

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 455**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 7/01</b>	(2006.01)
<b>A61K 35/76</b>	(2015.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01)
<b>C07K 14/14</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/86</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/46</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2008 PCT/CA2008/000964**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2008 WO08141448**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2008 E 08748334 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.10.2016 EP 2150613**

54 Título: **Reovirus mutantes y métodos de elaboración y uso**

30 Prioridad:

**21.05.2007 US 939255 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.05.2017**

73 Titular/es:

**ONCOLYTICS BIOTECH, INC. (100.0%)  
Suite 210, 1167 Kensington Crescent N.W.  
Calgary, Alberta T2N 1X7, CA**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 611 455 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

Reovirus mutantes y métodos de elaboración y uso

Antecedentes

5 La capacidad de los reovirus para establecer una infección productiva requiere de proteólisis de la cápsida externa. La proteólisis convierte el virión en una forma mencionada como una partícula de subvirión intermedia (ISVP), la cual tiene la capacidad de penetrar las membranas celulares y por lo tanto nuevamente acceder a los componentes citoplásmicos requeridos para una expresión del gen viral. La proteólisis parcial de un virión de reovirus intacto para generar una ISVP también puede realizarse *in vitro* utilizando una proteasa tal como quimiotripsina o tripsina. Véase, por ejemplo, Golden et al. (2002, J. Virol., 76:7430-43) y Chandran & Nibert (1998, J. Virol., 72:467-75).

10 Resumen

La presente invención se define en y por las reivindicaciones adjuntas. Esta descripción describe reovirus mutantes que carecen o exhiben expresión reducida del polipéptido sigma3 o que carecen de un polipéptido sigma3 funcional. El reovirus mutante descrito aquí también se puede utilizar para generar y propagar las ISVP de manera estable.

15 Se describe un reovirus mutante que comprende una primera mutación que reduce la expresión de un polipéptido sigma3, esencialmente elimina la expresión de un polipéptido sigma3, o resulta en una ausencia de un polipéptido sigma3 funcional. La primera mutación puede estar en un ácido nucleico que codifica el polipéptido sigma3 o en un ácido nucleico que regula la expresión del polipéptido sigma3. En ciertos casos, el ácido nucleico es el gen S4. Las mutaciones representativas incluyen una sustitución modificada por medio de ingeniería genética y una inserción o supresión modificada por medio de ingeniería genética de uno o más nucleótidos. Normalmente, la primera mutación reduce la expresión del polipéptido sigma3 en por lo menos 30%.

20 Un reovirus mutante como se describe aquí puede incluir una o más mutaciones adicionales. La mutación o mutaciones adicionales pueden ser una mutación que reduce la expresión de un polipéptido mu1, esencialmente elimina la expresión de un polipéptido mu1, o resulta en una ausencia de un polipéptido mu1 funcional; una mutación que reduce la expresión de un polipéptido lambda2, esencialmente elimina la expresión de un polipéptido lambda2, o resulta en una ausencia de un polipéptido lambda2 funcional, y/o una mutación que reduce la expresión de un polipéptido sigma1, esencialmente elimina la expresión de un polipéptido sigma1, o resulta en una ausencia de un polipéptido sigma1 funcional.

25 También se proporciona una partícula subviral infecciosa del reovirus modificada por medio de ingeniería genética (ISVP). Dicha ISVP de reovirus se puede modificar por medio de ingeniería genética para exhibir expresión reducida de un polipéptido sigma3, o para expresar un polipéptido sigma3 no funcional. Una ISVP de reovirus como se describe aquí se puede modificar por medio de ingeniería genética para incluir una primera mutación. La primera mutación puede estar en un ácido nucleico que codifica el polipéptido sigma3 o en un ácido nucleico que regula la expresión del polipéptido sigma3. En ciertos casos, el ácido nucleico es el gen S4. Las mutaciones representativas incluyen una sustitución y una inserción o supresión de uno o más nucleótidos. Normalmente, la primera mutación reduce la expresión del polipéptido sigma3 en por lo menos 30%.

30 Un reovirus mutante como se describe aquí puede incluir una o más mutaciones adicionales. La mutación o mutaciones adicionales pueden ser una mutación que reduce la expresión de un polipéptido mu1, esencialmente elimina la expresión de un polipéptido mu1, o resulta en una ausencia de un polipéptido mu1 funcional; una mutación que reduce la expresión de un polipéptido lambda2, esencialmente elimina la expresión de un polipéptido lambda2, o resulta en una ausencia de un polipéptido lambda2 funcional; y/o una mutación que reduce la expresión de un polipéptido sigma1, esencialmente elimina la expresión de un polipéptido sigma1, o resulta en una ausencia de un polipéptido sigma1 funcional.

35 Se proporciona un método para hacer un reovirus que tiene incremento en la infectividad. Dicho reovirus se puede hacer al mutar un primer reovirus para generar un reovirus mutante, en el que el reovirus mutante exhibe expresión reducida de un polipéptido sigma3, carece de expresión de un polipéptido sigma3, o expresa un polipéptido sigma3 no funcional y aislar el reovirus mutante, en el que el reovirus mutante ha incrementado la infectividad en comparación con el primer reovirus. El incremento en la infectividad puede ser evidente por un incremento en el rango de las células neoplásicas que se pueden infectar por el reovirus mutante en comparación con el primer reovirus o por un incremento en el número de las células infectadas por el reovirus mutante en comparación con el primer reovirus.

