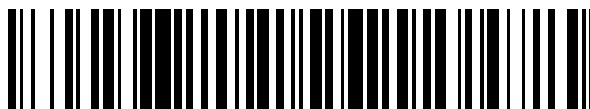


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 166**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.05.2010 PCT/EP2010/003070**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO10139401**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010 E 10728115 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2437759**

54 Título: **Método para la terapia del cáncer basado en la coadministración de un parvovirus y una citoquina**

30 Prioridad:

04.06.2009 EP 09007433

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIPRIJANOVA, IRINA;
FISCHER, MANUEL;
ROMMELAERE, JEAN;
SCHLEHOFER, JÖRG y
GELETNEKY, KARSTEN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 629 166 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

Método para la terapia del cáncer basado en la coadministración de un parvovirus y una citoquina

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende (a) el parvovirus H1 y (b) la citoquina IFN- γ para su uso en un método de tratamiento del cáncer, p. ej., un tumor cerebral donde (a) H1-PV y (b) un IFN-gamma se administran secuencialmente o se administran de forma conjunta.

Los gliomas humanos malignos representan la mayor parte de los tumores cerebrales humanos malignos. Hasta la fecha, el tratamiento de los gliomas incluye técnicas neuroquirúrgicas (procedimientos estereotácticos o de resección), radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, a pesar de estas terapias, los gliomas están considerados como incurables, ya que no responden a la radiación ionizante, quimioterapia ni a la resección quirúrgica. En otras palabras, con estas terapias solo se puede conseguir una prolongación muy limitada de la esperanza de vida de los pacientes, es decir, a pesar de estas terapias, la esperanza de vida media después del diagnóstico es de apenas 12 a 16 meses.

La terapia del cáncer usando virus o derivados de vectores armados que matan específicamente células transformadas neoplásicamente (oncolisis) es una nueva propuesta para el tratamiento de esta enfermedad letal. Algunos parvovirus autónomos pertenecen a la categoría de los llamados virus oncolíticos. Los parvovirus son partículas pequeñas (25-30 nm), no envueltas que contienen un genoma de ADN monocatenario de 5.1 kb a partir del cual se expresan dos proteínas no estructurales (NS1, NS2) y dos proteínas de cápside (VP1, VP2). El parvovirus H-1PV tiene la ventaja única de desencadenar un proceso de muerte distinto, al menos en tumores cerebrales y en algunos otros tumores, concretamente la reubicación citosólica y la activación de las proteasas lisosomales (catepsinas). Varios miembros del género parvovirus (H-1PV, MVM, Lull), cuyos huéspedes naturales son los roedores, están siendo considerados actualmente en aplicaciones de terapia génica del cáncer, debido a su incapacidad de transformar células huésped, su capacidad para producir una infección asintomática en seres humanos y su habilidad para propagarse en (oncotropismo) y matar (oncolisis) preferentemente células transformadas neoplásicamente. Se ha demostrado que los virus MVMp y H-1PV ejercen actividades oncosupresoras *in vivo*, es decir, son capaces de inhibir la formación de tumores espontáneos, inducidos víricamente o inducidos químicamente en animales de laboratorio. Los vectores basados en un casete de expresión parvoviral conservan las características oncotrópicas de los virus de origen natural. A pesar de los impresionantes resultados obtenidos, se necesita mejorar la eficacia anticancerígena de los candidatos de parvovirus más prometedores para aplicaciones clínicas en seres humanos (incluido el H-1PV), p. ej., en lo que respecta a la prolongación de la esperanza de vida tras el diagnóstico.

El documento US 2004/029106 A1 divulga genomas de vectores de parvovirus duplicados que en las condiciones apropiadas son capaces de formar una molécula bicatenaria mediante apareamiento de bases intracatenario.

El documento US 5.952.221 A divulga el uso de viriones recombinantes de virus adenoasociados (AAV, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de tumores sólidos.

Giese *et al.*, Cancer Gene Therapy, 2002, Vol. 9, N.º 5, págs. 432-442 describen la supresión de hemangiosarcomas metastásicos en ratones inmunocompetentes tras la inyección intratumoral del parvovirus MVMp como vector portador de la quimiocina IP-10.

