relación Normalizada Internacional (INR); fibrinógeno, 4. Genomas víricos (Q-PCR).
- Día 8 (Ciclo 1 - 4) - Evaluaciones Clínicas - Examen físico, tomografía computarizada; biopsia del tumor(es) diana (la biopsia se realizará también en no más de 1 o 2 tumor(es) no inyectados que muestren un cambio significativo incluyendo inflamación, necrosis o encogimiento, etc.). La biopsia se realizará solo en el ciclo 1 y 2 por la evaluación subjetiva del investigador principal de la condición del paciente. Registro de efectos secundarios y enfermedades concurrentes.
- Evaluaciones de laboratorio: Sangre - 1. Análisis de sangre de rutina (incluyendo recuentos de plaquetas y recuentos diferenciales), 2. Análisis de la química del suero: sodio, potasio, BUN, creatinina, ALT, AST, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, LDH, calcio, fósforo, magnesio, glucosa al azar, proteína total, albúmina y ácido úrico, 3.

Prueba de coagulación: tiempo de protrombina (PT), tiempo de trombotoplastina parcial (PTT) y Relación Normalizada Internacional (INR); fibrinógeno, 4. Citoquinas (incluyendo GM-CSF), 5. Título de anticuerpos neutralizantes, 6. Genomas víricos (Q-PCR).

5 Evaluaciones de laboratorio: Otros - 1. Examen de orina para pfu, 2. Frotis de garganta para pfu, 3. Aspiración con aguja fina de la necrosis cuando se produce la necrosis (realizado solo en el ciclo 1 y 2).

Día 15 (Ciclo 1 - 4) -- Evaluaciones clínicas - Examen físico

10 Evaluaciones de laboratorio: Sangre - 1. Análisis de sangre de rutina (incluyendo recuentos de plaquetas y recuentos diferenciales), 2. Análisis de la química del suero: sodio, potasio, BUN, creatinina, ALT, AST, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, LDH, calcio, fósforo, magnesio, glucosa al azar, proteína total, albúmina y ácido úrico, 3. Análisis de coagulación: tiempo de protrombina (PT), tiempo de trombotoplastina parcial (PTT) y Relación Normalizada Internacional (INR); fibrinógeno, 4. Genomas víricos (Q-PCR).

Evaluaciones de laboratorio: Otras - 1. Examen de orina para pfu, 2. Frotis de garganta para pfu

15 Día 22 (ciclo 1 - 4) - Evaluaciones clínicas - 1. Examen físico, 2. Evaluaciones basadas en imágenes: tomografía computarizada del abdomen (realizada en los ciclos 2 y 4 solamente), 3. Medición del(los) tumor(es) diana (n=1-3); medición de tumores adicionales no inyectados (n=1-3), 4. Biopsia de tumor(es) diana (la biopsia se realizará también en no más de 1 o 2 tumor(es) no inyectados que muestren un cambio significativo incluyendo inflamación, necrosis o encogimiento, 5. Registro de efectos secundarios y enfermedades concurrentes, 6. El día 22 se puede usar como día 1 antes del siguiente ciclo. Puede haber hasta un intervalo de una semana entre el día 22 y el día 1 del siguiente ciclo.

20 Evaluaciones de laboratorio: Sangre - 1. Análisis de sangre de rutina (incluyendo recuentos de plaquetas y recuentos diferenciales), 2. Ensayo de la química del suero: sodio, potasio, BUN, creatinina, ALT, AST, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, LDH, calcio, fósforo, magnesio, glucosa al azar, proteína total, albúmina y ácido úrico, 3. Prueba de coagulación: tiempo de protrombina (PT), tiempo de trombotoplastina parcial (PTT) y Relación Normalizada Internacional (INR); fibrinógeno, 4. Anticuerpos neutralizantes, 5. Genomas víricos (Q-PCR), 6. Prueba de los marcadores tumorales apropiados (CA125, CEA, AFP, PSA, CA19-9, etc.) en la prueba de cribado, dependiendo del tipo de tumor; cuando se incrementan, se realizará la prueba en el día 22 de cada ciclo.

25 Evaluaciones de laboratorio: Otras - 1. Examen de orina para pfu, 2. Frotis de garganta para pfu

Día 28 o visitas fin del estudio - evaluaciones clínicas - examen físico, y registro de efectos secundarios y enfermedades concurrentes.

30 Evaluaciones de laboratorio: Sangre - 1. Análisis de sangre de rutina (incluyendo recuentos de plaquetas y recuentos diferenciales), 2. Análisis de la química del suero: sodio, potasio, BUN, creatinina, ALT, AST, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, LDH, calcio, fósforo, magnesio, glucosa al azar, proteína total, albúmina y ácido úrico, 3. Prueba de coagulación: tiempo de protrombina (PT), tiempo de trombotoplastina parcial (PTT) y Relación Normalizada Internacional (INR); fibrinógeno, 4. Genomas víricos (Q-PCR).

35 Ciclo 3-4 - 1. Un paciente cuyo lugar de inyección del tumor no ha mostrado > 25% de aumento en el diámetro más largo en el día 22 del ciclo 2 avanzará al ciclo 3-4, 2. Un paciente cuyo lugar de inyección del tumor ha mostrado del 25-50% de aumento en el diámetro más largo en el día 22 del ciclo 2 puede avanzar al ciclo 3-4, 3. Un paciente cuyo lugar de inyección del tumor ha mostrado > 50% de aumento en el diámetro más largo en el día 22 del ciclo 2 se dará por terminado del estudio.

40 Seguimiento y revisión de pacientes - Los pacientes que han completado el estudio clínico serán seguidos en la modalidad de seguimiento de rutina para pacientes con cáncer hepático durante un año después de la visita del final del estudio. Independientemente del estudio clínico, los pacientes vivos pueden hacerse exámenes de rutina tales como prueba de suero de hepatoma y evaluaciones basadas en imágenes cuando regresen para una visita al hospital y hacerse exámenes cada 3 meses. Después de la finalización del estudio clínico, si se determina un beneficio clínico notable, se pueden administrar hasta un total de 4 veces de inyecciones adicionales después de obtener un consentimiento informado por escrito separado. En este momento, en todos los procedimientos del estudio se procederá de la misma manera que con las primeras 4 administraciones de este estudio. Después de la finalización del estudio hasta el ciclo 4, mientras que el investigador principal juzgue que hay un beneficio clínico significativo (más que enfermedad estable), se pueden administrar hasta un total de 4 veces de inyecciones adicionales del fármaco del estudio. En este caso, el PI debería discutir con el patrocinador con antelación y obtener un acuerdo del patrocinador. Todos los planes de estudio procederán de la misma manera que este estudio clínico.

50

E. Replicación vírica, propagación y pruebas especiales

1. Ensayos Q-PCR y de unidades formadoras de placas en plasma y orina (ensayo farmacocinético)

5 La propagación vírica al torrente sanguíneo se evaluará por la prueba de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (Q-PCR). Para detectar si los virus están presentes en la orina y frotis de garganta, se recogerán muestras post-tratamiento.

2. Biopsias tumorales y aspiraciones con aguja fina (prueba de respuesta de inmunidad)

Para averiguar la replicación vírica en el lugar(es) del tumor(es), se harán biopsias centrales y aspiraciones con aguja fina (se considera seguro y fácil) antes y después del tratamiento. Estas biopsias se analizarán en cuanto a evidencia de replicación vírica, infiltración de células inflamatorias e inmunes, necrosis y apoptosis.

10 Para obtener los tejidos, se usará la biopsia con aguja gruesa o se realizará la biopsia por aspiración con aguja fina bajo la guía de imágenes. Sin embargo, a veces estas biopsias pueden causar una urgencia o situación peligrosa al paciente. Por lo tanto, cuando se hace una biopsia para obtener tejidos, la seguridad del paciente debería ser la primera preocupación. Si el estado del paciente hace muy probable que se le ponga en peligro (tumor hepático capsular etc.), los tejidos deben ser obtenidos por medio de una vía segura.

15 Si el PI juzga que la biopsia del tejido (aspiración con aguja fina) es probable que ponga en peligro al paciente, la biopsia (aspiración con aguja fina) no puede llevarse a cabo. Además, si es necesario para la seguridad de un paciente, a discreción del PI, los pacientes pueden ser hospitalizados y observados durante un máximo de 5 días antes y después de la realización de una biopsia de tejido (aspiración con aguja fina) y/o inyección intratumoral con JX-594.

20 3. Análisis de citoquinas (prueba de respuesta de inmunidad)

Las concentraciones séricas de GM-CSF, IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, If- δ y TNF- α se medirán con un ensayo de ELISA.

4. Ensayo de anticuerpos neutralizantes (prueba farmacocinética)

La ocurrencia de títulos de anticuerpos neutralizantes de JX-594 en el suero serialmente diluido de un paciente se identificará con un ensayo de placa.

25 5. Muestras de sangre farmacocinéticas

Se tomarán muestras de 3 ml de sangre para la farmacocinética cada una en un minivacutainer de tapa amarilla.

F. Administración de los fármacos en investigación

1. Dosis, Administración y programación de tratamientos

30 Dosis. Las dosis serán típicamente como sigue: Cohorte 1: 1×10^8 pfu, Cohorte 2: 3×10^8 pfu, Cohorte 3: 1×10^9 pfu, Cohorte 4: 3×10^9 pfu.

35 Administración del fármaco. JX-594 puede ser administrado por medio de la inyección intratumoral. Las inyecciones intratumorales se administrarán por un médico experto en la forma que se describe. Usando una aguja de calibre 21 o más pequeña, se inyectarán los tumores directamente con la solución que contiene el virus cuyo volumen es equivalente a aproximadamente 25% del volumen total de los tumores (de 1 - 3 tumores) que se van a inyectar. Típicamente, la inyección se llevará a cabo bajo la guía de imagen (por ejemplo, bajo CT). Pueden inyectarse de uno a tres tumores. Cada tumor debería recibir una cantidad igual de solución. Si se inyectan 2-3 tumores, el volumen de la solución de virus inyectado en el tumor será proporcional al volumen del tumor en relación con los otros (es decir, si un tumor es dos veces el volumen del otro, el tumor mayor recibirá 2/3 del volumen total de la solución de virus).

40 Aunque el tumor(es) diana seleccionado(s) en el ciclo 1 puede dejar de crecer, deben continuar las inyecciones en todos los ciclos. Sin embargo, si es necesario, en el ciclo 3 los investigadores pueden seleccionar adicionalmente tumores no diana que no han sido inyectados en el ciclo 1 y 2, hasta tres, incluyendo el(los) tumor(es) diana en el ciclo 1. La suma de los diámetros máximos de los tumores inyectados debe ser ≤ 10 cm. La dosis de solución de virus inyectada intratumoralmente será proporcional al volumen del tumor.

45 Preparación de JX-594. Se proporciona JX-594 en un vial de vidrio congelado (-60° C o por debajo), de único uso que contiene 150 μ l de formulación de virus (para entregar 0,1 ml). El volumen de 100 μ l contiene $1,9 \times 10^8$ pfu de virus. El vial debe ser descongelado verticalmente a temperatura ambiente. JX-594 no debe ser colocado en un baño de agua caliente. Vuelva a suspender con una pipeta. Mientras que está siendo diluido y llevado a un paciente, se puede almacenar el virus a 4° C. JX-594 descongelado no debería inyectarse después de 4 horas.

50 Un farmacéutico senior y otros farmacéuticos designados deben almacenar JX-594 verticalmente en cabinas de seguridad biológicas (Clase 2) con precauciones (uso de guantes, gafas de seguridad, una bata etc.). Procedimiento

inicial para todas las diluciones: cuando se usa una jeringa, retirar el volumen requerido de solución salina estéril y transferirlo a un tubo Falcon estandarizado. El volumen final del virus más el diluyente para la inyección debe ser equivalente a aproximadamente 25% del volumen del tumor diana.

5 Cohorte 1: Un (1) vial de JX-594 se usará para los pacientes en la cohorte 1. El volumen prescrito de JX-594 transferido a la solución salina estéril se tomará con una micropipeta/jeringa.

Cohorte 2: Dos (2) viales de JX-594 se usarán para los pacientes en la cohorte 2. Después de mezclar, el contenido en el primer vial se transferirá al segundo vial. El volumen prescrito de JX-594 transferido a la solución salina estéril se tomará con una micropipeta/jeringa.

10 Cohortes 3 y 4: Cuatro (4) u once (11) viales de JX-594 se usarán para administración a los pacientes en la cohorte 3 o 4, respectivamente. Todos los contenidos se transferirán a un tubo de polipropileno de mezcla pequeño. El volumen prescrito de JX-594 transferido a la solución salina estéril se tomará con una micropipeta/jeringa.

15 Procedimiento final para todas las diluciones: Envuelva el tubo con papel de aluminio o colóquelo en una bolsa a prueba de luz a temperatura ambiente. Agite en un vórtex vigorosamente durante 10 segundos antes de la administración. No se debe inyectar después de 30 minutos expuesto a temperatura ambiente o después de 4 horas descongelado.

20 Programa de tratamiento. Típicamente, los pacientes inscritos reciben 1 tratamiento o dosis de JX-594 por ciclo. Un paciente cuyo tumor diana inyectado con JX-594 no ha progresado al final del ciclo recibirá el tratamiento en el ciclo posterior (hasta un total de 4 ciclos). Un paciente cuyo tumor diana ha progresado no tendrá más visitas. Un ciclo se define como 3 semanas. Una dosis puede ser dividida en partes iguales entre de 1-3 lesiones. La suma de los diámetros máximos de las lesiones inyectadas debe ser ≤ 10 cm.

Escalada de la dosis. En la fase de escalada de la dosis del estudio clínico, serán inscritos de 2-6 pacientes por cada cohorte. Si ninguno de los 3 primeros pacientes experimenta una DLT, el estudio proseguirá a la siguiente cohorte. Si una DLT ocurre en uno de los 3 primeros pacientes en una cohorte, el estudio proseguirá hasta que un total de 6 pacientes se hayan inscrito en la cohorte o 2 pacientes incluyendo el primero experimenten una DLT.

25 Si menos de 2 pacientes de 6 en la cohorte 1 experimenta una DLT hasta 2 semanas después de la primera inyección, el estudio avanzará a la siguiente cohorte. Si 2 pacientes experimentan una DLT, la dosis inmediatamente anterior se define como la MTD.

30 El segundo paciente no se inscribirá hasta 1 semana después de la administración de la primera inyección al primer paciente en el ciclo 1; esta regla se aplica a la entrada del siguiente paciente. Si una DLT ocurre en una cohorte, todos los pacientes reclutados posteriormente empezarán el tratamiento 2 semanas después de completar la primera inyección del ciclo 1 a todos los pacientes previamente reclutados. Los pacientes entrarán la cohorte del siguiente nivel de dosis al menos 2 semanas después de que el último paciente en la cohorte anterior complete la primera inyección del ciclo 1.

Si más de 2 pacientes en la cohorte 1 experimentan una DLT, el estudio clínico se suspenderá.

35 G. Seguridad

Después del tratamiento, se pueden producir efectos secundarios sistémicos: fiebre, escalofríos, mialgia, fatiga/astenia, náusea, y vómitos. Pueden ocurrir efectos secundarios en el sitio del tumor inyectado tales como dolor, necrosis, ulceración e inflamación. A la luz de la experiencia en el estudio preclínico y el estudio clínico GM-CSF, puede ocurrir un aumento temporal de los linfocitos, monocitos, o glóbulos blancos acompañado de una mayor neutrofilia. Lo siguiente puede ocurrir en el lugar de inyección del tumor: dolor, necrosis, ulceración e inflamación.

Aunque poco probable y no descrito en el ensayo de fase I anterior con JX-594, una erupción asociada con la diseminación de vaccinia o encefalitis es teóricamente posible; estas complicaciones se han descrito en aproximadamente 1 en 10.000 y 1 en 1.000.000 de recipientes de vaccinia, respectivamente.

1. Toxicidad limitante de la dosis (DLT)

45 DLT se define como cualquier toxicidad de Grado 3 o más atribuida a JX-594, excluyendo los síntomas de tipo gripe por ejemplo, fatiga, náusea o mialgia), que duren más de 5 días o cualquier toxicidad de Grado 4 de cualquier duración atribuida a JX-594.

50 Seguridad de la seguridad de los pacientes de los riesgos de los procedimientos. La biopsia puede causar complicaciones tales como sangrado y/o choque intraperitoneal debido a la ruptura del tumor. Aunque la incidencia de complicaciones reportada es $< 0,1\%$ y puede curarse con embolización transcatéter, la seguridad del paciente debe ser la primera preocupación. Por lo tanto, si el médico que le trata juzga que es probable que una biopsia cause daño a un paciente, la biopsia no puede llevarse a cabo. Además, si es necesario para la seguridad de un paciente, a la discreción del PI, los pacientes pueden ser hospitalizados y observados durante un máximo de 5 días antes y después de someterse a una biopsia y/o inyección intratumoral de JX-594.

H. Eficacia

5 El objetivo primario de este estudio, que es un estudio clínico de fase I, es investigar la seguridad, no un beneficio clínico. Sin embargo, se espera que este estudio cause la contracción del(los) tumor(es) inyectado(s) y/o no inyectados debido a un efecto vírico directo (es decir, efecto de oncolisis) y/o destrucción del tumor mediada por el sistema inmune inducida por el tratamiento.

El criterio de evaluación de la eficacia es el cambio en las lesiones diana. Si hay cambio en las lesiones no diana, serán evaluadas en base a la respuesta de las lesiones diana con referencia a la tabla a continuación.

10 Evaluación de las lesiones diana. Respuesta completa (CR): desaparición de todas las lesiones diana. Respuesta parcial (PR): por lo menos una disminución del 30% en la suma de LD de lesiones diana tomando como referencia la suma de referencia LD. Enfermedad progresiva (PD): al menos un 20 % de aumento en la suma de LD de lesiones diana tomando como referencia la suma LD menor registrada desde el inicio del tratamiento. Enfermedad estable (SD): ninguna contracción suficiente para calificar como PR ni aumento suficiente para calificar de PD tomando como referencia la suma más pequeña de LD desde que comenzó el tratamiento.

15 Los criterios de evaluación de la respuesta general se presentan en la tabla siguiente. La mejor respuesta global significa la mejor respuesta registrada desde el punto de partida del tratamiento hasta la progresión/recurrencia de la enfermedad.

Tabla 2 Evaluación de la mejor respuesta global

Lesiones diana	Lesiones no diana	Nuevas lesiones	Respuesta global
CR	CR	No	CR
CR	No-CR/No-PD	No	PR
PR	No-PD	No	PR
SD	No-PD	No	SD
PD	Cualquiera	Si o No	PD
Cualquiera	PD	Si o No	PD
Cualquiera	Cualquiera	Si	PD
CR=Respuesta completa; PR=Respuesta parcial; SD=Enfermedad estable; PD=Progresión			

20 Nota: Los pacientes con un deterioro global del estado de salud que requieran la interrupción del tratamiento sin evidencia objetiva de progresión de la enfermedad en ese momento deberían de ser calificados como que tienen "deterioro sintomático". Deberían hacerse todos los esfuerzos para detectar la progresión objetiva de la enfermedad, aún después de discontinuar el tratamiento.

25 En algunas circunstancias, puede ser difícil distinguir la enfermedad residual del tejido normal. Cuando la evaluación de la respuesta completa depende de esta determinación, se recomienda que la lesión residual sea investigada (aspiración con aguja fina/biopsia) antes de confirmar el estado de respuesta completa.

