

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 198**

51 Int. Cl.:

A61K 35/768 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2012** **E 12713983 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016** **EP 2696881**

54 Título: **Metapneumovirus aviar en oncólisis**

30 Prioridad:

12.04.2011 EP 11162008

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

01.04.2016

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

SCHRIER, CARLA CHRISTINA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 565 198 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

Metapneumovirus aviar en oncólisis

5 La presente invención se refiere a metapneumovirus aviar (AMPV) para su uso en terapia y a composiciones farmacéuticas que comprenden metapneumovirus aviar (AMPV) para su uso en terapia.

10 Se ha conocido durante varias décadas que algunos virus pueden ser capaces de erradicar tumores. Dichos virus se conocen habitualmente como virus oncolíticos. Aunque el número de tumores oncolíticos es relativamente bajo, se descubren en varios géneros virales. Los miembros oncolíticos de, entre otros, los siguientes géneros son conocidos: adenovirus, herpesvirus, poliomavirus, poxvirus, parvovirus, reovirus, ortomixovirus, paramixovirus, rabdovirus, coronavirus, picornavirus, togavirus y retrovirus. Una reciente mini-revisión de Vaha-Koskela, M. et al., proporciona una visión general de virus oncolíticos en terapia oncológica (Cancer Letters 254: 178-216 (2007)).

15 Un problema afrontado con todos los virus oncolíticos es que, después de la administración de una primera dosis, comienza a desarrollarse la inmunidad contra el virus usado. Además, dadas las impredecibles rutas de diferenciación e indiferenciación en células tumorales, puede ocurrir perfectamente que algunas células tumorales individuales de cierta masa tumoral se vuelvan resistentes para un virus oncolítico usado en una terapia oncológica. Esto puede deberse, por ejemplo al hecho de que dichas células tumorales pierden un receptor para ese virus oncolítico.

20 Aunque solo fuera por estas razones, existe una necesidad de nuevos virus oncolíticos, que pueden usarse cuando se inicia una terapia oncológica o como alternativa cuando otros virus oncolíticos no resultan eficaces en una terapia oncológica.

25 Actualmente se ha descubierto sorprendentemente, que un virus aviar vivo, el virus de la rinotraqueitis del pavo, actualmente conocido también como metapneumovirus aviar (AMPV), inesperadamente presenta efectos oncolíticos sobre células de mamífero.

30 El virus de la rinotraqueitis del pavo (TRT) o metapneumovirus aviar es un miembro del género metapneumovirus dentro de la familia de virus *Paramyxoviridae*. Los metapneumovirus tienen un genoma de ARN monocatenario no segmentado de polaridad antisentido.

35 Dentro de la familia *Paramyxoviridae*, hasta ahora, se sabía que cuatro géneros de virus comprenden un miembro oncolítico: un miembros dentro del género Avulavirus (virus de la enfermedad de Newcastle), uno dentro del género Morbillivirus (cepas de sarampión específicas), uno dentro del género Respirivirus (virus Sendai) y uno dentro del género Rubulavirus (virus de las paperas).

Hasta ahora no se sabía ni se sospechaba que el género metapneumovirus de la familia *Paramyxoviridae* tiene un miembro que muestra propiedades oncolíticas.

40 El género metapneumovirus tiene dos miembros, uno que es AMPV mencionado anteriormente, el otro miembro es metapneumovirus humano (HMPV). Ambos virus causan enfermedad de las vías respiratorias; el HMPV en seres humanos y el AMPV en aves de corral.

45 Es la proteína de fusión (F) de metapneumovirus la que es responsable de la diferencia de tropismo. Ha sido demostrado de forma convincente por De Graaf et al., que el HMPV no es capaz de infectar a aves de corral. Y viceversa, no se ha notificado nunca que el AMPV cause enfermedad o ni siquiera cualesquiera síntomas clínicos en mamíferos. (De Graaf M., et al., J. Gen. Virol. 90: 1408-1416 (2009))

Además, no se ha descrito ningún efecto antitumoral para HMPV ni para AMPV.

50 El AMPV vivo destruye selectivamente células tumorales de mamífero pero no células diferenciadas normales de mamífero y células proliferantes normales de mamífero a la misma dosis. Esta característica de destruir selectivamente células tumorales de mamífero se denominará, además, un efecto antitumoral.

