

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 622 983**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

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: **11.02.2015** **E 15154629 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.02.2017** **EP 3056216**

54 Título: **Terapia contra el cáncer con un parvovirus combinado con bevacizumab**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2017

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(50.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE y
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GELETNEKY, KARSTEN;
ROMMELAERE, JEAN;
WICK, WOLFGANG;
WICK, ANTJE y
DAHM, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 622 983 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 contra el cáncer con un parvovirus combinado con bevacizumab

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende (a) parvovirus H-1 y (b) bevacizumab (Avastin®), y a dicha composición para uso en un método de tratamiento de un tumor cerebral.

5 El cáncer es la segunda causa principal de muerte a nivel mundial. Se ha estimado que la mitad de los hombres y un tercio de las mujeres serán diagnosticados con alguna forma de cáncer durante su vida. Además, debido a que el cáncer es predominantemente una enfermedad del envejecimiento, se predice que el número de muertes por cáncer a nivel mundial aumentará alrededor de 45% desde 2007 a 2030 (desde 7,9 millones de muertes a 11,5 millones) debido a la proporción creciente de personas ancianas (estimaciones de la OMS, 2008). El cáncer es casi la enfermedad más costosa. Las estimaciones más recientes del National Cancer Institute mostraron que el coste económico global del cáncer en los Estados Unidos de América en 2007 fue 226,8 mil millones de dólares y, a menos que se desarrollen intervenciones preventivas más exitosas, una detección más temprana y tratamientos más eficaces, se espera que esta carga económica ya grande crezca adicionalmente durante las siguientes dos décadas. A pesar de los progresos significativos en la prevención, detección, diagnóstico y tratamiento de muchas formas de cáncer, lo que se testifica mediante un incremento de los porcentajes de supervivientes de cáncer a los 5 años en los Estados Unidos de América y en Europa a lo largo de los últimos 30 años, algunos tipos de tumores, tales como el pancreático, hepático, pulmonar, cerebral, siguen careciendo de tratamientos eficaces, requiriendo el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas. Los virus oncolíticos, que aprovechan las vulnerabilidades específicas del cáncer para exterminar células cancerosas mientras respetan a las células normales, están surgiendo rápidamente como herramientas prometedoras para combatir el cáncer (Breitbach et al, 2011; Russell et al, 2012). No menos de doce virus oncolíticos diferentes están actualmente en ensayos clínicos de fase I-III contra diversas neoplasias (Russell et al, 2012), usados solos o en combinación con otros agentes anticancerosos. Entre ellos, el parvovirus de rata oncolítico H-1PV está siendo actualmente evaluado para determinar la seguridad y los primeros signos de eficacia en un ensayo clínico de fase I-IIa en pacientes que tienen glioblastoma multiforme recurrente (GBM) (Geletneký et al, 2012).

El H-1PV es una partícula eicosaédrica pequeña (~25 nm de diámetro), sin cubierta, que contiene un genoma de ADN bicatenario de 5,1 kb de longitud (Cotmore y Tattersall, 2007). La organización genómica de H-1PV consiste en dos unidades transcripcionales bajo el control de dos promotores, el promotor temprano P4 y el promotor tardío P38. P4 regula la expresión del gen que codifica las proteínas no estructurales (NS) (NS1 y NS2), y el P38 aquella que codifica las proteínas de la cápside (VP) (VP1, VP2, VP3) (Cotmore y Tattersall, 2007). El virus se multiplica preferentemente en células cancerosas que se dividen rápidamente. Esta oncospecificidad no se basa en una mejor captación del virus por las células cancerosas, sino más bien es debida al hecho de que las células cancerosas sobreexpresan factores, tales como ciclina A, E2F, o CREB/ATF, requeridos para la replicación del ADN del virus. Además, las células cancerosas a menudo son defectuosas en su capacidad para montar una respuesta inmunitaria antivírica eficiente, que favorece la multiplicación vírica (Nuesch et al, 2012). Se sabe que el virus activa múltiples rutas de la muerte celular. Dependiendo del tipo celular y de las condiciones de crecimiento, H-1PV puede inducir apoptosis (Hristov et al, 2010; Ohshima et al, 1998; Rayet et al, 1998; Ueno et al, 2001), necrosis (Ran et al, 1999), o muerte celular dependiente de cathepsina B (Di Piazza et al, 2007). El virus fue capaz de inducir oncolisis incluso en células cancerosas resistentes a TRAIL (ligando que induce apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral), cisplatino, e incluso cuando se sobreexpresó Bcl-2 (di Piazza et al., 2007). Estos últimos resultados sugieren que Bcl-2 no es un modulador negativo de la citotoxicidad del parvovirus. Se ha descrito recientemente la terapia del cáncer usando un parvovirus y su combinación con quimioterapia o con un inhibidor de HDAC (documentos WO 2009/083232 A1; WO 2011/113600 A1).