Directrices para la evaluación de las lesiones mesurables. Todas las medidas deben de ser tomadas en el último día del ciclo 2 (día 22) y el último día del ciclo 4 (día 22) por CT o MRI y registradas en notación métrica mediante el uso de una regla o calibrador. Todas las evaluaciones basales deben ser realizadas tan cerca como sea posible del comienzo del tratamiento y nunca más de 4 semanas antes del comienzo del tratamiento.

30 Nota: las lesiones que han sido irradiadas antes no son aceptables como lesiones mesurables. Si estas lesiones se consideran aceptables como lesiones mesurables a discreción del investigador, la condición para la consideración de estas lesiones debe de ser descrita en el protocolo. También hay que tener en cuenta que las lesiones tumorales que se encuentran en una zona previamente irradiada podrían no considerarse mesurables. Si el investigador considera que son apropiadas como lesiones mesurables, las condiciones en las cuales tales lesiones deberían considerarse deben ser definidas en el protocolo.

35

El mismo modo de evaluación y la misma técnica se deben utilizar para caracterizar cada lesión identificada y reportada al inicio y durante el seguimiento. La evaluación basada en imágenes es preferida a la evaluación por examen clínico cuando se han realizado dos métodos para evaluar el efecto antitumoral de un tratamiento.

5 CT convencional debería llevarse a cabo con cortes contiguos de un grosor de 5 mm o menos. CT espiral debe realizarse utilizando un algoritmo de reconstrucción de 5 mm contiguos. Si es necesario, PET-CT se puede llevar a cabo en la visita de cribado y en este caso PET-CT debería usarse en la evaluación del día 22 del ciclo 2. Si es necesario, PET-CT puede ser repetido en el día 22 del ciclo 4.

10 Confirmación de la medida/Duración de la respuesta. Confirmación: para ser asignados un estado PR o CR, los cambios en las mediciones tumorales deben de ser confirmados por evaluaciones de repetición que se deben realizar a las 8 semanas después de que los criterios para la respuesta se han satisfecho primeramente. En el caso de SD, las mediciones de seguimiento de un mínimo de 16 semanas de intervalo tienen que haber satisfecho los criterios de SD al menos una vez después de la entrada en el estudio.

15 Duración de la respuesta: la duración de la respuesta global se define como el tiempo desde la fecha de la primera RC o RP documentada (lo que se documente primero) a la fecha más temprana de la recurrencia o enfermedad progresiva objetivamente confirmada (tomando como referencia para la enfermedad progresiva las menores medidas registradas desde el inicio del tratamiento). La duración de la respuesta completa en general se define como el tiempo desde la fecha de la primera CR documentada a la fecha más temprana de la recurrencia confirmada objetivamente.

20 Duración de la enfermedad estable: SD se define como el tiempo desde la fecha de la primera SD documentada después del tratamiento a la primera fecha de la EP confirmada objetivamente (tomando como referencia las medidas más pequeñas registradas desde que el tratamiento comenzó).

Nueva valoración de la respuesta del tumor. Si es necesario, los radiólogos independientes de este estudio evaluarán la respuesta del tumor. Sin embargo, las evaluaciones de resultados se utilizan sólo para el propósito del estudio y no afectará la conclusión clínica.

25 I. MÉTODOS ESTADÍSTICOS Y ANÁLISIS DE DATOS

1. Tamaño de la muestra

30 El tamaño estimado de la muestra será de 18 pacientes y el intervalo posible será de 2-30 pacientes. Los objetivos primarios del estudio son determinar la seguridad y la MTD o MFD de JX-594 por inyección intratumoral. Este estudio representa el segundo ensayo clínico de JX-594 en seres humanos. Debido a que no hay estudios clínicos previos en seres humanos que se basen en cálculos estadísticos significativos, se selecciona el tamaño de la muestra para este estudio en base a consideraciones de seguridad clínica. Los resultados del estudio pueden ser utilizados para proporcionar estimaciones de la variabilidad para determinar los requisitos de tamaño de la muestra para futuros estudios clínicos.

35 Los pacientes en cada cohorte tienen la oportunidad de dejar el estudio antes de llegar a la MTD real, así como la oportunidad de avanzar más allá de la MTD real. Las siguientes tablas muestran la probabilidad estadística de cada resultado basado en la verdadera incidencia de DLT. La siguiente tabla presenta las probabilidades (varias incidencias reales dadas de cada población de pacientes) de cada resultado en una cohorte de los 3 primeros pacientes.

Tabla 3

# DLTs en una cohorte de 3 pacientes	Acción	Incidencia real de DLT en la población de pacientes				
		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
		Probabilidad de cada resultado				
0	Avance a la próxima cohorte	0,729	0,512	0,343	0,216	0,125
1	Inscriba a 3 pacientes adicionales	0,243	0,384	0,441	0,432	0,375
≥ 2	Pare el tratamiento, defina MTD	0,028	0,104	0,216	0,352	0,500

La siguiente tabla muestra las probabilidades de cada resultado en una cohorte de 6 pacientes. Después de observar 1 DLT en los 3 primeros pacientes en la cohorte y la adición de 3 pacientes más a la cohorte, representa varias incidencias reales en la población de pacientes dada.

Tabla 4

# DLTs en una cohorte de 6 pacientes	Acción	Incidencia real de DLT en la población de pacientes				
		0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
		Probabilidad de cada resultado				
0	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1	Inscriba 3 pacientes adicionales	0,177	0,197	0,151	0,093	0,047
≥ 2*	Pare el tratamiento, defina MTD	0,066	0,187	0,290	0,339	0,328
* 1 paciente de los primeros 3 y 1 paciente de los segundos 3						

5

2. Métodos estadísticos/análisis de los datos

La población que se va a resumir será la población que se intenta tratar (ITT), definida como que todos los pacientes habrán recibido al menos un tratamiento con JX-594. Además, una población de pacientes evaluables también se evaluará como un subconjunto de la población ITT. Pacientes evaluables son aquellos que han recibido al menos un ciclo de terapia con medición del tumor apropiada que se realizará en un periodo de tiempo adecuado del tratamiento anterior y posterior.

10

En este estudio se procederá con cuatro cohortes de tratamiento para tener de dos a seis pacientes según la cohorte. Los datos de cada cohorte se resumirán con estadísticas apropiadas descriptivas, tabulaciones de frecuencia, gráficos y listas de datos. Los datos de las cohortes de tratamiento se combinarán para la exposición de los datos seleccionados. Las exposiciones específicas de los datos que se generarán se describen a continuación.

15

La edad, peso y altura de los sujetos se resumirán con estadística descriptiva (promedio, mediana, desviación estándar, mínimo y máximo), mientras que el género y la raza se resumirán con tabulaciones de frecuencia. Los datos para las cohortes de tratamiento se resumirán por separado para cada paciente, así como también se combinarán. Para ello, se producirán los listados de pacientes individuales. Serán separados los datos de la historia médica física para cada cohorte de tratamiento y se combinarán para su resumen con las tabulaciones de frecuencia. La administración del tratamiento será resumido con estadísticas descriptivas (promedio, mediana, desviación estándar, mínimo y máximo). Cualquier paciente que reciba el fármaco del estudio será incluido en el análisis de seguridad. Los datos de seguridad, incluyendo los eventos adversos, los resultados de laboratorio, la toxicidad, los signos vitales y la información de retirada del estudio se resumirán por separado en el momento de la terminación de cada cohorte de tratamiento. AEs serán codificados y tabulados usando el esquema de clasificación del sistema del cuerpo COSTART. El número y el porcentaje de sujetos que tienen AEs serán tabulados por cohorte de tratamiento y propósito del tratamiento; además, los datos serán estratificados en cuanto a la severidad de AEs y la relación especificada del investigador para JX-594.

20

25

Los resultados de laboratorio se resumirán en el momento de la terminación, con tablas de variación que muestren los números de los pacientes con cambios de pre a post tratamiento. Los resultados de laboratorio de variables seleccionadas se mostrarán gráficamente.

30

Además de las tasas globales de respuesta tumoral, se informarán las tasas de respuesta al tumor en los sitios diana y no diana. La progresión del tumor en el tiempo para los sitios diana y no diana será reportada y la supervivencia global también será reportada. Como este es un estudio no controlado no aleatorio con un pequeño número de pacientes en cada grupo, no se asume la hipótesis a probar por los datos a partir de este estudio solamente. Con el fin de evaluar las diferencias entre cohortes de tratamiento, se pueden usar para comparar cada grupo tanto métodos paramétricos como no paramétricos según sea apropiado.

35

EJEMPLO 2

Tratamiento del melanoma maligno no resecable

A. Dosis y tiempos de administración

1. Justificación de la dosis y la pauta de tratamiento

5 Se dará una dosis total por tratamiento de 1×10^8 pfu. Esta dosis es menor que la dosis semanal superior de $1,6 \times 10^8$ pfu, que fue administrada en forma segura en el primer estudio de fase I de JX-594 para el tratamiento del melanoma cutáneo incurable por cirugía (Mastrangelo *et al.*, 1998). Además, 1×10^8 pfu es diez veces menor que la dosis más alta que se ha administrado de forma segura hasta la fecha (n=2 pacientes) en el ensayo intratumoral (IT) de fase I en marcha con JX-594 y tres veces menor que el nivel de dosis mayor aclarada hasta ahora. En este ensayo, los tratamientos por inyección en 1-3 tumores hepáticos se administran cada tres semanas. Los resultados
10 preliminares de este estudio revelan que los síntomas similares a la gripe y los parámetros hematológicos se recuperan a niveles basales típicamente dentro de los 4 días (es decir, el día 5) después del tratamiento con JX-594.

Se eligió un régimen de dosificación semanal ya que los pacientes en todas las cohortes se recuperaron el día 5 de las toxicidades de leves a moderadas relacionadas con el tratamiento en el estudio en marcha descrito anteriormente de inyección IT en el hígado. Además, los datos de Mastrangelo *et al.* 1998 indican que dos
15 inyecciones semanales de hasta 8×10^7 pfu por tratamiento son seguras y eficaces.

Como se evidencia del estudio del melanoma fase I/II inicial (Mastrangelo *et al.*, 1998), se encontró que los pacientes habían desarrollado una respuesta inmune humoral significativa al virus vaccinia dentro de los 14-21 días después de la revacunación. Se encontró que los títulos de anticuerpos llegaron a una meseta a las 4-6 semanas después de la exposición a pesar de los tratamientos continuados. Por lo tanto, este protocolo investiga la
20 administración semanal IT durante seis semanas con el fin de conferir la máxima entrega posible y los efectos antitumorales de JX-594 antes del desarrollo de anticuerpos de título alto y de células T.

2. Justificación del estudio

El melanoma puede ser el objetivo óptimo para inmunoterapia de JX-594 debido a la relativamente alta tasa de enfermedad accesible para la inyección, la respuesta positiva del melanoma vista con inmunoterapia de IL-2, y la falta de una terapia eficaz, tolerable para el paciente con melanoma metastásico. Además, se contempla que la replicación de JX-594 se dirige al camino del EGFR, que está altamente expresado en los melanocitos.
25

Los resultados de un estudio de fase I/II inicial sugieren que la inyección intratumoral de JX-594 es segura y eficaz en el tratamiento de la enfermedad tanto inyectada como distante en pacientes con melanoma metastásico quirúrgicamente incurable. Se demostró la respuesta de ambos tumores inyectados (en 5 de 7 pacientes) y la respuesta de al menos un tumor no inyectado (en 4 de 7 pacientes), incluyendo dos pacientes que obtuvieron una respuesta parcial (6 + meses) y una respuesta completa (4 + meses) al tratamiento de JX-594. Es de resaltar que la eficacia y la expresión génica se produjo a pesar de la vacunación antes del tratamiento (y por tanto, la inmunidad preexistente contra vaccinia) a todos los pacientes.
30

Este diseño de estudio fue seleccionado con el fin de ampliar el estudio inicial de fase I/II descrito anteriormente y evaluar la respuesta tumoral inyectada en un máximo de 15 pacientes evaluables con melanoma metastásico no resecable de estado 3 o estado 4. Además, será evaluada la seguridad de JX-594, la farmacocinética, la farmacodinámica, la respuesta inmune a JX-594, y la expresión del transgén GM-CSF en la sangre y tejidos tumorales. Los investigadores también evaluarán si JX-594 es capaz de propagarse por vía intravenosa e infectar la enfermedad no inyectada regional y distante, lo que sugiere que pueda ser capaz de conferir efectos antitumorales similares a los experimentados en el sitio de la inyección intratumoral directa. Este hallazgo, además de la adición a la experiencia clínica general de JX-594 administrado IT, soportaría fuertemente el tratamiento de JX-594 por administración IV para el tratamiento de la enfermedad metastásica avanzada, particularmente en el tratamiento del melanoma maligno avanzado.
35
40

B. Descripción del producto de investigación

JX-594 es un virus específico para el cáncer de vaccinia de replicación selectiva derivado de la cepa de la vacuna de Wyeth comúnmente utilizada (Dryvax®, Wyeth laboratories). El virus se deriva de una cepa de vaccinia con un gen de timidina quinasa (TK) inactivado. JX-594 contiene el gen y el promotor para GM-CSF, una potente citoquina implicada en la respuesta inmune. JX-594 se modifica adicionalmente con la inserción del gen *lacZ* para permitir el seguimiento del virus en los tejidos.
50

C. Objetivos

Los objetivos incluyen la evaluación de (a) la tasa de respuesta objetiva de(los) tumor(es) inyectados, (b) la seguridad y toxicidad de JX-594 después de la administración por inyección IT, (c) la tasa de respuesta objetiva de

la carga entera de morbilidad después de la administración de JX-594 por inyección IT (criterios RECIST), (d) el tiempo de supervivencia sin progresión (PFS), y (e) la tasa de respuesta del(los) tumor(es) no inyectados.

D. Diseño del estudio

1. Estudio en general

5 Este es un estudio de fase I/II, de etiqueta abierta en pacientes con un melanoma maligno irreseccable de estado 3 o estado 4. Los pacientes recibirán un total de seis (6) inyecciones intratumorales de JX-594 durante un periodo de 6 semanas. Se administrará una dosis total de 1×10^8 unidades formadoras de placa (pfu) en cada tratamiento y se dividirá por igual entre hasta cinco (5) tumores. Si los pacientes experimentan una respuesta parcial tumoral al tratamiento de inyección IT de JX-594 después de completar 6 tratamientos, pueden administrarse semanalmente 3
10 tratamientos adicionales.

2. Criterios de valoración del estudio

Los criterios de valoración primarios de los estudios clínicos son típicamente la tasa de respuesta del(los) tumor(es) inyectado(s), incluyendo la tasa de respuesta completa, tasa de respuesta parcial, y duración de la respuesta. Los
15 criterios de valoración secundarios para dichos estudios pueden incluir la seguridad, como se determina por la incidencia de efectos adversos relacionados con el tratamiento, efectos adversos serio (SAEs), y cambios clínicamente significativos de la línea de base en parámetros rutinarios de laboratorio incluyendo la tasa de respuesta completa, tasa de respuesta parcial, y duración de la respuesta, tiempo de supervivencia sin progresión (PFS), tasa de respuesta del(los) tumor(es) no inyectado(s) incluyendo la tasa de respuesta completa, tasa de respuesta parcial, y duración de la respuesta. Otros criterios de valoración pueden incluir la supervivencia global,
20 beneficio clínico (incluyendo el aumento de peso y la mejora en el estado funcional), evaluación de JX-594 (por ejemplo, el genoma vírico (Q-PCR) en plasma y/o sangre entera; virus infeccioso vírico en plasma y/o sangre entera, opcional (ensayo de placa)), evaluación inmunológica (anticuerpos neutralizantes de JX-594 en suero; mediciones de GM-CSF en plasma (ensayo de ELISA)), evaluación histológica (expresión génica vírica en el tejido; expresión de GM-CSF; expresión de lac-Z; infiltrado inflamatorio celular; necrosis; apoptosis; fábricas de replicación del virus dentro del citoplasma; estado del camino de EGFR; y estado de la timidina quinasa tumoral).
25

3. Dosis

Típicamente se diluirá el virus en solución salina estéril normal como se describe en el presente documento. Se administrará una dosis total de 1×10^8 unidades formadoras de placa (pfu) en cada tratamiento y se dividirá por igual entre hasta cinco (5) tumores.

30 4. Duración general del estudio y seguimiento

Un periodo de estudio consistirá típicamente en visitas de paciente para el cribado, tratamiento del estudio, y evaluaciones de seguimiento post-tratamiento.

Cribado. La elegibilidad de un paciente para un estudio se determinará dentro de los 14 días antes del primer tratamiento con JX-594.

35 Tratamiento. Los pacientes elegibles serán tratados con una dosis de 1×10^8 pfu administrada por inyección semanalmente (días 1, 8, 15, 22, 29, y 36) para un total de 6 tratamientos dados durante 6 semanas. Los pacientes deben continuar cumpliendo todos los criterios de elegibilidad antes de volver al tratamiento. Si no se realiza un tratamiento por cualquier motivo, el tratamiento no realizado se realizará la siguiente semana siempre que se cumplan los criterios de elegibilidad, y el calendario de visitas se ajustará y los pacientes serán seguidos en consecuencia de tal manera que el paciente reciba un total de 6 tratamientos. Las Inyecciones pueden ser
40 retrasadas por un máximo acumulado de 4 semanas. Los pacientes que han retrasado el tratamiento completarán todos los 6 tratamientos y serán evaluados para la respuesta una semana después de su 6º tratamiento. La evaluación de la respuesta se conducirá inicialmente una semana después de la administración de la última dosis (o sea, en el día 43). Si los pacientes experimentan una respuesta parcial tumoral al tratamiento de inyección IT de JX-594 después de completar 6 tratamientos, pueden administrarse semanalmente 3 tratamientos adicionales.
45

Seguimiento post-tratamiento. Todos los pacientes volverán para una visita de seguimiento 28 días después del último tratamientos con JX-594 (o sea, en el día 64). Durante 6 meses después de la finalización o hasta que el paciente tenga una enfermedad progresiva en el lugar de la inyección, empieza una nueva terapia de cáncer, o muere. El paciente volverá a la clínica cada tres semanas después de la última inyección para la medición del tumor por examen físico (PE) (si es posible) y la evaluación de la respuesta. Cada 6 semanas, los pacientes tendrán también una evaluación de la respuesta por PE y/o CT/MRI. Después de 6 meses de seguimiento, el paciente volverá a la clínica cada tres meses para la medición del tumor y la evaluación de la respuesta (incluyendo CT/MRI) hasta que el paciente tenga una enfermedad progresiva en el lugar de la inyección, muera, o empiece una nueva
50 terapia de cáncer.

Seguimiento a largo plazo de los productos de terapia génica. Después de la progresión de la enfermedad en el lugar de la inyección o iniciación de una nueva terapia de cáncer, el paciente puede continuar siendo monitorizado en cuanto a la supervivencia y posibles efectos a largo plazo de la terapia génica según las directrices actuales de la FDA. Si los pacientes ya no regresan a la clínica para el tratamiento o seguimiento de post-tratamiento, estos datos se pueden recoger por correo o por teléfono.

