

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 570**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61K 31/4412** (2006.01)

**A61K 35/768** (2015.01)

**A61P 35/04** (2006.01)

**A61K 31/44** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2010 PCT/US2010/048829**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2011 WO11032180**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2010 E 10816293 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2477499**

54 Título: **Terapia combinada contra el cáncer con virus oncolítico de vaccinia**

30 Prioridad:

**14.09.2009 US 242238 P**

**21.09.2009 US 244250 P**

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

**07.06.2018**

73 Titular/es:

**SILLAJEN BIOTHERAPEUTICS, INC. (100.0%)**

**450 Sansome Street, Suite 650**

**San Francisco, CA 94111, US**

72 Inventor/es:

**KIRN, DAVID y**

**BREITBACH, CAROLINE**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 671 570 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 combinada contra el cáncer con virus oncolítico de vaccinia

**Antecedentes de la invención**

I. Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a los campos de la oncología y la virología. Más particularmente, trata de poxvirus, que incluyen específicamente virus oncolíticos de vaccinia adecuados para el tratamiento del cáncer, y su uso en combinación con agentes antiangiogénicos.

II. Antecedentes

10 La homeostasis tisular normal es un proceso sumamente regulado de proliferación celular y muerte celular. Un desequilibrio, sea de la proliferación celular o de la muerte celular, puede evolucionar a un estado canceroso (Solyanik *et al.*, 1995; Stokke *et al.*, 1997; Mumby y Walter, 1991; Natoli *et al.*, 1998; Magi-Galluzzi *et al.*, 1998). Por ejemplo, el cáncer cervical, el de riñón, de pulmón, pancreático, colorrectal y cerebral son solo algunos ejemplos de los muchos cánceres que pueden producirse (Erlandsson, 1998; Kolmel, 1998; Mangray y King, 1998; Mougín *et al.*, 1998). De hecho, la incidencia de cáncer es tan elevada que se atribuyen al cáncer más de 500.000 muertes al año, solo en los Estados Unidos.

Existen en la actualidad pocas opciones eficaces para el tratamiento de muchos tipos comunes de cáncer. El curso del tratamiento para un individuo dado depende del diagnóstico, de la fase hasta la que se ha desarrollado la enfermedad y de factores tales como la edad, el sexo y la salud general del paciente. Las opciones más convencionales de tratamiento del cáncer son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. La cirugía desempeña un papel central en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Típicamente, se requiere un enfoque quirúrgico para la biopsia y para eliminar el crecimiento canceroso. Sin embargo, si el cáncer ha metastatizado y está extendido, es poco probable que la cirugía consiga la cura, por lo que se debe adoptar un enfoque alternativo.

25 Los virus oncolíticos selectivos en cuanto a la replicación son prometedores para el tratamiento del cáncer (Kirn *et al.*, 2001). Estos virus pueden originar la muerte de células tumorales a través de efectos oncolíticos que dependen de la replicación directa y/o la expresión génica vírica (Kirn *et al.*, 2001). Además, los virus pueden intensificar la inducción de inmunidad antitumoral mediada por células dentro del hospedante (Todo *et al.*, 2001; Sinkovics *et al.*, 2000). También se pueden modificar estos virus mediante ingeniería genética para dar transgenes terapéuticos expresados dentro del tumor, con el fin de mejorar la eficacia antitumoral (Hermiston, 2000). Sin embargo, también existen importantes limitaciones para este enfoque terapéutico.

30 El 14 de junio de 2008, durante la 14ª Reunión anual en 2008 de la Japan Society of Gene Therapy (Sociedad japonesa de terapia génica), se celebró una "Conferencia Especial II", presidida por Shigetaka Asano, con el tema "Recent Progress in Cancer Gene Therapy (2)" (Avances recientes en terapia génica contra el cáncer (2)). Según la agenda de la reunión, estaban previstas dos presentaciones:

1. David Kirn (JENNEREX Biotherapeutics Inc.)

35 "ONCOLYTIC POXVIRUS PRODUCT CLASS: TARGETED & ARMED MULTIMECHANISTIC THERAPEUTICS FOR CANCER" (Clase de producto poxvirus oncolítico: terapia multimecanística apuntada y armada contra el cáncer)

2. Tae-Ho Hwang (Pusan National University Hospital)

40 "COMBINATIONAL THERAPY WITH JX-594 ONCOLYTIC VACCINIA VIRUS AND SORAFENIB (NEXAVAR) IN HUMAN HEPATOCELLULAR CANCER CELL LINES" (Terapia combinacional con virus oncolítico JX-594 de vaccinia y sorafenib (Nexavar) en líneas celulares de cáncer hepatocelular humano"

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

**Compendio de la invención**

45 Estudios *in vitro* han indicado que el sorafenib y similares inhibidores de cinasa suprimen la efectividad de poxvirus, virus de vaccinia y en particular JX-594, cuando se emplean en combinación sobre líneas celulares cultivadas. Contrariamente a los hallazgos *in vitro*, los modelos de eficacia preclínica han demostrado que la combinación de sorafenib y JX-594 muestra realmente una mejor eficacia que cualquiera de los agentes solo. Por lo tanto, diversos aspectos de la invención están dirigidos a la aplicación de estos hallazgos inesperados como terapia *in vivo* empleando una combinación de poxvirus, virus de vaccinia o virus JX-594 y agentes antiangiogénicos, tales como inhibidores de cinasa, sorafenib, Sutent o compuestos similares.

50 La invención está dirigida al inhibidor antiangiogénico de tirosina cinasa sorafenib, para uso en un método para tratar cáncer metastásico en un sujeto, habiendo sido sometido previamente el sujeto a una terapia con virus de vaccinia,

en donde el virus de vaccinia es un virus de vaccinia que expresa GM-CSF y carece de un gen funcional de timidina cinasa, en donde el inhibidor antiangiogénico de tirosina cinasa se administra como máximo 13 semanas después de la terapia con virus de vaccinia, y en donde el virus de vaccinia se ha administrado intravascularmente, o tanto intravascularmente como intratumoralmente. En ciertos aspectos, se determina que el tumor que se está tratando está experimentando revascularización. Se describe que el poxvirus es un virus de vaccinia. Según la invención, el virus de vaccinia es un virus de vaccinia que expresa GM-CSF. Además, el virus de vaccinia carece de un gen funcional de timidina cinasa. En ciertos aspectos, el virus de vaccinia es JA-594.

Ciertas realizaciones están dirigidas a potenciar la terapia antiangiogénica, particularmente aquellas para las cuales un paciente ha fallado, ha desarrollado una tolerancia, no responde o responde parcialmente. En el presente documento, el término "potenciar" y las expresiones "que potencia", "que potencia la terapia", "se potencia el efecto terapéutico" y "que potencia los efectos terapéuticos" se definen como la producción de uno o más de los siguientes efectos fisiológicos: el aumento o intensificación de la actividad citotóxica de agentes terapéuticos por actuar de una manera citotóxica aditiva o sinérgica con los agentes terapéuticos; la sensibilización de células cancerosas o de un tumor hacia la actividad anticancerosa de agentes terapéuticos; y/o el restablecimiento de la eficacia antiangiogénica de una terapia o de la sensibilidad de un tumor a la terapia. Se describen agentes antiangiogénicos como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer. También se describen métodos para potenciar la terapia antiangiogénica, incluida la administración de un poxvirus a un paciente que es insensible a la terapia antiangiogénica, ha desarrollado una tolerancia a la misma o no responde suficientemente a la misma, en una cantidad que potencia la eficacia terapéutica de la terapia antiangiogénica. Según la invención, la terapia antiangiogénica es sorafenib. Se describe además que la terapia antiangiogénica es un inhibidor de cinasa, Sutent o compuesto similar. Los métodos de la invención también pueden incluir identificar un paciente que sea resistente o no responda o presente recurrencia de cáncer después de una terapia antiangiogénica. En ciertos aspectos, se administra una cantidad sensibilizante de virus de vaccinia o virus JX-594 a un paciente que es resistente, tolerante o insensible a la terapia antiangiogénica (inhibidores antiangiogénicos de cinasa, sorafenib, Sutent o compuestos similares). Una cantidad sensibilizante es una cantidad suficiente para hacer a un tumor que no presenta respuesta terapéutica a un tratamiento –cuando lo determine un médico o un científico–, capaz de responder a dicha terapia o a una terapia similar.

Se denominan cánceres y tumores "resistentes a la terapia" a cánceres que se han vuelto resistentes a terapias antiangiogénicas contra el cáncer. Los cánceres "sensibles a la terapia" responden a la terapia (se pueden detectar o medir parámetros clínicos de respuesta, tales como reducción del crecimiento tumoral, necrosis tumoral, contracción del tumor, cierre vascular del tumor y similares). Un experto en la materia apreciará que algunos cánceres son sensibles a la terapia en el caso de agentes particulares, pero no de otros.

En ciertos aspectos, el agente antiangiogénico es un inhibidor de cinasa. En otros aspectos, el inhibidor de cinasa inhibe la ruta de cinasa Raf. Según la invención, el inhibidor de cinasa es sorafenib. Se describe adicionalmente Sutent, o similar inhibidor antiangiogénico de cinasa.

Ciertas realizaciones están dirigidas al uso en un método de tratamiento que comprende además determinar si un tumor está experimentando revascularización. En ciertos aspectos, la revascularización se determina mediante obtención no invasiva de imágenes del tumor, por ejemplo, obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI, por sus siglas en inglés). En ciertos aspectos, la obtención de imágenes por resonancia magnética consiste en MRI realizada con contraste dinámico (DCE-MRI).