55 Un efecto antitumoral significa que células individuales de un tumor son destruidas por el virus, fuera cual fuera el modo de acción. Los virus pueden tener, por ejemplo, un efecto antitumoral sobre células, dado que son líticos para estas células: se cree que las cepas de virus líticos dañan la membrana plasmática de células infectadas. Otra forma de un efecto antitumoral se observa, por ejemplo, con virus no líticos; estos parecen interferir en el metabolismo de la célula y causar la muerte de la célula debido a este modo de acción. El efecto antitumoral de AMPV hace al virus muy adecuado para su uso en terapia oncológica.

60 Por lo tanto, una primera realización de la presente invención se refiere a un metapneumovirus aviar (AMPV) vivo para su uso en terapia oncológica en un mamífero.

Preferentemente, el AMPV se usa en terapia oncológica contra cáncer de mama, de pulmón, de próstata, glioblastoma, fibrosarcoma, de ovario, de cuello del útero, de vejiga o de colon o contra melanoma.

65

Más preferentemente, el AMPV se usa en terapia oncológica contra cáncer de colon.

Para tener un efecto antitumoral, el virus AMP tiene que ser administrado en una cantidad que es citotóxica para células tumorales. Esta cantidad se denomina una cantidad citotóxica. Por lo tanto, la cantidad citotóxica de AMPV es la cantidad de virus necesaria para la inducción de la muerte de células tumorales.

En teoría, un AMPV puede infectar y destruir una célula tumoral. De este modo, la cantidad citotóxica de AMPV necesaria para la inducción de muerte de células tumorales sería un virus por célula. En un entorno práctico, sin embargo, se administraría una cantidad que es una mucho mayor que el número de células tumorales a infectar.

No obstante, serían necesarias cantidades muy bajas de virus para inducir un efecto antitumoral. Cantidades de 10^3 unidades formadoras de placa (ufp) de virus por dosis ya serían suficientes para atacar bajas cantidades de células tumorales. Por lo tanto, para muchos fines prácticos, una cantidad de tan solo 10^3 ufp de virus ya podría considerarse como una cantidad citotóxica.

Sin embargo, estará claro que si la cantidad de virus administrada es tan baja que solamente unas pocas células tumorales son infectadas, pasará algún tiempo antes de que la primera serie de infección haya causado virus de nueva descendencia que sea capaz de infectar células tumorales adicionales. Lo mismo es cierto para subsiguientes series de replicación, y, mientras tanto, se desarrollará una respuesta inmunitaria contra el virus e interferirá con el virus. Por lo tanto, preferentemente cantidades más elevadas de virus se administrarían de una vez. En ese caso, muchas células tumorales se volverán infectadas al mismo tiempo y, de este modo, muchas células tumorales se volverán infectadas antes de que se desarrolle inmunidad contra el virus.

Los efectos muy leves o incluso ausentes del virus sobre células no tumorales en mamíferos permiten que dichas dosis relativamente altas se administren. De este modo, aunque dosis en el amplio intervalo de 10^3 a 10^{12} ufp serían dosis aceptables, dosis en el intervalo de 10^6 y 10^{12} ufp serán dosis preferidas para la mayoría de aplicaciones que se beneficiarían de una elevada cantidad de virus. Dosis en el intervalo de 10^9 a 10^{12} ufp serían más preferidas.

Otra realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en terapia oncológica en un mamífero, caracterizada por que dicha composición farmacéutica comprende una cantidad citotóxica de metapneumovirus aviar (AMPV) vivo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El concepto de un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se explica en otra parte (véase a continuación).

Especialmente cuando un tumor es un tumor sólido que ha alcanzado un grosor de varias capas de células, las capas internas pueden no estar expuestas directamente al ataque viral. Estos es especialmente cierto para tumores con un nivel bajo de vascularización. Por lo tanto, es importante que el virus de descendencia que se origina a partir de células tumorales destruidas, o virus recién administrado, esté disponible para la infección de capas celulares más profundas dentro del tumor después de que las capas celulares superiores son destruidas.

Por esta razón, y en vista de que más pronto o más tarde se desarrollará una respuesta inmunitaria contra el AMPV, podría ser beneficioso administrar agentes inmunosupresores a un paciente, antes y/o durante el tratamiento con AMPV. Esto podría posponer o suprimir una respuesta inmunitaria contra el virus, de modo que subsiguientes series de infección puedan tener lugar hasta que todas las células tumorales susceptibles sean destruidas. Los agentes inmunosupresores son ampliamente conocidos en la técnica. Son ejemplos de dichos agentes inmunosupresores, entre otros: glucocorticoides que inhiben genes que codifican interleuquinas y $\text{TNF-}\gamma$; citostáticos tales como metotrexato y azatriopina; anticuerpos dirigidos contra CD25 y CD3 tales como Dactinomicina; fármacos que actúan sobre inmunofilinas tales como ciclosporina y tacrolimus; y otros fármacos tales como interferones, opioides, proteínas de unión a TNF, micofenolato y pequeños agentes biológicos tales como fingolimod y miriocina. El uso de dichos agentes inmunosupresores estaría indicado por los proveedores de estos agentes.