E. Población del estudio

1. Criterios de inclusión

Generalmente los pacientes cumplirán los siguientes criterios: melanoma maligno confirmado histológicamente de estado 3 o estado 4; al menos una masa tumoral medible por CT/MRI y/o examen físico que puede ser inyectada con la ayuda de la visualización directa o con ultrasonido; supervivencia anticipada de al menos 16 semanas; el cáncer no es resecable quirúrgicamente para la curación; puntuación de KPS \geq 70; edad \geq 18 años; hombres y mujeres con capacidad reproductiva deben estar dispuestos a seguir métodos anticonceptivos durante el tratamiento y durante 3 meses después del último tratamiento con JX-594; entender y voluntariamente firmar un formulario de consentimiento informado aprobado por la Junta de Revisión Institucional (IRB)/Comité Independiente de Ética (IEC); capaz de cumplir con los procedimientos del estudio y exámenes de seguimiento; función hepática adecuada (bilirrubina total \leq 2,0 \times ULN; AST, ALT \leq 2,0 \times ULN); función de la médula ósea adecuada (WBC $>$ 3.500 células/mm³ y $<$ 50.000 células/mm³; ANC $>$ 1.500 células/mm³, hemoglobina $>$ 10 g/dl; recuento de plaquetas $>$ 125.000 plts/mm³); estado de coagulación aceptable (INR $<$ (ULN + 10%)); y función renal aceptable (creatinina sérica $<$ 2,0 mg/dl).

2. Criterios de exclusión

Generalmente, los pacientes no deberían de cumplir ninguno de los criterios de exclusión siguientes: tumor(es) diana adherente(s) a y/o invadiendo una estructura vascular importante (por ejemplo, la arteria carótida); estar embarazada o amamantando un bebé; infección conocida con VIH; corticosteroides sistémicos u otro uso de medicación inmunosupresora dentro de las 4 semanas del primer tratamiento con JX-594; infección activa clínicamente significativa o condición médica no controlada (por ejemplo, pulmonar, neurológica, cardiovascular, gastrointestinal, genitourinaria) considerada de alto riesgo para el tratamiento con un fármaco nuevo de investigación; inmunodeficiencia significativa debido a una enfermedad subyacente y/o medicamentos (por ejemplo, corticosteroides sistémicos); historia de eczema que en alguna etapa ha requerido terapia sistémica; ascitis clínicamente significativa y/o de acumulación rápida, derrames peri-cárdicos y/o pleurales (por ejemplo, que requieran drenaje para el control de los síntomas); enfermedad cardíaca seria o inestable que incluye, pero no se limita a, cualquiera de las siguientes dentro de los 6 meses antes del cribado: infarto de miocardio, angina inestable, insuficiencia cardíaca congestiva, miocarditis, arritmias diagnosticadas y que requiere medicación, o cualquier cambio clínicamente significativo en estado cardíaco; tratamiento del(los) tumor(es) diana con radioterapia, quimioterapia, cirugía, o un fármaco de investigación dentro de las 4 semanas antes del cribado (6 semanas en el caso de mitomicina C o nitrosoureas); haber experimentado una reacción o efecto secundario grave como resultado de una vacunación contra la viruela anterior; incapacidad o falta de voluntad para dar un consentimiento informado o cumplir con los procedimientos requeridos en este protocolo; pacientes con contactos en el hogar que estén embarazadas o amamantando un bebé, niños $<$ 5 años de edad, que tengan una historia de eczema que en alguna etapa ha requerido terapia sistémica, o que tienen una inmunodeficiencia significativa debido a una enfermedad subyacente (por ejemplo, VIH) y/o medicación (por ejemplo, corticosteroides sistémicos) serán excluidos a menos que se puedan hacer arreglos de vida alternativos durante el periodo de administración activa del paciente y durante tres semanas después de la última dosis de medicación del estudio.

3. Otras consideraciones de los criterios de elegibilidad

Desviaciones de los criterios de elegibilidad. Los pacientes con desviaciones menores de los criterios de inclusión/exclusión anteriores (por ejemplo, valores de laboratorio fuera del intervalo especificado previamente) pueden ser permitidos en el estudio si no se espera que estas desviaciones afecten la seguridad del paciente, la conducta del estudio, o la interpretación de los resultados del estudio. Debe solicitarse aprobación por escrito del patrocinador del estudio o el representante del patrocinador para la inscripción de los pacientes con desviaciones menores.

4. Procedimientos de inscripción de pacientes

Una vez que el investigador lleva a cabo las evaluaciones de cribado y confirma la elegibilidad del paciente, el patrocinador normalmente revisa la información de cribado y la elegibilidad y proporciona verificación por escrito al investigador para la inscripción de cada paciente. Al confirmar la inscripción, el paciente será asignado un identificador usando un esquema de numeración de pacientes definido con anterioridad. El identificador del paciente será una combinación del número del estudio, número del centro, número del paciente e iniciales del paciente.

F. Producto de investigación

JX-594 será suministrado por Jennerex Biotherapeutics. Normalmente, JX-594 se formula como un líquido y se almacena congelado en viales de vidrio diseñados para uso único. Cada vial contiene 0,15 ml. La solución de virus es una solución incolora a ligeramente amarilla que es de transparente a ligeramente opalescente. La concentración de JX-594 es $1,9 \times 10^9$ pfu/ml.

JX-594 es considerado una sustancia infecciosa de nivel de bioseguridad 2 (BSL-2). La designación BSL-2 y directrices asociadas se aplican a agentes de peligro potencial moderado para el personal y el medio ambiente. Ejemplos de otros agentes BSL-2 incluyen el virus del sarampión, salmonelas y el virus de la hepatitis B. Las políticas de control de infección institucional deberían ser consultadas.

JX-594 se almacena normalmente en un congelador monitorizado, seguro, de acceso restringido. JX-594 se almacenará en viales claramente marcados en el embalaje secundario a -60°C o menos con el etiquetado de bio-peligro adecuado (indicando la naturaleza del agente) en la puerta del congelador y la puerta de la habitación. Los congeladores deben tener un límite de alerta fijado a -65°C para dar tiempo a responder antes de que la temperatura del congelador se eleve a -60°C . Un tiempo extendido a $> -60^{\circ}\text{C}$ requerirá colocar el material afectado en cuarentena hasta que el título pueda ser reconfirmado.

Se proporcionarán hojas de trabajo diseñadas para asegurar la correcta manipulación y preparación de JX-594 al centro del estudio con la información suplementaria del estudio. Deben ser consultadas y seguidas las políticas de control de infección institucional para la preparación, transporte, y eliminación de vectores víricos [nivel de bioseguridad 2 (BSL-2)]. Guantes, batas y escudos oculares deben ser usados en todo momento. Todo el trabajo con JX-594 será llevado a cabo en una cabina de seguridad biológica vertical (clase 2) según las directrices de manipulación de BSL-2 en una farmacia/laboratorio bajo la dirección de un farmacéutico/científico acreditado. La campana misma será limpiada con etanol al 70% antes y después de cada uso.

Descongelación. La descongelación debería ocurrir a temperatura ambiente con el vial de pie. JX-594 no debe ser colocado en un baño de agua caliente. Una vez descongelado, se coloca el vial en un tubo cónico de centrifuga de 15 ml de polipropileno (por ejemplo, de Corning o Falcon), se tapa el tubo, y se centrifuga a $100 \times g$ durante 2 minutos. Se retira el vial de JX-594 del tubo de polipropileno con forceps o equivalente. La formulación del virus debe ser almacenada sobre hielo o refrigerada ($2 - 8^{\circ}\text{C}$) hasta que se diluya y se administre al paciente. La infusión no debería de empezar más de 4 horas después de que la formulación del virus se haya descongelado.

Preparación. Después de la centrifugación del vial, se suspende de nuevo suavemente con una micropipeta (se sugiere una micropipeta de $200 \mu\text{l}$ colocada a $100 \mu\text{l}$). Se debe tener cuidado de no soplar burbujas en la formulación. Normalmente se prepara aproximadamente 2,75 ml de solución de virus (JX-594 + solución salina), que se distribuirá en 5 jeringas de 0,5 ml/cada una. Usando una micropipeta, se transfieren 2,64 ml de solución salina normal estéril a un tubo de polipropileno de tamaño adecuado (por ejemplo, un tubo Falcon de 5 ml). A partir de un (1) vial de JX-594, sacar $116 \mu\text{l}$ de JX-594 y transferirlo al tubo de Falcon que contiene la solución salina. Reemplazar la tapa del tubo Falcon, proteger el tubo de la luz (con papel de aluminio o en receptáculo a prueba de la luz), e inmediatamente colocar el tubo cubierto a $2 - 8^{\circ}\text{C}$ (se refrigera o se pone en hielo mojado).

Dentro de los 30 minutos antes de la administración, agitar con vórtex vigorosamente durante 10 segundos. Después de la agitación, meter 0,5 ml de la solución de virus (JX-594 + solución salina) dentro de cada 5 jeringas. Tapar las jeringas y entregar al investigador para la inyección. No empezar la inyección más de 4 horas después de que la formulación del virus se haya descongelado. La formulación del virus debe ser almacenada sobre hielo o refrigerada ($2 - 8^{\circ}\text{C}$) hasta que se diluya y se administre al paciente.

1. Administración de JX-594

JX-594 se administrará por inyección intratumoral cada semana para un total de seis (6) inyecciones durante seis semanas. La administración se hará en los días 1, 8, 15, 22, 29, y 36. Los pacientes recibirán una dosis de 1×10^8 pfu por tratamiento dividido en ≤ 5 lesiones. Solo las lesiones accesibles al tratamiento por medio de una inyección percutánea (por ejemplo, nódulos cutáneos palpables o metástasis en los ganglios linfáticos) o inyección guiada por ultrasonido (US) serán elegibles para tratamiento.

El investigador determinará en cada tratamiento cuáles lesiones (tumores) se van a inyectar. Los tumores se inyectarán en base a su tamaño; las lesiones más grandes se deben inyectar en cada tratamiento. A discreción del investigador, pueden usarse una o más jeringas para tratar un tumor.

Después de la preparación aséptica de la piel en el lugar de entrada de la(s) aguja(s), se administrará un anestésico local. Se usará una aguja de calibre 18 - 22 para la inyección. La aguja de la inyección se introducirá en el tumor como se describe a continuación. Las inyecciones se harán por el investigador principal o sub-investigador.

La inyección en cada tumor se hará inyectando el volumen total de la jeringa (0,5 ml) en cuatro tramos de aguja igualmente espaciados por tumor irradiando desde el lugar de la punción central. Como un ejemplo, la inyección del virus se puede realizar como sigue: (1) insertar la aguja(calibre 18 - 22) en el centro del tumor, (2) extender la aguja

hacia el borde del tumor (a dentro de 1 - 3 mm del borde del tumor), (3) inyectar aproximadamente 25% del volumen de la jeringa (aproximadamente 0,125 ml) mientras se tira de nuevo hacia el lugar de la punción central, (4) sin retirar la aguja completamente del tumor, repetir los pasos anteriores con un espaciamiento de 90° para un total de 4 tramos de aguja.

- 5 Toxicidades esperadas. Se espera la siguiente toxicidad sistémica después del tratamiento: fiebre, escalofríos, anorexia, mialgia, fatiga/astenia y/o dolor de cabeza. Se esperan disminuciones transitorias de los neutrófilos, linfocitos, plaquetas y hematocrito. Los parámetros hematológicos normalmente vuelven a los niveles basales alrededor del día 5 (duración normal 2-3 días). Para el ciclo 1 solamente, es posible un aumento de los leucocitos dentro de los primeros cuatro días después de la inyección inicial. Se informó de un recuento total de glóbulos blancos de 24.000/ μ l y 118.000/ μ l en dos pacientes de la cohorte 3 dentro de los 5-8 días después de la dosis. También se espera un aumento de los eosinófilos después de la dosis y normalmente permanecen elevados hasta el día 8. En el lugar de la inyección, las siguientes toxicidades son probables: dolor, necrosis, ulceración e inflamación. En otros lugares de replicación vírica (por ejemplo, tumores distantes), es posible el dolor, necrosis, ulceración, e inflamación.
- 10 Aunque es muy poco probable y no se observó después de ningún tratamiento o exposición a JX-594, una erupción diseminada asociada con la vaccinia o encefalitis es posible; estas complicaciones se han descrito en aproximadamente en 1 en 10.000 y 1 en 1.000.000 receptores de la vacuna contra la viruela, respectivamente. Además, se demostró un aumento estadísticamente significativo del riesgo de miocarditis (1 - 2 por 10.000 vacunaciones) en un programa reciente de vacunaciones con la cepa de vaccinia NYCBOH (Arness *et al.*, 2004).

20 G. Estadística

1. Definiciones de resultados

Lo siguiente son definiciones de los resultados en relación a los análisis estadísticos. La codificación de la toxicidad y las definiciones de enfermedad progresiva, respuesta completa, respuesta parcial, duración de la respuesta general, paciente evaluable, y relacionado con el tratamiento se describen en el protocolo en otro lugar.

- 25 Supervivencia libre de progresión. Tiempo desde el primer tratamiento con JX-594 hasta la fecha del diagnóstico de una progresión, según lo evaluado por el investigador, o la fecha de la muerte sin progresión. Los pacientes que se saben están vivos según las últimas noticias sin progresión serán censurados en el momento de su última evaluación de la progresión. Los pacientes que recibieran terapia fuera del protocolo antes de la documentación de la enfermedad progresiva también serán designados como censurados en el análisis estadístico.
- 30 Supervivencia general. Tiempo desde el primer tratamiento con JX-594 hasta la fecha de la muerte o la última fecha conocida en que estaba vivo; los pacientes que se sabe están vivos según las últimas noticias se designan como censurados en el análisis estadístico.

2. Conjuntos de análisis o poblaciones

- 35 Se analizará a todos los pacientes que reciban JX-594 en cuanto a sus características demográficas en el cribado y posteriormente en cuanto a la seguridad, eficacia, farmacocinética y farmacodinámica. La población que se resume será la población que se intenta tratar (ITT), definida como todos los pacientes que reciban al menos un tratamiento con JX-594. Además, también se evaluará una población evaluable de la población de pacientes (un subconjunto de la población ITT). A un paciente se le considerará como un paciente evaluable si el paciente recibe al menos un tratamiento de JX-594 y tiene una medición apropiada del tumor en la línea de base y en el primer tiempo apropiado después del tratamiento.

3. Métodos de análisis

- 45 Las variables continuas se resumirán usando estadísticas descriptivas (n, promedio, desviación estándar, mediana, mínimo, y máximo). Las variables categóricas se resumirán mostrando el número y porcentaje (n, %) de pacientes dentro de cada clasificación. Los análisis se realizarán sobre la base de pacientes evaluables, así como en la población que se intenta tratar. Se llevarán a cabo análisis generales; adicionalmente se correlacionarán los análisis de seguridad y eficacia con la estratificación de la enfermedad.

- 50 Seguridad: Métodos de análisis. Los pacientes que reciban cualquier medicación del estudio serán incluidos en el análisis de seguridad. Los datos de seguridad incluyendo eventos adversos, resultados de laboratorio, toxicidad, signos vitales y la información de retirada del estudio se resumirán en el tiempo. La edad de los pacientes, peso, y estatura se resumirán con las estadísticas descriptivas, mientras que el género y la raza se resumirá con las tabulaciones de frecuencia. Los datos de la historia médica se resumirán con las tabulaciones de frecuencia.

Los eventos adversos se codificarán y tabularán usando el esquema de clasificación MedDRA. La incidencia de AEs emergentes del tratamiento se tabulará; además, los datos se estratificarán en cuanto a la gravedad (grado) de los eventos adversos y relación especificada por el investigador con JX-594. El análisis de seguridad se centrará en los

eventos adversos no hematológicos de grado 3 o 4 y eventos adversos hematológicos de grado 4. Se producirá un listado de SAEs.

5 Los resultados de hematología y análisis químico sérico se resumirán usando estadísticas descriptivas para variables continuas. Además, se realizará y resumirá un análisis de nadir de parámetros seleccionados de hematología. Los resultados de laboratorio se resumirán en el tiempo en tablas de desplazamiento que presentan los números de los pacientes con los cambios después de la dosis desde la línea de base en relación al intervalo referencia. Los resultados de laboratorio para variables seleccionadas también se presentarán gráficamente.

10 Se resumirán las puntuaciones del estado funcional de KPS usando estadísticas descriptivas para variables categóricas. También puede resumirse la desviación en las puntuaciones del estado funcional de KPS en comparación con el cribado y/o línea de base. El resto de las variables de seguridad se resumirán usando estadísticas descriptivas.

Farmacocinética/Farmacodinámica: Métodos de análisis. Se evaluará en el tiempo la replicación vírica y la difusión en la sangre por medio de las concentraciones de genoma en la sangre. Se medirán las concentraciones de JX-594 y GM-CSF en la sangre en todos los pacientes y se estimarán los parámetros farmacocinéticos.

15 Los parámetros farmacodinámicos a analizar incluirán el efecto de JX-594 y GM-CSF en los recuentos de sangre periférica, MIA, y tejido de la biopsia del tumor. Se evaluará y resumirá la respuesta inmune a JX-594 después de la inyección IT, incluyendo los cambios desde la línea de base en subconjuntos de glóbulos blancos (recuento absoluto de eosinófilos, ANC, linfocitos), citoquinas, y formación de anticuerpos neutralizantes para JX-594.

20 Se evaluará y resumirá los cambios desde la línea de base en puntos finales histológicos (tejido tumoral y tejido normal de control), incluyendo la infiltración inflamatoria de células, expresión genética vírica, expresión de GM-CSF, expresión de lac-Z y necrosis tumoral. También pueden ser evaluados la apoptosis, fábricas de replicación vírica dentro del citoplasma, estado del camino EGFR, y estado de la timidina quinasa tumoral.

25 Eficacia: Métodos de análisis. La tasa de respuesta al tratamiento basado en los criterios de RECIST se evaluará para lo siguiente: respuesta general, respuesta del tumor inyectado, y respuesta del tumor no inyectado. Se resumirán las tasas de respuesta completa, respuesta parcial, enfermedad estable, y enfermedad progresiva. También se informará de la supervivencia libre de progresión, el tiempo hasta la progresión, la duración de la respuesta, y la supervivencia general. Se evaluará la correlación con el estado de la enfermedad.

30 La supervivencia libre de progresión y la duración de la respuesta se estimarán usando el método de Kaplan-Meier. Se presentarán la mediana, intervalo de confianza del 95% (de 2 lados) de la mediana, mínimo, y máximo de la duración, así como el número de pacientes censurados. Se harán las estadísticas descriptivas y las curvas para la supervivencia libre de progresión. También se hará la evaluación del beneficio clínico a los pacientes por la evaluación de la ganancia de peso y la mejoría en el estado funcional en el tiempo después del tratamiento con JX-594. Puede evaluarse el cambio en el tiempo de la proteína inhibidora de la actividad del melanoma (MIA). MIA también se puede comparar frente a la respuesta al tratamiento.

35 Revisión independiente de la evaluación de la respuesta. Puede pedirse a los centros que proporcionen copias de todos los datos de radiología de pacientes seleccionados (se prefiere formato digital o CD-ROM) a un revisor independiente de radiología (IRR). Para los pacientes con lesiones cutáneas, también se enviarían las fotos al IRR para la revisión independiente. Se presentarán los resultados tanto de los centros como del IRR. No se hará ninguna evaluación de discordancia entre las lecturas.