También se proporciona un método para obtener una partícula subviral infecciosa del reovirus modificada por medio de ingeniería genética (ISVP). Dicho método incluye modificar por medio de ingeniería genética un primer reovirus para exhibir la expresión reducida de un polipéptido sigma3, para carecer de expresión de un polipéptido sigma3, o

expresar un polipéptido sigma3 no funcional; cultivar el reovirus modificado por medio de ingeniería genética y aislar las ISVP para obtener de esta manera una ISVP de reovirus modificada por medio de ingeniería genética.

5 Adicionalmente se proporciona un método para tratar un trastorno proliferativo en un sujeto. Dicho método de tratamiento incluye administrar, al sujeto, el reovirus mutante descrito aquí o la ISVP del reovirus modificada por medio de ingeniería genética descrita aquí. Dichos métodos también pueden incluir por lo menos un procedimiento elegido de cirugía, quimioterapia, terapia de radiación y terapia inmunosupresora.

Se proporciona una composición farmacéutica que incluye el reovirus mutante descrito aquí o la ISVP del reovirus modificada por medio de ingeniería genética descrita aquí. Dicha composición farmacéutica adicionalmente puede incluir uno o más agentes quimioterapéuticos y/o uno o más agentes inmunosupresores.

10 También se proporciona un polipéptido sigma3 que incluye una mutación que resulta en un polipéptido sigma3 que no se incorpora en una cápsida viral o que se incorpora en niveles reducidos en la cápsida.

15 A menos de que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por una persona de experiencia normal en la técnica a la cual pertenecen los métodos y composiciones de la materia. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica o prueba de los métodos y composiciones presentes de la materia, se describen más adelante métodos y materiales adecuados. Adicionalmente, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un esquema que muestra los elementos estructurales de un virión reovirus y una ISVP de reovirus.

20 Descripción detallada de la invención

25 Se describen aquí reovirus mutantes que carecen o exhiben la expresión reducida del polipéptido sigma3 o que carecen de un polipéptido sigma3 funcional. Además de contener una mutación en el ácido nucleico que codifica o regula el polipéptido sigma3, el reovirus mutante descrito aquí también puede contener una mutación adicional en una o más de las otras proteínas de cápsida externas. Se pueden utilizar los reovirus mutantes proporcionados aquí para generar partículas de subvirión intermedias (ISVPs) que se pueden propagar establemente como ISVPs para múltiples pasajes. Las ISVP normalmente exhiben incremento en la infectividad y/o reducción en la inmunogenicidad en comparación con el reovirus en sí mismo, pero las ISVP normalmente carecen de la capacidad para propagarse en una forma estable. Las ISVP formadas por el reovirus mutante, en contraste, demuestran propagación estable para las replicaciones múltiples, las ISVP diferentes creadas por tratamiento enzimático o similares.

30 Reovirus mutantes y métodos de elaboración

35 Los reovirus mutantes como se describen aquí pueden contener una primera mutación que reduce o esencialmente elimina la expresión de un polipéptido sigma3 o que resulta en la ausencia de un polipéptido sigma3 funcional. Una mutación que elimina la expresión de un polipéptido sigma3 o que resulta en la ausencia de un polipéptido sigma3 funcional que puede estar en el ácido nucleico que codifica el polipéptido sigma3 (es decir, el gen S4) o en un ácido nucleico que codifica un polipéptido que regula la expresión o función del polipéptido sigma3.

40 El polipéptido sigma3 es de 365 aminoácidos de longitud y tiene un peso molecular de 41 kDa. Un virión intacto contiene 600 copias del polipéptido sigma3. El polipéptido sigma3 probablemente interactúa con otras proteínas de cápsida externas que incluyen, por ejemplo, mu1, lambda2 y sigma1 y también cumple una función en la selección de ARN o empaquetado de ARN. Las imágenes de los viriones del reovirus demuestran que el polipéptido sigma3 se proyecta a manera de dedos en la superficie del virión y contribuye significativamente a la densidad del virión. Véase figura 1.

45 Como se utiliza aquí, una mutación que reduce la expresión de un polipéptido sigma3 se refiere a una mutación que resulta en una disminución en la cantidad de los polipéptidos sigma3, en comparación con un reovirus que expresa niveles tipo naturales del polipéptido sigma3, de por lo menos 30% (por ejemplo, por lo menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 95%). Como se utiliza aquí, una mutación que esencialmente elimina la expresión de un polipéptido sigma3, se refiere a una mutación que resulta en una disminución en la cantidad de los polipéptidos sigma3, relativa a la cantidad de los polipéptidos sigma3 producidos por un reovirus de tipo natural, de por lo menos 95% (por ejemplo, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%). Como se utiliza aquí, una mutación que resulta en una disminución en o ausencia de un polipéptido sigma3 funcional se refiere a una mutación que permite la expresión del polipéptido sigma3 pero que resulta en un polipéptido sigma3 que no es capaz de ensamblarse o incorporarse en la cápsida viral. Se entenderá que puede ser deseable o necesario para los polipéptidos sigma3 retener otras

funcionalidades (por ejemplo, la capacidad para unirse al ARN) con el fin de que el reovirus mutante retenga la capacidad de propagarse.

Una mutación en un polipéptido sigma3 como se describe aquí puede resultar en un polipéptido sigma3 que se incorpora en la cápsida en los niveles que se reducen en relación con un polipéptido sigma3 que no contiene la mutación (por ejemplo, un polipéptido sigma3 tipo natural). Una mutación en un polipéptido sigma3 como se describe aquí también puede resultar en un polipéptido sigma3 que no se puede incorporar en una cápsida viral. Sin estar limitado por cualquier mecanismo particular, un polipéptido sigma3 puede haber reducido la función o carecer de función debido a, por ejemplo, una incapacidad del polipéptido sigma3 y el polipéptido mu1 para unirse apropiadamente, o a un cambio conformacional que reduce o prohíbe la incorporación del polipéptido sigma3 en la cápsida.