Por lo tanto, una forma preferida de esta realización se refiere a una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, caracterizada por que dicha composición comprende además un agente inmunosupresor.

Los agentes inmunosupresores pueden administrarse una vez, pero también pueden administrarse en dosis repetidas durante un periodo más largo, por ejemplo para mantener el efecto inmunosupresor a lo largo del tiempo.

Por lo tanto, una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, independientemente de si comprende un agente inmunosupresor o no, se administra preferentemente a mamíferos que están sometidos a un tratamiento con un agente inmunosupresor.

Tal como se ha mencionado anteriormente, sin la administración de agentes inmunosupresores, más pronto o más tarde se desarrollará una respuesta inmunitaria contra AMPV, lo que tiene consecuencias negativas para la posibilidad de infectar células que no fueron infectadas por el virus en una primera serie de infección. Este problema puede evitarse en una vía alternativa a través de la administración de otro virus (ahora no AMP) que tiene un efecto antitumoral (para ejemplos, véase anteriormente). Dichos virus no estarían bloqueados por una respuesta inmunitaria contra AMPV.

Preferentemente, el intervalo de tiempo entre la administración de AMPV y un AMPV (o un no AMPV y AMPV, véase a continuación) estará entre 2 y 56 semanas. El periodo de 2-56 semanas entre la administración del primer y el segundo virus tiene la siguiente base lógica: algunos tumores son de crecimiento rápido, mientras que otros tumores, o incluso células tumorales metastásicas pueden ser de crecimiento lento o incluso ser "latentes" durante bastante tiempo. Por lo tanto, dependiendo de las características del tumor, podría ser beneficioso administrar un segundo virus antes o después en el tiempo. En muchos casos, el periodo entre la administración del primer y el segundo virus sería más corto, dado que el tiempo de "latencia" es menor de 56 semanas. Y además, se podría desear evitar un riesgo de excrecencia más temprana de células. Por lo tanto, un periodo preferido sería de entre 2 y 28 semanas, más preferido entre 2-20, 2-16, 2-12 o incluso 2-8 semanas en ese orden de preferencia.

Por lo tanto, otra forma de esta realización se refiere a una composición farmacéutica para su uso en terapia oncológica en un mamífero de acuerdo con la invención, caracterizada por que dicha terapia oncológica comprende la etapa de administrar una cantidad citotóxica de AMPV vivo a dicho mamífero, seguida por la etapa de administrar una cantidad citotóxica de un no AMPV a dicho mamífero en el plazo de 2-56 semanas de dicha administración de una cantidad citotóxica de AMPV vivo.

Está claro que este uso en terapia oncológica puede aplicarse, realizando los cambios necesarios, también a animales que han sido tratados antes con un no AMPV. Dicho uso se aplicaría a una terapia que comprende la etapa de administrar una cantidad citotóxica de AMPV vivo en el plazo de 2-56 semanas después de la administración de una cantidad citotóxica de un no AMPV.

Por lo tanto, de nuevo otra forma de esta realización se refiere a una composición farmacéutica para su uso en terapia oncológica en un mamífero de acuerdo con la invención, caracterizada por que dicha terapia oncológica comprende la etapa de administrar una cantidad citotóxica de AMPV vivo a dicho mamífero en el plazo de 2-56 semanas después de la etapa de administrar una cantidad citotóxica de un no AMPV a dicho mamífero.

De los virus no AMP oncolíticos mencionados anteriormente, el virus usado más frecuentemente en terapia oncológica es otro paramixovirus citotóxico, el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). A continuación se proporciona una amplia orientación para el uso de NDV.

Por lo tanto, en una realización preferida, el no AMPV es NDV.

Además del uso de agentes inmunosupresores y el uso de otros virus (no AMPV) citotóxicos antes de o adyacente al uso de AMPV, existen varios enfoques para mejorar la administración de virus a células tumorales. Un enfoque es el pretratamiento de tejido tumoral con compuestos tales como enzimas proteolíticas por ejemplo hialuronidasa y colagenasa. (McKee, T.D. et al, Cancer Res. 66: 2509-2513 (2006), Cairns, R. et al., Mol. Cancer Res. 4: 61-70 (2006), Minchinton, A.I. et al., Nat. Rev. Cancer 6: 583-592 (2006)).