40 Ejemplo 3

Tratamiento de tumores hepáticos refractarios

45 En un estudio piloto de fase I de JX-594, siete pacientes con melanoma recibieron dosis crecientes inyectadas dentro de metástasis superficiales de la piel (Mastrangelo *et al.*, 1999). No se informó de la dosis máxima tolerada (MTD); se informó sobre las respuestas tumorales. Los objetivos del ensayo actual fueron definir lo siguiente: seguridad y MTD a dosis significativamente más altas (100 veces), sin pre-immunización (como se hizo en el estudio piloto), siguiendo específicamente el tratamiento dentro del órgano sólido; farmacocinética, incluyendo la diseminación en la sangre dependiente de la replicación durante tres semanas; eficacia contra un amplio espectro de tipos de cáncer. En este ensayo de fase I los inventores por lo tanto trataron a pacientes con tumores hepáticos (primarios o metastásicos) por inyección intratumoral. Por primera vez, los inventores informan sobre una MTD, más un alto nivel de replicación de JX-594 y expresión sistémica de GM-CSF, eficacia y focalización en tumores distantes a dosis bien toleradas. Los resultados presentados en este documento apoyan ensayos i.t. e i.v. con JX-594 y productos de esta clase.

A. Materiales y Métodos

1. Diseño del estudio

El objetivo primario fue determinar la seguridad y MTD de JX-594. Los objetivos secundarios incluyeron farmacocinética, replicación y difusión (orina, frotis de garganta), respuestas inmunes (anticuerpos neutralizantes, citoquinas) y respuestas tumorales. Los pacientes recibieron uno de cuatro niveles de dosis (10^8 , 3×10^8 , 10^9 , 3×10^9 unidades formadoras de placa, pfu) en un diseño de escalada de la dosis secuencial de grupo (de 2 - 6 pacientes por nivel de dosis). La MTD se definió como el nivel de dosis inmediatamente anterior a aquel donde se observaron dos o más toxicidades limitativas de la dosis (DLT). DLT se definió como cualquier toxicidad de grado 4, o toxicidad de grado 3 que duró ≥ 5 días. Una junta de control de seguridad de datos (DSMB) independiente revisó todas las decisiones de escalado de las dosis y evaluaciones importantes de la seguridad.

2. Selección de pacientes

Los pacientes firmaron el consentimiento informado, según las directrices de la Buena Práctica Clínica (GCP). Los criterios de inclusión incluyeron tumor(es) sólido(s) irreseccable(s), inyectable(s) dentro del hígado que habían progresado a pesar del tratamiento con terapias estándar, función hematopoyética normal (recuento de leucocitos $> 3.000/mm^3$, hemoglobina $> 10g/dl$, recuento de plaquetas $> 75.000/mm^3$ y función orgánica (incluyendo creatinina $\leq 1,5 mg/dl$, AST/ALT $\leq 2-5$ de ULN, Child-Pugh clase A o B), expectativa de vida ≥ 16 semanas, y estado de funcionalidad de Karnofsky (KPS) ≥ 70 . Los criterios de exclusión incluyeron un aumento del riesgo de complicaciones de la vacunación (por ejemplo, inmunosupresión, eczema), tratamiento con agentes inmunosupresores o de tratamiento del cáncer dentro de las 4 semanas anteriores, embarazo, o amamantar un bebé.

3. Fabricación y preparación de JX-594

JX-594 es una vaccinia de la cepa Wyeth modificada por inserción de los genes humanos GM-CSF y lacZ en la región genética TK bajo control del promotor sintético temprano-tardío y promotor p7.5, respectivamente. El material del ensayo clínico se genera según las directrices de GMP en células Vero y se purifica a través de centrifugación en gradiente de sacarosa. La relación genoma-a-pfu fue aproximadamente 70:1. JX-594 se formuló en solución salina tamponada con fosfato con 10% de glicerol, 138 mM cloruro sódico a pH de 7,4. Los ensayos finales de control de calidad de liberación del producto incluyeron ensayos de esterilidad, endotoxina y potencia. JX-594 se diluyó en solución salina normal al 0,9% en un volumen equivalente al 25% del volumen total estimado de tumor(es) diana.

4. Procedimientos del tratamiento

JX-594 se administró a través de imagen por inyección intratumoral utilizando agujas calibre 21 PEIT (inyección percutánea de etanol, multiporos; HAKKO Medicals; Tokio, Japón). Los tumores ($n = 1-3$) se inyectaron cada tres semanas a lo largo de dos pistas de agujas durante la extracción de la aguja a través del tumor. El curso del tratamiento inicial fue de 2 ciclos; hasta 6 ciclos adicionales se permitían si se produjo respuesta del tumor.

5. Monitorización de pacientes

Los pacientes fueron monitorizados como se describe en la tabla 5. Los pacientes fueron monitorizados después del tratamiento en el hospital durante al menos 48 horas, y durante cuatro semanas como pacientes externos.

Tabla 5 Procedimientos del estudio

Día del estudio	Día 14-0	Día 1 Pre	Día 1 Post	Día 3	Día 5	Día 8	Día 15	Día 22 ⁷	Día 28 visita de fin del estudio
Inyección de JX-594 (siguiendo las directrices CT)			x						
Evaluación clínica									
Examen físico, estado de la realización de ECOG	x	x	x ¹	x	x	x	x	x	x
Evaluaciones de laboratorio de seguridad²									
Hematología ³ / Coagulación	x	x		x	x	x	x	x	x

Día del estudio	Día 14-0	Día 1 Pre	Día 1 Post	Día 3	Día 5	Día 8	Día 15	Día 22 ⁷	Día 28 visita de fin del estudio
Químicas sérica	x	x		x	x	x	x	x	x
Ensayos víricos									
Niveles de JX-594 en plasma/sangre: Q-PCR		x	x ⁴	x	x	x	x	x	x
Diseminación (frotis de garganta, orina): ensayo de placa		x	x ⁴	x		x	x	x	
Evaluaciones inmunológicas									
Anticuerpos neutralizantes		x						x	
Citoquinas (inc. GM-CSF)		x	x ⁵	x		x			
Evaluaciones patológicas									
Biopsia del tumor		x ⁶				x ⁶		x ⁶	
Evaluaciones de eficiencia									
Escáner de CT PET-CT (opcional)	x							x	
Marcadores tumorales en el suero ⁸	x							x	

6. Títulos de anticuerpos neutralizantes (NAb)

5 Los títulos de NAb se determinaron por ensayo de inhibición del efecto citopático. Suero inactivado por calor se diluyó serialmente en medio usando diluciones logarítmicas de mitad. Se incubaron muestras de 50 µl con 1.000 pfu de JX-594 durante dos horas, después se inocularon en células A2780. Después de 3 días, la viabilidad celular se determinó utilizando el Kit 8 de conteo de células (Donjindo Laboratories, Kumamoto, Japan). El título NAb se definió como el recíproco de la dilución más alta de suero que resultó en ≥ 50% de viabilidad celular.

7. PCR cuantitativa para JX-594

10 Se utilizó PCR cuantitativa (Q-PCR) para medir genomas de JX-594 en la sangre diluida serialmente debido a su reproducibilidad y capacidad para detectar producto independientemente del anticuerpo y/o neutralización del complemento. ADN de JX-594 se purificó a partir de muestras utilizando el mini kit QIAamp de ADN sangre (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Q-PCR se llevó a cabo como se describió previamente (Kulesh *et al.*, 2004). Los límites más bajos de detección de JX-594 y la cuantificación fueron 666 y 3.333 copias/ml de plasma, respectivamente.

8. Detección de la diseminación de JX-594

15 Se utilizó un ensayo de formación de placa para detectar cualquier diseminación de JX-594 infeccioso en el medio ambiente; la diseminación de unidades infecciosas tendría relevancia para la salud pública. Las muestra de orina y saliva se centrifugaron, se resuspendieron en Tris 10 mM (pH 9,0), y se titularon con células A2780 mediante ensayos de placa. Los límites de detección fueron 20 pfu/ml de muestra.

9. Ensayos de citoquinas

20 GM-CSF se detectó mediante el kit de ELISA (BioSource International; Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del vendedor. Los niveles séricos de IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-alfa, e interferón-gamma se evaluaron utilizando el kit LINCoplex según las instrucciones del fabricante (LINCO; St. Charles, MO).

10. Tinción histopatológica para las proteínas de vaccinia y LacZ en muestras de sangre y del tumor

Biopsias embebidas en parafina, fijadas con formalina, fueron teñidas con hematoxilina y eosina para la histología. Para la inmunohistoquímica, se utilizaron anticuerpos de ratón monoclonales para B5R (Vac-14, α -B5R, 46 μ g/ml; Dr. Gary Cohen, University Pennsylvania; diluido 1: 50 o 1:100) seguido por incubación con DAKO EnVision+™ anti-ratón polímero marcado HRP(DAKO, Carpintería, California) antes de desarrollar utilizando DAB (Kirkegaard & Perry Laboratories; Gaithersburg, MD). Para el teñido de LacZ, las células se centrifugaron a 900 rpm durante 1 minuto, se enjuagaron, y se fijaron con glutaraldehído al 0,5% sobre portaobjetos de vidrio. Las células fueron después lavadas y teñidas con solución de X-gal durante de 4 horas a toda la noche.

11. Evaluación de la respuesta del tumor

10 La respuesta del tumor fue evaluada después de cada dos ciclos. El potenciador de contraste CT para escanear fue el estándar (a menos que esté contraindicado). Fueron obtenidos los diámetros máximos del tumor y las unidades Hounsfield (HU; densidad estimada). Se aplicaron los criterios RECIST y Choi para la respuesta (Choi *et al.*, 2007). Los marcadores tumorales fueron seguidos si estaban elevados al comienzo.

12. Problemas estadísticos

15 El tamaño de la muestra del estudio fue determinado por cuestiones de seguridad. La población que se intenta tratar (≥ 1 dosis) y el diseño de escalado de dosis estándar fueron utilizados. La probabilidad del escalado de la dosis, teniendo en cuenta las variaciones verdaderas de las tasas de DLT en la población tratada, se calculó como de rutina en los ensayos de escalación de dosis de fase I.

B. Resultados

20 1. Características de los pacientes

Catorce pacientes fueron incluidos (características enumeradas en la tabla 6; el perfil de la prueba en la FIG. 20). Tres pacientes fueron tratados en las cohortes 1-2, seis en la tercera y dos en la más alta. Seis pacientes fueron tratados en la cohorte 3 a petición del DSMB debido a una muerte del paciente no relacionada atribuida a la progresión del tumor. Dos pacientes (cohortes 1, 3) tuvieron suspendido el tratamiento después de un ciclo debido a eventos adversos no relacionados, y los pacientes con dosis más alta recibieron un ciclo debido a la DLT (ver más abajo).

Tabla 6. Demografía de los pacientes

Media de edad (años)	56,5 (37 - 66)
Sexo	11 hombres, 3 mujeres
Promedio de las terapias previas	5,6 (2-12)
Tamaño del tumor (cm)	6,9 (3,5 - 9,8)
Ciclos de JX-594 recibidos	3,4 (1 - 8)
Tipos de tumores	Colon (4), HCC (3), melanoma (2), RCC (1), SCC-tímico (1), SCC-pulmón (1), gástrico (1), células germinales extragonadales (1)

2. Toxicidad relacionada con el tratamiento

30 a. Eventos adversos (AE)

JX-594 fue bien tolerado hasta la MTD (10^9 pfu). No se registraron muertes relacionadas con el estudio. Todos los pacientes experimentaron síntomas como de gripe de grado 1-2 (desde 4 a 16 horas después del tratamiento. Hipotensión relacionada con la dosis (grado 2, sin disfunción orgánica) ocurrió dentro de las 4-12 horas. La tabla 7 lista los AEs más comunes posiblemente relacionados con JX-594. Solamente un caso grave de AE (anorexia y dolor abdominal) se consideró relacionado con el tratamiento. Diez serios y no relacionados (según el PI) AEs fueron reportados y atribuidos a complicaciones asociadas con la progresión del tumor. Cuatro pacientes murieron por la progresión del tumor durante el periodo de reportar los AE.

40 Dos pacientes de la cohorte 4 experimentaron DLTs. Ambos experimentaron hiperbilirrubinemia directa de grado 3 debido a la hinchazón del tumor y obstrucción del ducto biliar intrahepático, más anorexia de grado III y dolor abdominal.

b. Datos de laboratorio

Una disminución transitoria de linfocitos, plaquetas y el hematocrito se observaron durante los 3 primeros días relacionado con el tratamiento. Nueve pacientes tuvieron un aumento significativo en los recuentos de neutrófilos absolutos (ANC) dentro de los primeros cuatro días (siete aumentados > 100%; FIG. 2A). Los aumentos de ANC fueron relacionados con la dosis y frecuentemente asociados con la detección de GM-CSF en la sangre. ANC aumentó significativamente ($\geq 5.000/\mu\text{l}$) en 75% de los pacientes en las cohortes 3 y 4 (frente a 17% en las cohortes 1, 2; FIG. 21A); se observaron aumentos en monocitos y eosinófilos. La trombocitopenia fue también dependiente de la dosis (FIG. 22A) pero independiente del ciclo (FIG. 22B). Los aumentos de ANC fueron mayores en el ciclo 1 (FIG. 22C). Linfopenia y leucopenia ocurrieron en 2 pacientes (Tabla 7). Transaminitis significativa no ocurrió en la MTD (FIG. 21B).

Tabla 7: Efectos adversos más comunes (incluyendo AEs grado 1/2 experimentados por ≥ 3 pacientes y AEs grado 3/4 experimentados por ≥ 1 paciente) posiblemente relacionados con JX-594

		Número de pacientes por cohorte												Pacientes totales (n=14)
		Grado 1/2				Grado 3				Grado 4 (5)				
Sistema corporal	Evento	1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=6)	4 (n=2)	1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=6)	4 (n=2)	1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=6)	4 (n=2)	
General	Fiebre	3	3	5	2			1						(14) 100%
	Escalofríos	3	2	6	2		1							(14) 100%
	Fatiga		2	3	1									(6) 43%
Gastrointestinal	Anorexia	2	2	5					1					(10) 71%
	Náusea	1	1	1										(3) 21%
Sistema nervioso	Dolor de cabeza	1	1	2										(4) 29%
Metabólico/ Laboratorio	Hiponatremia							2						(2) 14%
	Fosfatasa alcalina aumentó						1	1						(2) 14%
	Hiperbilirrubinemia					1			2					(3) 21%
	ALT aumentada					1		1						(2) 14%
	AST aumentada					1			1					(2) 14%
	Hipofosfatemia								1					(1) 7%
	Disminución de fibrinógeno	1	1											(2) 14%
Hematológico	Recuento de leucocitos aumentado			2	1			1						(4) 29%

		Número de pacientes por cohorte												
		Grado 1/2				Grado 3				Grado 4 (5)				Pacientes totales (n=14)
Sistema corporal	Evento	1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=6)	4 (n=2)	1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=6)	4 (n=2)	1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=6)	4 (n=2)	
	Recuento de plaquetas disminuido			1			2							(3) 21%
	Leucopenia		1	1			1							(3) 21%
	Recuento de neutrófilos disminuido						2							(2) 14%
Dolor	Dolor general	1	1	2										(4) 29%

3. Puntos finales de la farmacocinética y la farmacodinámica

a. GM-CSF en suero

5 Trece pacientes fueron negativos para GM-CSF en suero en la línea de base. Tres pacientes en la MTD tenían GM-CSF detectable > 48 horas (46 - 16.000 pg/ml) después de la inyección de JX-594 (FIG. 21A), concentraciones que fueron mayores que aquellas reportadas después de la inyección subcutánea de la proteína GM-CSF en pacientes (Cebon *et al.*, 1992). Las concentraciones de GM-CSF correlacionaron con la inducción de WBC (FIG. 21A).

b. Anticuerpos neutralizantes (NABs)

10 Se observaron niveles bajos (< 10) o indetectables de anticuerpos anti-JX-594 (NAb) en la línea de base en 79% de los pacientes. Todos los pacientes desarrollaron NABs dentro de los 22 días. La titulación de NAb alcanzó su punto máximo después de la primera dosis en el 45% de los pacientes y aumentó posteriormente al 55%.

15 No se observó correlación entre la titulación de NAb en la línea de base y cualquier criterio de valoración clínica o de laboratorio, incluyendo la farmacocinética de JX-594, replicación, expresión o eficacia de GM-CSF. Tres pacientes con respuestas tumorales RECIST objetivas tenían titulación basal detectable de NAB y alta titulación después del tratamiento (32.000, 32.000, y 10.000). Además, dos pacientes habían desarrollado recientemente nuevas metástasis de cuello tratadas después de la inducción de altos niveles de NAb, y ambos tumores se sometieron a respuestas objetivas (a continuación; Tabla 8 y FIG. 24B).

Tabla 8. Respuestas de los tumores diana y duración de la supervivencia

Paciente (tipo de tumor/ Diámetro/tratamientos previos)	Cohorte/ ciclos	RECIST ²	Choi ³	PET	Marcador del tumor ⁴	Supervivencia ⁵
103 (SCC pulmón/9,8 cm/5)	1/6	PR	+(↓51% diam)	n.a.	n.a.	19,8 m ⁶
201 (HCC/6,2 cm/5)	2/8	Hígado: PR Cuello: PR	+(↓30% diam) +(↓57% diam)	Hígado:neg Cuello: -76%	PR (-98%)	11+ m
304 (Melanoma/7,8 cm/3)	3/6	Hígado: PR Cuello: SD	+(↓33% diam) +(↓51% HU)	Hígado:-29% Cuello: -42%		12,2+ m
301 (RCC/5,7 cm/5)	3/4	SD	+(↓42% HU ⁷)	+40%		15,1 m ⁶
302 (colon/9,0 cm/6)	3/4	SD	+(↓15% HU)	+4%	SD	8,9 m
202 (SCC del timo/9,7 cm/4)	2/4	SD	+(↓16% HU)	n.a.	n.a.	10,1 m
102 (colon/4,1 cm/4)	1/3	SD	+(↓31% HU)	n.a.	n.a.	8,2 m

203 (germinal extragonadal/ 6,1 cm/4)	2/5	SD	+(↓40% HU)	-6%	SD	4,5 m
305 (colon/7,4 cm/5)	3/2	SD	-(↑28%)	+55%	PD	1,8 m
306 (colon/5,8 cm/11)	3/2	PD	+(↓33% HU)	+56%	SD	9,4 m ⁶
101 (gástrico/8,5 cm/6)	1/1	n.a. ⁸	n.a. ⁸	n.a.	n.a.	1,8 m
303 (Melanoma/10,9 cm/7)	3/1	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	10 d
401 (HCC/3,5 cm/12)	4/1	n.a.	n.a.	-41%	PR (-81%)	3+ m
402 (HCC/9,8 cm/2)	4/1	n.a.	n.a.	n.a.	PR (-65%)	18+ d

¹ El primer número refleja el nivel de dosificación (por ejemplo 103 estaba en el nivel de dosificación 1)

² Criterios de RECIST: respuesta parcial (PR) es una disminución máxima del diámetro de $\geq 30\%$; enfermedad progresiva (PD) es un aumento de $\geq 20\%$; enfermedad estable es un cambio en el diámetro entre estos dos límites para PR y PD

³ Criterios de Choi: disminución máxima del diámetro de $\geq 10\%$ o disminución de la densidad de $\geq 15\%$; + indica respuesta

⁴ Definición de la respuesta de los marcadores de los tumores: $\geq 50\%$ de disminución: PR; $\geq 25\%$ de aumento: PD; $< 50\%$ de disminución o 25% de aumento: SD; el marcador fue alfa-fetoproteína (AFP) en los pacientes 201, 301, 402; PIVKA2 para 401; antígeno carcinoembrionario (CEA) para 302, 305, 306.