La proteína no estructural principal NS1 es el regulador maestro de la replicación del ADN del virus, de la expresión del gen vírico, y de la citotoxicidad. La sola expresión de NS1, de forma similar a todo el virus, es suficiente para inducir la detención del ciclo celular, la apoptosis y la lisis celular vía acumulación de especies de oxígeno reactivas y daño al ADN (Hristov et al, 2010). Como resultado de sus actividades oncolíticas, se ha mostrado que el virus posee propiedades oncosupresoras, demostradas en un número de modelos animales que ponen la base para el lanzamiento del ensayo clínico frente a GBM (Geletneký et al, 2012).

Tanto el crecimiento como la metástasis de tumores sólidos dependen de la angiogénesis (Folkman, J. Cancer Res., 46, 467-73 (1986); Folkman, J. Nat. Cancer Inst., 82, 4-6 (1989); Folkman et al., "Tumor Angiogenesis, "Capítulo 10, p. 206-32, en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn et al., eds. (W.B. Saunders, 1995)). Por ejemplo, se ha mostrado que los tumores que se agrandan hasta más de 2 mm de diámetro deben obtener su propio suministro de sangre, y lo hacen induciendo el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos capilares. Después de que estos nuevos vasos sanguíneos se embeben en el tumor, proporcionan nutrientes y factores de crecimiento esenciales para el crecimiento tumoral, así como un medio para que las células tumorales entren a la circulación y se metastaticen hacia sitios distantes, tales como el hígado, pulmón o hueso (Weidner, New Eng. J. Med., 324(1), 1-8 (1991)). Cuando se usan como fármacos en animales que poseen tumores, los inhibidores naturales de la angiogénesis pueden prevenir el crecimiento de pequeños tumores (O'Reilly et al., O'Reilly et al. Cell, 79, 315-28 (1994)). De hecho, en algunos protocolos, la aplicación de tales inhibidores conduce a la regresión tumoral y a la dormancia, incluso después de cesar el tratamiento (O'Reilly et al., Cell, 88, 277-85 (1997)). Además, el suministro de

inhibidores de la angiogénesis a ciertos tumores puede potenciar su respuesta a otros regímenes terapéuticos (por ejemplo, quimioterapia) (véase, por ejemplo, Teischer et al., Int. J. Cancer, 57, 920-25 (1994)).

5 Un candidato clínicamente aprobado como inhibidor de la angiogénesis es bevacizumab (Avastin® - Genentech/Roche), que es un anticuerpo monoclonal humanizado que reconoce y bloquea el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). VEGF es una señal química que estimula el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis). Este compuesto, y su preparación, se describe en el documento US 6.054.297.

El documento WO 2006/075165 A1 se refiere a una terapia de combinación que comprende un virus tóxico selectivo de tumor y uno o más agentes terapéuticos que reducen la formación de vasos sanguíneos tumorales o dañan la vasculatura tumoral.

10 En un estudio clínico de fase III reciente (estudio "AVAglio", Roche) para tratar glioblastoma, se administró bevacizumab junto con el agente quimioterapéutico temozolomida y radiación. Los resultados no han sido prometedores con relación a la supervivencia global, y los expertos en la reunión de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) en 2013 llegaron a la conclusión de que las expectativas para una terapia de primera línea no se han satisfecho.

15 Por lo tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar medios para una terapia mejorada contra el tumor cerebral.

Según la invención, esto se logra mediante las materias objeto definidas en las reivindicaciones.

20 En el estudio que da como resultado la presente invención nos preguntamos si un anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo bevacizumab, sinergiza con parvovirus H-1PV en el exterminio de células cancerosas. Se mostró que la administración de bevacizumab potencia la actividad oncolítica del parvovirus de una manera sinérgica en varios pacientes.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1: Diseño del ensayo del estudio clínico de fase I/IIa

Fig. 2: Uso compasivo de H-1PV con Avastin® en el Paciente 2-04

25 Fig. 3: Uso compasivo de H-1PV con Avastin® en el Paciente 5-14

Fig. 4: Datos de EliSpot del Paciente 2-04 Conjunto 1 y Conjunto 2: péptidos específicos de glioblastoma multiforme (GMB) Conjunto 3 y Conjunto 4: péptidos específicos del parvovirus H-1 – NS1 y VP

La presente invención proporciona una composición farmacéutica y un kit que contienen (a) parvovirus H-1 y (b) bevacizumab.

30 Preferiblemente, en dicha composición farmacéutica y kit, el parvovirus H-1 y bevacizumab están presentes en una dosis eficaz, y (cada uno) se combinan con un vehículo farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" pretende englobar cualquier vehículo, el cual no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos y no es tóxico al paciente al que se le administra. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica, e incluyen disoluciones salinas amortiguadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Tales vehículos se pueden formular por métodos convencionales, y se pueden administrar al sujeto a una dosis eficaz.

40 El término "parvovirus", como se usa aquí, comprende derivados del mismo de tipo salvaje o modificados competentes para la replicación, así como virus o vectores relacionados basados en tales virus o derivados. Los parvovirus, derivados, etc. adecuados, así como las células que se pueden usar para producir de forma activa dichos parvovirus y que son útiles para terapia, son fácilmente determinables dentro de la pericia de la técnica en base a la descripción aquí, sin un esfuerzo empírico excesivo.