Otro enfoque para incrementar la permeabilidad hematotumoral es a través de la administración de compuestos vaso-activos o vaso-normalizantes tales como bradiquinina, paclitaxel o leucotrienos.

El uso de dichos compuestos estaría indicado por los proveedores de los compuestos.

Dicho tratamiento facilita la penetración del virus y, por lo tanto, la administración del virus a las células tumorales.

Dichos compuestos se denominan además compuestos que mejoran la administración del virus.

Por lo tanto, otra forma preferida de esta realización se refiere a una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, caracterizada por que dicha composición comprende además un compuesto que mejora la administración del virus.

Además, se han propuesto métodos que dependen de métodos físicos que mejoran la administración del virus, por ejemplo incrementando la oxigenación de tumores como una manera de incrementar la permeabilidad hematotumoral. Dichos métodos dependen, por ejemplo, de la inhalación de gas hiperóxico o hipertermia local. Dichos métodos se denominan además métodos que mejoran la administración del virus.

Compuestos que mejoran la administración del virus pueden administrarse una vez, pero también pueden administrarse en dosis repetidas durante un periodo más largo, por ejemplo para mantener el efecto a lo largo del tiempo.

Por lo tanto, una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, independientemente de si comprende un compuesto que mejora o no la administración del virus, se administra preferentemente a mamíferos que están sometidos a un tratamiento con un compuesto que mejora la administración del virus.

Igualmente, pueden aplicarse métodos que mejoran la administración del virus a un mamífero durante un periodo de tiempo prolongado.

Por lo tanto, una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, independientemente de si comprende o no un compuesto que mejora la administración del virus, se administra preferentemente a mamíferos que están sometidos a un tratamiento con un método que mejora la administración del virus.

Otro enfoque que puede aplicarse con éxito en combinación con el tratamiento con AMPV de acuerdo con la invención es el enfoque más clásico de usar compuestos citostáticos. Dichos compuestos son bien conocidos en la técnica y comprenden agentes alquilantes, tales como, clorambucilo e ifosfamida, antimetabolitos, tales como, mercaptopurina, alcaloides y terpenoides vegetales, tales como, vincristina, podofilotoxina y tannanos, e inhibidores de topoisomerasa, tales como, irinotecán y amsacrina. Y como es cierto para los agentes inmunosupresores, enzimas y compuestos mencionados anteriormente, el uso de dichas enzimas o compuestos estaría indicado por los proveedores de los compuestos citostáticos.

Por lo tanto, de nuevo otra forma preferida de esta realización, se refiere a una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, caracterizada por que dicha composición comprende además un compuesto citostático.

Los agentes citostáticos pueden administrarse una vez, pero también pueden administrarse en dosis repetidas durante un periodo de tiempo más largo, por ejemplo, para mantener el efecto citostático a lo largo del tiempo.

Por lo tanto, una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, independientemente de si comprende o no un agente citostático, se administra preferentemente a mamíferos que están sometidos a un tratamiento con un compuesto citostático.

Con respecto a la naturaleza del mamífero, puede decirse lo siguiente: huelga decir que el uso de la presente invención para terapia oncológica es muy adecuado para seres humanos. El uso en mamíferos no humanos, es decir para aplicación veterinaria sería, entre otras, por razones económicas especialmente aplicable en animales de compañía tales como especies equinas, caninas o felinas.

Por lo tanto, otra realización preferida se refiere a una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, caracterizada por que el mamífero pertenece a una especie humana, equina, canina o felina.

Con respecto a la vía o el punto de administración, en principio, el virus puede administrarse por vía oral, por inhalación y mediante aplicación sistémica. La aplicación sistémica incluye administración intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, intravenosa e intra- o peritumoral.

Para tumores en las vías respiratorias, la vía intravenosa y la vía por inhalación serían las vías preferidas.

Para la mayoría de los demás tumores, la administración intravenosa y/o intra- y/o peritumoral sería el método de elección preferido.

Por lo tanto, otra forma preferida de esta realización se refiere a una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, caracterizada por que el punto de administración de dicha composición farmacéutica es intratumoral. La administración intratumoral es administración al interior de la masa del tumor.

De nuevo otra forma preferida de esta realización se refiere a una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, caracterizada por que el punto de administración de dicha composición farmacéutica es peritumoral. La administración peritumoral es administración alrededor de la masa del tumor.

Además, otra forma preferida de esta realización se refiere a una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, caracterizada por que el punto de administración de dicha composición farmacéutica es intravenoso.

Otra forma preferida más de esta realización se refiere a una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención, caracterizada por que la vía de administración de dicha composición farmacéutica es por inhalación.