⁵ Supervivencia: + indica ninguna muerte relacionada con el cáncer; m: meses; d: días

⁶ Todavía vivo

⁷ HU: unidades de Hounsfield

⁸ Imágenes de CT realizadas en la semana 3 muestran la progresión del tumor

C. Citoquinas

La interleucina-6, IL-10 y TNF- α alcanzaron el máximo en 3 horas. Fueron también observados picos más tarde (días 3 - 22). La inducción de citoquinas fue mayor en los ciclos 2-8 que en el ciclo 1. La inducción de interleucina 6 correlacionó con GM-CSF en suero. No se apreció inducción de IL-1 β e IL-4.

d. Farmacocinética de JX-594

Todos los pacientes tuvieron genomas de JX-594 detectados inmediatamente después de la inyección (49 de 50 ciclos). Las concentraciones se correlacionaron con la dosis (FIG. 23A y 23B), disminuyendo $\sim 50\%$ en 15 minutos y $\sim 90\%$ en de 4 - 6 horas. Las tasas de aclaramiento inicial no fueron dependientes de las dosis ni dependientes de la titulación del anticuerpo. Siguiendo la liberación inicial y el aclaramiento en la sangre del JX-594 inyectado, fue detectado el retraso reemergente del JX-594 circulante frecuentemente, consistente con la replicación. Doce de 15 (80%) pacientes tuvieron genomas detectables (sangre o plasma) entre los días 3 - 22. Concentraciones de pico secundarias generalmente se correlacionaron con la dosis, y la farmacocinética fue similar (FIG. 23B). Los picos de concentración secundaria más bajos fueron detectados después de la dosificación repetida en los ciclos 2 - 7 (4 de 11 pacientes). Farmacocinéticas representativas se muestran en la figura 23C.

e. Diseminación de JX-594, replicación dentro de sitios del tumor distantes no inyectados

JX-594 fue detectado en los tejidos de tumores no inyectados, indicando infección selectiva del tumor distante y replicación (FIG. 23D-F). Por ejemplo, los derrames malignos de ascitis y pleura de un paciente tuvieron concentraciones de genoma más altas (17- y 12-veces más altas respectivamente), y concentraciones de GM-CSF (24 y 13 veces más altas respectivamente), que en sangre en el mismo punto de tiempo (FIG. 3D). Las células LacZ(+) en el derrame pleural confirmaron la infección de JX-594 (FIG. 23E). Otro paciente tuvo una biopsia de cuello distante realizada y la replicación de JX-594 fue demostrada histológicamente (FIG. 23F).

f. Diseminación de JX-594

No se detectó ningún JX-594 infeccioso en ninguna muestra de garganta u orina.

4. Eficacia antitumoral de JX-594

Diez pacientes fueron evaluados para las respuestas del tumor diana; Los pacientes no evaluables tuvieron contraindicaciones para el contraste (2) o no hubo exploraciones posteriores al tratamiento (2). Nueve (90%) tuvieron una respuesta objetiva (30%) o enfermedad estable (60%) por los criterios de CT RECIST. Ocho (80%) tuvieron una respuesta objetiva por criterios Choi (Tabla 8). Los pacientes con respuesta en ambos criterios RECIST y Choi tenían cáncer de pulmón de células no pequeñas (FIG. 24A), HCC y melanoma (Tabla 8). Las respuestas objetivas fueron duraderas; no hubo nuevo crecimiento en los tumores que respondieron (4 - 18 meses de seguimiento). La inyección directa de los tumores previamente no inyectados en el cuello de dos pacientes, después de cuatro ciclos anteriores en el hígado, dio lugar a respuestas Choi y/ o RECIST a pesar del alto nivel de anticuerpos neutralizantes para JX-594 (Tabla 8, FIG. 24B); por tanto, la eficacia del retratamiento fue posible.

También se evaluaron las respuestas en tumores distantes, no inyectados. Entre siete pacientes con tumores distantes no inyectados, seis pacientes tuvieron enfermedad a distancia estable por criterios RECIST; el tiempo a la progresión de estos tumores distantes varió de 6+ a 30+ semanas. Tres de estos pacientes tuvieron respuestas por los criterios de Choi (n=2) o PET-CT (n=1; 25-100% disminución; Tabla 9).

Tabla 9. Respuestas de tumores distantes en pacientes con control del tumor diana (RECIST PR o SD)

Paciente (dosis gp ¹)	Tamaño del tumor distante (cm)/localización	RECIST	Choi	PET	Tiempo a la progresión del tumor ²
202	5-9/ Hígado	SD	+ (↓35% HU)	n.a.	30+ semanas
103	8-5/ Hígado	SD	+ (↓22% HU)	n.a.	7+ semanas
304	7/ cara, mediastino	n.a.	n.a.	Tumor CR – SC Tumor PR - PA	6+ semanas
102	4-3/ Hígado	SD	- (↓10% HU)	n.a.	9 semanas
203	8-3/ LNs	SD	- (↑5%)	-6% (12 semanas)	15 semanas
201	3-7/ Hígado	SD	- (↓6%)	SD	18 semanas
301	11-8/ Hígado	PD	- (↑22%)	+10%	6 semanas

¹ El primer número refleja el nivel de la dosis (por ejemplo, 103 se encontraba en el nivel de dosis 1)

² por CT RECIST; + indica ninguna muerte relacionada con el cáncer

HU: Unidades de Hounsfield; LN: nodos linfáticos; SC: supraclavicular; PA: preauricular; CR: respuesta completa; PR: respuesta parcial; SD: enfermedad estable; PD: enfermedad progresiva

Hasta la fecha, ocho pacientes (57%) han sobrevivido por lo menos 8 meses, cuatro más de un año y uno hasta más de 20 meses. La mediana de supervivencia ha sido de 9 meses.

Referencias

20 Documento de patente de los Estados Unidos 4.554.101
 Documento de patente de los Estados Unidos 4.683.202
 Documento de patente de los Estados Unidos 4.684.611
 Documento de patente de los Estados Unidos 4.952.500
 Documento de patente de los Estados Unidos 5.073.627
 25 Documento de patente de los Estados Unidos 5.302.523
 Documento de patente de los Estados Unidos 5.322.783
 Documento de patente de los Estados Unidos 5.384.253
 Documento de patente de los Estados Unidos 5.399.363

- Documento de patente de los Estados Unidos 5.464.765
Documento de patente de los Estados Unidos 5.466.468
Documento de patente de los Estados Unidos 5.538.877
Documento de patente de los Estados Unidos 5.538.880
5 Documento de patente de los Estados Unidos 5.543.158
Documento de patente de los Estados Unidos 5.550.318
Documento de patente de los Estados Unidos 5.563.055
Documento de patente de los Estados Unidos 5.580.859
Documento de patente de los Estados Unidos 5.589.466
10 Documento de patente de los Estados Unidos 5.591.616
Documento de patente de los Estados Unidos 5.610.042
Documento de patente de los Estados Unidos 5.633.016
Documento de patente de los Estados Unidos 5.641.515
Documento de patente de los Estados Unidos 5.656.610
15 Documento de patente de los Estados Unidos 5.702.932
Documento de patente de los Estados Unidos 5.736.524
Documento de patente de los Estados Unidos 5.739.169
Documento de patente de los Estados Unidos 5.780.448
Documento de patente de los Estados Unidos 5.789.215
20 Documento de patente de los Estados Unidos 5.798.339
Documento de patente de los Estados Unidos 5.801.005
Documento de patente de los Estados Unidos 5.824.311
Documento de patente de los Estados Unidos 5.824.348
Documento de patente de los Estados Unidos 5.830.880
25 Documento de patente de los Estados Unidos 5.846.225
Documento de patente de los Estados Unidos 5.846.233
Documento de patente de los Estados Unidos 5.846.945
Documento de patente de los Estados Unidos 5.925.565
Documento de patente de los Estados Unidos 5.928.906
30 Documento de patente de los Estados Unidos 5.935.819
Documento de patente de los Estados Unidos 5.945.100
Documento de patente de los Estados Unidos 5.981.274
Documento de patente de los Estados Unidos 5.994.624
Alcami y Smith, Cell., 71(1):153-167, 1992.
35 Alcami et al., J. Gen. Virol., 80:949-959, 1999
Alcami et al., Sem. Virol., 5:419-427, 1998.
Alcami et al., Virology, 74(23):11230-11239, 2000.

- Almendro et al., *J. Immunol.*, 157(12):5411-5421, 1996.
- Arap et al., *Cancer Res.*, 55(6):1351-1354, 1995.
- Arness et al., *Am. J. Epidemiol.*, 160:642-51, 2004.
- Austin-Ward y Villaseca, *Revista Médica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.
- 5 Ausubel et al., en: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 16.15.1-16.18.10, 1996.
- Bajorin et al., *J. Clin. Oncol.*, 6(5):786-792, 1988.
- Bakhshi et al., *Cell*, 41(3):899-906, 1985.
- Blasco y Moss, *J. Virology*, 66(7): 4170-4179, 1992.
- Blasco et al., *J. Virology*, 67(6):3319-3325, 1993.
- 10 Boyd et al., *Cell*, 79:341-351, 1994.
- Brizel, *Semin. Radiat. Oncol.*, 8(4):237-246, 1998.
- Bukowski et al., *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.
- Caldas et al., *Cancer Res.*, 54:3568-3573, 1994.
- Carbonelli et al., *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1):75-82, 1999.
- 15 Cebon et al., *Br. J. Haematol.*, 80(2):144-150, 1992.
- Chandler et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596-601, 1997.
- Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.
- Cheng et al., *Cancer Res.*, 54(21):5547-5551, 1994.
- Choi et al., *J. Clin. Oncol.*, 25(13):1753-1759, 2007.
- 20 Christodoulides et al., *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.
- Cleary y Sklar, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(21):7439-7443, 1985.
- Cleary et al., *J. Exp. Med.*, 164(1):315-320, 1986.
- Cocea, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.
- Colamonici et al., *J. Biol. Chem.*, 270:15974-15978, 1995.
- 25 Culver et al., *Science*, 256(5063):1550-1552, 1992.
- Curran, *Seminars Radiation Oncol.*, 8(4Suppl):2-4, 1998.
- Davidson et al., *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.
- Dillman, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14(1):5-10, 1999.
- Dobbelstein y Shenk, *J. Virology*, 70:6479-6485, 1996.
- 30 Durrant y Spendlove, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2(7):959-66, 2001.
- Eliopoulos et al., *Oncogene*, 11(7):1217-28, 1995.
- Erlandsson, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 104(1):1-18, 1998.
- Fechheimer et al., *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.
- Fraley et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.
- 35 GenBank Accession Number NC001559
- Gnant et al., *Ann Surg*, 230(3):352-360, 1999.
- Gnant et al., *Cancer Res.*, 59(14):3396-403, 1999.

- Gnant et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 91(20):1744-1750, 1999.
- Goebel et al., *Virology*, 179(1):247-266, 517-563, 1990.
- Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.
- Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.
- 5 Graham et al., *Virology*, 229(1):12-24, 1997.
- Gross et al., *Genes Dev.*, 13(15):1899-911, 1999.
- Gross et al., *J. Biol. Chem.*, 274:1156-1163, 1999.
- Hanibuchi et al., *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.
- 10 Heise et al., *Cancer Gene Ther.*, 6(6):499-504, 1999.
- Heise et al., *Cancer Res.*, 59(11):2623-2628, 1999.
- Hellstrand et al., *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
- Hermiston, *J. Clin. Invest.*, 105:1169-1172, 2000.
- Ho et al., *J. Biol. Chem.*, 27:7765-7769, 1998.
- 15 Homey et al., *Nature. Rev. Immunol.*, 2:175-184, 2002.
- Hui y Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- Hussussian et al., *Nat. Genet.*, 8(1):15-21, 1994.
- Ikeda et al., *Nat. Med.*, 5(8):881-7, 1999.
- Inouye y Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109, 1985.
- 20 Irie y Morton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(22):8694-8698, 1986.
- Irie et al., *Lancet.*, 1(8641):786-787, 1989.
- Isaacs et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(2):628-32, 1992.
- Johnson y Hamdy, *Oncol. Rep.*, 5(3):553-557, 1998.
- Ju et al., *Gene Ther.*, 7(19):1672-1679, 2000.
- 25 Ju et al., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 59(3):241-250, 2000.
- Kaeppeler et al., *Plant Cell Reports*, 9:415-418, 1990.
- Kamb et al., *Nat. Genet.*, 8(1):23-26, 1994.
- Kamb et al., *Science*, 267:436-440, 1994.
- Kaneda et al., *Science*, 243:375-378, 1989.
- 30 Kato et al., *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.
- Kay et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(9):4686-4691, 1997.
- Kerr et al., *Br. J. Cancer*, 26(4):239-257, 1972.
- Kettle et al., *J. Gen. Virology*, 78:677-685, 1997.
- Kirn et al., *Nat. Med.*, 7:781-787, 2001.
- 35 Kolmel, *J. Neurooncol.*, 38(2-3):121-125, 1998.
- Kraus et al. *FEBS Lett.*, 428(3):165-170, 1998.
- Kulesh et al., *J. Clin. Microbiol.*, 42(2):601-609, 2004.

- Kyte y Doolittle, J. Mol. Biol., 157(1):105-132, 1982.
- Lareyre et al., J. Biol. Chem., 274(12):8282-8290, 1999.
- Lee et al., Biochem. Biophys. Res. Common., 238(2):462-467, 1997.
- Levenson et al., Hum. Gene Ther., 9(8):1233-1236, 1998.
- 5 Liebermann, Oncogene, 17(10):1189-94, 1998.
- Macejak y Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991.
- Magi-Galluzzi et al., Anal. Quant. Cytol. Histol., 20(5):343-350, 1998.
- Mangray y King, Front Biosci., 3:D1148-1160, 1998.
- Marsters et al., Recent Prog. Horm. Res., 54:225-234, 1999.
- 10 Mastrangelo et al., Cancer Gene There., 6(5):409-422, 1999.
- Mastrangelo et al., Cancer Treat Res., 94:35-50, 1998.
- Mayer et al., Radiat. Oncol. Investig., 6(6):281-288, 1998.
- McCart et al., Gene Ther., 7(14):1217-23, 2000.
- Mitchell et al., Ann. NY Acad. Sci., 690:153-166, 1993.
- 15 Mitchell et al., J. Clin. Oncol., 8(5):856-869, 1990.
- Mori et al., Cancer Res., 54(13):3396-3397, 1994.
- Morton et al., Arch. Surg., 127:392-399, 1992.
- Moss, en: Fields Virology., Fields (Ed.), Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 2637-2672, 1996.
- Mossman et al., Virology, 215(1):17-30, 1996.
- 20 Mougín et al., Ann. Biol. Clin., (Paris) 56(1): 21-8, 1998.
- Mumby y Walter, Cell Regul., 2(8):589-98, 1991.
- Natoli et al., Biochem. Pharmacol., 56(8):915-20, 1998.
- Nicolau y Sene Nobori *et al.*, 1994
- Nomoto et al., Gene, 236(2):259-271, 1999.
- 25 Ochi et al., Am. J. Gastroenterol., 93(8):1366-1368, 1998.
- Ohara, Gan To Kagaku Ryoho, 25(6): 823-828, 1998.
- Okamoto et al., Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 91(23):11045-11049, 1994.
- Omirulleh et al., PlantMol. Biol., 21(3):415-428, 1993.
- Orlow et al., Cancer Res, 54(11):2848-2851, 1994.
- 30 Solicitud PCT del documento de patente internacional 94/09699
- Solicitud PCT del documento de patente internacional WO 95/06128
- Pelletier y Sonenberg, Nature, 334(6180):320-325, 1988.
- Pietras et al., Oncogene, 17(17):2235-2249, 1998.
- Puhlmann et al., Cancer Gene Ther., 7:66-73, 2000.
- 35 Qin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(24):14411-14416, 1998.
- Ravindranath y Morton, Intern. Rev. Immunol., 7: 303-329, 1991.
- Remington's Pharmaceutical Sciences" 15^{ava} edición 1035-1038 y 1870-1591,1990.

- Rippe, et al., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rosel et al., *J. Virol.*, 60(2):436-449, 1986.
- Rosenberg et al., *Ann. Surg.* 210(4):474-548, 1989.
- Rosenberg et al., *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.
- 5 Sambrook et al., en: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Saraiva y Alcami, *J. Virology*, 75(1):226-33, 2001.
- Serrano et al., *Nature*, 366:704-707, 1993.
- Serrano et al., *Science*, 267(5195):249-252, 1995.
- 10 Sinkovics y Horvath, *J. Clin. Viro.*, 16:1-15, 2000.
- Smith et al., *Immunol. Rev.*, 159:137-154, 1997.
- Smith et al., *J. Clin. Oncol.*, 18:2046-2052, 2000.
- Smith et al., *Neuron.*, 20:1093-1102, 1998.
- Solyanik et al., *Cell. Prolif.*, 28(5):263-278, 1995.
- 15 Spriggs et al., *Cell.*, 71(1):145-52, 1992.
- Stokke et al., *Cell. Prolif.*, 30(5):197-218, 1997.
- Symons et al., *Cell*, 81:551-560, 1995.
- Todo et al., *Cancer Res.*, 61:153-161, 2001.
- Tsujimoto y Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14):5214-5218, 1986.
- 20 Tsujimoto et al., *Nature*, 315:340-343, 1985.
- Tsujimoto et al., *Science*, 228(4706):1440-1443, 1985.
- Tsumaki et al., *J. Biol. Chem.*, 273(36):22861-22864, 1998.
- Upton et al., *Science*, 258(5086):1369-1372, 1992.
- Upton et al., *Virology*, 184(1):370-82, 1991.
- 25 Vanderplasschen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(13):7544-7549, 1998.
- Vicari y Caus, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13:143-154, 2002.
- Vogelstein y Kinzler, *Cell*, 70(4):523-6, 1992.
- Wallach et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 17:331-367, 1999.
- Wold et al., *J. Virol.*, 52:307-313, 1984.
- 30 Wold et al., *Trends Microbiol.*, 2:437-443, 1994.
- Wong et al., *Gene*, 10:87-94, 1980.
- Wu et al., *Biochem. Biophys. Res. Common.*, 233(1):221-226, 1997.
- Zhao-Emonet et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1442(2-3):109-119, 1998.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector del virus de vaccinia que es deficiente de timidina quinasa (TK) y expresa GM-CSF, que es capaz de replicarse, para uso en un método para inducir la oncolisis de un tumor en un sujeto humano, en donde el método comprende administrar a dicho sujeto al menos 1×10^9 pfu del vector del virus de vaccinia por inyección en la masa tumoral o vasos del tumor.
- 10 2. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 1, en donde el tumor es un tumor de cáncer de cerebro, un tumor de cáncer de cabeza y cuello, un tumor de cáncer de esófago, un tumor de cáncer de piel, un tumor de cáncer de pulmón, un tumor de cáncer del timo, un tumor de cáncer de estómago, un tumor de cáncer de colon, un tumor de cáncer de hígado, un tumor de cáncer de ovarios, un tumor de cáncer uterino, un tumor de cáncer de vejiga, un tumor de cáncer testicular, un tumor de cáncer renal, un tumor de cáncer de mama, un tumor de cáncer pancreático, un carcinoma hepatocelular, o un melanoma.
- 15 3. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 1, en donde la oncolisis se induce en al menos el 20% de las células de dicho tumor, en al menos el 30% de las células de dicho tumor, en al menos el 40% de las células de dicho tumor, en al menos el 50% de las células de dicho tumor, en al menos el 60% de las células de dicho tumor, en al menos el 70% de las células de dicho tumor, en al menos el 80% de las células de dicho tumor, o en al menos el 90% de las células de dicho tumor
- 20 4. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 1, en donde el tumor es recurrente.
5. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 1, en donde el tumor es primario.
6. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 1, en donde el tumor es metastásico.
- 25 7. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 1, en donde el tumor es resistente a varios fármacos.
8. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 1, en donde el medicamento está formulado para la administración en combinación con una segunda terapia del cáncer.
9. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 8, en donde la segunda terapia del cáncer es la quimioterapia, una terapia biológica, la radioterapia, inmunoterapia, una terapia hormonal, una terapia antivascular, crioterapia, una terapia de toxina, o cirugía.
- 30 10. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 1, en donde el tumor es no resecable anterior al tratamiento y resecable después del tratamiento.
11. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 1, en donde el vector del virus vaccinia comprende uno o más genes víricos modificados.
- 35 12. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 11, en donde el uno o más genes víricos modificados comprende uno o más de:
- (a) un polipéptido modulador de interferón seleccionado de A53R, B8R, B13R, B18R, vC12L, y E3L;
- (b) un polipéptido de control de complemento VCP;
- (c) un polipéptido modulador de TNF seleccionado de A53R y B28R;
- (d) un inhibidor de la serina proteasa seleccionado de B 13R y B22R;
- 40 (e) un polipéptido de forma EEV no infeccioso, en donde el polipéptido es A34R o B5R.
13. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 1, en donde el medicamento es para dos o más veces de administración.
14. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 13, en donde el medicamento es para dos o más veces de administración durante un periodo de al menos 6 semanas.
- 45 15. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 14, en donde el medicamento se administra semanalmente (días 1, 8, 15, 22, 29, y 36) para una totalidad de 6 tratamientos o cada tres semanas.
16. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 2, en donde el tumor es un tumor de cáncer de hígado, un carcinoma hepatocelular, o un melanoma.