Un reovirus mutante de acuerdo a esta descripción puede ser un ortorreovirus de mamífero de tipo 3. Los ortorreovirus de mamífero de tipo 3 incluyen, sin limitación, cepas Dearing y Abney (T3D o T3A, respectivamente). Véase, por ejemplo, Nos. de acceso ATCC VR-232 Y VR-824. Un reovirus mutante como se describe aquí puede contener una mutación generada espontáneamente o una mutación modificada mediante ingeniería genética. Por ejemplo, los reovirus de origen natural (por ejemplo, aislados de una fuente en la naturaleza tal como de un paciente) pueden ser reovirus mutados o recombinantes (véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 7,163,678) se pueden generar de manera que no expresan el polipéptido sigma3 o que carecen de un polipéptido sigma3 funcional. Se observa que los reovirus que llevan una mutación en el gen 84 tal como aquellos descritos por Clark et al. (2006, *J. Virol.*, 80:671-81), Ebert et al. (2001, *J. Virol.*, 75:3197206) y Wetzel et al. (1997, *J. Virol.*, 71:1362-9) no son parte de y se excluyen de los mutantes presentes debido a que se considerará que dichos mutantes expresan un polipéptido sigma3 funcional.

Una mutación como se refiere aquí puede ser una sustitución o una inserción o supresión de uno o más nucleótidos. Las mutaciones de punto incluyen, por ejemplo, transiciones de nucleótido sencillo (purina a purina o pirimidina a pirimidina) o transversiones (purina a pirimidina o viceversa) y supresiones o inserciones de nucleótido sencillas a múltiples. Una mutación en un ácido nucleico puede resultar en una o más sustituciones de aminoácido conservadas o no conservadas en el polipéptido codificado, el cual puede resultar en los cambios conformacionales o la pérdida o pérdida parcial de la función, un cambio en la estructura de lectura de la traducción ("cambio de estructura") resultando en un polipéptido totalmente diferente codificado a partir de ese punto sobre, un codón de detención prematuro en un polipéptido truncado ("truncamiento"), o una mutación en un ácido nucleico de reovirus no puede cambiar el polipéptido codificado totalmente ("silencioso" a "sin sentido"). Véase, por ejemplo, Johnson & Overington, 1993, *J. Mol. Biol.*, 233:716-38; Henikoff & Henikoff, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-19; y la Patente Estadounidense No. 4,554,101 para la divulgación sobre sustituciones de aminoácidos no conservadas y conservadas.

Las mutaciones se pueden generar en el ácido nucleico de un reovirus utilizando cualquier número de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar la mutagénesis dirigida a sitio para modificar una secuencia de ácidos nucleicos de reovirus. Uno de los métodos más comunes de la mutagénesis dirigida al sitio es la mutagénesis dirigida al oligonucleótido. En la mutagénesis dirigida al oligonucleótido, un oligonucleótido que codifica los cambios deseados en la secuencia se hibrida por una hebra del ADN de interés y sirve como un cebador para el inicio de la síntesis de ADN. De esta manera, el oligonucleótido que contiene el cambio de secuencia se incorpora en la hebra sintetizada nuevamente. Véase, por ejemplo, Kunkel, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 488; Kunkel et al., 1987, *Meth. Enzymol.*, 154:367; Lewis & Thompson, 1990, *Nucl. Acids Res.*, 18:3439; Bohnsack, 1996, *Meth. Mol. Biol.*, 57:1; Deng & Nickoloff, 1992, *Anal. Biochem.*, 200:81; y Shimada, 1996, *Meth. Mol. Biol.*, 57:157. Habitualmente se utilizan otros métodos en la técnica para modificar la secuencia de una proteína o polipéptido. Por ejemplo, se pueden generar ácidos nucleicos que contienen una mutación utilizando PCR o síntesis química, o polipéptidos que tienen el cambio deseado en la secuencia de aminoácidos que se puede sintetizar químicamente. Véase, por ejemplo, Bang & Kent, 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102:5014-9 y las referencias aquí.

Adicionalmente a una mutación que elimina o reduce la expresión del polipéptido sigma3 o que resulta en un polipéptido sigma3 de función reducida o no funcional, un reovirus mutante como se describe aquí también contiene una o más mutaciones adicionales (por ejemplo, una segunda, tercera o cuarta mutación) en uno de los otros polipéptidos de cápsida del reovirus (por ejemplo, mu1, lambda2, y/o sigma1). Los reovirus que contienen una mutación que afecta el polipéptido sigma3 y opcionalmente, una mutación adicional en cualquiera o todas las proteínas de cápsida externas se pueden cribar con respecto a la capacidad de dichos reovirus mutantes para infectar y provocar la lisis de las células. Por ejemplo, las células neoplásicas que son resistentes a lisis por el reovirus de tipo natural se pueden utilizar para separar por exclusión los reovirus mutantes descritos aquí.

Por ejemplo, una mutación adicional puede reducir o esencialmente eliminar la expresión de un polipéptido mu1 o resultar en la ausencia de un polipéptido mu1 funcional. El polipéptido mu1, que se codifica por el gen M2, se involucra probablemente en la penetración de la célula y puede cumplir una función en la activación de la transcriptasa. Cada virión contiene alrededor de 600 copias de los polipéptidos mu1, que están presentes en la forma del complejo 1:1 con los polipéptidos sigma3. El polipéptido mu1 se miristoila sobre su terminal N, y luego los

residuos de terminal N miristoilados se dividen, resultando en un fragmento de terminal C (mu1C). Adicional o alternativamente, una mutación adicional puede reducir o esencialmente eliminar la expresión de un polipéptido lambda2 o resultar en la ausencia de un polipéptido lambda2 funcional y/o una mutación adicional puede reducir o esencialmente eliminar la expresión de un polipéptido sigma1 o resultar en la ausencia de un polipéptido sigma1 funcional. El polipéptido lambda2 se codifica por el gen L2 y se involucra en el ensamble de partícula y exhibe actividad de guanililtransferasa y metiltransferasa. El polipéptido sigma1 se codifica por el gen S1 y se involucra en la adhesión celular y sirve como la hemaglutinina viral.