El amplio conocimiento que existe en la técnica con respecto a la administración de otro paramixovirus citotóxico, el virus de la en el presente documento de Newcastle (NDV) debe proporcionar también al experto en la materia amplia orientación. Simplemente como ejemplos de la técnica, se proporciona la siguiente visión de conjunto:

En estudios en animales, la infección por NDV se ha conseguido mediante, entre otras, vía intratumoral, intraperitoneal e intravenosa tal como se revisa en Schirmacher V., Griesbach A., Ahlert T., Int. J. Oncol. 18: 945-52. La infección por NDV a través de la vía intramuscular o subcutánea ha sido revisada por, entre otros, Heicappell R., Schirmacher V., von Hoegen P., et al., Int. J. Cancer 37: 569-577 (1986). En estudios en humanos, en casos en los que pacientes han sido infectados con una cepa lítica de NDV, se ha usado inyección intratumoral, intravenosa o intramuscular (Cassel W.A., Garrett R.E., Cancer 18: 863-868 (1965), Csatory L.K., Moss R.W., Beuth J., et al. Anticancer Res. 19: 635-638 (1999), Pecora A.L., Rizvi N., Cohen G.I., et al., J. Clin. Oncol. 20: 2251-2266 (2002), Csatory L.K., Bakács T., JAMA 281: 1588-1589 (1999), Wheelock E.F., Dingle J.H., N. Engl. J. Med. 271: 645-651 (1964), Csatory L.K., Lancet 2 (7728): 825 (1971). También se usan las siguientes vías: inhalación e inyección directa en el colon (es decir, mediante una abertura de colostomía). (Csatory L.K., Moss R.W., Beuth J., et al. Anticancer Res. 19: 635-638 (1999), Csatory L.K., Eckhardt S., Bukosza I., et al., Cancer Detect. Prev. 17: 619-27 (1993)).

La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención debe comprender, en principio, el AMPV en un vehículo farmacéuticamente aceptable, para permitir la administración del AMPV.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende ayudar a la administración eficaz de un compuesto, sin causar efectos adversos (graves) para la salud del animal al que se le administra. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, agua estéril o una solución salina fisiológica estéril. En una forma más compleja, el vehículo puede ser, por ejemplo, un tampón, que puede comprender aditivos adicionales, tales como estabilizantes o conservantes. La naturaleza del vehículo depende, entre otras, de la vía de administración. Si la vía de administración es por inhalación, el vehículo podría ser tan sencillo como agua estéril, una solución salina fisiológica o un tampón. Si la vía preferida es inyección, el vehículo debe ser preferentemente isotónico y tener restricciones de pH que le hagan adecuado para inyección. Dichos vehículos son, sin embargo, ampliamente conocidos en la técnica.

Detalles y ejemplos se describen, por ejemplo, en manuales bien conocidos por ejemplo: tales como: "Remington: the science and practice of pharmacy" (2000, Lippincot, EE. UU., ISBN: 683306472). Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables útiles en la presente invención incluyen estabilizantes tales como SPGA, carbohidratos (por ejemplo sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrina), proteínas albúmina o caseína, agentes que contienen proteínas tales como suero bovino o leche desnatada y tampones (por ejemplo tampón fosfato). Preferentemente, el estabilizante está libre de compuestos de origen animal, o incluso químicamente definido, tal como se desvela en el documento WO 2006/094.974. Especialmente cuando se añaden dichos estabilizantes a la composición farmacéutica, la composición farmacéutica es muy adecuada para liofilización. La liofilización es un método muy adecuado para impedir la inactivación del AMPV. Por lo tanto, en una forma más preferida, composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención están en una forma liofilizada.

Leyenda de las figuras:

Figura 1: Manifestaciones de lisis celular después de la infección con TRT.

Imágenes representativas de poblaciones celulares.

Foto a-c: células CIPp, foto tomada a los 7 días después de la infección.

Foto d-f: células HMPOS, foto tomada a los 3 días después de la infección.

Foto g-i: células Mel-T4, foto tomada a los 3 días después de la infección.

Las células en a, d, g fueron células infectadas de forma simulada, las células en b, e, h fueron infectadas con una multiplicidad de infección (MDI) de 0,1, células en c, f, i fueron infectadas con una MDI de 1.

Ejemplos

Ejemplo 1.

Cultivo celular:

Línea celular de cáncer de colon humano LS 174T con número de clasificación de la ATCC CL188 se cultivaron de acuerdo con las instrucciones facilitadas por la ATCC hasta semiconfluencia.