45 Una "dosis eficaz" se refiere a cantidades de los ingredientes activos que son suficientes para afectar el curso y la gravedad de la enfermedad, conduciendo a la reducción o remisión de tal patología. Una "dosis eficaz" útil para tratar y/o prevenir estas enfermedades o trastornos se puede determinar usando métodos conocidos por un experto en la técnica.

Los vehículos farmacéuticamente compatibles adicionales pueden incluir geles, materiales de matriz bioabsorbibles, elementos de implantación que contienen el agente terapéutico, o cualquier otro vehículo adecuado, medio de suministro o de dispensación o material o materiales.

50 La administración de los compuestos se puede efectuar por diferentes maneras, por ejemplo mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intratumoral o intradérmica. Por supuesto, la vía de administración depende del tipo de terapia y del tipo de compuestos contenidos en la

composición farmacéutica. El régimen de dosificación del parvovirus y bevacizumab es fácilmente determinable dentro de la pericia de la técnica, por el médico, basado en los datos del paciente, observaciones y otros factores clínicos, incluyendo, por ejemplo, el tamaño del paciente, superficie del cuerpo, edad, sexo, el parvovirus particular, el inhibidor particular, etc., a administrar, el tiempo y vía de administración, el tipo y las características del tumor, la salud general del paciente, y otras terapias de fármacos a las que se somete el paciente.

Si el parvovirus en la combinación con bevacizumab según la invención comprende partículas víricas infecciosas con la capacidad para penetrar a través de la barrera hematoencefálica, el tratamiento se puede realizar o al menos iniciar mediante inyección intravenosa del virus. Sin embargo, una vía de administración preferida es la administración intratumoral.

Puesto que el tratamiento intravenoso a largo plazo es susceptible de hacerse ineficaz como resultado de la formación de anticuerpos neutralizantes contra el virus, se pueden adoptar diferentes modos de administración tras un régimen inicial mediante administración vírica intravenosa, o tales técnicas de administración diferentes, por ejemplo la administración del virus intracraneal o intratumoral, se pueden usar alternativamente durante todo el transcurso del tratamiento parvovírico.

Como otra técnica de administración específica, el parvovirus (virus, vector y/o agente celular) se puede administrar al paciente a partir de una fuente implantada en el paciente. Por ejemplo, se puede conectar un catéter, por ejemplo de silicona o de otro material biocompatible, a un pequeño depósito subcutáneo (depósito de Rickham) instalado en el paciente durante la eliminación del tumor, o mediante un procedimiento separado, para permitir que la composición del parvovirus sea inyectada localmente en diversos momentos sin intervención quirúrgica adicional. El parvovirus o vectores derivados se pueden inyectar en el tumor mediante técnicas quirúrgicas estereotácticas, o mediante técnicas de selección de dianas mediante neuronavegación.

La administración del parvovirus también se puede llevar a cabo mediante infusión continua de partículas víricas o fluidos que contienen partículas víricas a través de catéteres implantados a caudales bajos usando sistemas de bomba adecuados, por ejemplo bombas de infusión peristálticas o bombas de suministro potenciado por convección (CED).

Aún otro método de administración de la composición de parvovirus es a partir de un artículo implantado, construido y dispuesto para dispensar el parvovirus al tejido canceroso deseado. Por ejemplo, se pueden emplear obleas que se han impregnado con el parvovirus, por ejemplo parvovirus H-1, en el que la oblea se une a los bordes de la cavidad de resección al final de la eliminación quirúrgica del tumor. Se pueden emplear múltiples obleas en tal intervención terapéutica. Las células que producen activamente el parvovirus H-1, o los vectores a base de H-1, se pueden inyectar en el tumor o en la cavidad tumoral tras la retirada del tumor.

La terapia combinada según la invención es útil para el tratamiento terapéutico de un tumor cerebral, y puede mejorar significativamente el pronóstico de dichas enfermedades. También puede permitir el uso clínico del virus y/o bevacizumab a menores dosis terapéuticas, conservando o incluso potenciando la eficacia anticancerosa a la vez que incrementa la seguridad y reduce y/o evita efectos secundarios. En vista del fuerte efecto sinérgico entre el parvovirus y bevacizumab, es posible predecir la reducción de las dosis terapéuticas, por ejemplo la mitad o un tercio de las dosis de los componentes individuales usadas previamente conservan el efecto terapéutico deseado. A la vista de las dosis reducidas, se pueden reducir o incluso evitar los efectos secundarios (graves).

La infección con el parvovirus provoca el exterminio de las células tumorales pero no daña las células normales, y tal infección se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante uso intracerebral de un parvovirus adecuado, por ejemplo parvovirus H-1, o un virus relacionado o vectores basados en tales virus, para efectuar la terapia específica del tumor sin efectos neurológicos adversos u otros efectos secundarios.