Los ácidos nucleicos de las partículas de reovirus se pueden aislar utilizando la metodología estándar para ácidos nucleicos comercialmente disponible. Véase también, por ejemplo, Schiff et al., "Orthoreoviruses and Their Replication", Ch 52, in Fields Virology, Knipe & Howley, eds., 2006, Lippincott Williams & Wilkins. Como se utilizan aquí, ácidos nucleicos aislados se refieren a los ácidos nucleicos que se separan de otros ácidos nucleicos con los que se asocian usualmente. Por lo tanto, un ácido nucleico aislado incluye, sin limitación, un ácido nucleico reoviral que está esencialmente libre de ácidos nucleicos no reovirales (por ejemplo, la célula anfitriona), o un segmento genómico reoviral que está esencialmente libre de ácidos nucleicos correspondientes a otros segmentos genómicos. Adicionalmente, un ácido nucleico aislado puede incluir un ácido nucleico modificado tal como un ácido nucleico sintético o recombinante.

Un reovirus mutante como se describe aquí se puede generar para reconstituir los segmentos del genoma que contienen por lo menos una primera mutación que afecta el polipéptido sigma3, el cual produce una partícula subviral infecciosa (ISVP; por ejemplo, una ISVP modificada por ingeniería genética) utilizando los métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Schiff et al., "Orthoreoviruses and Their Replication", Ch 52, in Fields Virology, Knipe & Howley, eds., 2006, Lippincott Williams & Wilkins; Smith et al., 1969, Virology, 39(4):791-810; y las Patentes Estadounidenses Nos. 7,186,542; 7,049,127; 6,808,916; y 6,528,305. Un reovirus mutante también se puede generar al expresar los segmentos del genoma del reovirus que utilizan un sistema genético inverso basado en el plásmido para producir una ISVP. Véase, por ejemplo, Kobayashi et al., 2007, Cell Host & Microbe, 1:147-57. Como se utiliza aquí, una ISVP mutante o modificada por medio de ingeniería genética es un reovirus mutante y se refiere a una ISVP generada de un reovirus que lleva una mutación generada espontáneamente o modificada por ingeniería genética afectando por lo menos el polipéptido sigma3. Las ISVP descritas aquí son estables y se pueden propagar como ISVPs para múltiples pasajes (por ejemplo, más de uno, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 6 más).

Los reovirus mutantes descritos aquí, producidos a través de una ISVP modificada por medio de ingeniería genética o a través de un sistema genético inverso basado en el plásmido, se puede cultivar en, por ejemplo, células neoplásicas humanas o células de fibroblastos de ratón L929. Los reovirus mutantes descritos aquí se pueden cultivar en las células que son solamente permisivas a las cepas de reovirus que carecen del polipéptido sigma3. Utilizando dichas estirpes celulares para pasar los reovirus mutantes descritos aquí se puede permitir la selección de los mutantes y también se puede utilizar para reducir o prevenir las reversiones de las mutaciones.

Los reovirus mutantes se pueden purificar utilizando metodología estándar. Véase, por ejemplo, Schiff et al., "Orthoreoviruses and Their Replication", Ch 52, in Fields Virology, Knipe & Howley, eds., 2006, Lippincott Williams & Wilkins; Smith et al., 1969, Virology, 39(4): 791-810; y las Patentes Estadounidenses Nos. 7,186,542; 7,049,127; 6,808,916; y 6,528,305. Se puede utilizar cromatografía de afinidad, por ejemplo, un anticuerpo dirigido hacia el polipéptido sigma3 para eliminar los reovirus que contienen el polipéptido sigma3 y permitir que los mutantes que carecen del polipéptido sigma3 tengan flujo continuo. Como se utiliza aquí, los reovirus mutantes purificados se refieren a reovirus que se han separado de los componentes celulares que naturalmente los acompañan. Normalmente, los reovirus se consideran purificados cuando están por lo menos 70% (por ejemplo, por lo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99%) en peso seco, libres de proteínas y otros componentes celulares con los cuales se asocian naturalmente.

Los reovirus mutantes descritos aquí exhiben incremento en la infectividad y/o disminución en la inmunogenicidad cuando se comparan con un reovirus no mutante (por ejemplo, un reovirus de control) y se pueden seleccionar sobre la base de dichas características. Se puede evidenciar el incremento de la infectividad por un incremento en el rango de las células neoplásicas y/o el número de las células que se infectan por un reovirus mutante en comparación con un reovirus que expresa un polipéptido sigma3 funcional (por ejemplo, un virión intacto; por ejemplo, un reovirus tipo natural). La disminución de la inmunogenicidad del reovirus mutante se puede evidenciar por la incapacidad de dichos reovirus mutantes para inducir una respuesta inmune significativa en el sujeto. El reovirus mutante descrito aquí también se puede cribar y seleccionar por otros rasgos deseables que incluyen, pero no se limitan a, una relación rápida de replicación; una relación rápida de empaquetado; la capacidad de inducir apoptosis; la capacidad de afectar la lisis en y eliminar efectivamente las estirpes celulares neoplásicas humanas; la capacidad para liberar epítomos de tumor efectivos; interacción con quimioterapias estándar y un incremento en el número de la progenie viral. Adicionalmente, los reovirus mutantes se pueden seleccionar por la capacidad de infectar líticamente una célula neoplásica (por ejemplo, una célula de mamífero que tiene una ruta Ras activa). Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 7,052,832.