En ciertos aspectos del uso en un método de tratamiento se administra el agente antiangiogénico al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más semanas, en particular como máximo 13 semanas, incluidos todos los valores e intervalos entre lo citado, después de la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta o más administración de virus de vaccinia.

Se describe que el tumor es un tumor cerebral, un tumor de cáncer de cabeza y cuello, un tumor esofágico, un tumor cutáneo, un tumor de pulmón, un tumor tímico, un tumor de estómago, un tumor de colon, un tumor de hígado, un tumor de ovario, un tumor uterino, un tumor de vejiga, un tumor testicular, un tumor rectal, un tumor de mama, un tumor de riñón o un tumor pancreático. En un aspecto adicional, el tumor es un carcinoma hepatocelular o un cáncer colorrectal.

Según la invención, el uso en un método de tratamiento comprende, en primer lugar, administrar al sujeto el virus de vaccinia o terapia vírica con JX-594. Según la invención, la terapia vírica se puede administrar por inyección en una masa tumoral o por administración intravascular. En un aspecto particular, se inyecta el virus en la vasculatura del tumor. En ciertos aspectos, la terapia vírica se puede administrar a través de modalidades múltiples, por ejemplo, intravascular e intratumoral, etc.

Ciertas realizaciones están dirigidas al uso en un método para tratar un tumor hepático o tumor metastásico en el hígado u otro órgano de un paciente, que comprende administrar sorafenib al tumor, en donde el tumor ha sido tratado previamente con un virus de vaccinia o virus JX-594. Los métodos de la invención también pueden incluir determinar si el tumor está experimentando reperfusión.

Ciertos aspectos están dirigidos al uso en un método para tratar un tumor hepático, ya sea primario o metastásico (un tumor metastásico es un tumor que se ha originado en un órgano o tejido distal con respecto a la ubicación en la que se está tratando) que comprende administrar una cantidad eficaz de un virus de vaccinia, o un virus JX-594, y administrar un agente antiangiogénico. En ciertos aspectos, el agente antiangiogénico será un inhibidor de cinasa. En aspectos adicionales, el inhibidor de la cinasa es sorafenib.

Ciertas realizaciones están dirigidas al uso en un método para tratar un tumor hepático que comprende administrar una cantidad eficaz de un virus de vaccinia, o un virus JX-594, en donde se evaluará el tumor en cuanto a reperfusión y se determinará que es un candidato para la terapia con sorafenib si el tumor está experimentando reperfusión.

En aún otros aspectos, se dirige al uso en un método para tratar a un paciente que padece un tumor, que comprende (a) evaluar, mediante obtención no invasiva de imágenes del tumor, con el fin de detectar reperfusión, un tumor que ha sido tratado con una terapia anticancerosa; y (b) administrar una cantidad eficaz de agente antiangiogénico, sorafenib, a un tumor en el que se detecta o se sospecha reperfusión. No se requiere la obtención de imágenes para tratar un tumor con la combinación de JX-594 y un antiangiogénico tal como sorafenib o Sutent o similar inhibidor de cinasa.

JX-594 es un poxvirus oncolítico con diana específica diseñado para replicarse selectivamente en células cancerosas y destruirlas. La oncólisis directa más la expresión del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) también estimula el cierre vascular del tumor en tumores.

La invención está dirigida al uso de un método que incluye la administración de un virus de vaccinia deficiente en timidina cinasa (tk, por sus siglas en inglés). En ciertos aspectos, los métodos incluyen administrar al sujeto un vector de virus de vaccinia deficiente en TK, que expresa GM-CSF, competente para la replicación (por ejemplo, JX-594) en una cantidad suficiente para inducir la oncólisis de células en el tumor tratado o en otros tumores distales con respecto al sitio de administración. La administración de virus de vaccinia puede ser seguida por la administración de un agente antiangiogénico, tal como un inhibidor antiangiogénico de tirosina cinasa.

Se han descrito los siguientes inhibidores de tirosina cinasa: sunitinib (SU1 1248; Sutent®), SU5416, SU6668, vatalanib (PTK787/ZK222584), AEE788, ZD6474, ZD4190, AZD2171, GW786034, sorafenib (BAY 43-9006), CP-547,632, AG013736, YM-359445, gefitinib (Iressa®), erlotinib (Tarceva®), EKB-569, HKI-272 y CI-1033. El sorafenib (Nexavar, Bayer) es un fármaco aprobado para el tratamiento del cáncer primario de riñón (carcinoma de células renales avanzado) y cáncer de hígado primario avanzado (carcinoma hepatocelular). El sorafenib es un inhibidor de molécula pequeña para varias proteína-cinasas de tirosina. El sorafenib tiene como diana la ruta Raf/Mek/Erk (ruta de cinasas MAP). Por lo tanto, también se describen y se consideran útiles en combinación con JX-594 otros inhibidores de cinasa que tienen como diana esta ruta.

En ciertos aspectos, al sujeto se le administran al menos  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$  o más partículas víricas o unidades formadoras de placas (UFP), incluidos los diversos valores e intervalos entre lo citado. La dosis vírica se puede administrar en 0,1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 100, 500, 1.000 o más mililitros, incluidos todos los valores y rangos entre lo citados. En un aspecto, la dosis es suficiente para generar un nivel detectable de GM-CSF en el suero del paciente, por ejemplo, al menos aproximadamente, como máximo aproximadamente, o aproximadamente, 2, 5, 10, 40, 50, 100, 200, 500, 1.000, 5.000, 10.000, 15.000 a 20.000 pg/ml, incluyendo todos los valores y rangos entre lo citado. Se contempla que una única dosis de virus se refiera a la cantidad administrada a un sujeto o un tumor durante un período de 0,1, 0,5, 1, 2, 5, 10, 15, 20 o 24 horas, incluidos todos los valores entre lo citado. La administración puede extenderse a lo largo del tiempo o bien llevarse a cabo mediante inyección separada. Típicamente, se administran múltiples dosis a la misma región diana general, por ejemplo en la proximidad de un tumor o, en el caso de la administración intravenosa, un punto de entrada particular en la corriente sanguínea o el sistema linfático de un sujeto. En ciertos aspectos, la dosis vírica se administra mediante un aparato de inyección que comprende una aguja que proporciona múltiples aberturas en una sola aguja o múltiples puntas acopladas a una jeringa, o una combinación de ambas cosas. En un aspecto adicional, el vector de virus de vaccinia se administra 2, 3, 4, 5 o más veces. Todavía en otro aspecto, el virus de vaccinia se administra durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días o semanas.

En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano. El sujeto puede estar aquejado de cáncer y/o de un tumor. En ciertas realizaciones, el tumor puede no ser reseccable antes del tratamiento y reseccable después del tratamiento. En ciertos aspectos, el tumor está localizado sobre el hígado o en el mismo. También se describe que el tumor puede ser un tumor de cáncer cerebral, un tumor de cáncer de cabeza y cuello, un tumor de cáncer esofágico, un tumor de cáncer de piel, un tumor de cáncer de pulmón, un tumor de cáncer tímico, un tumor de cáncer de estómago, un tumor de cáncer de colon, un tumor de cáncer de hígado, un tumor de cáncer de ovario, un tumor de cáncer uterino, un tumor de cáncer de vejiga, un tumor de cáncer testicular, un tumor de cáncer rectal, un tumor de cáncer de mama o un tumor de cáncer pancreático. Se describe que el tumor es un tumor de vejiga. Se describe adicionalmente que el tumor es melanoma. El tumor puede ser un tumor recurrente, primario, metastásico y/o multiresistente a fármacos. En ciertas realizaciones, el tumor es un tumor hepatocelular o un tumor metastatizado que procede de otro tejido o ubicación. En ciertos aspectos, el tumor está en el hígado.

En ciertos aspectos, se vigila al paciente en cuanto a reperfusión tumoral. En ciertos aspectos, la vigilancia o evaluación del paciente se realizará mediante obtención no invasiva o mínimamente invasiva de imágenes, por ejemplo obtención de imágenes por resonancia magnética. Si se detecta o se sospecha reperfusión, se puede administrar a un paciente un agente antiangiogénico, a saber, un inhibidor antiangiogénico de tirosina cinasa. Según la invención, el inhibidor de tirosina cinasa es sorafenib. El agente antiangiogénico se puede administrar al menos, como máximo, o aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o más semanas después de la terapia con virus de vaccinia.

En ciertos aspectos, el método comprende además administrar al sujeto una terapia anticáncer adicional. La terapia anticáncer adicional puede ser quimioterapia, terapia biológica, radioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia antivascolar, crioterapia, terapia con toxinas y/o cirugía, inclusive combinaciones de las mismas. En otro aspecto más, la cirugía incluye la quimioembolización transarterial (procedimiento TACE, véase Vogl *et al.*, *European Radiology* 16(6): 1393, 2005). El método puede comprender además una segunda administración del vector de virus de vaccinia. Los métodos de la invención pueden comprender además evaluar la viabilidad de las células tumorales antes, durante o después del tratamiento, o una combinación de ello. En ciertas realizaciones, se administra el virus por vía intravascular (IV), por vía intratumoral (IT) o por una combinación de ambas. En un aspecto adicional, la administración se realiza mediante inyección en una masa tumoral. En otra realización más, la administración se realiza mediante inyección dentro o en la región de la vasculatura tumoral. En otra realización más, la administración se realiza mediante inyección en el sistema linfático o vascular proximal al tumor. En ciertos aspectos, el método incluye obtener imágenes del tumor antes o durante la administración. En ciertos aspectos, un paciente está o no preinmunizado con una vacuna de virus de vaccinia. En un aspecto adicional, el sujeto puede estar inmunocomprometido, ya sea de manera natural o clínicamente.