17. El vector del virus vaccinia que es capaz de replicarse para uso de la reivindicación 16, en donde el tumor es un melanoma maligno no resecable.

Diseño del estudio del ensayo clínico
 JX-594 por inyección intratumoral
 Número de protocolo JX594-IT-hep001
 Un estudio clínico de Fase I para evaluar la seguridad y eficacia de JX-594
 (virus vaccinia con delección de timidina quinasa más GM-CSF) administrado por inyección intratumoral

Fase I	Pacientes	Sitios	Localización	Soporte de IND
1	~18	1	Corea	Dr. Hwang TH

Inyección en
 pacientes con
 tumores sólidos

en el hígado

Elegibilidad	Objetivo primario (Secundario y otro)	Dosis	Tratamiento
Carcinoma hepatocelular (HCC) u otro cáncer metastático para el hígado	-MTD (o MFD) -Seguridad -594 replicación/PK -respuesta inmune 594 -eficacia antitumoral (inyectado y distante)	4 Cohortes Comienza a 10 ⁸ pfu/dosis; termina a 3x10 ⁹ pfu/dosis	-1 ciclo = 3 semanas - 4 ciclos posibles -Repetir opción de dosificación -Respuesta eval Q 6 semanas - Biopsia requerida (si es segura) -PET opcional

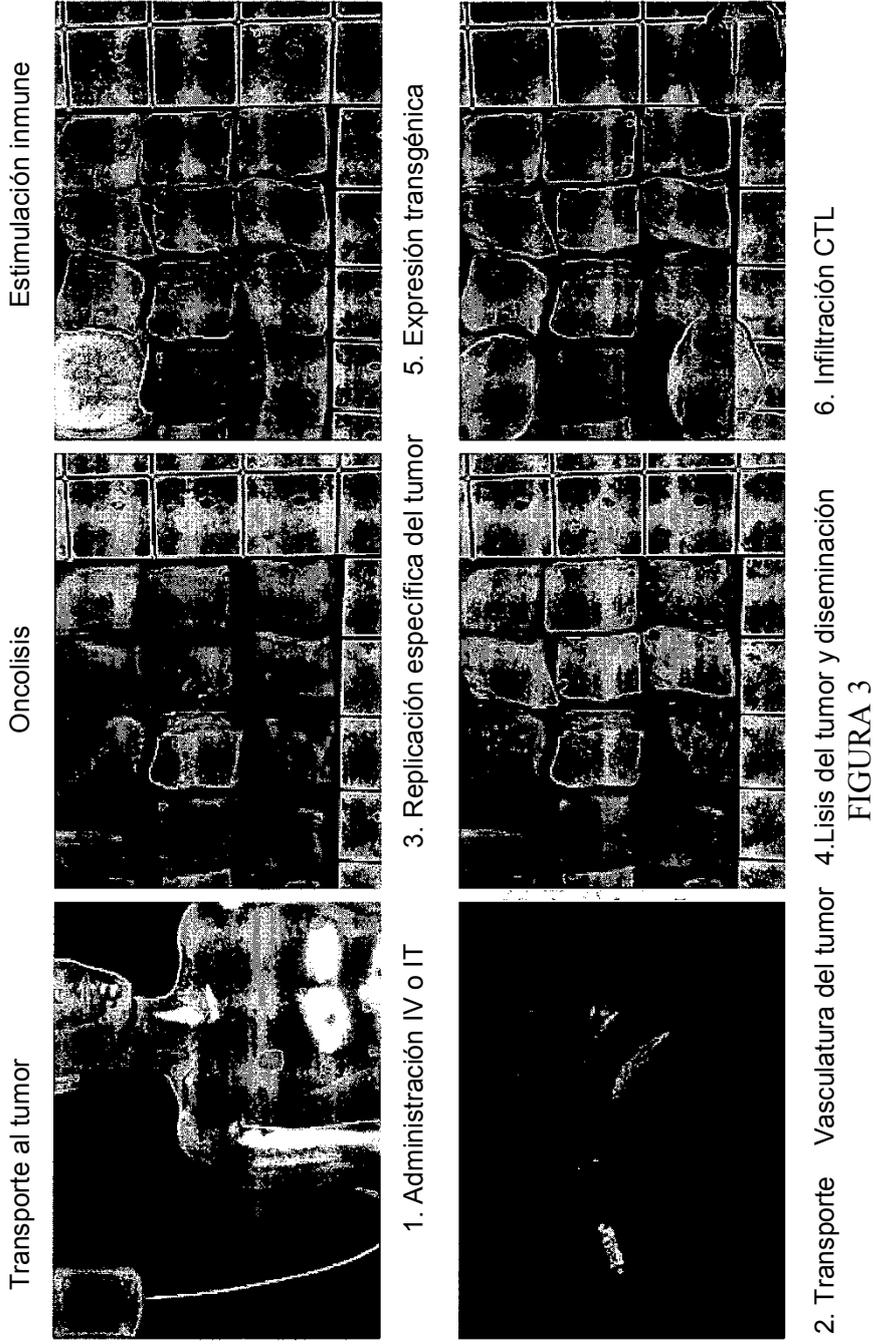
FIGURA 1

Diseño del estudio clínico de
 JX-594 por inyección intratumoral
 Número de protocolo JX594-IT-MEL005
 Un estudio de Fase II de etiqueta abierta de JX-594 (virus vacinia con Timidina Quinasa suprimida más GM-CSF) administrado por inyección intratumoral en pacientes con melanoma maligno no reseccables en estadios 3 o 4.

Fase	Pacientes	Sitios	Localización	Soprote de IND
1/2	15	2-3	Estados Unidos	Jennerex

Elegibilidad	Objetivo primario (Secundario y otro)	Dosis	Tratamiento
Melanoma maligno en estadios 3 o 4 no reseccable quirúrgicamente para su curación	-tasa de respuesta objetiva de los tumores inyectados -seguridad y toxicidad tasa de respuesta total - supervivencia libre de progresión tasa de respuesta objetiva de tumores no inyectados -supervivencia total, beneficio clínico, MIA, PK y PD de 594, respuesta inmune a 594, puntos finales histológicos	1 nivel de dosis: 1 x 10 ⁸ pfu / tratamiento	-Inyecciones semanales x 6 semanas -Evaluación de la respuesta @ 6 semanas y cada 3-6 semanas después -Biopsia en el subgrupo de hasta 10 pacientes -PK en todos los pacientes

FIGURA 2



Línea de base

Respuesta completa

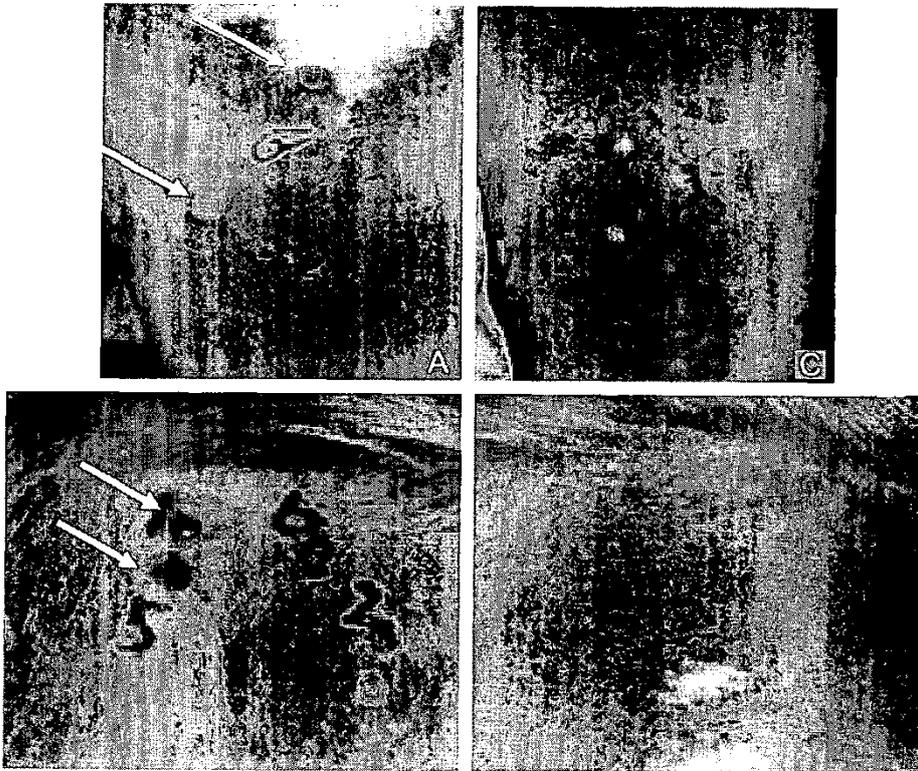
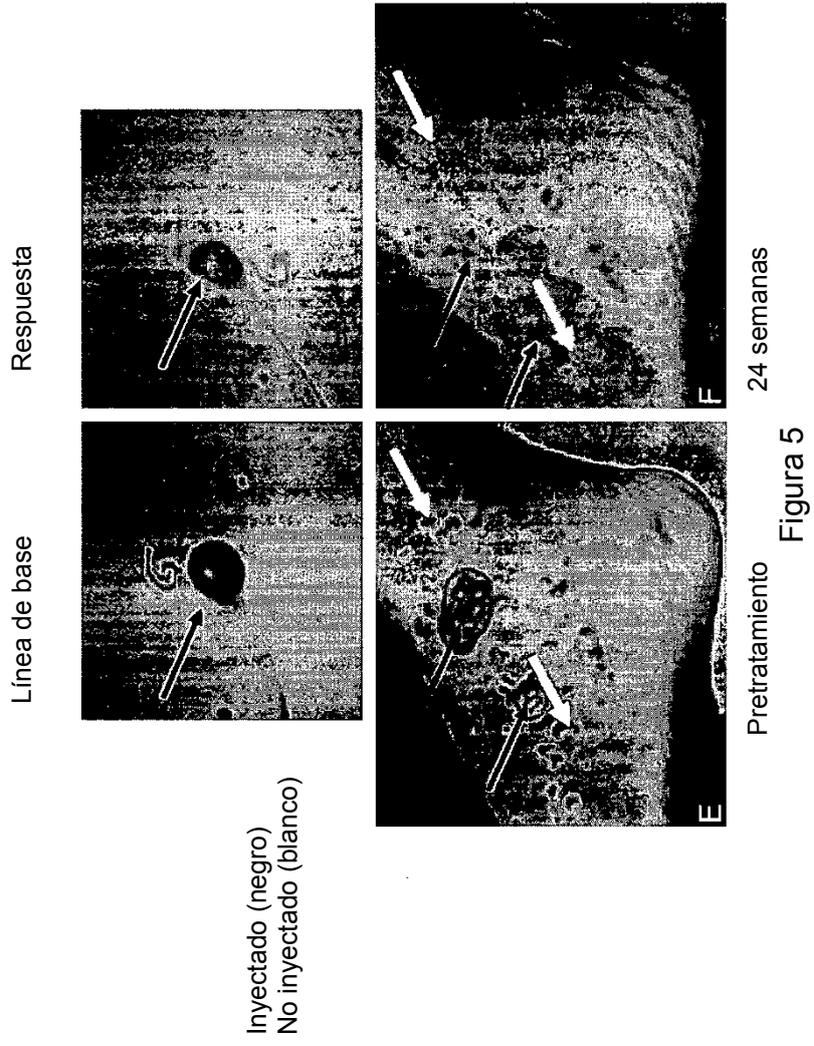


FIGURA 4



Cohorte	# de paciente	Demog de paciente	Tipo de tumor (Diana vivo LD)	# de ciclos (fecha del 1 ^{er} tratamiento)	Estado
1	101	M 55	Gástrico (8,5 cm)	1 (09-Enero-2006)	Tratamiento completado (Murio 04-Marzo-2006)
1	102	F 56	Colon sigmoideo (4,1 cm)	3 (06-Febrero-2006)	Tratamiento completo (Murio 11-October-2006)
1	103	M 53	Tímico (9,8 cm)	6 + 2HAI (16-Mayo-2006)	Tratamiento completado (vivo, en seguimiento)
2	201	M 66	HCC (6,2 cm)	8 (30-Mayo-2006)	Tratamiento completado (vivo, en seguimiento)
2	202	M 50	Pulmón escamoso* (9,7 cm)	4 (12-Junio-2006)	Tratamiento completado (vivo, en seguimiento)
2	203	M 56	HCC (6,1 cm)	5 (12-Julio-2006)	Tratamiento completado (Murio 23-Noviembre-2006)

◆presumido

FIGURA 6

Cohorte	# de paciente	demografía de paciente	Tipo de tumor (Diana del hígado LD)	# de ciclos (fecha del 1 ^{er} tratamiento)	Estado
3	301	M 44	Renal (5,7 cm)	4 (02-Octubre-2006)	Tratamiento completado (vivo, en seguimiento)
3	302	F 62	Colon (9,0 cm)	4 (22-Noviembre-2006)	Tratamiento completado (vivo, en seguimiento)
3	303	M 37	Melanoma (10,9 cm)	1 (28-Noviembre-2006)	Tratamiento completado (murió 06-Diciembre-2006)
3	304	M 65	Melanoma (1,8 cm)	3+ (28-Diciembre-2006)	Activo
3	305	M 63	Colon (7,4cm)	1+ (28-Febrero-2007)	Activo

FIGURA 7

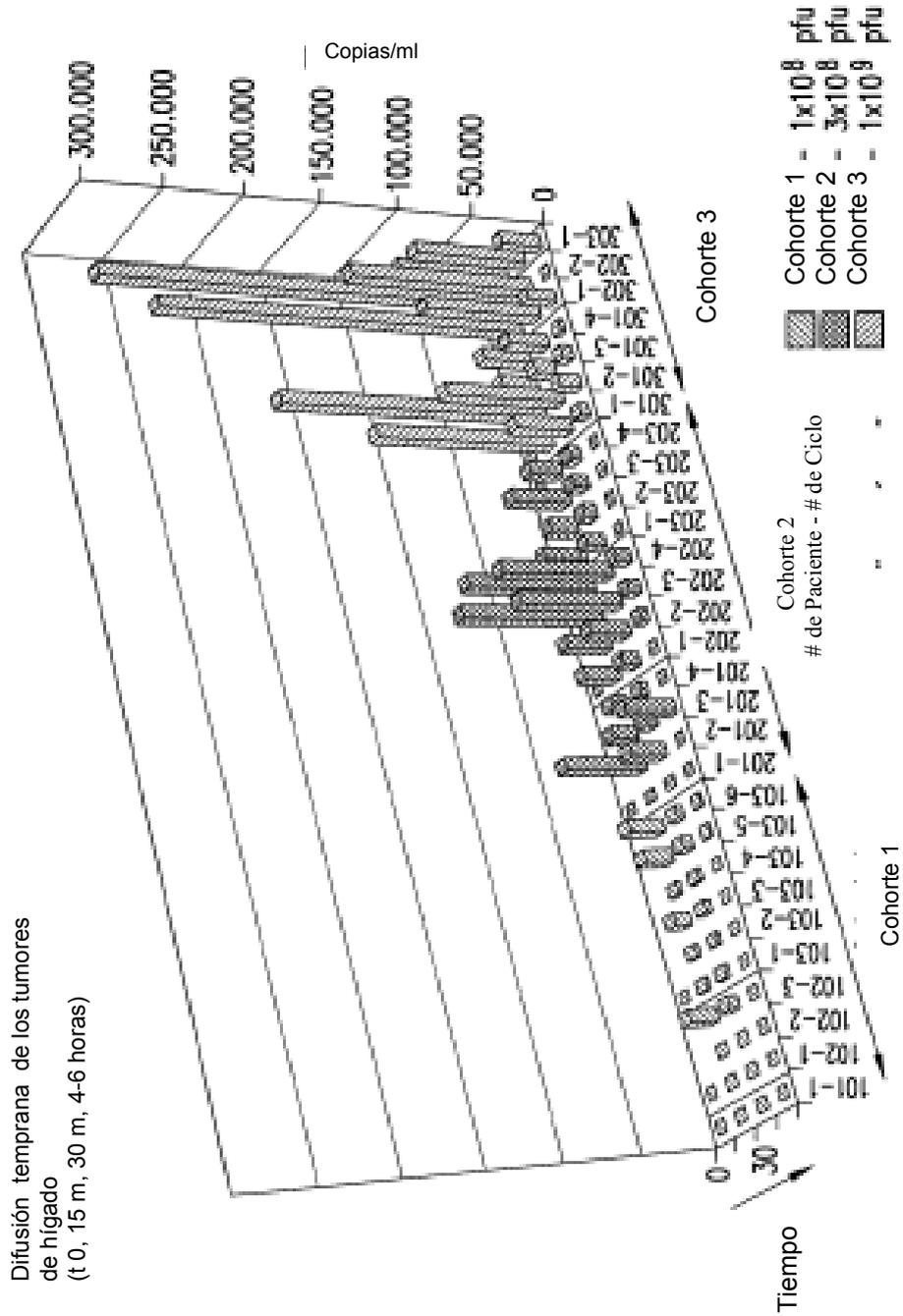


FIGURA 8

		# de Ciclo			
# de Paciente		1	2	3	4
Cohorte 1	101	+			
	102	-	-	-	
	103	+	-	+	-
Cohorte 2	201 hepático	+	+	-	+
	201 cuello	+	-	+	-
	202	-	-	-	-
	203	+	-	-	-
Cohorte 3	301	-	-	-	+
	302	+	-	P	P
	303	+			
	304	+	-	P	P