Métodos para utilizar reovirus que tienen secuencias modificadas

Como se describió anteriormente (véase, por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 6,110,461; 6,136,307; 6,261,555; 6,344,195; 6,576,234; y 6,811,775), los reovirus utilizan una maquinaria de ruta Ras de célula anfitriona para subregular la proteína quinasa activada del ARN de hebra doble (PKR) y de esta manera la replicación en la célula. Con base en estos descubrimientos, se han desarrollado métodos para utilizar los reovirus que tratan trastornos proliferativos en los mamíferos tales como ratones, perros, gatos, ovejas, cabras, vacas, caballos, cerdos, primates no humanos y humanos. Los reovirus mutantes descritos aquí se pueden utilizar para tratar un trastorno proliferativo en un sujeto.

Un trastorno proliferativo es cualquier trastorno celular en el cual las células se proliferan más rápidamente que el crecimiento del tejido normal. Por lo tanto una célula proliferada es una célula que se prolifera más rápidamente que las células normales. Un trastorno proliferativo incluye, pero no se limita a, neoplasmas, los cuales también se refieren a tumores. Un neoplasma puede incluir, pero no se limita a, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma), cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer adrenal, cáncer de hígado, neurofibromatosis 1, y leucemia. Un neoplasma puede ser un neoplasma sólido (por ejemplo, sarcoma o carcinoma) o un crecimiento canceroso que afecta el sistema hematopoyético (por ejemplo, linfoma o leucemia). Otros trastornos proliferativos incluyen, pero no se limitan a neurofibromatosis.

En general, en los trastornos proliferativos para los cuales se utiliza el reovirus como un tratamiento, por lo menos algunas de las células proliferadas pueden tener una mutación en la cual se activa el gen Ras (o un elemento de la ruta de señalización Ras), ya sea directamente (por ejemplo, mediante una mutación activada en Ras) o indirectamente (por ejemplo, mediante activación de un elemento en dirección 5' o 3' en la ruta Ras). La activación de un elemento en dirección 5' en la ruta Ras incluye, por ejemplo, la transformación con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o Sos. Véase, por ejemplo, Wiessmuller & Wittinghofer, 1994, Cellular Signaling, 6(3):247-267; y Barbacid, 1987, Ann. Rev. Biochem., 56, 779-827. La activación de un elemento en dirección 3' en la ruta Ras incluye, por ejemplo, la mutación dentro de B-Raf. Véase, por ejemplo, la mutación dentro de B-Raf. Véase, por ejemplo, Brose et al. (2002, Cancer Res., 62:6997-7000). Adicionalmente, el reovirus es útil para tratar trastornos proliferativos provocados por mutaciones o desregulación del PKR. Véase, por ejemplo, Strong et al. (1998, EMBO J., 17:3351-62).

Los reovirus mutantes descritos aquí se pueden administrar a un mamífero que tiene un trastorno proliferativo. Como se utiliza aquí, la administración se refiere al suministro de un reovirus mutante (por ejemplo, una ISVP) de tal manera que el reovirus mutante se pone en contacto con las células proliferativas. La ruta por la cual se administra un reovirus mutante dependerá del tipo de trastorno y la ubicación de las células proliferativas. Se puede emplear una amplia variedad de rutas de administración, y las siguientes se proporcionan simplemente a manera de ejemplo y no significa que sean limitantes en alguna manera.

Para un neoplasma sólido, por ejemplo, se puede administrar un reovirus mutante por los métodos que incluyen la inyección directa en el tumor o administración sistémica (por ejemplo, por vía intravenosa) por inyección, infusión o similares. Para un neoplasma hematopoyético, por ejemplo, un reovirus mutante se puede administrar por vía intravenosa o por vía intravascular. Para neoplasmas metastásicos o neoplasmas tales como tumores cerebrales, por ejemplo, un reovirus mutante se puede administrar en una manera tal que se transporta de forma sistémica a través del cuerpo (por ejemplo, por vía intratecal, por vía intravenosa o por vía intramuscular). Un reovirus mutante también se puede administrar por vía subcutánea, por vía intraperitoneal (por ejemplo, para neoplasmas de ovario), por vía tópica (por ejemplo, para melanomas), por vía oral (por ejemplo, para neoplasmas orales o esofágicos), por vía rectal (por ejemplo, para neoplasmas colorrectales), por vía vaginal (por ejemplo, para neoplasmas cervicales o vaginales), por vía nasal o por inhalación de aerosol (por ejemplo, para neoplasmas de pulmón). Un reovirus mutante se puede administrar por más de una ruta y/o en más de una ubicación en un sujeto.

Un reovirus mutante como se describe aquí se administra en una cantidad que es suficiente para tratar el trastorno proliferativo (por ejemplo, una cantidad efectiva). Un trastorno proliferativo se trata cuando la administración de un reovirus mutante a las células proliferativas afecta la lisis (por ejemplo, oncólisis) de las células, resultando en una reducción en el número de células proliferativas, una reducción en el tamaño de un neoplasma, y/o una reducción en o eliminación de los síntomas (por ejemplo, dolor) se asocia con el trastorno proliferativo. Como se utiliza aquí, el término oncólisis significa por lo menos 10% de las células proliferativas que se lisan (por ejemplo, por lo menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, o 75% de las células se lisaron). El porcentaje de lisis se puede determinar, por ejemplo, al medir la reducción en el tamaño de un neoplasma o en el número de las células proliferativas en un mamífero, o al medir la cantidad de lisis de las células in vitro (por ejemplo, de una biopsia de las células proliferativas).