Haag *et al.*, Human Gene Therapy, 2000, Vol. 11, N.º 4, págs. 597-609 divulgan la transducción y expresión eficaz de genes de citoquinas en células tumorales humanas mediada por vectores de parvovirus autónomos.

El artículo de Enderlin *et al.*, (Cancer Gene Therapy, 2009, Vol. 16, N.º 2, págs. 149-160) trata sobre el suministro de TNF- α y la proteína 10 inducible por el IFN-gamma (IP-10/CXCL) mediante vectores parvovirales en glioblastoma de ratón.

Abschuetz *et al.*, Cell and Tissue Research, 2006, Vol. 325, N.º 3, págs. 423-436 describen que los parvovirus autónomos murinos son vectores candidatos para la terapia génica del glioma.

Angelova *et al.* divulgan el uso del parvovirus H1-PV para el tratamiento del linfoma en estudios *in vivo* e *in vitro*.

Ehtesham *et al.*, Cancer Gene Therapy, 2002, Vol. 9, N.º 11, págs. 925-934 divulgan el uso de IFN- γ , así como de TNF- α para el tratamiento de gliomas intracraneales, ambos suministrados usando un vector adenoviral.

Por lo tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar medios para una terapia mejorada basada en parvovirus.

De acuerdo con la invención, esto se consigue mediante los contenidos definidos en las reivindicaciones.

La presente invención se basa en los hallazgos del solicitante de que mediante el tratamiento combinado con el parvovirus H1 (H1-PV) y la citoquina IFN- γ puede mejorarse la eficacia terapéutica. La observación de que la

combinación de H1-PV e IFN- γ también muestra efectos beneficiosos en mamíferos inmunodeficientes indica que este efecto no depende de los linfocitos T.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Monitorización del crecimiento de un tumor de rata (glioma RG2) mediante tomografía de RM.

5 Figura 2: Monitorización del crecimiento de un tumor humano (glioma U87) mediante tomografía de RM.

Por lo tanto, la presente invención proporciona el parvovirus H1 (H1-PV) e IFN- γ para su uso en un método para tratar el cáncer, donde (a) H1-PV y (b) IFN- γ son administrados secuencialmente o administrados conjuntamente.

Preferentemente, los componentes (a) y (b) se suministran como entidades separadas, p. ej., en recipientes separados.

10 Según se usa en la presente, el término “citoquina” se refiere a una categoría de moléculas señalizadoras que se usan ampliamente en comunicación celular. Comprenden proteínas, péptidos y glicoproteínas. El término citoquina engloba una gran familia de reguladores polipeptídicos que son producidos ampliamente en todo el cuerpo por células de diverso origen embriológico. La acción de las citoquinas puede ser autocrina, paracrina y endocrina. Todas las citoquinas son críticas para el desarrollo y funcionamiento de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa. A menudo son secretadas por células inmunitarias que han encontrado un patógeno, de este modo activan y reclutan células inmunitarias adicionales para aumentar la respuesta del sistema al patógeno. Basándose en los ensayos mostrados en los Ejemplos 2 y 3 el experto en la materia está capacitado para seleccionar citoquinas que muestren efectos beneficiosos cuando sean administradas de acuerdo con la presente invención.

20 La citoquina de la presente invención es el interferón- γ . Todos los interferones (IFN) son proteínas de señalización celular naturales producidas por las células del sistema inmune de la mayoría de vertebrados en respuesta a amenazas tales como virus, parásitos y células tumorales. Los interferones son producidos por una amplia variedad de células en respuesta a la presencia de ARN bicatenario, un indicador clave de una infección viral. Los interferones asisten a la respuesta inmune inhibiendo la replicación viral en células huésped, activando linfocitos citolíticos naturales y macrófagos, aumentando la presentación de antígenos a los linfocitos e induciendo la resistencia de las células huésped a la infección viral. En general, todos los interferones tienen varios efectos en común y, en consecuencia, los resultados obtenidos mediante el uso de IFN- γ combinado con H1-PV podrían aplicarse a interferones adicionales. Los interferones son antivirales y poseen propiedades antioncogénicas, de activación de macrófagos y linfocitos citolíticos naturales, aumento de las glicoproteínas de clases I y II del complejo mayor de histocompatibilidad y por lo tanto presentación de péptidos exógenos (microbianos) a los linfocitos T. La producción de interferones se induce como respuesta a microbios tales como virus y bacterias y a sus productos (glicoproteínas virales, ARN viral, endotoxina bacteriana, flagelos bacterianos, sitios CpG) así como mitógenos y otras citoquinas, por ejemplo, la interleuquina, interleuquina 2, interleuquina 12, el factor de necrosis tumoral y el factor estimulante de colonias, que son sintetizados en respuesta a la aparición de varios antígenos en el cuerpo. Su metabolismo y excreción tienen lugar principalmente en el hígado y los riñones. Raramente pasan a la placenta, pero pueden atravesar la barrera hematoencefálica.