En ciertos aspectos, se administra el virus en una cantidad suficiente para inducir muerte o necrosis celular o de células cancerosas en al menos 15% de las células de un tumor inyectado, en al menos 20% de las células de un tumor inyectado, en al menos 30% de células de un tumor inyectado, en al menos 40% de las células de un tumor inyectado, en al menos 50% de las células de un tumor inyectado, en al menos 60% de células de un tumor inyectado, en al menos un 70% de las células de un tumor inyectado, en al menos un 80% de las células de un tumor inyectado o en al menos un 90% de las células de un tumor inyectado.

En un aspecto adicional de la invención, los métodos pueden excluir el tratamiento previo de un sujeto con una vacuna de vaccinia, por ejemplo, un sujeto no necesita ser vacunado 1, 2, 3, 4, 5 o más días, semanas, meses o años antes de administrar la terapia descrita en la presente memoria. En algunos aspectos, se infectarán con el virus terapéutico tumores o cáncer no inyectados, tratando así a un paciente tanto mediante administración local como por diseminación sistémica.

A lo largo de esta solicitud se comentan otras realizaciones de la invención. Cualquier realización comentada con respecto a un aspecto de la invención se aplica también a otros aspectos de la invención y viceversa. Se entiende que las realizaciones de la sección de Ejemplos son realizaciones de la invención que son aplicables a todos los aspectos de la invención.

Cuando se emplean en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva los términos "inhibición", "reducción" o "prevención", o cualquier variación de estos términos, incluyen cualquier disminución medible, o la inhibición completa, para lograr un resultado deseado.

El uso de la palabra "un" o "uno" cuando se emplea junto con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva puede significar "uno", pero también es coherente con el significado de "uno o varios", "al menos uno" y "uno o más de uno".

Se contempla que cualquier realización discutida en la presente memoria pueda implementarse con respecto a cualquier método o composición de la invención, y viceversa. Además, las composiciones y kits de la invención se pueden emplear para lograr los métodos de la invención.

A lo largo de esta solicitud, se emplea el término "aproximadamente" para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor.

El uso de la partícula "o" en las reivindicaciones se usa para indicar "y/o", salvo que se indique explícitamente que se refiere solo a alternativas o bien las alternativas sean mutuamente excluyentes, aunque la descripción respalda una definición que se refiere solo a alternativas e "y/o".

En la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, las palabras "que comprende" (y cualquier forma de comprender, tales como "comprende" y "comprenden"), "que tiene" (y cualquier forma de tener, como "tiene" y "tienen"), "que incluye" (y cualquier forma de incluir, como "incluye" e "incluyen") o "que contiene" (y cualquier forma de contener, como "contiene" y "contienen") son inclusivas o abiertas, y no excluyen elementos o pasos de método adicionales no enumerados.

A partir de la descripción detallada que sigue se harán evidentes otros objetos, características y ventajas de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se ofrecen solamente a modo de ilustración.

**Descripción de los dibujos**

- 5 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas ofrecida en el presente documento.
- 10 **Figura 1.** La replicación de JX-594 es inhibida en presencia de sorafenib *in vitro*. Con diversas multiplicidades de infección (MOI, por sus siglas en inglés), se añadió JX-594 solo, o junto con sorafenib 10 µM, a células PLC/PRF/5. Tras 24 horas de infección, se recuperaron las células y sobrenadantes para titulación mediante ensayo de placas sobre células Vero.
- 15 **Figura 2.** Sorafenib inhibe la formación de placas y la replicación de JX-594. Se permitió que JX-594 infectara monocapas de células A2780 o HepG2 en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de sorafenib. Los recuadros superiores muestran experimentos que miden la formación de placas en la monocapa original y la producción de nuevas partículas víricas (estallido). El recuadro inferior muestra que concentraciones por debajo de los niveles citotóxicos son eficaces para inhibir la replicación vírica. Los datos están expresados como porcentaje con respecto al testigo (sin JX-594, sin sorafenib). Las barras de error son la desviación estándar de repeticiones.
- 20 **Figura 3.** La terapia combinada con sorafenib mejora la eficacia de JX-594 contra tumores sólidos subcutáneos CT26. El recuadro superior muestra el diseño del estudio de un estudio preclínico de eficacia de la combinación en ratones con tumores subcutáneos CT2. En el recuadro central se muestran curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para cada caso. En el recuadro inferior se muestran los efectos sobre el volumen tumoral.
- 25 **Figura 4.** La terapia combinada con sorafenib mejora la eficacia de JX-594 en el modelo de melanoma metastásico B16 murino. El recuadro superior muestra el diseño del estudio de un estudio preclínico de eficacia de la combinación en el modelo de tumor murino B16. El recuadro inferior muestra el número medio de metástasis pulmonares que se desarrollaron en cada grupo.
- 30 **Figura 5.** JX-594 seguido de sorafenib muestra eficacia superior en el modelo de xenoinjerto de HCC (carcinoma hepatocelular, por sus siglas en inglés). La tabla describe la pauta de tratamiento para cada grupo. El gráfico representa el tamaño medio del tumor (en mm<sup>3</sup>) para cada grupo con el transcurso del tiempo (las barras son el error estándar de la media).
- 35 **Figura 6.** Efectos antivasculares de JX-594 seguido de sorafenib. Los recuadros superiores muestran el diseño del estudio de un estudio preclínico de JX-594 seguido de sorafenib en el modelo de xenoinjerto de HepG2. El recuadro inferior muestra el número medio de vasos en los tumores (se contaron tres campos a 200 aumentos). Las barras de error son el error estándar.
- Figura 7.** Escaneos por DCE-MRI de paciente con HCC, que muestran cierre vascular.
- Figura 8.** Escaneos por DCE-MRI que muestran respuesta en sitios distantes a sitios de inyección intratumoral.
- Figura 9.** Escaneos por DCE-MRI que muestran respuesta en sitios distantes a sitios de inyección intratumoral.
- Figura 10.** Ilustra un resumen de respuestas de pacientes, incluida la evaluación de Choi.
- 40 **Figura 11.** Paciente 1702 - imágenes de DCE-MRI 4 semanas y 8 semanas después del tratamiento con sorafenib (se muestran 3 planos diferentes, con imágenes de 4 semanas y 8 semanas de cada plano).
- Figura 12.** Paciente 1705 - imágenes de DCE-MRI antes y 5 días después del tratamiento con JX-594: imágenes de DCE-MRI antes y 4 semanas después del tratamiento con sorafenib.
- Figura 13.** Paciente 1712 - imágenes de DCE-MRI antes y 4 semanas después del tratamiento con sorafenib.
- Figura 14.** Paciente 11301 - evaluación del paciente con metástasis de carcinoma de células renales al hígado.
- 45 **Figura 15.** Ilustración de estabilización tumoral y disminución de la intensificación observada con JX-594 y sorafenib secuenciales (paciente 1705).
- Figura 16.** Ilustra la inducción de necrosis significativa en paciente tratado con JX-594 seguido de sorafenib (paciente 1705).
- Figura 17.** Ilustra el volumen de tumor viable reducido después de la terapia secuencial con JX-594 y sorafenib.

Figura 18. Escaneos por DCE-MRI de paciente con carcinoma hepatocelular y que había sido incluido en un ensayo clínico de fase 2 con JX-594 mostraron pérdida de perfusión 10 días después del inicio de sorafenib en un tumor extrahepático no inyectado. Una vez completada la administración de JX-594 (una dosis intravenosa y dos dosis intratumorales), el paciente recibió sorafenib.

5 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se refiere al uso de un virus de vaccinia que expresa GM-CSF para lograr un grado particular de oncólisis. En otra realización, se puede emplear un virus de vaccinia en un régimen de tratamiento que es más eficaz para tratar tumores vascularizados o en vascularización. Un régimen particular es el uso de un agente antiangiogénico después del tratamiento con un virus oncológico de vaccinia. En ciertos aspectos, el régimen de tratamiento incluye obtener imágenes del tumor para evaluar la reperfusión que resulta de la revascularización del tumor después de que el virus de la vacuna induzca el colapso vascular del tumor. En ciertos aspectos, el virus de vaccinia es el virus JX-594 (virus de vaccinia TK menos, que expresa GM-CSF).

I. Regímenes de tratamiento y formulaciones farmacéuticas

15 En una realización de la presente invención se contempla un método de tratamiento contra una enfermedad hiperproliferativa, tal como el cáncer, mediante la administración de un virus oncolítico de vaccinia, tal como JX-594.

Los métodos incluyen administraciones de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un virus oncolítico de vaccinia o un agente antiangiogénico. Se define una cantidad farmacéuticamente eficaz como la cantidad suficiente para inducir oncólisis –la disrupción o lisis de una célula cancerosa– y/o la inhibición de la vascularización o la destrucción de neovascularización de tumores. El término incluye el retraso, la inhibición o la reducción del crecimiento o el tamaño de un tumor, e incluye en ciertos casos la erradicación del tumor. En ciertos aspectos, una cantidad eficaz de virus de vaccinia da como resultado la diseminación sistémica del virus terapéutico a tumores, por ejemplo la infección de tumores no inyectados.