También se describe el uso de (a) parvovirus y (b) bevacizumab para la preparación de (a) composición o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de cáncer. El modo de administración de (a) y (b) puede ser simultánea o secuencialmente, en el que, preferiblemente, (a) y (b) se administran secuencialmente (o separadamente). Esto significa que (a) y (b) se pueden proporcionar como una forma de dosificación unitaria individual para ser tomadas juntas o como entidades separadas (por ejemplo, en recipientes separados) para ser administrada simultáneamente o con un cierto tiempo de diferencia. Esta diferencia temporal puede ser entre 1 hora y 1 semana, preferiblemente entre 12 horas y 3 días. Además, es posible administrar el parvovirus vía otra manera de administración que bevacizumab. A este respecto, puede ser ventajoso administrar el parvovirus o bevacizumab intratumoralmente, y el otro, sistémica u oralmente. En una realización preferida particular, el parvovirus se administra intratumoralmente, y bevacizumab intravenosamente. Preferiblemente, el parvovirus y bevacizumab se administran como compuestos separados. También es posible el tratamiento concomitante con los dos agentes.

En una realización preferida de la presente invención, se utiliza la combinación de agentes en el tratamiento de tumores sólidos y sus metástasis. Los ejemplos son tumor cerebral, carcinoma pancreático, carcinoma cervical, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama o cáncer de colon. En una realización preferida, estos tumores son resistentes a la toxicidad del parvovirus. En una realización preferida adicional, estos tumores a tratar son tumores recurrentes. Una ventaja particular de la composición farmacéutica y kit de la presente invención

es que se pueden tratar con éxito incluso células madre que inician un cáncer.

Esto tiene un efecto positivo con respecto a evitar la recidiva de los tumores y la formación de metástasis.

En la presente invención, el parvovirus de la composición incluye parvovirus H-1 (H-1PV).

5 Los pacientes tratables mediante la combinación de agentes según la invención incluyen seres humanos, así como animales no humanos. Los ejemplos de estos últimos incluyen, sin limitación, animales tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros, y gatos.

En la presente invención se ha mostrado por primera vez que el uso combinatorio de parvovirus H-1PV y bevacizumab puede ser un enfoque válido contra gliomas.

10 Con respecto al tratamiento de tumores cerebrales, a diferencia de otros virus oncolíticos, se mostró que H-1PV atraviesa la barrera hematoencefálica e infecta a los tumores intracerebrales. Esto ofrece la oportunidad de reforzar la terapia local inicial mediante administraciones intravenosas consecutivas o para el retratamiento a intervalos sin la necesidad de craneotomía.

15 En general, se considera que el parvovirus H-1PV provoca un efecto de vacunación contra el cáncer basado en la liberación de antígenos asociados a tumor, y la inmunestimulación subsiguiente. Esto podría conducir a efectos a largo plazo en la prevención de la recidiva de la enfermedad, añadiéndose potencialmente a la oncolisis inicial. Este efecto es potenciado por el uso de bevacizumab, que es un anticuerpo anti-VEGF y actúa como un agente antiangiogénico. En otras palabras, el bevacizumab reduce o normaliza la formación de nuevos vasos sanguíneos alrededor del tumor, así como reduce los efectos inmunoinhibidores de VEGF. Esta combinación de efectos hace al tumor más susceptible al sistema inmunitario, en particular tras la terapia previa con el parvovirus. Los ejemplos de
20 pacientes muestran que esta terapia de combinación conduce a la remisión o a una enfermedad estable, incluso cuando estos pacientes sufrieron GBM recurrente progresivo.

El ejemplo a continuación explica la invención con más detalle.

Ejemplo 1

Bevacizumab potencia la actividad oncolítica de H-1PV de manera sinérgica

25 Se inició un ensayo clínico de fase I/IIa en 18 pacientes que sufren gliomas malignos recurrentes. Este ensayo busca investigar la seguridad, biodistribución, dosis tolerada máxima y signos de actividad antitumoral de parvovirus H-1. Según datos preclínicos, el parvovirus no solo incluirá la aplicación del virus intratumoral sino también el tratamiento intravenoso.

30 La aplicación del parvovirus H-1 (preparación de grado GMP) se llevó a cabo en 2 grupos de 12 (grupo I) y 6 pacientes (grupo II). La vía de administración difiere entre el grupo 1 y el grupo 2 (Figura 1).

Dentro de cada grupo, el modo de aplicación es idéntico, pero la dosis se incrementará si no se observan sucesos limitantes de la dosis. En el grupo I, el parvovirus H-1 (también denominado "producto médico de investigación"; IMP) se administró en cuatro niveles de dosis, y en el grupo II en 2 niveles de dosis (Tabla 1).