Pretratamiento de virus:

Se realizaron infecciones con suspensiones del virus TRT en medio de cultivo celular que se pretrataron con tripsina de la siguiente manera: Se añadieron 10 USP TU/ml de tripsina a las suspensiones de virus y la mezcla se incubó durante 30 minutos. Para inhibir la actividad de tripsina, se añadió FBS al 10 % (Biochrome AG) a la suspensión de virus.

Infección de la línea celular de cáncer de colon humano LS 174T:

Se retiró medio de cultivo celular de las células CL188 y se añadieron suspensiones de virus de 1 ml a una multiplicidad de infección (MDI) de 0,1 y MDI 0,01. Después de 1 hora de incubación en condiciones de cultivo tisular (37 °C, 5 % CO₂), se añadieron 4 ml de medio de cultivo titular completo, que comprende suero fetal de ternero al 10 %, cantidades estándar de neomicina, pima fusina y tilosina tal como se usan generalmente en cultivo celular y 2 ug/ml de Fungizone (Gibco) y las células se mantuvieron en condiciones de cultivo tisular durante 3 días. A continuación, el sobrenadante celular se recogió y se almacenó a -70 °C. Se añadió medio de cultivo tisular completo fresco a las células y a los 7 días después de la infección, los sobrenadantes celulares se recogieron. Posteriormente, se añadió 1 ml PBS-rojo a las células, que a continuación se rasparon para desprenderlas de la superficie de cultivo celular. Finalmente, se determinaron los títulos del virus (Log₁₀ TCID₅₀/ml) del inoculado, tanto recolecciones de sobrenadante celular como células recogidas.

Resultados

La tabla 1 muestra los títulos de TRT (Log₁₀ TCID₅₀/ml) del inoculado, los sobrenadantes celulares a los 3 y 7 días después de la inoculación y las células recogidas.

Tabla 1: títulos del virus TRT.

<i>Log10 TCID₅₀/ml</i>	MDI 0,1	MDI 0,01	Contr. neg.
inoculado	5,2	3,4	
sobrenadante 3dpi	3,3	2,3	
sobrenadante 7dpi	3,1	1,8	0,0
células 7dpi	4,6	3,5	0,0

Los títulos del virus se usaron a continuación para determinar si había tenido lugar replicación del virus en el transcurso de la infección. Para ese fin, se calcularon las cantidades absolutas de virus presentes en el inoculado, los sobrenadantes celulares y la recolección celular. Para los sobrenadantes celulares, esta cantidad se corrigió para el volumen de los sobrenadantes (5 ml). La suma de las cantidades virales en los sobrenadantes celulares a los 3 y 7 días después de la infección se añadió a la cantidad de virus en las células a los 7 días después de la infección. Esta cantidad viral total se dividió por la cantidad de virus en el inoculado. Un factor de replicación de >1 indica que la amplificación viral ha tenido lugar (Tabla 2).

Tabla 2: replicación de TRT

<i>Cantidades virales absolutas (volúmenes corregidos)</i>	MDI 0,1	MDI 0,01	ml
inoculado	158489	2512	1
sobrenadante 3dpi	9976	998	5
sobrenadante 7dpi	6295	315	5
células 7dpi	39811	3162	1
Virus totales (susp + células)	56082	4475	
Factor de replicación	0,35	1,78	

Conclusión

La infección de células de cáncer de colon humano CL188 con TRT a una MDI de 0,01 da como resultado replicación viral. La infección a una MDI de 0,1 no permitió replicarse al virus.

Ejemplo 2.

Para investigar el efecto citolítico del virus de la rinotraqueítis del pavo (TRT) sobre células tumorales caninas, se infectaron tres líneas celulares con TRT a dos multiplicidades de infección (MDI). Las células no infectadas sirvieron como control negativo. La aparición de lisis celular se monitorizó y se puntuó mediante microscopía a partir de 3 días después de la infección durante 5 días consecutivos.

Materiales

Líneas celulares:

- CIPp: Células de carcinoma mamario canino, derivadas de una lesión primaria, mantenidas en DMEM/F12, suplementado con suero fetal bovino al (FBS) 10 %, piruvato sódico y L-glutamina. Origen: Prof. Nobuo Sasaki, Laboratorio de Cirugía Veterinaria, Escuela de Posgrado de Ciencias Agrícolas y de la Vida, Universidad de Tokio, Japón.
- HMPOS: Células de osteosarcoma canino altamente metastásicas, mantenidas en RPMI1640, suplementado con FBS al 10 % y piruvato sódico. Origen: Prof. dr. Jolle Kirpensteijn, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Utrecht, Países Bajos
- Mel-T4: Células de melanoma canino, mantenidas en M199/F10, suplementado con FBS al 10 % y piruvato sódico. Origen: MSD Animal Health, Boxmeer, Países Bajos.
- Virus: Virus de la rinotraqueítis del pavo (TRT), cepa 1194 5,86 ¹⁰log TCID₅₀/ vial