A. Tratamientos combinados

25 Los compuestos y métodos de la presente invención se pueden utilizar en el contexto de enfermedades o afecciones hiperproliferativas, entre ellas cáncer, y se pueden utilizar en un orden de administración particular, con diversos espacios de tiempo entre administraciones. Para aumentar la eficacia de un tratamiento con las composiciones de la presente invención, por ejemplo un virus de vaccinia que expresa GM-CSF, es deseable combinar estas composiciones con agentes antiangiogénicos y otros agentes eficaces en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, se puede implementar el tratamiento de un cáncer con compuestos terapéuticos de la presente invención en combinación con agentes antiangiogénicos.

Se pueden utilizar diversas combinaciones; por ejemplo un poxvirus, tal como el virus de vaccinia JX-594, es "A" y la terapia secundaria antiangiogénica es "B":

- A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B
- B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A
- 35 B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

La administración de los vectores de poxvirus/vaccinia de la presente invención a un paciente seguirá los protocolos generales para la administración de esa terapia particular, teniendo en cuenta la toxicidad, si la hubiera, del tratamiento con poxvirus. Después del tratamiento con virus de vaccinia se administra un agente antiangiogénico para tratar eficazmente la neovascularización o reperfusión del tumor tratado con virus de vaccinia. Se espera que los ciclos de tratamiento se repitan según se precise. También se contempla que se puedan aplicar diversas terapias estándar, así como la intervención quirúrgica, en combinación con la terapia anticancerosa o contra células tumorales descrita.

Un agente "antiangiogénico" es capaz de afectar negativamente a la angiogénesis en un tumor, por ejemplo, matando células, induciendo apoptosis en células, reduciendo la tasa de crecimiento de células involucradas en la angiogénesis y reduciendo efectivamente el suministro de sangre a un tumor o célula cancerosa. Los ejemplos de agentes antiangiogénicos incluyen, pero sin limitación, sorafenib, Sutent y compuestos similares, ácido retinoico y sus derivados, 2-metoxiestradiol, Angiostatín™, Endostatin™, suramina, escualamina, inhibidor tisular de metaloproteínasa-1, inhibidor tisular de metaloproteínasa-2, inhibidor 1 de activador de plasminógeno, inhibidor 2 de activador de plasminógeno, inhibidor derivado de cartilago, paclitaxel, factor plaquetario 4, sulfato de protamina (clupeína), derivados de quitina sulfatados (preparados a partir de caparzones de cangrejo de las nieves), complejo de polisacárido sulfatado y peptidoglicano (sp-pg), estaurosporina, moduladores del metabolismo de matriz, que incluyen, por ejemplo, análogos de prolina ((ácido L-azetidín-2-carboxílico (LACA), cis-hidroxi prolina, d,l-3,4-deshidroprolina, tiaprolina, alfa-dipiridilo, fumarato de beta-aminopropionitrilo, 4-propil-5-(4-piridinil)-2(3H)-oxazolona, metotrexato, mitoxantrona, heparina, interferones, 2-macroglobulina sérica, ChIMP-3, quimostatina, tetradecasulfato de β-ciclodextrina, eponemicina, fumagilina, tiomalato de sodio y oro, D-penicilamina (CDPT), beta-1-anticolagenasa sérica, alfa-2-antiplasmina, bisantreno, lobenzarit disódico, ácido n-(2-carboxifenil)-4-cloroantranílico disódico o

"CCA", talidomida, esteroide angiostático, carboxinaminolimidazol, inhibidores de metaloproteinasa tales como BB94. Otros agentes antiangiogénicos incluyen anticuerpos, por ejemplo anticuerpos monoclonales contra estos factores de crecimiento angiogénicos: bFGF, aFGF, FGF-5, isoformas de VEGF, VEGF-C, HGF/SF y Ang-1/Ang-2. Ferrara N. y Alitalo, K. "Clinical application of angiogenic growth factors and their inhibitors" (Aplicación clínica de factores de crecimiento angiogénicos y sus inhibidores) (1999) Nature Medicine 5:1359-1364. Otros agentes antiangiogénicos pueden incluir inhibidores de la transcripción de VEGF.

La angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes, es una secuencia de eventos que tiene importancia clave en una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos. Diversas enfermedades están asociadas con la formación de nueva vasculatura. La angiogénesis es una característica importante de diversas patologías, entre ellas patologías caracterizadas o asociadas con una proliferación anormal o incontrolada de células, por ejemplo los tumores. Las patologías que implican angiogénesis excesiva incluyen, por ejemplo, cánceres (tanto tumores sólidos como hematológicos). El paciente con cáncer puede beneficiarse de la inhibición de la angiogénesis o vascularización del tumor.

La angiogénesis es crucial para el crecimiento de los tejidos neoplásicos. Durante más de 100 años se ha observado que los tumores son más vasculares que los tejidos normales. Diversos estudios experimentales han sugerido que tanto el crecimiento tumoral primario como la metástasis requieren neovascularización. La angiogénesis patológica necesaria para el crecimiento tumoral activo es generalmente sostenida y persistente, siendo la adquisición inicial del fenotipo angiogénico un mecanismo común para el desarrollo de una variedad de tipos de tumores sólidos y hematopoyéticos. Típicamente, los tumores que no pueden reclutar y mantener una red vascular permanecen latentes como lesiones asintomáticas *in situ*. La metástasis también depende de la angiogénesis: para que una célula tumoral metastatice con éxito, generalmente accede a la vasculatura en el tumor primario, sobrevive a la circulación, se detiene en la microvasculatura del órgano diana, sale de esta vasculatura, crece en el órgano diana e induce la angiogénesis en el sitio diana. Por tanto, la angiogénesis parece ser necesaria al comienzo y también al final de la cascada metastásica.

La criticidad de la angiogénesis con respecto al crecimiento y la metástasis de neoplasmas proporciona así un objetivo para los esfuerzos terapéuticos. Agentes antiangiogénicos apropiados pueden actuar directa o indirectamente para influir en la angiogénesis asociada a tumores, ya sea retrasando su aparición o bloqueando la sostenibilidad de la neovascularización de tumores.

Agentes anticancerosos adicionales incluyen agentes biológicos (bioterapia), agentes quimioterapéuticos y agentes radioterapéuticos. Más generalmente, estas otras composiciones se proporcionarían en una cantidad combinada eficaz para matar la célula o inhibir su proliferación.

Típicamente, la terapia con virus de vaccinia precederá a otros agentes en intervalos que varían de días a semanas. En realizaciones en las que se aplican por separado a la célula el otro agente y poxvirus, generalmente se aseguraría que no transcurriese un período de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de modo que el agente y el poxvirus puedan ejercer aún un efecto ventajosamente combinado sobre la célula. En tales casos, se contempla que se puede poner en contacto la célula con ambas modalidades dentro de aproximadamente 2-20 semanas una de la otra. En algunas situaciones, puede ser conveniente ampliar significativamente el período de tiempo para el tratamiento, transcurriendo desde varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) hasta varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8) entre las respectivas administraciones.

Además de tratar un sujeto con virus de vaccinia y un agente antiangiogénico, se puede utilizar una terapia adicional que incluya terapias anticancerosas tradicionales.

### 1. Quimioterapia

Las terapias contra el cáncer incluyen una variedad de terapias combinadas con tratamientos tanto químicos como basados en radiación. Las quimioterapias combinadas incluyen, por ejemplo, cisplatino (CDDP), carboplatino, procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosourea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión a receptor de estrógeno, taxol, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, temozolomida (una forma acuosa de DTIC), o cualquier análogo o variante derivado de los anteriores. La combinación de quimioterapia con terapia biológica se conoce como bioquimioterapia.

### 2. Radioterapia

Otros factores que provocan daños en el ADN y que han sido ampliamente utilizados incluyen lo que comúnmente se conoce como rayos gamma, rayos X y/o la administración dirigida de radioisótopos a células tumorales. También se contemplan otras formas de factores que dañan el ADN, tales como las microondas e la irradiación UV. Es muy probable que todos estos factores provoquen un amplio abanico de daños en el ADN, en los precursores del ADN, en la replicación y reparación del ADN y en el ensamblaje y mantenimiento de los cromosomas. Los rangos de administración para rayos X varían desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante períodos prolongados de tiempo (de 3 a 4 semanas), hasta dosis únicas de 2.000 a 6.000 roentgens. Los rangos de dosis para los

radioisótopos varían ampliamente, y dependen de la vida media del isótopo, de la intensidad y tipo de la radiación emitida, y de la absorción por las células neoplásicas.

5 La expresión "puesto en contacto" y el término "expuesto", aplicadas a una célula, se usan en el presente documento para describir el proceso mediante el cual se administran a una célula diana, o se colocan en yuxtaposición directa con la célula diana, un constructo terapéutico y un agente quimioterapéutico o radioterapéutico. Para lograr la muerte o la estasis celular, se administran ambos agentes a una célula en una cantidad combinada efectiva para matar a la célula o evitar que se divida.