FIGURA 9

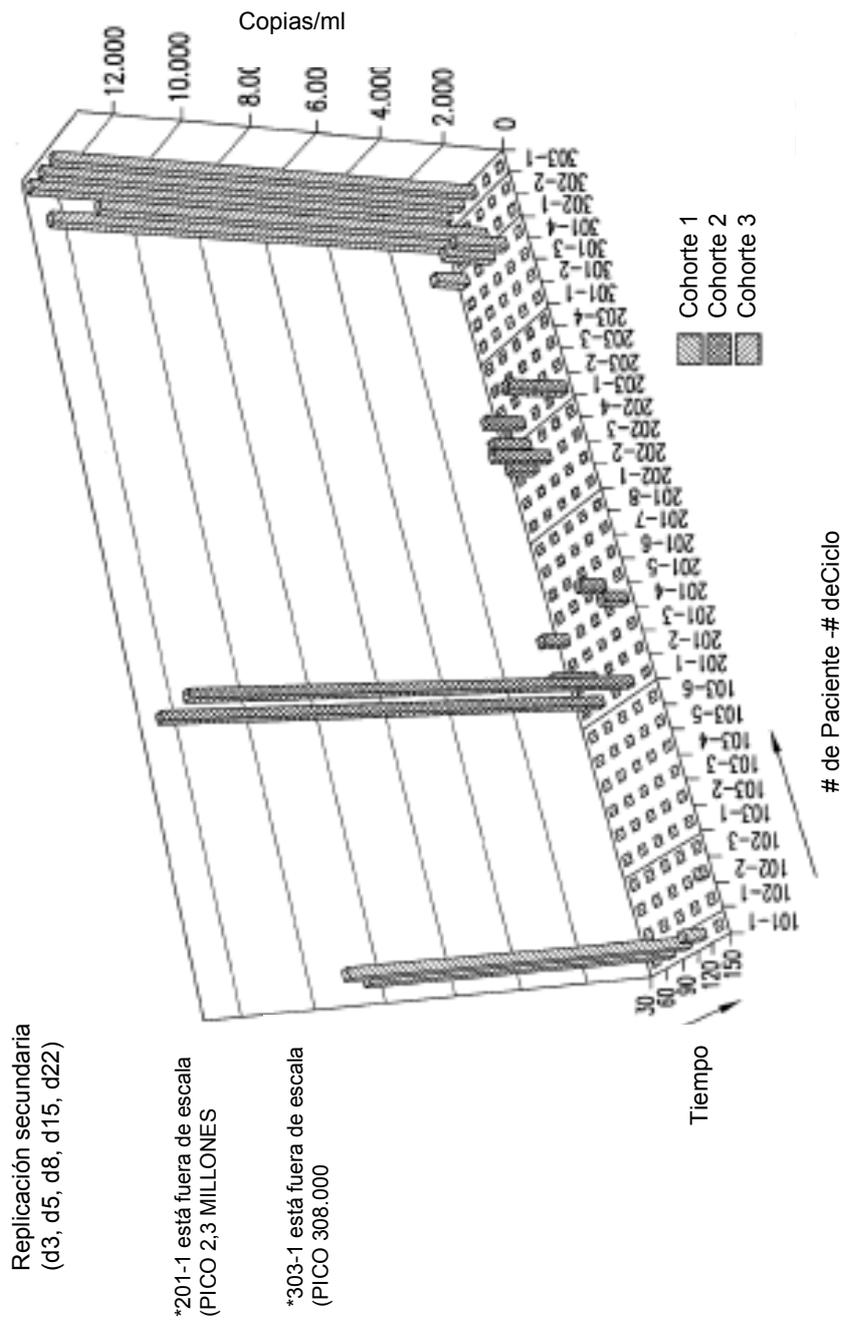


FIGURA 10

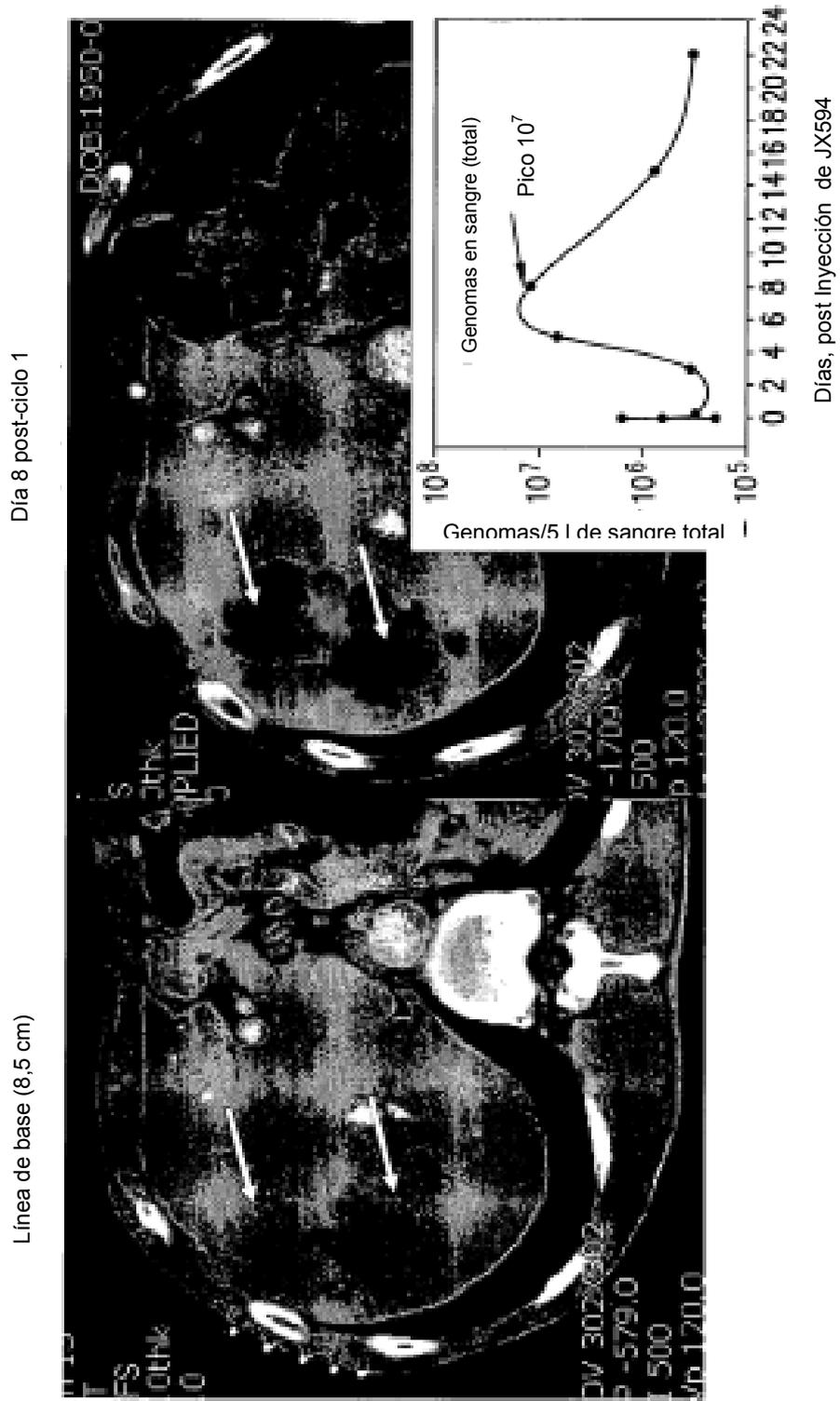


FIGURA 11

SD a 4 meses

SD a 6 meses

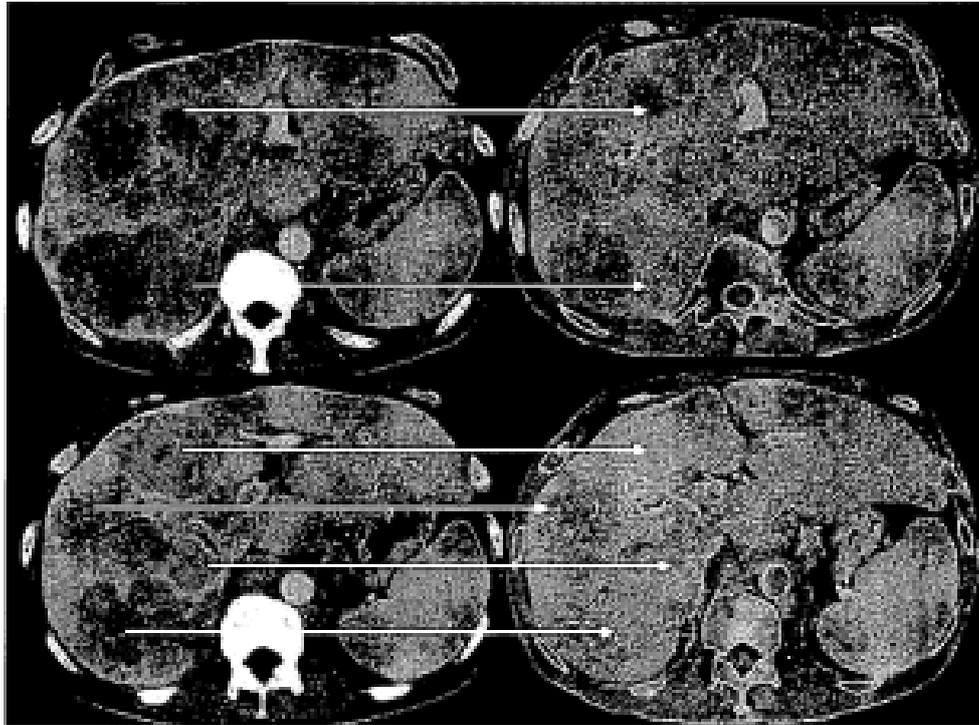
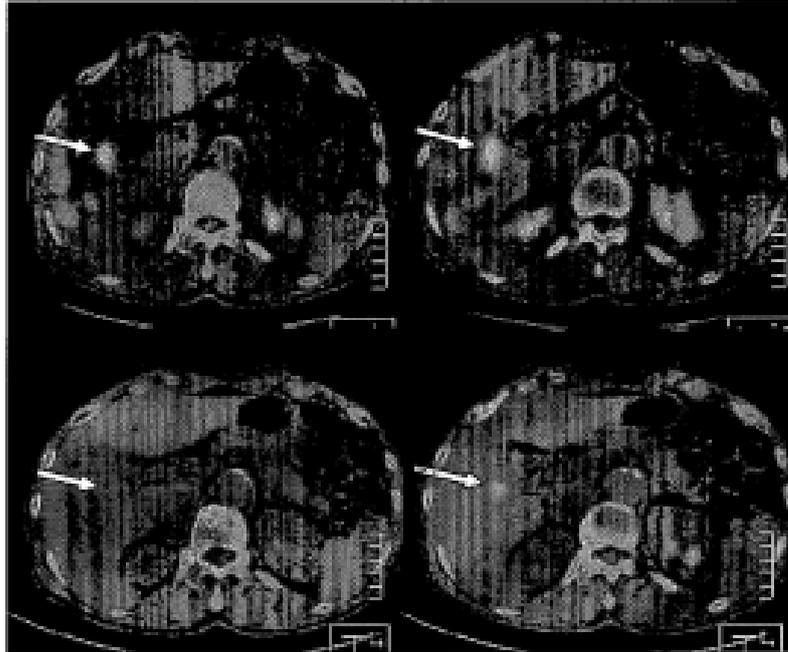


FIGURA 12

Línea de base



Ciclo 2, día 22

FIGURA 13

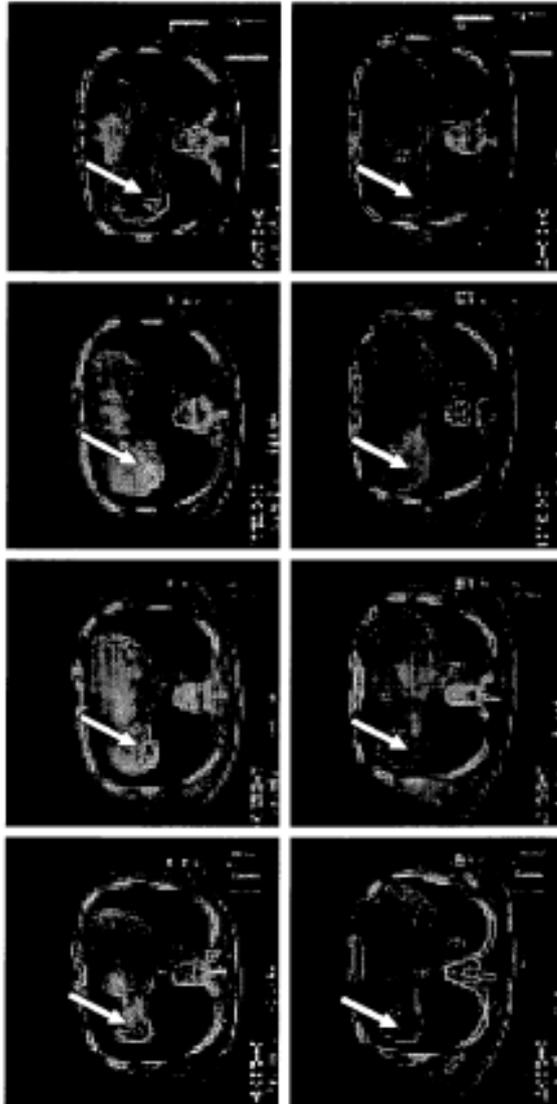


FIGURA 14

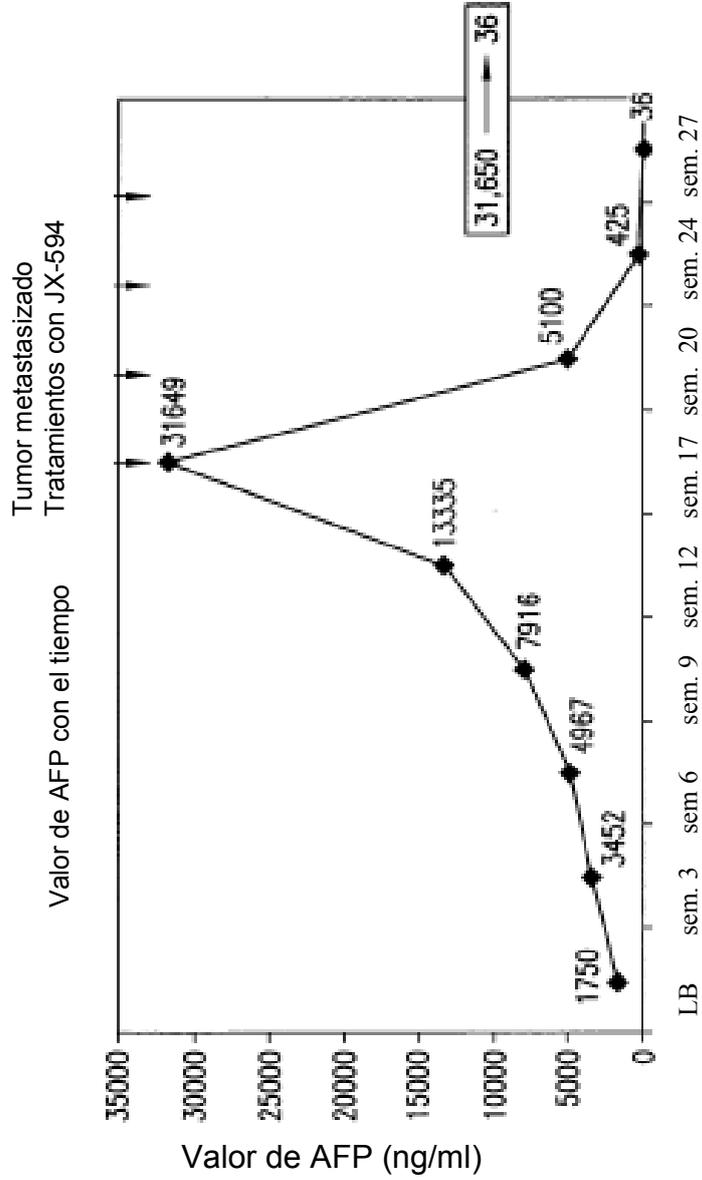


FIGURA 15

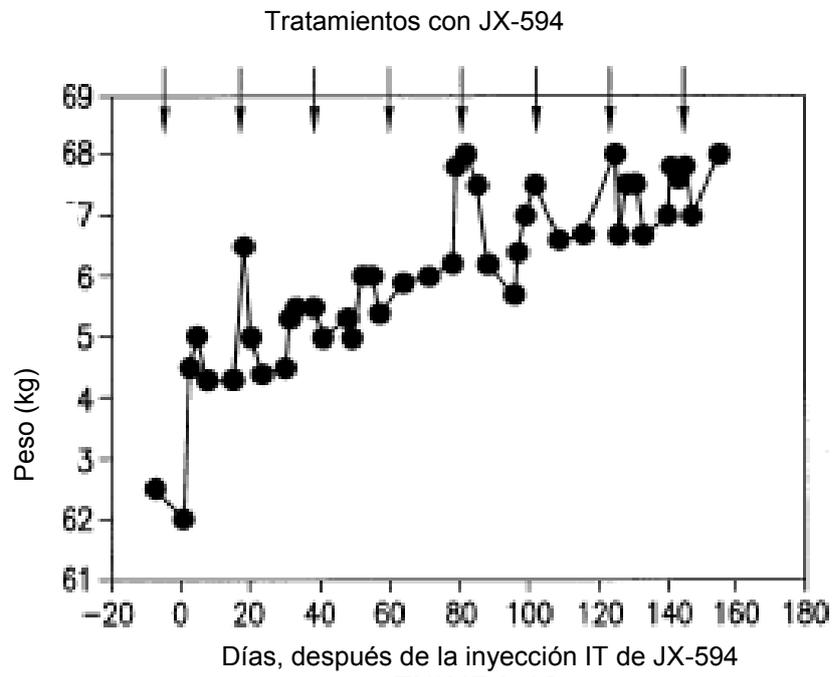
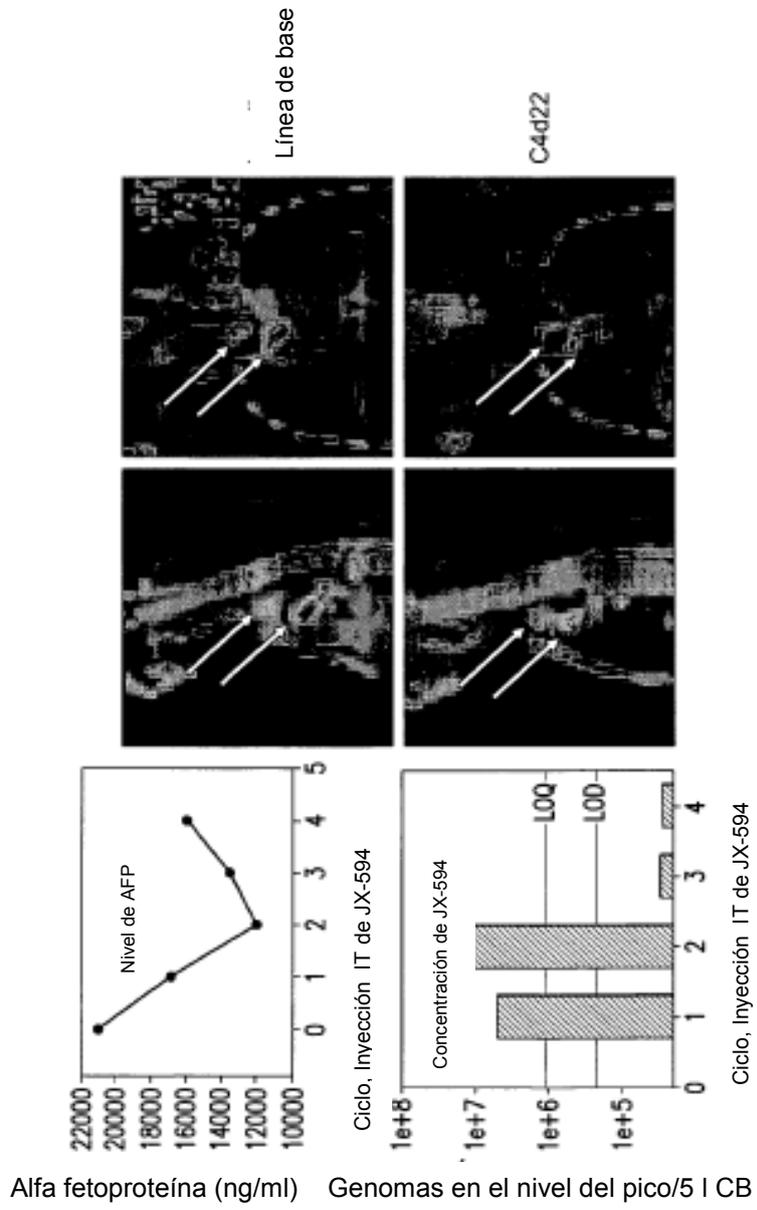