Tabla 1. Calendario de dosificación para ambos grupos de estudio

GRUPO I			
Nivel de aumento de escala	Tiempo del estudio	Dosis y vía de administración	Duración
Nivel 1 Dosis total: 1×10^6 pfu	Día 1	5×10^5 pfu, intratumoral (vía catéter)	15 minutos
	Día 10	5×10^5 pfu, intracerebral (inyección directa en múltiples localizaciones de la pared de resección)	15-30 minutos
Nivel 2 Dosis total: 5×10^7 pfu	Día 1	$2,5 \times 10^7$ pfu, intratumoral (vía catéter)	15 minutos
	Día 10	$2,5 \times 10^7$ pfu, intracerebral (inyección directa en múltiples localizaciones de la pared de resección)	15-30 minutos
Nivel 3 Dosis total: 1×10^9 pfu	Día 1	5×10^8 pfu, intratumoral (vía catéter)	15 minutos

ES 2 622 983 T3

	Día 10	5 x 10 ⁸ pfu, intracerebral (inyección directa en múltiples localizaciones de la pared de resección)	15-30 minutos
Nivel 4 Dosis total: 5 x 10 ⁹ pfu	Día 1	2,5 x 10 ⁹ pfu, intratumoral (vía catéter)	15 minutos
	Día 10	2,5 x 10 ⁹ pfu, intracerebral (inyección directa en múltiples localizaciones de la pared de resección)	15-30 minutos
GRUPO II			
Nivel de aumento de escala			
Nivel 2 Dosis total: 5 x 10 ⁷	Día 1 -5	0,5 x 10 ⁷ pfu, infusión intravenosa	2 horas
	Día 10	2,5 x 10 ⁷ pfu, intracerebral (inyección directa en múltiples localizaciones de la pared de resección)	15-30 minutos
Nivel 3 Dosis total: 1 x 10 ⁹ pfu	Día 1-5	1 x 10 ⁸ pfu, infusión intravenosa	2 horas
	Día 10	5 x 10 ⁸ pfu, intracerebral (inyección directa en múltiples localizaciones de la pared de resección)	15-30 minutos

5 En el grupo 1, los pacientes recibieron el IMP en el día 1 vía inyección guiada por imagen en el tejido tumoral. En este día, al paciente se le inyecta 50% de la dosis global pretendida. Después de un período de observación de 9 días, el tumor se extirpó en el día 10. Tras la eliminación del tumor, se administró la segunda mitad de la dosis a las paredes de la cavidad de la resección, mediante inyección directa. La administración del IMP se completó con esta inyección durante la cirugía abierta, y no se llevó a cabo ninguna aplicación adicional de virus.

10 En el grupo 2, la administración inicial del IMP fue mediante la vía intravenosa. Los sujetos recibieron 50% de la dosis pretendida mediante 5 infusiones en los días 1 a 5, conteniendo cada infusión 10% de la dosis total. Después de la última infusión en el día 5, existe un período de observación hasta el día 9, y, en el día 10, se llevó a cabo la extirpación del tumor como en el grupo 1. Análogamente al grupo 1, los pacientes recibieron la segunda mitad de la dosis mediante inyección en el tejido que rodea a la cavidad tumoral tras la eliminación del tumor, y no se llevaron a cabo inyecciones de virus adicionales en cada individuo durante el transcurso del ensayo.

6 pacientes solicitaron otra inyección de H-1PV en base a un acuerdo de uso compasivo durante la extirpación de la recidiva tumoral:

- 15
- Grupo I Nivel 1 (intratumoral): 2 pacientes
 - Grupo I Nivel 2 (intratumoral): 1 paciente
 - Grupo I Nivel 3 (intratumoral): 1 paciente
 - Grupo II Nivel 3 (intravenoso): 2 pacientes

20 Tras la extirpación del tumor, el virus se volvió a aplicar en las paredes de la cavidad tumoral, mientras que todos los pacientes recibieron la misma dosis de virus de 5x10⁸ PFU.

Como parte del programa de uso compasivo, estos pacientes recibieron, tras la extirpación de la recidiva tumoral, un tratamiento con bevacizumab.

25 El resumen a continuación (Tabla 2) de los datos de supervivencia muestra el resultado interesante de que, en 5 de 6 pacientes, hasta ahora el tiempo entre la segunda inyección de virus y la segunda recidiva o muerte (PFS2) fue mayor que el tiempo entre la primera inyección de virus y la primera recidiva (PFS1). Esto no es típico para el glioblastoma multiforme, y es un resultado muy sorprendente.

Tabla 2

DG ID	Tu	S	OS		PFS1	PFS2	
	ccm	t/st	m	†	PV-R1	CU-R2	
DG1	1-01	1,0	total	27,4	†	12,6	14,2
	1-03	3,7	total	25,7	†	9,0	15,7
DG2	2-04	1,8	total	34,9		8,0	21,8
DG3	3-08	13,1	total	16,4	†	4,3	11,6
DG3	5-13	15,2	>90%	11,3		6,0	4,0
	5-14	5,8	>95%	11,8		4,0	6,6

DG: grupo de dosis (nivel), Tu: tamaño tumoral, S: cirugía, t: total, st: subtotal, m: mes, OS: supervivencia global (mes), PFS: supervivencia libre de progresión (mes), PFS1: comienzo de viroterapia, primera inyección vírica – recidiva, PFS2: comienzo de uso compasivo, segunda inyección de virus – recidiva o muerte

5 En la Tabla anterior, los primeros cuatro pacientes (1-01, 1-03, 2-04, 3-08) proceden del grupo de tratamiento intratumoral (Grupo I), y los dos últimos pacientes (5-13 y 5-14) proceden del grupo de tratamiento intravenoso (Grupo II).