### 3. Inmunoterapia

10 En general, los agentes inmunoterapéuticos se basan en el uso de células y moléculas efectoras inmunitarias para atacar y destruir células cancerosas. El efector inmunitario puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico contra algún marcador situado en la superficie de una célula tumoral. Puede servir como efector de la terapia el anticuerpo solo, o bien puede reclutar otras células para producir efectivamente la muerte celular. El anticuerpo también puede estar conjugado con un fármaco o toxina (agente quimioterapéutico, radionúclido, cadena A de ricina, toxina del cólera, toxina pertussis, etc.) y servir meramente como un agente de direccionamiento. Como alternativa, el efector  
15 puede ser un linfocito que porta una molécula de superficie que interactúa, sea directa o indirectamente, con una diana de célula tumoral. Las diversas células efectoras incluyen células T citotóxicas y células NK. La combinación de modalidades terapéuticas, es decir, de la actividad citotóxica directa y de la inhibición o reducción, que ciertos polipéptidos de poxvirus poseen, proporcionaría un beneficio terapéutico en el tratamiento del cáncer.

### 4. Cirugía

20 Aproximadamente el 60% de las personas que padecen cáncer se someterán a cirugía de algún tipo, entre ellas la cirugía preventiva, diagnóstica o de estadificación, curativa y paliativa. La cirugía curativa es un tratamiento anticanceroso que se puede usar junto con otras terapias, tales como el tratamiento de la presente invención, la quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, terapia génica, inmunoterapia y/o terapias alternativas.

25 La cirugía curativa incluye la resección en la que se elimina, se extirpa y/o se destruye físicamente la totalidad o parte del tejido canceroso. La resección tumoral hace referencia a la extirpación física de al menos parte de un tumor. Además de la resección tumoral, el tratamiento mediante cirugía incluye cirugía con láser, criocirugía, electrocirugía y cirugía controlada microscópicamente (cirugía de Mohs). Se contempla además que se puede utilizar la presente invención junto con la eliminación de cánceres superficiales, precánceres o cantidades incidentales de tejido normal.

30 Al extirpar parte o la totalidad de las células, tejido o tumor cancerosos, se puede formar en el cuerpo una cavidad. El tratamiento se puede realizar mediante perfusión, inyección directa o aplicación local en la zona, con una terapia anticancerosa adicional. Se puede repetir tal tratamiento, por ejemplo, cada 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, o cada 1, 2, 3, 4 y 5 semanas o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses. Estos tratamientos también pueden comprender dosis variables.

### 35 5. Otros agentes

Otra forma de terapia para uso junto con los métodos actuales incluye la hipertermia, que es un procedimiento en el cual se expone el tejido del paciente a temperaturas elevadas (hasta 41°C (106°F)). En la aplicación de hipertermia local, regional o de cuerpo entero pueden estar involucrados dispositivos calefactores externos o internos. La hipertermia local implica la aplicación de calor a una zona pequeña, por ejemplo un tumor. El calor puede generarse  
40 externamente con ondas de alta frecuencia dirigidas a un tumor desde un dispositivo externo al cuerpo. El calor interno puede incluir una sonda estéril, incluidos cables calentados delgados, o tubos huecos llenos de agua tibia, antenas de microondas implantadas o electrodos de radiofrecuencia.

45 Para la terapia regional se calienta un órgano o una extremidad de un paciente, lo que se logra utilizando dispositivos que producen alta energía, por ejemplo imanes. Como alternativa, se puede extraer parte de la sangre del paciente y calentarla antes de perfundirla en una zona que resultará calentada internamente. También se puede implementar el calentamiento de todo el cuerpo en los casos en donde el cáncer se ha extendido por el cuerpo. Se pueden emplear para este fin mantas de agua caliente, cera caliente, bobinas inductivas y cámaras térmicas.

También se puede emplear la terapia hormonal junto con la presente invención o en combinación con cualquier otra  
50 terapia anticancerosa descrita en lo que antecede. Se puede emplear el uso de hormonas en el tratamiento de ciertos cánceres, como el cáncer de mama, de próstata, ovárico o cervical, con el fin de reducir el nivel de ciertas hormonas, como la testosterona o el estrógeno, o bloquear sus efectos.

### B. Administración

55 Para tratar un tumor, los métodos de la presente invención administran un virus oncolítico de vaccinia y luego, en un momento posterior, administran una composición que comprende un agente antiangiogénico. Las vías de administración variarán, naturalmente, con la ubicación y naturaleza del tumor, e incluyen, por ejemplo, la

administración intradérmica, transdérmica, parenteral, intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, regional (por ejemplo, en la proximidad de un tumor, en particular en la vasculatura de un tumor o la vasculatura adyacente al mismo), percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intraarterial, intravesical, intratumoral, por inhalación, perfusión, lavado y por vía oral. Las composiciones se formularán en función de la vía de administración particular.

- 5 Se contempla específicamente la inyección intratumoral, o inyección directa en la vasculatura tumoral. También puede ser adecuada la administración local, regional o sistémica. Para tumores >4 cm, el volumen a administrar será de aproximadamente 4-10 ml (preferiblemente 10 ml), mientras que para tumores <4 cm se empleará un volumen de aproximadamente 1-3 ml (preferiblemente 3 ml). Las inyecciones múltiples administradas como dosis única comprenden volúmenes de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 ml. El virus se puede administrar al tumor en inyecciones múltiples, espaciadas a intervalos de aproximadamente 1 cm. En caso de intervención quirúrgica, la presente invención se puede usar de forma preoperatoria, para hacer objeto de resección a un tumor inoperable. Cuando sea apropiado, también se puede aplicar la administración continua, por ejemplo implantando un catéter en un tumor o en la vasculatura de un tumor. Tal perfusión continua puede ocurrir durante un período de aproximadamente 1-2 horas, aproximadamente 2-6 horas, aproximadamente 6-12 horas, aproximadamente 12-24 horas, aproximadamente 1-2 días, aproximadamente 1-2 semanas o más tiempo, después del inicio del tratamiento. En general, la dosis de la composición terapéutica a través de la perfusión continua será equivalente a la que se administra mediante inyecciones únicas o múltiples, ajustadas a lo largo del período de tiempo durante el cual se produce la perfusión. Se contempla además que se pueda utilizar la perfusión de miembros o de órganos para administrar composiciones terapéuticas de la presente invención, en particular en el tratamiento de tumores hepáticos, melanomas y sarcomas.

Los regímenes de tratamiento también pueden variar, y con frecuencia dependen del tipo de tumor, de la ubicación del tumor, del avance de la enfermedad y de la salud y edad del paciente. Ciertos tipos de tumores requerirán un tratamiento más agresivo, mientras que, al mismo tiempo, algunos pacientes no pueden tolerar protocolos más exigentes. El clínico será el más adecuado para tomar tales decisiones, basándose en la eficacia y toxicidad (si la hubiera) conocidas de las formulaciones terapéuticas.

En ciertas realizaciones, el tumor que se está tratando puede no ser, al menos inicialmente, resecable. Los tratamientos con constructos víricos terapéuticos pueden incrementar la resecabilidad del tumor debido a la contracción en los márgenes o por eliminación de ciertas porciones particularmente invasivas. Tras los tratamientos, puede ser posible la resección. Tratamientos adicionales posteriores a la resección servirán para eliminar la enfermedad microscópica residual en el sitio del tumor.

Los tratamientos pueden incluir diversas "dosis unitarias". Se define dosis unitaria como la que contiene una cantidad predeterminada de la composición terapéutica. La cantidad a administrar, y la ruta y formulación particulares, están dentro de la habilidad de los expertos en las ciencias clínicas. No es necesario administrar una dosis unitaria como una única inyección, sino que puede comprender la infusión continua a lo largo de un período de tiempo determinado. La dosis unitaria de la presente invención puede describirse convenientemente en términos de unidades formadoras de placas (UFP) para un constructo vírico. Las dosis unitarias abarcan  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  UFP y más. Como alternativa, dependiendo del tipo de virus y del título alcanzable, se administrarán de 1 a 100, de 10 a 50, 100-1.000, o hasta aproximadamente o al menos aproximadamente  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$  o  $1 \times 10^{15}$  o más partículas víricas (PV) infecciosas, incluidos todos los valores y rangos entre lo citado, al tumor o al sitio del tumor.

### C. Composiciones y formulaciones inyectables

En la presente invención, el método preferido para la administración de un constructo de expresión o virus que codifica la totalidad o parte de un genoma de poxvirus, a células cancerosas o tumorales, consiste en la inyección intratumoral. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden administrar como alternativa por vía parenteral, intravenosa, intradérmica, intramuscular, transdérmica o incluso intraperitoneal, tal como se describe en la patente de EE. UU. 5.543.158, la patente de EE. UU. 5.641.515 y la patente de EE. UU. 5.399.363 (todas ellas específicamente incorporadas aquí en su totalidad por referencia).

La inyección de constructos de ácido nucleico puede administrarse mediante jeringa o cualquier otro método utilizado para la inyección de una solución, siempre que el constructo de expresión pueda pasar a través del calibre particular de aguja requerido para la inyección. Recientemente se ha descrito un novedoso sistema de inyección sin aguja (patente de EE. UU. 5.846.233) que tiene una boquilla que define una cámara de ampolla para contener la solución y un dispositivo de energía para empujar la solución fuera de la boquilla al sitio de suministro. También se ha descrito un sistema de jeringa para su uso en terapia génica que permite inyecciones múltiples de cantidades predeterminadas de una solución, con precisión, a cualquier profundidad (patente de EE. UU. 5.846.225).

Las soluciones de los compuestos activos en forma de base libre o de sales farmacológicamente aceptables se pueden preparar en agua adecuadamente mezclada con un tensioactivo, por ejemplo hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o

dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (patente de EE. UU. 5.466.468, específicamente incorporada aquí en su totalidad por referencia). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida a fin de que permita una fácil administración con jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos, por ejemplo bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio y gelatina.