Existen tres clases principales de interferones que han sido descritos para seres humanos:

- (a) Interferón de tipo I: Los interferones de tipo I presentes en seres humanos son IFN- α , IFN- β e IFN- ω .
- (b) Interferón de tipo II: En seres humanos este es el IFN- γ .
- (c) Interferón de tipo III: Señalizan a través de un complejo receptor que consta de IL10R2 (también llamado CRF2-4) e IFNLR1 (también llamado CRF2-12).

De acuerdo con la presente invención el interferón es interferón- γ .

Preferentemente, en dicha composición farmacéutica el parvovirus y la citoquina están presentes en una dosis efectiva y combinados con un portador farmacéuticamente aceptable. Se pretende que la expresión “farmacéuticamente aceptable” englobe cualquier portador que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos y que no sea tóxico para el paciente al que se le administra. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Este tipo de portadores se pueden formular mediante métodos convencionales y se pueden administrar al sujeto en una dosis efectiva.

50 Una “dosis efectiva” se refiere a cantidades de los principios activos que son suficientes para afectar al curso y la gravedad de la enfermedad, con lo que provocan la reducción o remisión de dicha patología. Una “dosis efectiva” útil para tratar y/o prevenir estas enfermedades o trastornos se puede determinar usando métodos conocidos por el experto en la materia (véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman and

Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., Nueva York, págs. 1-46 (1975)).

Las dosis preferidas para el parvovirus están en el rango de aproximadamente 10^8 a 10^9 pfu (inyección única) y para la citoquina IFN- γ en el rango de aproximadamente 10^6 a 10^7 U (inyección única).

5 Otros portadores farmacéuticamente compatibles pueden incluir geles, materiales de matriz bioadsorbible, elementos de implante que contengan el agente terapéutico o cualquier otro vehículo, material(es) o medios de suministro o dispensación adecuados.

10 La administración de los compuestos se puede efectuar de diferentes formas, p. ej., mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La vía de administración, obviamente, depende del tipo de terapia y del tipo de compuestos contenidos en la composición farmacéutica. Una vía preferida de administración es la administración intravenosa. La posología del parvovirus y la citoquina puede ser determinada fácilmente, dentro de la experiencia en la técnica, por el médico responsable basándose en datos del paciente, observaciones y otros factores clínicos, que incluyen, por ejemplo, las dimensiones del paciente, el área de superficie corporal, edad, sexo, el parvovirus particular que se ha de administrar, el tiempo y la vía de administración el tipo y características del tumor, la salud general del paciente y otras terapias farmacológicas a las que el paciente esté siendo sometido.

15 Si el parvovirus comprende partículas de virus infeccioso con la habilidad de penetrar a través de la barrera hematoencefálica, el tratamiento se puede llevar a cabo o al menos iniciarse mediante inyección intravenosa del virus parvovirus H1. Una vía de administración preferida es la administración intratumoral.

20 Puesto que el tratamiento intravenoso a largo plazo es susceptible de volverse ineficaz como resultado de la formación de anticuerpos neutralizantes para el parvovirus, se pueden adoptar diferentes formas de administración tras un plan inicial de administración viral intravenosa, o alternativamente, se pueden usar dichas técnicas diferentes de administración, p. ej., administración del virus intracraneal o intratumoral, durante todo el curso de tratamiento parvoviral.

25 Como otra técnica específica de administración, el parvovirus (virus, vector y/o agente celular) que contiene la composición se puede administrar al paciente a partir de una fuente implantada en el paciente. Por ejemplo, un catéter, p. ej., de silicona u otro material biocompatible, se puede conectar a un pequeño depósito subcutáneo (reservorio de Rickham) colocado en el paciente durante la eliminación del tumor o en un procedimiento separado, para permitir que la composición que contiene el parvovirus sea inyectada localmente en varias ocasiones sin intervención quirúrgica adicional. El parvovirus o vectores derivados que contengan la composición también se pueden inyectar en el tumor mediante técnicas quirúrgicas estereotácticas o mediante técnicas de neuronavegación dirigida.