10 4 pacientes respondieron de forma extremadamente favorable en la combinación de la inyección repetida de H-1PV seguido de terapia con bevacizumab. 2 de los 4 pacientes [2-04 y 5-14] sufrieron remisión. Estos datos sugieren una posible estimulación inmunitaria mediante inyección repetida de H-1PV, que posiblemente potencia los efectos de bevacizumab.

Para los dos pacientes que muestran remisión (pacientes 2-04 y 5-13), en las Figs. 2 y 3 se muestran el protocolo de tratamiento y los barridos de MRI.

15 En la Fig. 4 se muestran los datos de EliSpot del paciente 2-04. Es absolutamente sorprendente que las respuestas de CTL contra péptidos NS1 específicos del virus (Poll3; Parvo NS) se producen en el día 625.

Listado de referencias

Breitbach CJ, Burke J, Jonker D, Stephenson J, Haas AR, Chow LQ, Nieva J, Hwang TH, Moon A, Patt R *et al.* (2011) Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* 477: 99-102

20 Cotmore SF, Tattersall P (2007) Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv Virus Res* 70: 183-232

Daeffler L, Hörlein R, Rommelaere J, Nüesch JPF (2003) Modulation of Minute Virus of Mice Cytotoxic Activities through Site-Directed Mutagenesis within the NS Coding Region. *Journal of Virology* 77: 12466-12478

25 Di Piazza M, Mader C, Geletneky K, Herrero y Calle M, Weber E, Schlehofer J, Deleu L, Rommelaere J (2007) Cytosolic Activation of Cathepsins Mediates Parvovirus H-1-Induced Killing of Cisplatin and TRAIL-Resistant Glioma Cells. *Journal of Virology* 81: 4186-4198

30 Geletneky K, Huesing J, Rommelaere J, Schlehofer JR, Leuchs B, Dahm M, Krebs O, von Knebel Doeberitz M, Huber B, Hajda J (2012) Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol. *BMC cancer* 12: 99

Hristov G, Kramer M, Li J, El-Andaloussi N, Mora R, Daeffler L, Zentgraf H, Rommelaere J, Marchini A (2010) Through Its Nonstructural Protein, NS1, Parvovirus H-1 Induces Apoptosis via Accumulation of Reactive Oxygen Species. *J Virol* 84: 5909-5922

35 Nuesch JP, Lacroix J, Marchini A, Rommelaere J (2012) Molecular pathways: rodent parvoviruses--mechanisms of oncolysis and prospects for clinical cancer treatment. *Clin Cancer Res* 18: 3516-3523

Ohshima T, Iwama M, Ueno Y, Sugiyama F, Nakajima T, Fukamizu A, Yagami K (1998) Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection. *The Journal of general virology* 79 (Pt 12): 3067-3071

40 Ran Z, Rayet B, Rommelaere J, Faisst S (1999) Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis. *Virus Res* 65: 161-174

Rayet B, Lopez-Guerrero JA, Rommelaere J, Dinsart C (1998) Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J Virol* 72: 8893-8903

Russell SJ, Peng KW, Bell JC (2012) Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30: 658-670

5 Ueno Y, Harada T, Iseki H, Ohshima T, Sugiyama F, Yagami K (2001) Propagation of rat parvovirus in thymic lymphoma cell line C58(NT)d and subsequent appearance of a resistant cell clone after lytic infection. *J Virol* 75: 3965-3970

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que contiene parvovirus H-1PV en combinación con bevacizumab.
- 5 2. Un kit que comprende un primer recipiente, un segundo recipiente y un inserto de envase, en el que el primer recipiente comprende al menos una dosis de una composición farmacéutica que contiene parvovirus H-1, el segundo recipiente comprende al menos una dosis de una composición farmacéutica que comprende bevacizumab, y el inserto de envase comprende instrucciones para tratar a un individuo que tiene un glioma o glioblastoma multiforme recurrente usando la composición o composiciones farmacéuticas.
3. El kit de la reivindicación 2 que contiene (a) el parvovirus y (b) bevacizumab, en el que el parvovirus se formula para la administración intratumoral o intravenosa, y bevacizumab se formula para la administración intravenosa.
- 10 4. La composición farmacéutica como se define en la reivindicación 1, o el kit como se define en las reivindicaciones 2 o 3, para uso en un método para tratar un glioma o glioblastoma multiforme recurrente.
5. El kit como se define en la reivindicación 2 o 3 para uso según la reivindicación 4, caracterizado por que el parvovirus y bevacizumab se administran secuencialmente.
- 15 6. El kit como se define en la reivindicación 2 o 3 para uso según la reivindicación 4 o 5, caracterizado por que el parvovirus y/o bevacizumab se administran mediante administración intratumoral o intravenosa.