Una cantidad efectiva de un reovirus mutante se determina sobre una base individual y se puede basar, por lo menos en parte, en el reovirus mutante particular utilizado; el tamaño individual, edad, género; y el tamaño y otras características de las células proliferativas. Por ejemplo, para el tratamiento de un humano, aproximadamente se pueden utilizar  $10^3$  a  $10^{12}$  unidades formadoras de placa (PFU) de un reovirus mutante dependiendo en el tipo, tamaño y número de células proliferativas o neoplasmas presentes. La cantidad efectiva puede ser, por ejemplo, de

aproximadamente 1.0 PFU/kg de peso corporal hasta alrededor de  $10^{15}$  PFU/kg de peso corporal (por ejemplo, desde alrededor de  $10^2$  PFU/kg de peso corporal a alrededor de  $10^{13}$  PFU/kg de peso corporal). Un reovirus mutante se puede administrar en una dosis única o en dosis múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, seis o más dosis). Las dosis múltiples se pueden administrar simultáneamente a consecutivamente (por ejemplo, durante un periodo de días o semanas). El tratamiento con un reovirus mutante puede durar desde varios días hasta varios meses o hasta que se logra la disminución de la enfermedad.

Se contempla que un reovirus mutante como se describe aquí se puede administrar en conjunto con cirugía o eliminación de células proliferativas (por ejemplo, un neoplasma). También se contempla que un reovirus mutante se puede administrar en conjunto con o sin la adición a terapia de radiación. Se contempla adicionalmente que un reovirus mutante se puede administrar en conjunto con o adicionalmente a compuestos contra el cáncer, agentes quimioterapéuticos y/o agentes inmunosupresores. Dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, mitomicina C, metotrexato, hidroxiaurea, gemcitabina, ciclofosfamida, decarbazina, mitoxantrona, antraciclinas (por ejemplo, epirrubicina y doxorubicina), agentes estabilizadores de tubulina (por ejemplo, alcaloides vinca), anticuerpos para receptores tales como HERCEPTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), etopósido y pregnasoma, compuestos de platino tales como carboplatino y cisplatino, taxanos tales como TAXOL® (Bristol-Myers Squibb, New York, NY) y TAXOTERE® (Rhone-Poulenc Rorer SA, Antony, Francia), terapias con hormonas tales como tamoxifeno y antiestrógenos, interferones, inhibidores de aromatasas, agentes progestacionales y análogos de LHRH. También se contempla que un reovirus mutante como el descrito aquí se pueda administrar en conjunto con o adicionalmente a agentes de permeabilidad vascular tales como, sin limitación, IL-2, TNF-alfa, VEGF, AVASTIN® (Genentech), y relaxina.

#### Composiciones farmacéuticas

Se proporcionan composiciones farmacéuticas que incluyen un reovirus mutante como se describe aquí. Véase, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 6,576,234. Adicionalmente a uno o más reovirus mutantes, una composición farmacéutica normalmente incluye un portador farmacéuticamente aceptable. Un portador farmacéuticamente aceptable puede ser un material sólido, semisólido o líquido que puede actuar como un vehículo, portador o medio para el reovirus mutante. Por lo tanto, las composiciones que contienen un reovirus mutante pueden estar en la forma de comprimidos, polvos, pastillas, bolsitas, parches, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos empacados estériles.

Algunos ejemplos de portadores adecuados incluyen solución salina regulada con fosfato u otra solución reguladora fisiológicamente aceptable, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe y metil celulosa. Una composición farmacéutica adicionalmente puede incluir, sin limitación, agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes de suspensión y emulsificantes; agentes conservantes tales como hidróxido-benzoatos de metilo y propilo; agentes endulzantes; y agentes saborizantes. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para proporcionar liberación rápida, sostenida o retardada de un reovirus mutante después de la administración al emplear los procedimientos conocidos en la técnica. Adicionalmente a las formulaciones representativas descritas a continuación, se pueden encontrar otras formulaciones adecuadas para uso en una composición farmacéutica en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003, Gennaro & Gennaro, eds., Lippincott Williams & Wilkens).

Para preparar las composiciones sólidas tales como comprimidos, se puede mezclar un reovirus mutante con un portador farmacéutico para formar una composición sólida. Opcionalmente, los comprimidos o píldoras se pueden recubrir o de otra manera componer para proporcionar una forma de dosis que consiga la ventaja de la acción prolongada. Por ejemplo, un comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interna y dosificación externa, la última en la forma de una envoltura sobre la primera. Los dos componentes se pueden separar por una capa entérica la cual sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o se retarde la liberación. Se puede utilizar una variedad de materiales para dichas capas o recubrimientos entéricos, incluyendo dichos materiales un número de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como shellac, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formulaciones líquidas que incluyen un reovirus mutante para administración oral o para inyección generalmente incluyen soluciones acuosas, jarabes de sabores adecuados, suspensiones acuosas o aceites y emulsiones de sabores con aceites comestibles, tales como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuate, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes orgánicos o acuosos, farmacéuticamente aceptables o mezclas de los mismos y, polvos. Estas composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describe aquí. Dichas composiciones se pueden administrar por ruta oral o respiratoria nasal para efecto local o sistémico. Las

composiciones en solventes farmacéuticamente aceptables se pueden nebulizar para uso en gases inertes. Las soluciones nebulizadas se pueden inhalar directamente del dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización se puede adherir a una mascarilla tipo facial o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o polvo se pueden administrar por vía oral o por vía nasal, desde dispositivos que liberan la formulación en una manera apropiada.