30 La administración de composiciones que contienen parvovirus también puede llevarse a cabo mediante infusión continua de partículas virales o fluidos que contengan partículas virales con bajas tasas de flujo a través de catéteres implantados usando sistemas de bombeo adecuados, p. ej., bombas peristálticas de infusión o bombas de suministro mejorado por convección (CED, por sus siglas en inglés).

35 Otro método más para la administración de la composición que contiene el parvovirus es a partir de un artículo implantado construido y dispuesto para dispensar la composición que contiene el parvovirus al tejido canceroso deseado. Por ejemplo, se pueden emplear obleas que hayan sido impregnadas con la composición que contiene el parvovirus, donde la oblea se fija a los bordes de la cavidad de resección al concluir la eliminación quirúrgica del tumor. Se pueden emplear múltiples obleas en este tipo de intervenciones quirúrgicas. Se pueden inyectar células que produzcan activamente el parvovirus H1 o vectores de H1 en el tumor, o en la cavidad tumoral tras la eliminación del tumor.

40 La terapia combinada es útil para el tratamiento terapéutico del cáncer, en particular tumores cerebrales, y puede mejorar significativamente el pronóstico de dichas enfermedades. La infección con el parvovirus H1 logra matar las células tumorales, pero no daña las células normales y una infección de este tipo puede, por ejemplo, llevarse a cabo mediante el uso intracerebral del parvovirus H1 (-1PV) o un virus relacionado o vectores basados en este tipo de virus, para llevar a cabo una terapia específica del tumor sin efectos neurológicos adversos u otros efectos secundarios.

45 La presente divulgación también se refiere al uso de (a) un parvovirus y (b) una citoquina, preferentemente IFN- γ , para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer en la que, preferentemente, (a) y (b) se administran secuencialmente (o separadamente).

50 En una realización preferida de la presente invención, la combinación de agentes se utiliza en el tratamiento de tumores cerebrales tales como glioma, meduloblastoma y meningioma. Los gliomas preferidos son los glioblastomas humanos malignos. Sin embargo, la terapia descrita es, en principio, aplicable a cualquier tumor que pueda ser infectado con el parvovirus, p. ej., el parvovirus H1. Los tumores de este tipo comprenden tumores pancreáticos,

tumores prostáticos, tumores pulmonares, tumores renales, tumores hepáticos, linfoma, cáncer de mama y hepatoma.

El término "parvovirus" como se usa en la presente comprende el de origen natural o derivados modificados de este aptos para la replicación, así como virus relacionados o vectores basados en este tipo de virus o derivados. Los parvovirus, derivados, etc. adecuados, así como las células que pueden usarse para producir activamente dichos parvovirus y que son útiles para terapia, se pueden determinar fácilmente dentro de la experiencia en la técnica basándose en la presente divulgación, sin excesivo esfuerzo empírico.

En la presente divulgación, el parvovirus de la composición incluye el parvovirus H1 (H1-PV) o un parvovirus relacionado tal como Lull, virus diminuto de ratón (MMV, por sus siglas en inglés), parvovirus de ratón (MPV, por sus siglas en inglés), virus diminuto de rata (RMV, por sus siglas en inglés), parvovirus de rata (RPV, por sus siglas en inglés) o virus de rata (RV, por sus siglas en inglés).

Los pacientes que se pueden tratar con la combinación de agentes de acuerdo con la invención incluyen seres humanos, así como animales no humanos. Los ejemplos de los últimos incluyen, sin carácter limitante, animales tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros y gatos.

Preferentemente, el parvovirus y la citoquina se administran como compuestos separados. La administración de la citoquina, cuando se administra separadamente, se puede conseguir de diversas formas (remítase a lo expuesto anteriormente) que incluyen sistémicamente mediante vías parenterales y enterales.

En una realización preferida adicional, el parvovirus se administra junto con la citoquina.