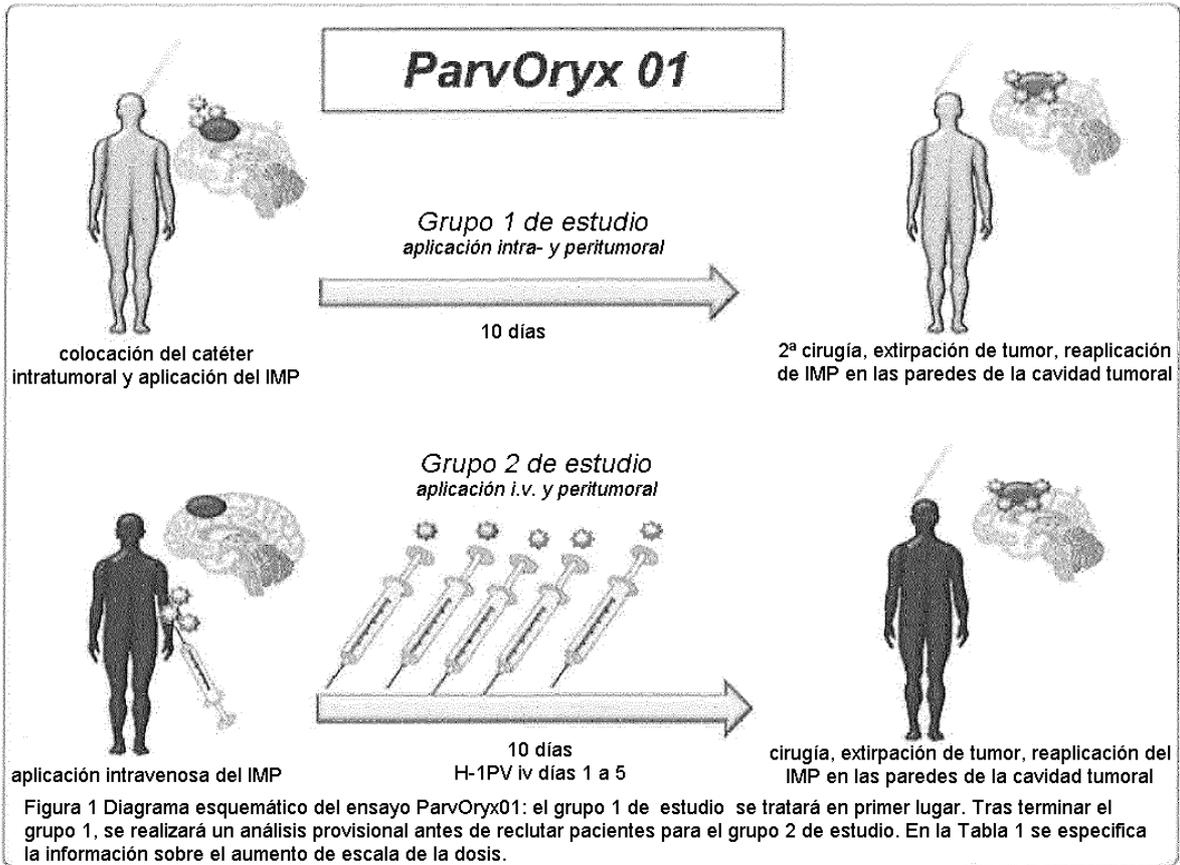


Fig. 1

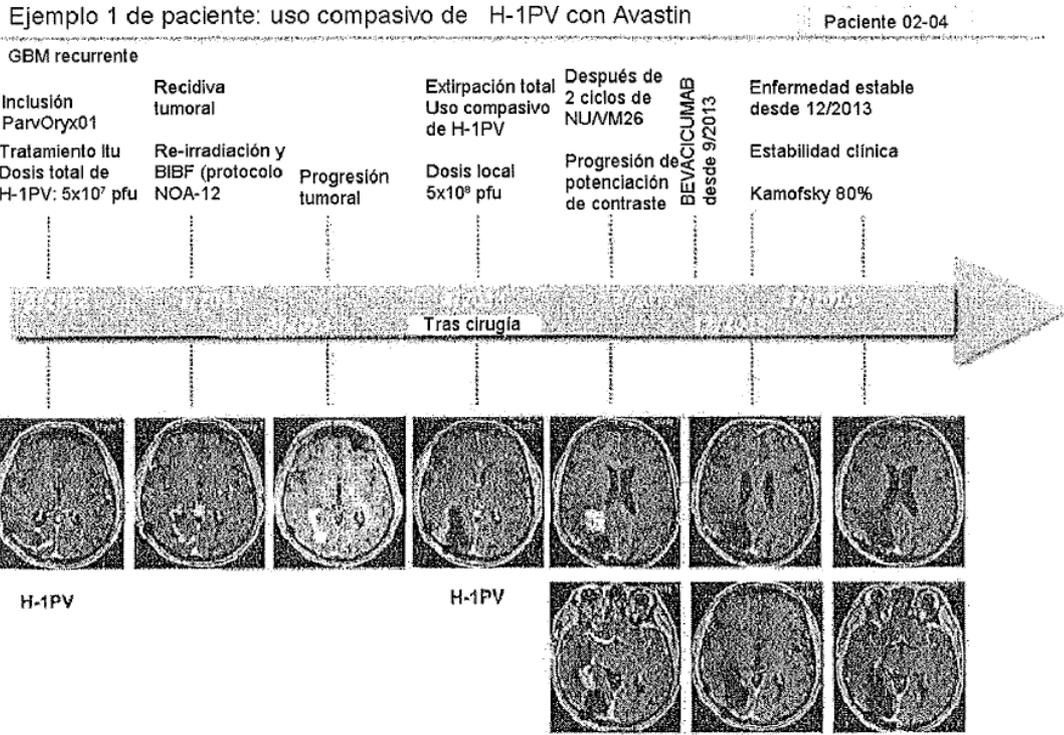


Fig. 2

Ejemplo 2 de paciente: uso compasivo de H-1PV con Avastin

Paciente 05-14

GBM recurrente

Inclusión
ParOryx01

Tratamiento iv

Dosis total de
H-1PV: 1×10^9 pfu

Progresión
tumoral

Progresión
tumoral masiva
Deterioro clínico

Extirpación