Para la administración por vía parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si fuera necesario y primeramente se hace isotónico el diluyente líquido con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intratumoral e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la materia sabrán, a la luz de la presente descripción, los medios acuosos estériles que se pueden emplear. Por ejemplo, se puede disolver una dosis en 1 ml de solución isotónica de NaCl y agregarlo a 1.000 ml de fluido de hipodermocclisis o bien inyectarlo en el sitio de infusión propuesto (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la posología dependiendo del estado del sujeto que está siendo tratado. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para el sujeto particular. Además, para su administración a seres humanos las preparaciones deben cumplir con estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según lo exigen los estándares de la FDA Office of Biologics (Oficina para productos biológicos de la Administración de alimentos y fármacos de EE. UU.)

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

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

En el presente documento, "vehículo" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios dispersantes, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, tampones, soluciones vehiculantes, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Salvo en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos suplementarios.

Las expresiones "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa alérgica o similar cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo se entiende bien en la técnica. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o como suspensiones; y también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para disolver o suspender en líquido antes de la inyección.

II. Virus de vaccinia JX-594

Los poxvirus se conocen desde hace siglos, y las características pústulas o cicatrices (en inglés, "pox") producidas por el virus de variola (viruela) dan su nombre a esta familia. Parece que la viruela apareció por primera vez en China y el Extremo Oriente hace más de 2.000 años. Afortunadamente, en la actualidad este virus frecuentemente fatal está erradicado, habiéndose producido el último brote natural en 1977 en Somalia.

La partícula vírica de un poxvirus es ovalada o tiene forma de paralelepípedo y mide alrededor de 200-400 nm de longitud. La superficie externa está surcada en filas paralelas, a veces dispuestas helicoidalmente. Las partículas son extremadamente complejas, y contienen más de 100 proteínas distintas. Las formas extracelulares contienen dos membranas (EEV - viriones con envoltura extracelulares, por sus siglas en inglés), mientras que las partículas intracelulares tienen solamente una membrana interna (IMV - viriones maduros intracelulares). La superficie externa está compuesta de lípidos y proteínas que rodean el núcleo, que se compone de una nucleoproteína fuertemente comprimida. En el aspecto antigénico, los poxvirus son también muy complejos, e inducen anticuerpos tanto específicos como de reacción cruzada. Hay al menos diez enzimas presentes en la partícula, principalmente relacionadas con el metabolismo del ácido nucleico o la replicación del genoma.

El genoma del poxvirus es ADN lineal de doble cadena de 130-300 kbp (kilo pares de bases). Los extremos del genoma tienen un bucle en horquilla terminal con varias secuencias de repetición en tándem. Se han secuenciado algunos genomas de poxvirus, estando la mayoría de los genes esenciales ubicados en la parte central del genoma, mientras que los genes no esenciales se encuentran en los extremos. En el genoma de poxvirus existen alrededor de 250 genes.

La replicación tiene lugar en el citoplasma, ya que el virus es lo suficientemente complejo como para haber adquirido todas las funciones necesarias para la replicación del genoma. Se da una cierta contribución de la célula, pero la naturaleza de esta contribución no está clara. Sin embargo, pese a que en células enucleadas la expresión génica del poxvirus y la replicación del genoma tienen lugar, la maduración está bloqueada, lo que indica algún papel por parte de la célula.

Los receptores para poxvirus no son conocidos en general, pero probablemente son múltiples en número y se encuentran en distintos tipos de células. Para vaccinia, uno de los receptores probables es el receptor EGF (McFadden, 2005). La penetración también puede involucrar más de un mecanismo. La pérdida de la envoltura se produce en dos etapas: (a) eliminación de la membrana externa a medida que la partícula entra en la célula y en el citoplasma, y (b) se pierde adicionalmente la envoltura de la partícula y el núcleo pasa al citoplasma.

Una vez en el citoplasma celular, la expresión génica se lleva a cabo mediante enzimas víricas asociadas con el núcleo. La expresión se divide en 2 fases: genes tempranos, que representan alrededor del 50% del genoma y que se expresan antes de la replicación del genoma, y genes tardíos, que se expresan después de la replicación del genoma. El control temporal de la expresión lo proporcionan los promotores tardíos, que dependen de la replicación del ADN para su actividad. Se cree que la replicación del genoma implica el autocebado, lo que conduce a la formación de un concatámero de alto peso molecular, que posteriormente se escinde y se repara para formar genomas víricos. El ensamblaje del virus se produce en el citoesqueleto, y probablemente involucra interacciones con las proteínas del citoesqueleto (por ejemplo, proteínas de unión a actina). Se forman inclusiones en el citoplasma que maduran en partículas de virus. La propagación de célula a célula puede proporcionar un mecanismo alternativo para la propagación de la infección. En conjunto, la replicación de este virus grande y complejo es bastante rápida, requiriendo por término medio solamente 12 horas.

Al menos nueve poxvirus diferentes causan enfermedades en seres humanos, pero los más conocidos son el virus de variola y el virus de vaccinia. Las cepas de variola se dividen en variola mayor (25-30% de fallecimientos) y variola menor (los mismos síntomas, pero tasa de mortalidad inferior a 1%). La infección con ambos virus se produce de forma natural por vía respiratoria y es sistémica, produciendo una variedad de síntomas, pero muy notablemente con pústulas características de variola y cicatrización de la piel.

A. Virus de vaccinia

El virus de vaccinia es un virus con envoltura, grande y complejo, que tiene un genoma de ADN bicatenario lineal de aproximadamente 190 kbp y que codifica aproximadamente 250 genes. La vaccinia es bien conocida por su papel como vacuna que ha erradicado la viruela. Con posterioridad a la erradicación de la viruela, los científicos han explorado el uso de vaccinia como herramienta para aportar genes a tejidos biológicos (terapia génica e ingeniería genética). El virus de vaccinia es único entre los virus de ADN porque solamente se replica en el citoplasma de la célula hospedante. Por consiguiente, se requiere que el gran genoma codifique varias enzimas y proteínas necesarias para la replicación del ADN vírico. Durante la replicación, la vaccinia produce diversas formas infecciosas que se diferencian en sus membranas externas: el virión maduro intracelular (IMV), el virión intracelular con envoltura (IEV), el virión con envoltura asociado a célula (CEV) y el virión extracelular con envoltura (EEV). El IMV es la forma infecciosa más abundante y se cree que es responsable de la propagación entre los hospedantes. Por otro lado, se cree que el CEV desempeña un papel en la propagación de una célula a otra, y se cree que el EEV es importante para la diseminación de largo recorrido dentro del organismo hospedante.

El virus de vaccinia está estrechamente relacionado con el virus que causa la viruela bovina. Se desconoce el origen exacto de la vaccinia, pero la opinión más común es que el virus de vaccinia, el virus de la viruela bovina y el virus de variola (el agente causal de la viruela) se han derivado todos de un virus ancestral común. También se ha especulado acerca de que el virus de vaccinia se aisló originalmente de caballos. Una infección por el virus de vaccinia es leve y típicamente asintomática en individuos sanos, pero puede causar una erupción leve y fiebre, con una tasa de mortalidad extremadamente baja. Una respuesta inmunitaria generada contra una infección por virus de vaccinia protege a esa persona contra una infección letal de viruela. Por esta razón, el virus de vaccinia se ha utilizado como vacuna de virus vivo contra la viruela. La vacuna con virus de vaccinia es segura porque no contiene el virus de la viruela, pero ocasionalmente pueden surgir algunas complicaciones y/o efectos adversos de la vacuna, especialmente si el vacunado está inmunocomprometido.

Como se ha discutido más arriba, se han modificado genéticamente virus de vaccinia para expresar diversas proteínas extrañas. Una de estas proteínas es el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). El GM-CSF es una proteína segregada por macrófagos que estimula las células madre para producir granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y macrófagos. El GM-CSF humano está glicosilado en los restos de aminoácido 23 (leucina), 27 (asparagina) y 39 (ácido glutámico) (véase la patente de EE. UU. 5.073.627, incorporada por referencia). Al GM-CSF también se le conoce como molgramostim o, cuando la proteína se ha expresado en células de levadura, sargramostim (marca comercial Leukine®), que se usan como medicamento para estimular la producción de glóbulos blancos sanguíneos, especialmente granulocitos y macrófagos, después de quimioterapia. Se ha publicado recientemente información acerca de un virus de vaccinia que expresa GM-CSF. Sin embargo, no ha sido presentado como agente oncolítico, sino simplemente como vector de suministro de GM-CSF. Así, se ha administrado a pacientes en una dosis inferior a la que puede lograr una oncólisis significativa. En la presente memoria se describe el uso de un virus de vaccinia que expresa GM-CSF que, en algunas realizaciones, se administra a concentraciones superiores a  $1 \times 10^9$  UFP o partículas.

El virus de vaccinia puede propagarse empleando los métodos descritos por Earl y Moss en Ausubel *et al.*, 1994, que se incorpora aquí por referencia.

### III. Composiciones de ácido nucleico

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a virus de vaccinia y variantes del mismo.

#### A. Variantes de polipéptidos víricos

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

Las variantes por delección carecen de uno o varios restos de la proteína nativa o de tipo silvestre. Se pueden eliminar restos individuales o bien se puede eliminar la totalidad o parte de un dominio (por ejemplo un dominio catalítico o de unión). Se puede introducir (por reemplazo o por inserción) un codón de parada en una secuencia de ácido nucleico codificante, a fin de generar una proteína truncada. Los mutantes por inserción implican típicamente la adición de material en un punto no terminal del polipéptido. Esto puede incluir la inserción de un epítipo inmunorreactivo o de simplemente uno o más restos. También se pueden generar adiciones terminales, denominadas proteínas de fusión.