Los ejemplos que se exponen a continuación explican la invención en más detalle.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

(A) Producción y detección de virus

El virus H-1 de origen natural se produjo infectando células NBK, se purificó mediante centrifugación a través de un gradiente de iodixanol y se sometió a diálisis en solución de Ringer. Los títulos virales se determinaron según se ha descrito previamente y se expresaron como unidades formadoras de centros de replicación (cfu, por sus siglas en inglés). Resumidamente, se aplicaron varias diluciones en serie de virus purificados a las células NBK. A las 48 horas de la infección, los cultivos infectados se secaron sobre filtros y se detectaron los centros de replicación mediante hibridización, usando una sonda radiactiva específica para ADN de virus (Russell *et al.*, J Virol 1992; 66:2821-8).

(B) Estudios en animales

(i) **Anestesia.** Todos los procedimientos quirúrgicos y de tomografía se llevaron a cabo bajo anestesia gaseosa con isoflurano (Aerrane®, Baxter, Maurepas, Francia) en oxígeno puro. Las concentraciones de isoflurano variaron entre un 5% al comienzo de la anestesia y un 2% (+/- 0.5%) durante el procedimiento quirúrgico o de tomografía.

(ii) **Animales.** Se usaron hembras de ratas Wistar o ratas inmunodeficientes RNU (Charles River, Sulzfeld, Alemania) de 6 a 7 semanas de edad que pesaban unos 220-250 g para la implantación de células tumorales. A las ratas Wistar se les implantaron células de glioma RG-2 y a las ratas RNU se les implantaron células humanas U87. Se mantuvo a los animales en condiciones convencionales (temperatura de 22 ± 2 °C, humedad relativa de $55 \pm 10\%$, ritmos de luz-oscuridad de 12 h) con acceso ilimitado a una dieta de pienso equilibrada y agua. Los experimentos con animales se llevaron a cabo de acuerdo a las normativas francesas y de la Comunidad Europea para el cuidado de los animales (número 86/609/CEE del 24 de noviembre de 1986).

(C) Tomografía de resonancia magnética

Los animales fueron examinados en un escáner de TRM de 2.45 Teslas (Bruker, Ettlingen, Alemania) usando imagen ponderada T1 antes y después de la inyección de 0.4 mL de un medio de contraste (Gadodiamida, Omniscan™, Amersham, Braunschweig, Alemania) en la vena de la cola. La imagen potenciada en T1 con Gadodiamida se llevó a cabo 5 min después de la inyección. Durante el examen por RM, las ratas fueron anestesiadas mediante insuflaciones de isoflurano (dosis inicial 5%, de mantenimiento 2%). El volumen de los tumores se determinó usando el programa MRICro.

Ejemplo 2

Aumento de la eficacia del tratamiento del glioma de rata en ratas inmunocompetentes mediante la combinación de IFN- γ con el parvovirus H-1 (H-1PV)

Modelo tumoral: Se implantaron intracranealmente células (10^4 células por animal) de una línea celular de glioma de rata (células RG2) en el prosencéfalo derecho de ratas Wistar. En total se analizaron 11 ratas inmunocompetentes Wistar (6-7 semanas de edad, 240-250 g, hembras) en los experimentos.

Se usaron 3 animales como control, es decir, se les implantaron células tumorales, pero sin que se sucediera ningún tratamiento, y el crecimiento del tumor fue monitorizado mediante tomografía de RM. Se dividieron 8 animales en tres grupos:

- (a) Un grupo (3 ratas, que portaban tumores de tipo glioma de rata) fue tratado mediante inyección intravenosa de IFN- γ (IFN- γ recombinante de rata, 10^5 U por animal) 7 días después de la implantación de células tumorales.
- (b) El segundo grupo (3 ratas portadoras de glioma de rata) fue tratado mediante inyección intravenosa de una combinación de H-1PV e IFN- γ de rata 7 días después de la implantación del tumor (dosis final de H-1PV por animal: 10^8 pfu; concentración final de IFN- γ por animal: 10^5 U).
- (c) El tercer grupo (2 ratas portadoras de glioma de rata) fue tratado mediante inyección intravenosa de H-1PV exclusivamente (10^8 pfu por animal) 7 días después de la implantación del tumor.

El crecimiento del tumor se analizó mediante tomografía de RM a intervalos de 7 días.

Resultados:

Los resultados se muestran en la Figura 1.