FIGURA 16



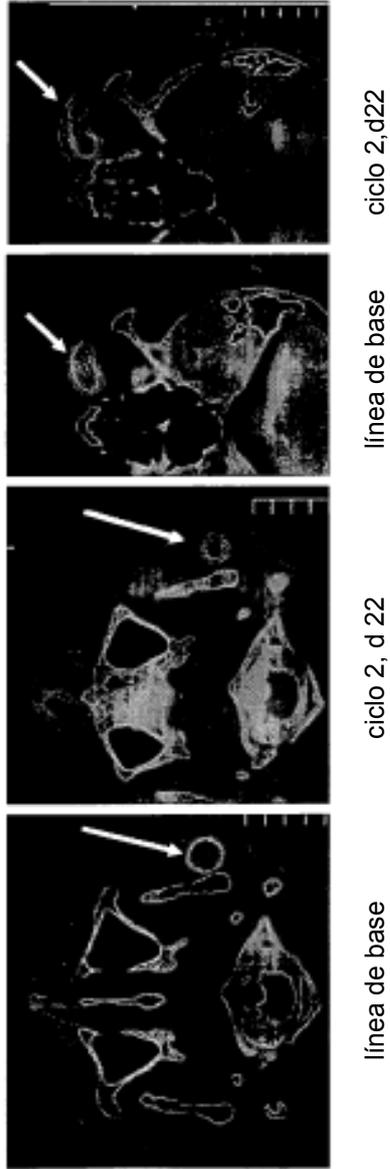


FIGURA 18

ID del paciente	# de Ciclos	Datos de eficacia L (sitio de la inyección); D (distante)	Días de supervivencia post -tratamiento (meses)
101 (gástrico)	1	L-apagado vascular agudo; necrosis (respuesta n.a.)	54
102 (CRC)	3	L-SD (TTP - 2 meses)	247 (8,2)
103 (del tinfo)	6 (2 HAI)	L-PR (área disminuida 70% - 5+ meses D - TTP (nuevos tumores) 4 meses)	280+ (9,5+)
201 (HCC)	8	L-cuello: PR (área disminuida 70% - 4+ meses); PET(-); hígado: PET disminuido, SD (8+ meses) D - nuevo tumor de cuello - PET cerca de CR post-IT AFP disminuido 99,9% (>30.000 a 36)	263+ (8,75+)
202 (escam. pulmón)	4	L - SD (8+ meses) D - nuevo tumor de cuello 6 meses (CR con XRT)	250+ (8,3+)
203 (HCC)	5	L - AFP disminuido 40% - SD: TTP 4 meses D - PET disminuido	134 (4,5)
301 (RCC)	4	L - SD - 4+ meses -D-PD (tumor de 12 cm)	138+ (4,6+)
302 (CRC)	4+	L - SD 3+ meses (CEA SD 3+)	87+ (3+)
304 (melanoma)	2+	L - PET disminuido D - PET disminuido	51+ (1,7+)

FIGURA 19

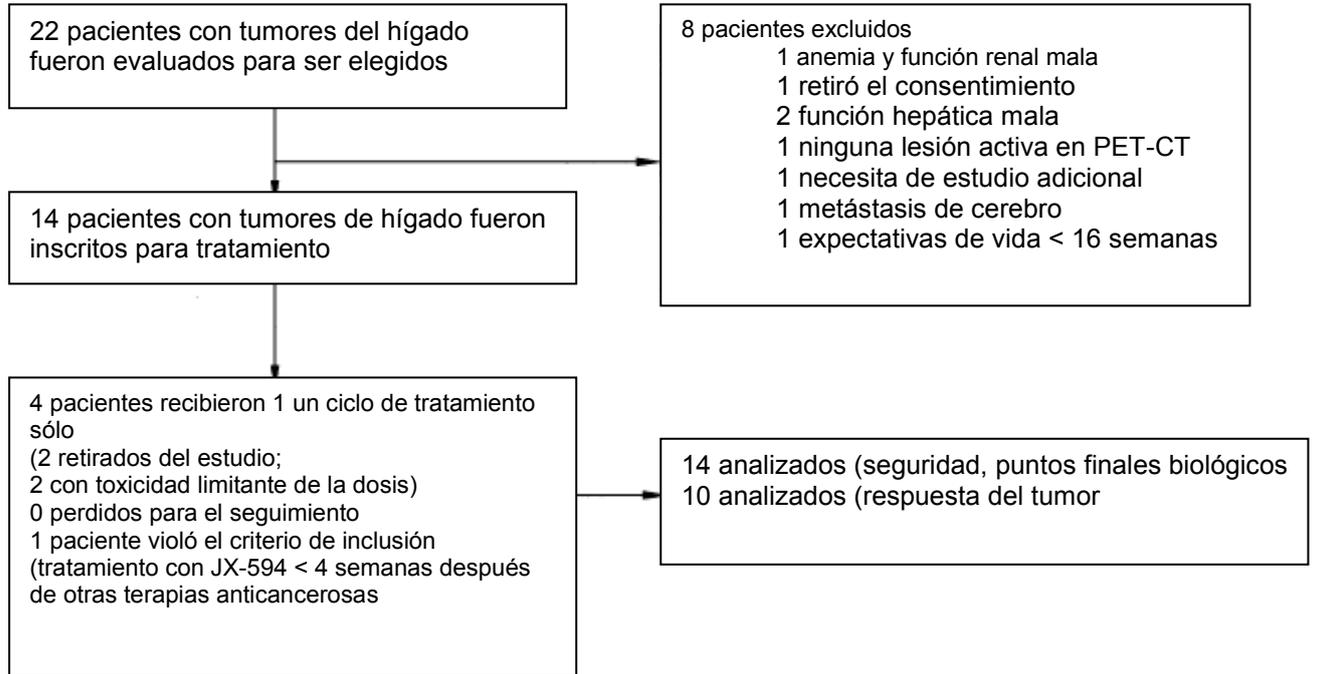


FIGURA 20

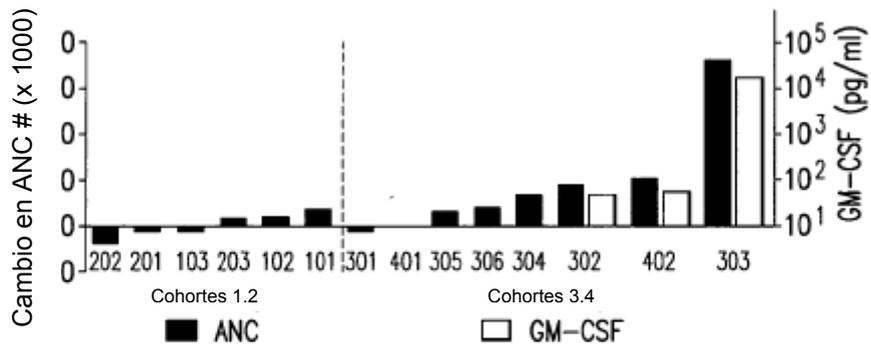


FIGURA 21A

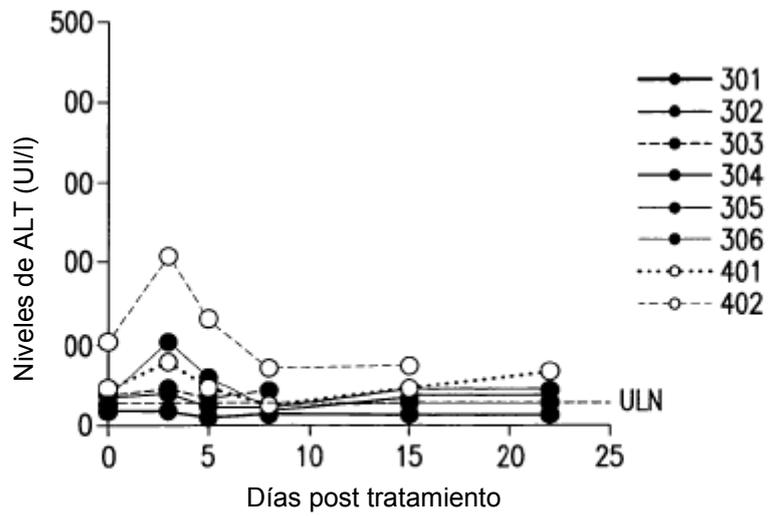
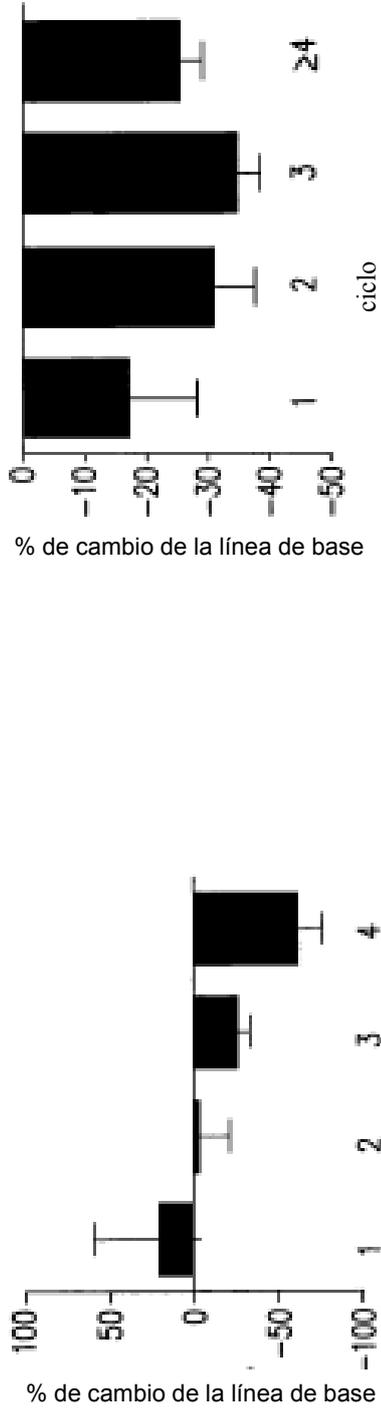
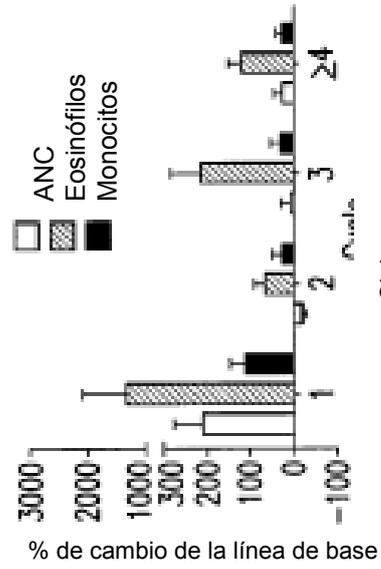


FIGURA 21B



Cohorte
FIGURA 22A

FIGURA 22B



Ciclo
FIGURA 22C

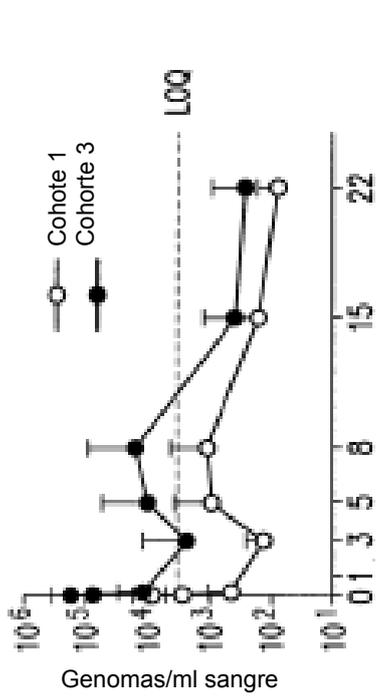


FIGURA 23 B

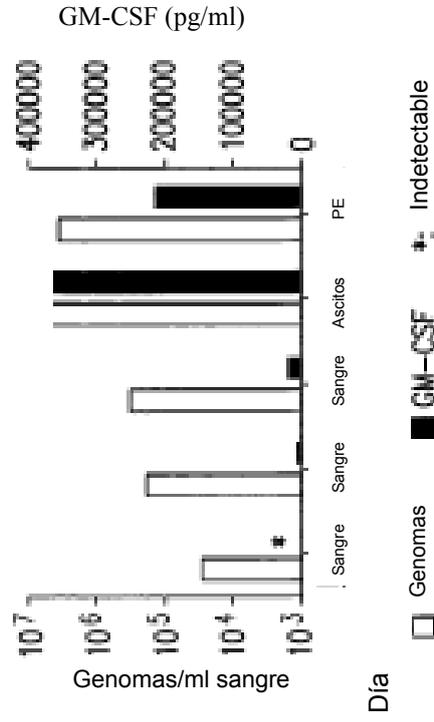


FIGURA 23 D

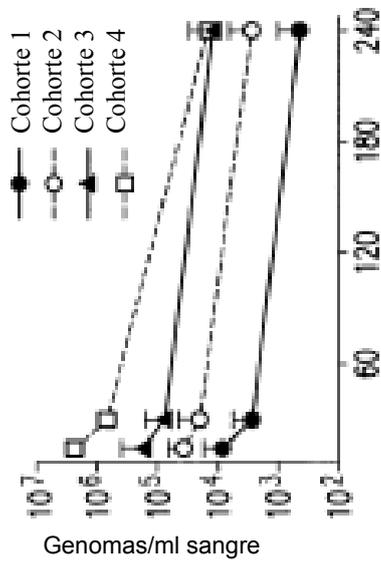


FIGURA 23 A

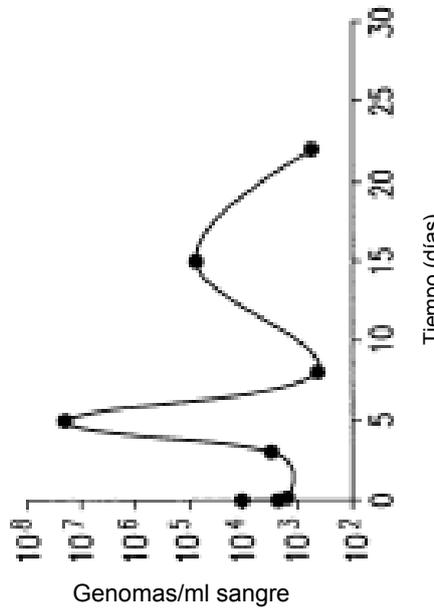
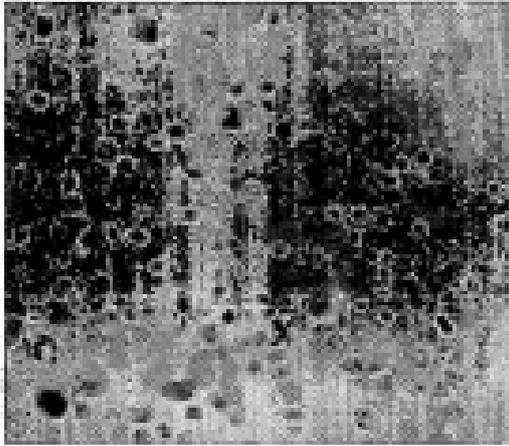


FIGURA 23 C



Efusión pleural

Figura 23 E

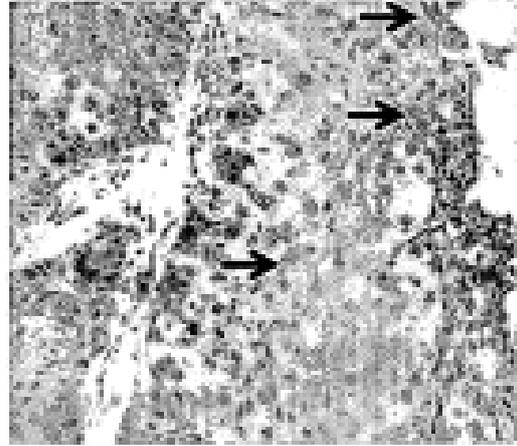


Figura 23 F

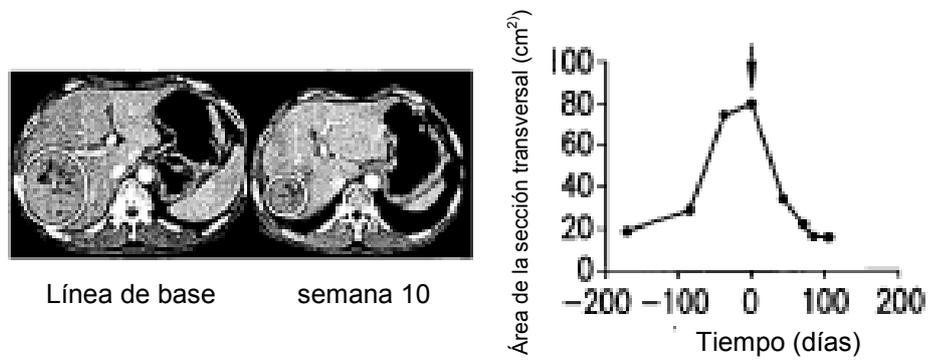


FIGURA 24A

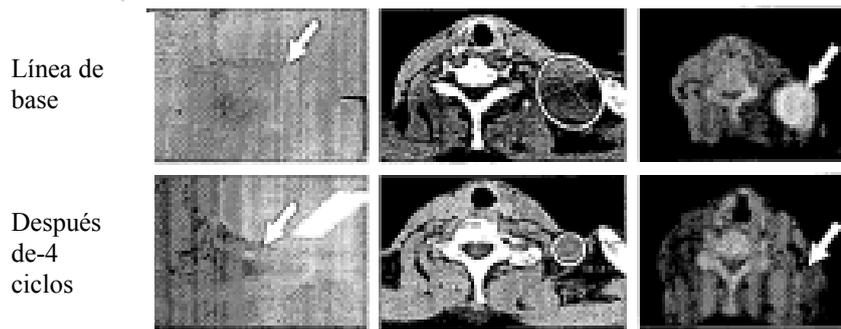


FIGURA 24B