Métodos

Las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos a 6000 células por pocillo (CIPp) o 15000 células por pocillo (HMPOS, Mel-T4). Se permitió a las células adherirse a la placa de cultivo tisular infectada posteriormente a MDI 1 o MDI 0,1 con TRT, diluido en PBS. Las células no infectadas sirvieron como control negativo. Después de 30 minutos, se añadió medio (suplementado con FCS al 4 %) a todos los pocillos, dando como resultado una concentración final de FCS del 2 %. Las células se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 %. A partir de 3 días después de la infección, las células se inspeccionaron visualmente durante 5 días consecutivos en busca de la aparición de lisis celular, usando un microscopio de contraste de fases invertido Olympus CKX41.

Resultados

Se podía observar lisis celular en todas las líneas celulares infectadas, aunque a diversas manifestaciones y grados. En las poblaciones de CIPp infectadas, se observaron células redondeadas. Las células HMPOS infectadas crecieron en agregados, dejando huecos en la monocapa. Las células individuales eran redondeadas. El crecimiento preferencial en agregados y la amplia destrucción de la monocapa también se observó en poblaciones de Mel-T4 infectadas (figura 1).

Se observó que el nivel de lisis celular y la temporización de su inicio eran dependientes tanto de la línea celular como de la MDI. El nivel de lisis celular se incrementaba a lo largo del tiempo. Tal como se muestra en la tabla 1, las células CIPp son las más resistentes a la infección con TRT. El día 5 (MDI 1) o el día 6 (MDI 0,1) los primeros signos de lisis celular se volvieron visibles. El efecto oncolítico de TRT sobre células HMPOS es evidente ya a los 3 días después de la infección a MDI 1. En contraste, la infección a MDI 0,1 no da como resultado lisis celular. Las células Mel-T4 son las más sensibles a la infección con TRT. Se observó lisis celular ya a los 3 días después de la infección a MDI 1. Para células infectadas con MDI 0,1 este efecto se retrasaba un día.

Tabla 1: Incremento gradual de lisis celular en células tumorales caninas infectadas con TRT

	MDI 1	MDI 0,1	Medio	MDI 1	MDI 0,1	Medio	MDI 1	MDI 0,1	Medio
	-	-	-	+	-	-	+	-	-
	-	-	-	++	-	-	++	+	-
	+	-	-	++	-	-	+++	+	-
	++	+	-	++	+/-	-	+++	++	-
	++	+	-	+++	-	-	+++	++	-
-: sin lisis celular, +/-: anomalías secundarias (algunas células redondas, unos pocos agregados celulares), +: lisis celular leve, ++: lisis celular sustancial, +++: lisis celular grave									

Conclusión

El TRT tiene un claro efecto citolítico sobre las líneas celulares tumorales caninas CIPp, HMPOS y Mel-T4. El nivel y la temporización de lisis celular están sujetos a la línea celular en cuestión y la MDI administrada.

REIVINDICACIONES

1. Metapneumovirus aviar (AMPV) vivo para su uso en terapia oncológica en un mamífero.
- 5 2. Composición farmacéutica para su uso en terapia oncológica en un mamífero, **caracterizada por que** dicha composición comprende una cantidad citotóxica de metapneumovirus aviar (AMPV) vivo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada por que** dicha composición comprende además un agente inmunosupresor.
4. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 3, **caracterizada por que** dicho mamífero está sometido a un tratamiento con agentes inmunosupresores.
- 15 5. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada por que** dicha composición comprende además un compuesto citostático.
6. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 5, **caracterizada por que** dicho mamífero está sometido a un tratamiento con un compuesto citostático.
- 20 7. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada por que** dicha composición comprende además un compuesto que mejora la administración del virus.
8. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 2 o 7, **caracterizada por que** dicho mamífero está sometido a un tratamiento con un compuesto y/o un método que mejora la administración del virus.
- 25 9. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada por que** dicha terapia oncológica comprende la etapa de administrar una cantidad citotóxica de AMPV vivo a dicho mamífero, seguida por la etapa de administrar una cantidad citotóxica de un no AMPV vivo a dicho mamífero dentro del plazo de 2-56 semanas desde dicha administración de una cantidad citotóxica de AMPV.
- 30 10. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizada por que** dicha terapia oncológica comprende la etapa de administrar una cantidad citotóxica de AMPV vivo a dicho mamífero dentro del plazo de 2-56 semanas después de la etapa de administrar a dicho mamífero una cantidad citotóxica de un no AMPV.
- 35 11. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-10, **caracterizada por que** el mamífero pertenece a una especie humana, equina, canina o felina.
- 40 12. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-10, **caracterizada por que** el punto de administración de dicha composición farmacéutica es intratumoral.
13. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-10, **caracterizada por que** el punto de administración de dicha composición farmacéutica es peritumoral.
- 45 14. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-10, **caracterizada por que** el punto de administración de dicha composición farmacéutica es intravenoso.
15. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-10, **caracterizada por que** la vía de administración de dicha composición farmacéutica es por inhalación.
- 50