- (a) En todos los animales de control, los tumores crecieron de forma continua y las ratas fueron sacrificadas tras un periodo máximo de 14 días debido a que presentaban signos de sufrimiento (caquexia, debilitamiento y dificultad para moverse o comer).
- (b) En 2 ratas se observó una regresión completa del tumor tras 7 días después del tratamiento en el grupo tratado con la combinación de H-1PV e IFN- γ de rata. En un animal, el crecimiento del tumor cesó tras el tratamiento.
- (c) En el grupo de animales tratados exclusivamente con H-1PV, el volumen del tumor se redujo 7 días después de la infección (no habiendo remitido completamente en ese momento).
- (d) Los tumores en ratas tratados únicamente con IFN- γ continuaron creciendo tras el tratamiento, aunque no tan rápido como en los animales de control. Las ratas de este grupo sobrevivieron hasta un máximo de 19 días después de la implantación de las células tumorales (es decir, 5 días más en comparación con los animales de control). En este grupo no se observó ni regresión del tumor ni detención del crecimiento del tumor.

Cabe esperar que se puedan conseguir no solo efectos aditivos sino incluso efectos sinérgicos *in vivo* mediante el tratamiento combinado con H-1PV y una citoquina tal como IFN- γ .

Ejemplo 3

Aumento de la eficacia del tratamiento de un tumor cerebral derivado de una línea celular de glioma humano en ratas inmunodeficientes mediante la combinación de IFN- γ con el parvovirus H-1 (H-1PV)

Modelo tumoral: Se implantaron intracranealmente células (10^5 células por animal) de una línea celular de glioma humano (células U87) en el prosencéfalo derecho de las ratas. En total se analizaron 18 ratas inmunodeficientes RNU (6-7 semanas de edad, 220-250 g, hembras) en los experimentos.

Se usaron 5 animales como control, es decir, se les implantaron células tumorales, pero no fueron sujetos a ningún tratamiento y el crecimiento del tumor fue monitorizado mediante tomografía de RM. Los 13 animales restantes se dividieron en tres grupos de tratamiento:

- (a) Un grupo (5 ratas, que portaban tumores derivados de células de glioma humano) fue tratado mediante inyección intravenosa de IFN- γ (IFN- γ humano recombinante, 10^5 U por animal) 7 días después de la implantación de células tumorales.
- (b) El segundo grupo (5 ratas portadoras de glioma humano) fue tratado mediante inyección intravenosa de una combinación de H-1PV e IFN- γ humano, 7 días después de la implantación del tumor (dosis final de H-

1PV por animal: 10^8 pfu; concentración final de IFN- γ por animal: 10^5 U).

- (c) El tercer grupo (3 ratas) fue tratado con una inyección intravenosa de H-1PV exclusivamente (10^8 pfu por animal), 7 días después de la implantación del tumor.

El crecimiento del tumor fue analizado mediante tomografía de RM a intervalos de 4 días.

5 **Resultados:**

Los resultados se muestran en la Figura 2.