Las variantes por reemplazo contienen típicamente el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido, con o sin pérdida de otras funciones o propiedades. Los reemplazos pueden ser conservadores, es decir, se sustituye un aminoácido por otro de forma y carga similares. Los reemplazos conservadores son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina a serina; arginina a lisina; asparagina a glutamina o histidina; aspartato a glutamato; cisteína a serina; glutamina a asparagina; glutamato a aspartato; glicina a prolina; histidina a asparagina o glutamina; isoleucina a leucina o valina; leucina a valina o isoleucina; lisina a arginina; metionina a leucina o isoleucina; fenilalanina a tirosina, leucina o metionina; serina a treonina; treonina a serina; triptófano a tirosina; tirosina a triptófano o fenilalanina; y valina a isoleucina o leucina. Como alternativa, los reemplazos pueden ser no conservadores, de modo que resulta afectada una función o actividad del polipéptido. Los cambios no conservadores implican generalmente reemplazar un resto por otro que sea químicamente diferente, por ejemplo un aminoácido polar o cargado en lugar de un aminoácido no polar o sin carga, y viceversa.

En la presente memoria se utiliza la expresión "codón funcionalmente equivalente" para referirse a codones que

codifican el mismo aminoácido (véase la Tabla 1 a continuación).

Tabla 1: Tabla de codones

Aminoácidos	Codones					
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU		
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU		
Ácido glutámico	Glu	E	GAA	GAG		
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU		
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU
Histidina	His	H	CAC	CAU		
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU	
Lisina	Lys	K	AAA	AAG		
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC
Metionina	Met	M	AUG			
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU		
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG		
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU
Triptófano	Trp	W	UGG			
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU		

- 5 También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos pueden incluir restos adicionales, tales como aminoácidos N- o C-terminales adicionales o secuencias 5' o 3', y aun así ser esencialmente como se establece en una de las secuencias descritas en la presente memoria, siempre que la secuencia cumpla los criterios expuestos más arriba, incluido el mantenimiento de la actividad de la proteína biológica en lo que respecta a la expresión de proteína. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácido nucleico que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes que flanquean a cualquiera de las porciones 5' o 3' de la región codificante, o bien pueden incluir diversas secuencias internas, es decir, intrones, que se sabe que ocurren dentro de los genes.

10 Lo que sigue es una discusión basada en el cambio de los aminoácidos de una proteína para crear una molécula de segunda generación equivalente, o incluso mejorada. Por ejemplo, se pueden reemplazar ciertos aminoácidos por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión sobre moléculas de sustrato. Puesto que es la capacidad y naturaleza interactiva de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, pueden realizarse ciertos reemplazos de aminoácidos en una secuencia de proteína y en su secuencia codificante de ADN subyacente, y sin embargo producir una proteína con propiedades similares. De este modo, los inventores contemplan que se puedan realizar diversos cambios en las secuencias de ADN de los genes sin pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica, como se comenta a continuación. La Tabla 1 muestra los codones que codifican aminoácidos particulares.

15 Al realizar tales cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la técnica según Kyte y Doolittle, 1982. Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares.

20 También se entiende en la técnica que el reemplazo de aminoácidos similares se puede realizar de manera eficaz sobre la base de su hidrofiliidad. La patente de EE. UU. 4.554.101, incorporada aquí por referencia, establece que la mayor hidrofiliidad media local de una proteína, que se rige por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Tal como se detalla en la patente de EE. UU. 4.554.101, se han asignado los siguientes valores de hidrofiliidad a restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina \*(-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4).

25 Se entiende que se puede reemplazar un aminoácido por otro que tenga un valor de hidrofiliidad similar y aún producir una proteína biológicamente equivalente e inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere el

reemplazo de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de  $\pm 2$ , son particularmente preferidos los que están dentro de  $\pm 1$ , y son aún más particularmente preferidos los que están dentro de  $\pm 0,5$ .

5 Como se ha bosquejado más arriba, los reemplazos de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral del aminoácido, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Los reemplazos ilustrativos que toman en consideración las diversas características antedichas son bien sabidos por los expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

#### B. Polinucleótidos que codifican proteínas nativas o proteínas modificadas

10 La presente invención se refiere a polinucleótidos, aislables de células, que son capaces de expresar la totalidad o parte de una proteína o polipéptido. En algunas realizaciones de la invención, trata de un genoma vírico que ha sido mutado específicamente para generar un virus que carece de ciertos polipéptidos víricos funcionales. Los polinucleótidos pueden codificar un péptido o polipéptido que contenga la totalidad o parte de una secuencia vírica de aminoácidos o bien pueden haber sido modificados genéticamente para que no codifiquen dicho polipéptido vírico o codifiquen un polipéptido vírico que tenga al menos una función o actividad reducida, disminuida o ausente. Se pueden purificar proteínas recombinantes a partir de células que las expresan, al objeto de producir proteínas activas. El genoma del virus de vaccinia, así como la definición de las regiones codificantes del mismo, se pueden encontrar en Rosel *et al.*, 1986; Goebel *et al.*, 1990; y/o número de acceso a GenBank NC\_001559, cada uno de los cuales se incorpora aquí por referencia.

20 En la presente memoria, la expresión "segmento de ADN" se refiere a una molécula de ADN que ha sido aislada separándola del ADN genómico total de una especie particular. Por lo tanto, un segmento de ADN que codifica un polipéptido se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias codificantes de polipéptido de tipo silvestre, polimórficas o mutantes, pero que ha sido aislado o ha sido purificado separándolo del ADN genómico total de mamífero o humano. Dentro de la expresión "segmento de ADN" se incluyen un polipéptido o polipéptidos, segmentos de ADN más pequeños que un polipéptido y vectores recombinantes, entre ellos, por ejemplo, plásmidos, cósmidos, fagos, virus y similares.

30 En la presente solicitud, la expresión "polinucleótido de poxvirus" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de poxvirus que ha sido aislado separándolo del ácido nucleico genómico total. Análogamente, un "polinucleótido de virus de vaccinia" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido del virus de vaccinia que ha sido aislado separándolo del ácido nucleico genómico total. Un "genoma de poxvirus" o un "genoma de virus de vaccinia" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se puede proporcionar a una célula hospedante para producir una partícula vírica, en presencia o ausencia de un virus auxiliar. El genoma puede o no haber sido mutado recombinantemente en comparación con el virus de tipo silvestre.

35 Se pretende que el término "ADNc" haga referencia a ADN preparado utilizando ARN mensajero (ARNm) como molde. La ventaja de utilizar un ADNc, a diferencia del ADN genómico o un ADN polimerizado a partir de un molde de ARN genómico, no procesado o parcialmente procesado, es que el ADNc contiene principalmente secuencias codificantes de la proteína correspondiente. Puede haber ocasiones en que se prefiera la secuencia genómica completa o parcial, por ejemplo cuando se requieren las regiones no codificantes para la expresión óptima o cuando se debe apuntar a regiones no codificantes tales como intrones, en una estrategia antisentido.

40 También se contempla que un polipéptido particular procedente de una especie dada puede estar representado por variantes naturales que presentan secuencias de ácido nucleico ligeramente distintas que, sin embargo, codifican la misma proteína (véase la Tabla 1 anterior).

45 Análogamente, un polinucleótido que comprende un gen polipeptídico mutante o de tipo silvestre aislado o purificado se refiere a un segmento de ADN que incluye secuencias codificantes de polipéptido de tipo silvestre o mutantes y, en ciertos aspectos, secuencias reguladoras, aisladas sustancialmente de otros genes naturales o secuencias codificantes de proteína. A este respecto, se emplea por simplicidad el término "gen" para referirse a una unidad funcional codificante de proteína, polipéptido o péptido (inclusive cualquier secuencia requerida para una adecuada transcripción, modificación postraduccional o localización). Como los expertos en la materia comprenderán, este término funcional incluye secuencias genómicas, secuencias de ADNc y segmentos de genes modificados más pequeños que expresan, o pueden adaptarse para expresar, proteínas, polipéptidos, dominios, péptidos, proteínas de fusión y mutantes.

50 Un ácido nucleico que codifica todo o parte de un polipéptido nativo o modificado puede contener una secuencia de ácido nucleico contigua que codifique la totalidad o una parte de tal polipéptido de las siguientes longitudes: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1.000, 1.010, 1.020, 1.030, 1.040, 1.050, 1.060, 1.070, 1.080, 1.090, 1.095, 1.100, 1.500, 2.000,

2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, 6.000, 6.500, 7.000, 7.500, 8.000, 9.000, 10.000 o más nucleótidos, nucleósidos o pares de bases.

5 El término "recombinante" puede emplearse junto con un polipéptido o el nombre de un polipéptido específico, y esto generalmente se refiere a un polipéptido producido a partir de una molécula de ácido nucleico que ha sido modificada *in vitro* o que es el producto replicado de dicha molécula.

10 Los segmentos de ácido nucleico utilizados en la presente invención, con independencia de la longitud de la propia secuencia codificante, se pueden combinar con otras secuencias de ácido nucleico, tales como promotores, señales de poliadenilación, sitios de enzima de restricción adicionales, sitios de clonación múltiple, otros segmentos codificantes y similares, de modo que su longitud total puede variar considerablemente. Por lo tanto, se contempla que se pueda emplear un fragmento de ácido nucleico de casi cualquier longitud, estando la longitud total preferiblemente limitada por la facilidad de preparación y uso en el protocolo de ADN recombinante pretendido.