parcial (90%)

Uso
compasivo
de H-1PV

Dosis local
 5×10^8 pfu

Progresión
de
potención
de
contraste

Efecto de
masa
Deterioro
clínico

BEVACICUMAB
desde 9/2014

Normalización
del efecto de masa
Mejoría clínica

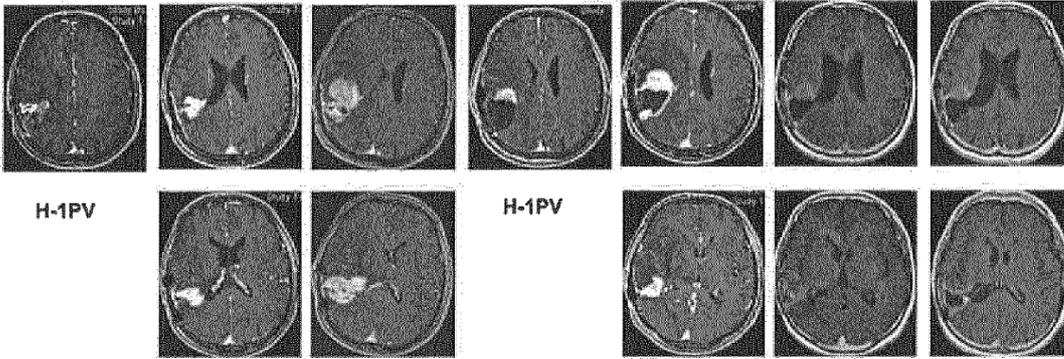
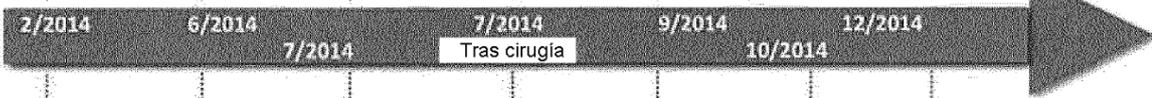


Fig. 3

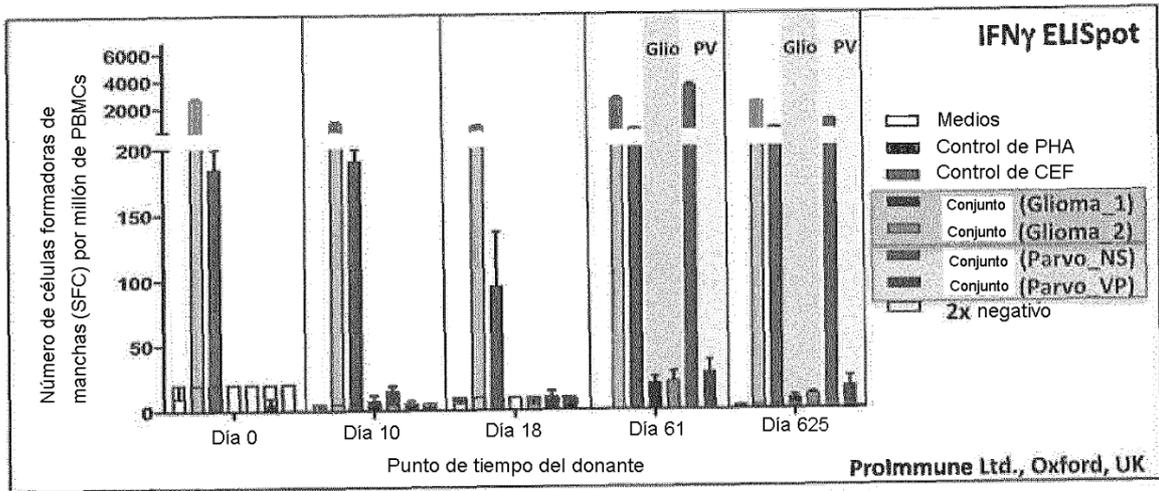


Fig. 4