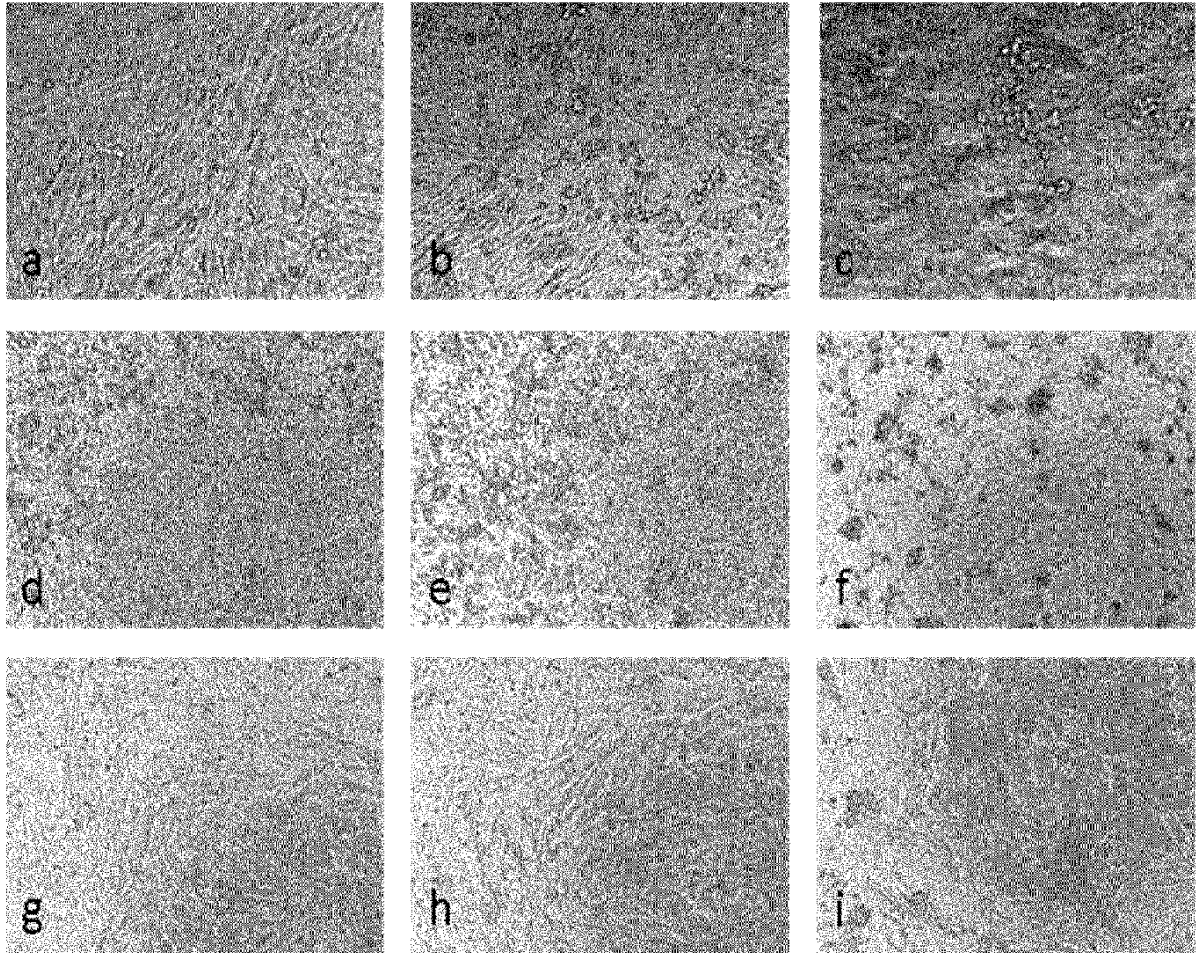


Figura 1