Otra formulación que se puede emplear en los métodos de la presente descripción emplea los dispositivos de administración transdérmica (por ejemplo, parches). Dichos parches transdérmicos se pueden utilizar para proporcionar infusión continua o discontinua de un reovirus mutante como se describe aquí. La construcción y uso de parches transdérmicos para liberación de agentes farmacéuticos se conoce bien en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente Estadounidense No. 5,023,252. Dichos parches se pueden construir para liberación continua, pulsátil o para administración sobre demanda de los reovirus mutantes.

Los reovirus mutantes, si es necesario, se pueden poner como recubrimiento en un liposoma o micela para reducir o prevenir una respuesta inmunitaria en un mamífero que ha desarrollado inmunidad hacia un reovirus. Dichas composiciones se denominan reovirus inmunoprotegidos. Véase, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 6,565,831 y 7,014,847. Adicionalmente, tal como se divulga aquí, un reovirus mutante (por ejemplo, uno que carece o es deficiente en el polipéptido sigma3 o función) se puede tratar proteolíticamente con una enzima para eliminar o eliminar parcialmente cualquiera de las proteínas de cápsida externas presentes.

Los reovirus mutantes o una composición farmacéutica que comprende tales dichos mutantes se pueden empaquetar en un conjunto. Se contempla que un conjunto también puede incluir uno o más agentes quimioterapéuticos, uno o más agentes inmunosupresores y/o uno o más anticuerpos antireovirus. Una composición farmacéutica se puede formular en una forma de dosificación unitaria. El término "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificación unitaria para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un reovirus mutante calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con la presente descripción, se pueden emplear técnicas de biología molecular, microbiología, bioquímica y ADN recombinante dentro de la habilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Los métodos y composiciones de la materia se describen adicionalmente en los siguientes ejemplos, los cuales no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

#### EJEMPLOS

##### 30 Ejemplo 1 - Generación de un reovirus mutante

Una construcción que expresa una forma mutante del gen S4 bajo el control de un promotor constitutivo o inducible se genera de tal manera que se transcribe el ARN de hebra plus. En un ejemplo, el codón de inicio para la traducción del gen S4 se muta mediante supresión, inserción o sustitución. Una estirpe celular susceptible al reovirus luego se transforma con la construcción.

35 La estirpe celular transformada se infecta con un reovirus y si es necesario, se induce la expresión del gen S4. El ARN S4 de hebra plus que contiene la mutación es un sustrato para la polimerasa de ARN dependiente de ARN viral, la cual genera el ARN S4 mutante de hebra doble que se empaqueta pero no es funcional, por lo menos con respecto a la incorporación del polipéptido sigma3 codificado en una cápsida.

40 El virus de progenie de célula transformada incluye ambos reovirus tipo natural que expresan el polipéptido sigma3 así como un reovirus mutante que no expresa el polipéptido sigma3. Un reovirus mutante que no expresa el polipéptido sigma3 se denomina ocasionalmente reovirus desnudo.

45 Los virus desnudos se seleccionan, por ejemplo, utilizando un ensayo de titulación en placa con una estirpe celular que ha demostrado un bloque en la etapa no recubierta. En dicha estirpe celular, el virus tipo natural no es capaz de replicarse efectivamente. La placa más grande se selecciona y expande. Alternativamente, el reovirus de tipo natural se purifica utilizando cromatografía de afinidad con los anticuerpos dirigidos contra el polipéptido sigma3. La presencia o ausencia del polipéptido sigma3 se determina por la electrotransferencia de Western y/o inmunoprecipitación.

50 Se entenderá que mientras los materiales y métodos se han descrito en conjunto con la descripción detallada de los mismos, se pretende que la descripción anterior se ilustre y no limite el alcance de los materiales y métodos, que se definen por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Se divulgan métodos y composiciones que se pueden utilizar para, se pueden utilizar en conjunto con, se pueden utilizar en la preparación para, o son productos de los métodos y composiciones descritos. Estos y otros materiales se describen aquí y se entiende que se describen las combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos métodos y composiciones. Es decir, mientras la referencia específica a cada una de diversas combinaciones individuales y colectivas y permutaciones de estas composiciones y métodos no se pueden divulgar explícitamente, cada una se contempla específicamente y se describe aquí. Por ejemplo, si se divulga y discute una mutación particular en un reovirus o un método particular y se discute un número de mutaciones que se pueden hacer al reovirus o modificaciones que se pueden hacer a los métodos, cada una y todas las combinaciones y permutaciones de los reovirus y métodos se contemplan específicamente a menos de que se indique específicamente lo contrario.