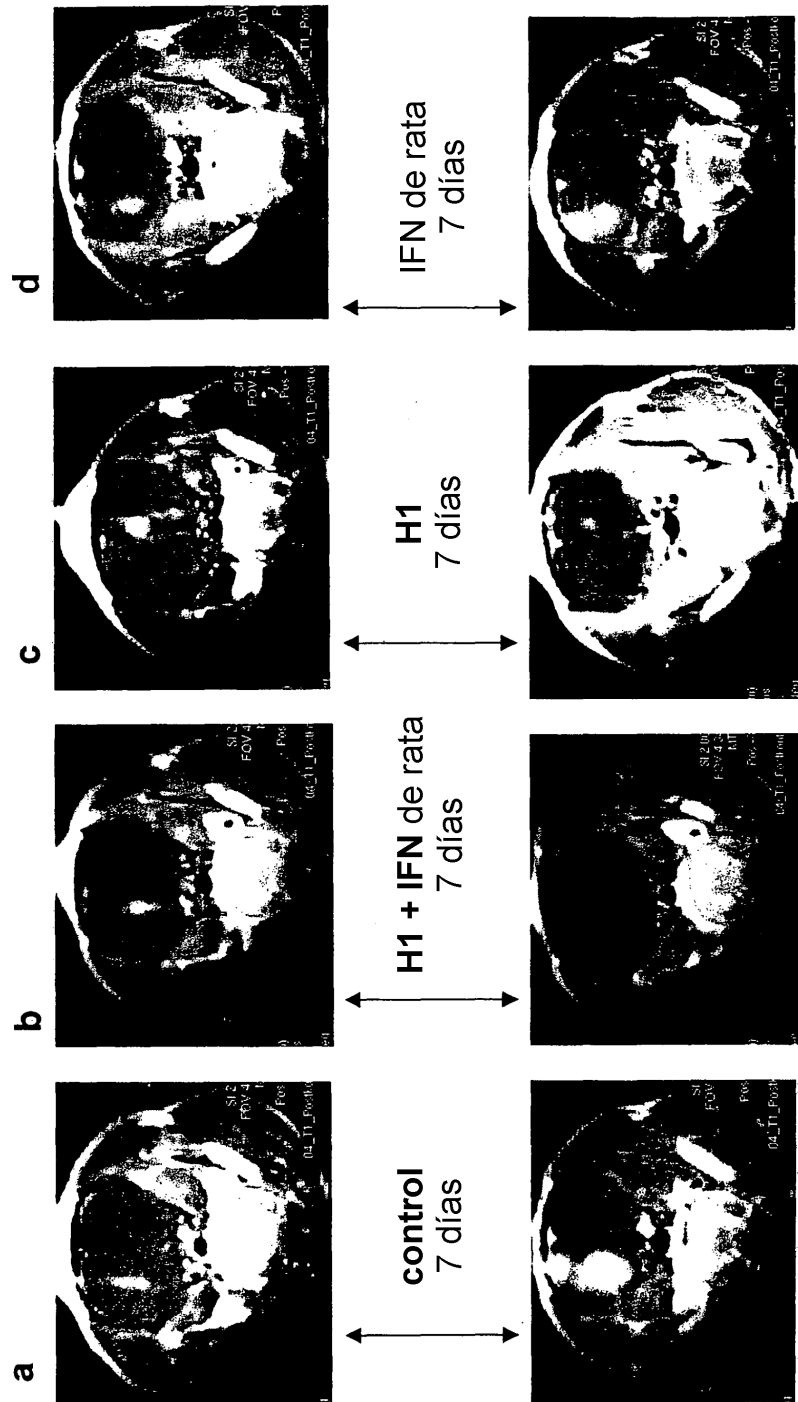
- (a) En todos los animales de control, los tumores crecieron de forma continua y las ratas fueron sacrificadas tras un periodo máximo de 14 días, debido a que presentaban signos de sufrimiento (caquexia, debilitamiento, dificultad para moverse o comer).
- 10 (b) En 3 ratas se observó una regresión completa del tumor humano en el grupo tratado con la combinación de H-1PV e IFN- γ humano. En dos animales el crecimiento del tumor cesó tras el tratamiento y el volumen del tumor permaneció constante hasta que las ratas fueron sacrificadas para realizar análisis histológicos.
- 15 (c) Los tumores en las ratas tratadas únicamente con IFN- γ continuaron creciendo tras el tratamiento, aunque no tan rápido como en los animales de control. Las ratas de este grupo sobrevivieron un máximo de 3 semanas posteriores a la implantación de las células tumorales (es decir, una semana más en comparación con los animales de control). En este grupo no se observó ni regresión del tumor ni detención del crecimiento del tumor.
- (d) En el grupo de animales tratados exclusivamente con H-1PV, el volumen del tumor se redujo 7 días después de la infección (no habiendo remitido completamente en ese momento).

20

REIVINDICACIONES

1. El parvovirus H1 (H1-PV) e IFN- γ para su uso en un método de tratamiento del cáncer, donde (a) H1-PV y (b) un IFN- γ se administran de manera secuencial o se administran conjuntamente.
- 5 2. H1-PV e IFN- γ para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho cáncer es un tumor cerebral.
3. H1-PV e IFN- γ para el uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde dicho tumor cerebral es un glioma, meduloblastoma o meningioma.
4. H1-PV e IFN- γ para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicho glioma es un glioblastoma humano maligno.
- 10 5. H1-PV e IFN- γ para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde H1-PV es administrado mediante administración intratumoral.

Glioma RG2 en rata (normales) Wistar (10 000 células/rata)



Glioma humano U87 en ratas (inmunodeficientes) RNU (100 000 células/rata)