5

10 De la misma forma, también se contempla y divulga específicamente cualquier subconjunto o combinación de estos.

**REIVINDICACIONES**

1. Una partícula subviral infecciosa de reovirus (ISVP) modificada por ingeniería genética en la que dicha ISVP comprende un ácido nucleico que comprende una mutación y en la que la mutación resulta en la carencia de expresión de un polipéptido sigma3.
- 5 2. La ISVP de reovirus de la reivindicación 1, en la que la mutación es un ácido nucleico que codifica el polipéptido sigma3 o un ácido nucleico que regula la expresión del polipéptido sigma3.
3. La ISVP de reovirus de la reivindicación 2, en la que dicho ácido nucleico es el gen S4.
4. La ISVP de reovirus de la reivindicación 1, en la que la mutación es una sustitución, o en la que la mutación es una inserción o supresión de uno o más nucleótidos.
- 10 5. La ISVP de reovirus de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una o más mutaciones adicionales, opcionalmente seleccionadas del grupo que consiste de:
- una mutación que reduce la expresión de un polipéptido mu1, esencialmente elimina la expresión de un polipéptido mu1, o resulta en una ausencia de un polipéptido mu1 funcional;
- 15 una mutación que reduce la expresión de un polipéptido lambda2, esencialmente elimina la expresión de un polipéptido lambda2, o resulta en una ausencia de un polipéptido lambda2 funcional; y/o una mutación que reduce la expresión de un polipéptido sigma1, esencialmente elimina la expresión de un polipéptido sigma1, o resulta en una ausencia de un polipéptido sigma1 funcional.
6. Un método para elaborar un reovirus que tiene aumento de infectividad, que comprende
- 20 modificar por ingeniería genética una mutación en un primer reovirus para generar un reovirus mutante, en el que dicho reovirus mutante carece de expresión de un polipéptido sigma3;
- cultivar dicho reovirus mutante; y
- aislar las ISVP para obtener de esta manera una ISVP de reovirus mutante.
7. La ISVP de reovirus de la reivindicación 1, para uso en un método para tratar un trastorno proliferativo en un sujeto.
- 25 8. La ISVP de reovirus para uso como se reivindica en la reivindicación 7, en la que el método comprende adicionalmente por lo menos uno de los procedimientos seleccionados del grupo que consiste de cirugía, quimioterapia, radioterapia y terapia inmunosupresora.
9. Una composición farmacéutica que comprende la ISVP de reovirus de la reivindicación 1.
- 30 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, que comprende adicionalmente uno o más agentes quimioterapéuticos y/o uno o más agentes inmunosupresores.

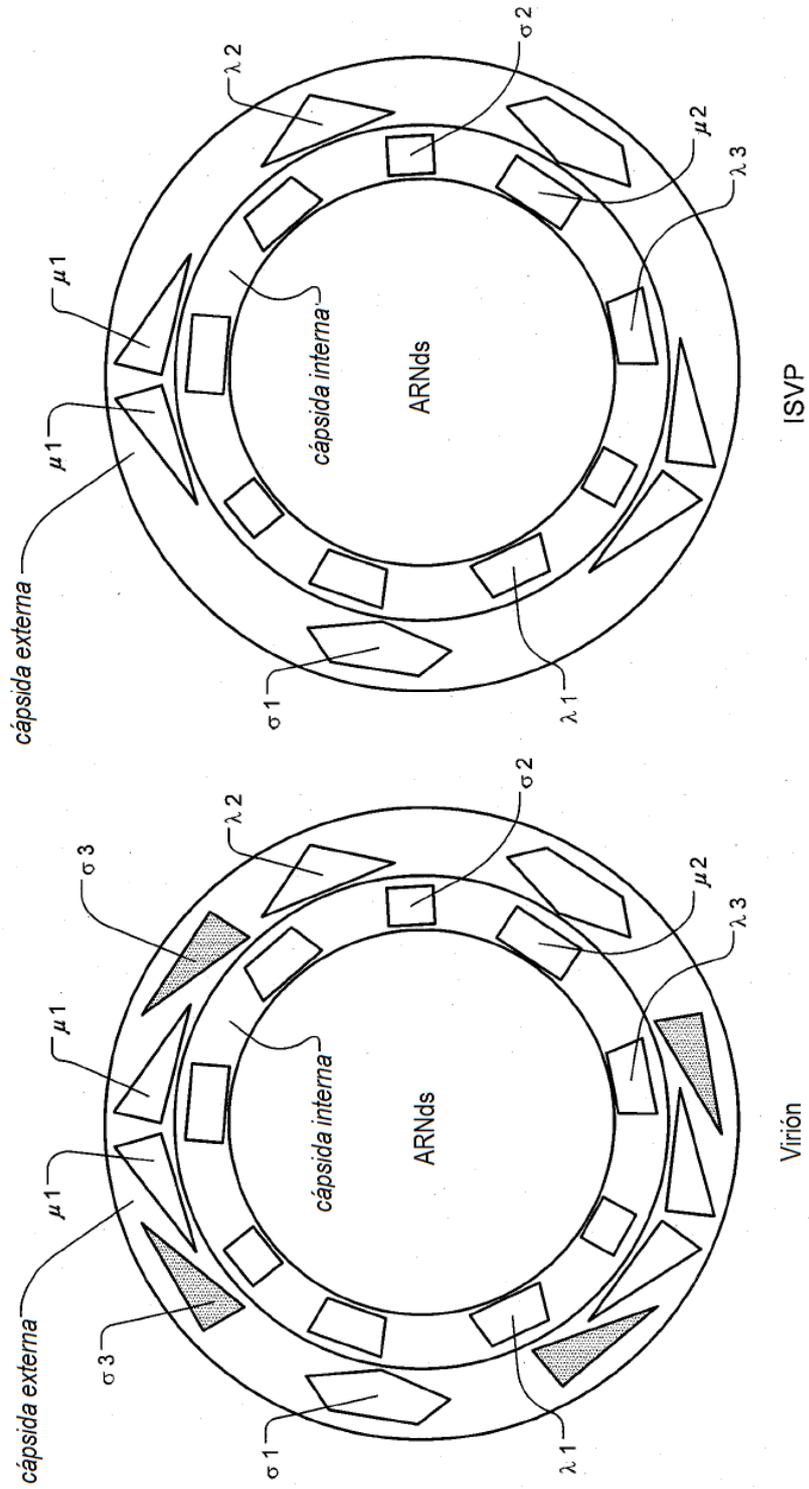


FIG. 1