15 Se contempla que los constructos de ácido nucleico de la presente invención puedan codificar polipéptido de longitud completa procedente de cualquier fuente o bien codificar una versión truncada del polipéptido, por ejemplo un polipéptido de virus de vaccinia truncado, de modo que la transcripción de la región codificante represente la versión truncada. El transcrito truncado puede ser traducido después a una proteína truncada. Se puede añadir una etiqueta u otro polipéptido heterólogo a la secuencia codificante de polipéptido modificada, en donde "heterólogo" se refiere a un polipéptido que no es el mismo que el polipéptido modificado.

20 En otras ciertas realizaciones, la invención se refiere a segmentos de ADN aislados y vectores recombinantes que incluyen dentro de su secuencia una secuencia de ácido nucleico contigua a la que se muestra en secuencias identificadas en la presente memoria (y/o incorporadas por referencia). Sin embargo, tales secuencias pueden ser mutadas para producir un producto proteico cuya actividad está alterada con respecto al tipo silvestre.

25 También se entenderá que esta invención no se limita a las secuencias particulares de ácido nucleico y de aminoácidos de estas secuencias identificadas. Por lo tanto, los vectores recombinantes y los segmentos de ADN aislados pueden incluir las propias regiones codificantes de poxvirus, regiones codificantes portadoras de alteraciones o modificaciones seleccionadas en la región codificante básica, o bien pueden codificar polipéptidos de mayor tamaño que, no obstante, incluyan regiones codificantes de poxvirus o puedan codificar proteínas o péptidos equivalentes biológicamente funcionales que tengan secuencias variantes de aminoácidos.

30 Los segmentos de ADN de la presente invención abarcan proteínas y péptidos de poxvirus equivalentes biológicamente funcionales. Dichas secuencias pueden surgir como consecuencia de la redundancia de codones y de la equivalencia funcional que se sabe suceden naturalmente dentro de las secuencias de ácidos nucleicos y de las proteínas así codificadas. Como alternativa, se pueden crear proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante, en la cual se pueden diseñar cambios en la estructura proteica, basándose en consideraciones acerca de las propiedades de los aminoácidos que se reemplazan. Los cambios diseñados artificialmente pueden introducirse mediante la aplicación de técnicas de mutagénesis de sitio dirigido, por ejemplo, para introducir mejoras en la antigenicidad de la proteína.

#### C. Mutagénesis de polinucleótidos de poxvirus

35 En diversas realizaciones se puede alterar o mutagenizar el polinucleótido de poxvirus. Las alteraciones o mutaciones pueden incluir inserciones, deleciones, mutaciones puntuales, inversiones y similares, y pueden dar como resultado la modulación, activación y/o inactivación de ciertas rutas o mecanismos moleculares o proteínas particulares (por ejemplo, timidina cinasa), así como alterar la función, ubicación o expresión de un producto génico, en particular, hacer que un producto génico no sea funcional. Cuando se emplea, la mutagénesis de un polinucleótido que codifica todo o parte de un poxvirus se puede llevar a cabo mediante una variedad de procedimientos mutagénicos estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

45 Se pueden inducir mutaciones posteriores a la exposición a mutágenos químicos o físicos. Tales agentes inductores de mutación incluyen la radiación ionizante, la luz ultravioleta y un diverso abanico de compuestos químicos tales como agentes alquilantes e hidrocarburos aromáticos policíclicos, todos los cuales son capaces de interactuar directa o indirectamente (generalmente después de algunas biotransformaciones metabólicas) con ácidos nucleicos. El daño en el ADN inducido por tales agentes puede conducir a modificaciones de la secuencia de bases cuando se replica o se repara el ADN afectado y, por lo tanto, a una mutación. La mutación también puede ser dirigida a sitio mediante el uso de métodos particulares de direccionamiento.

#### D. Vectores

50 Para generar mutaciones en el genoma de poxvirus, se pueden codificar polipéptidos nativos y modificados mediante una molécula de ácido nucleico comprendida en un vector. El término "vector" se utiliza para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que puede insertarse una secuencia exógena de ácido nucleico para introducirla en una célula donde pueda replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", lo que significa que es extraña a la célula en la que se está introduciendo el vector o bien que la secuencia es homóloga a una secuencia de la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula hospedante en la que

generalmente no se encuentra la secuencia. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus de animales y virus de plantas) y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la materia estaría bien preparado para construir un vector a través de técnicas recombinantes convencionales, que se describen en Sambrook *et al.*, (1989) y Ausubel *et al.*, 1994, ambos incorporados aquí por referencia. Además de codificar un polipéptido modificado tal como gelonina modificada, un vector puede codificar secuencias polipeptídicas no modificadas tales como una etiqueta o una molécula marcadora.

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

### 1. Promotores e intensificadores

Un "promotor" es una secuencia de control que es una región de una secuencia de ácido nucleico en la que se controlan el inicio y la tasa de transcripción. Puede contener elementos genéticos en donde se pueden fijar proteínas y moléculas reguladoras, como ARN polimerasa y otros factores de transcripción. Las expresiones "posicionado operativamente", "ligado operativamente", "bajo control" y "bajo control transcripcional" significan que un promotor se encuentra en una ubicación y/u orientación funcional correcta en relación con una secuencia de ácido nucleico con el fin de controlar el inicio de la transcripción y/o la expresión de esa secuencia. Un promotor puede usarse o no junto con un "intensificador", que se refiere a una secuencia reguladora que actúa en cis implicada en la activación transcripcional de una secuencia de ácido nucleico.

Un promotor puede ser uno asociado de forma natural con un gen o secuencia, que puede obtenerse aislando las secuencias no codificantes 5' situadas aguas arriba del segmento codificante y/o exón. A este promotor se le puede denominar "endógeno". Análogamente, un intensificador puede ser uno asociado de forma natural con una secuencia de ácido nucleico, localizada tanto aguas abajo como aguas arriba de esa secuencia. De forma alternativa, se obtendrán ciertas ventajas situando el segmento de ácido nucleico codificante bajo el control de un promotor recombinante o heterólogo, que se refiere a un promotor que normalmente no está asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Un intensificador recombinante o heterólogo hace referencia también a un intensificador normalmente no asociado con una secuencia de ácido nucleico en su entorno natural. Tales promotores o intensificadores pueden incluir promotores o intensificadores de otros genes, y promotores o intensificadores aislados de cualquier otra célula procariota, vírica o eucariota, y promotores o intensificadores que no sean "de origen natural", es decir, que contengan distintos elementos de diferentes regiones reguladoras de la transcripción, y/o mutaciones que alteren la expresión. Además de producir sintéticamente secuencias de ácido nucleico de promotores e intensificadores, se pueden generar secuencias usando tecnología de clonación recombinante y/o de amplificación de ácido nucleico, inclusive PCR™, en conexión con las composiciones descritas en la presente memoria (véanse la patente de EE. UU. 4.683.202 y la patente de EE. UU. 5.928.906, incorporadas ambas aquí por referencia). Además, se contempla que se puedan utilizar asimismo las secuencias de control que dirigen la transcripción y/o expresión de secuencias dentro de orgánulos no nucleares tales como mitocondrias, cloroplastos y similares.

Naturalmente, puede ser importante emplear un promotor y/o intensificador que dirija eficazmente la expresión del segmento de ADN en el tipo de célula, orgánulo y organismo elegidos para la expresión. Los expertos en la técnica de la biología molecular generalmente conocen el uso de promotores, intensificadores y combinaciones de tipos celulares para la expresión de proteínas, véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* (1989), incorporado aquí por referencia. Los promotores empleados pueden ser constitutivos, específicos de tejido, inducibles y/o útiles en las condiciones apropiadas para dirigir la expresión de alto nivel del segmento de ADN introducido, como es ventajoso en la producción a gran escala de proteínas y/o péptidos recombinantes. El promotor puede ser heterólogo o endógeno.

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

## 2. Señales de inicio y sitios internos de unión a ribosoma

También se puede necesitar una señal específica de inicio para la traducción eficaz de secuencias codificantes. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG o secuencias adyacentes. Puede ser necesario proporcionar señales exógenas de control de la traducción, entre ellas el codón de inicio ATG. Un experto ordinario en la materia será fácilmente capaz de determinar este hecho y proporcionar las señales necesarias. Es bien sabido que, para garantizar la traducción de la totalidad de la inserción, el codón de iniciación debe estar "en marco" con respecto al marco de lectura de la secuencia de codificación deseada. Las señales exógenas de control de traducción y los codones de inicio pueden ser de origen tanto natural como sintético. Se puede incrementar la eficacia de la expresión mediante la inclusión de adecuados elementos intensificadores de la transcripción.

En ciertas realizaciones de la invención se utilizan elementos de sitios internos de entrada a ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) para crear mensajes multigénicos o policistrónicos. Los elementos IRES pueden eludir el modelo de barrido ribosómico de la traducción dependiente de Cap metilado en 5' y comenzar la traducción en sitios internos (Pelletier y Sonenberg, 1988). Se han descrito elementos IRES procedentes de dos miembros de la familia picornavirus (polio y encefalomiocarditis) (Pelletier y Sonenberg, 1988), así como un IRES procedente de un mensaje de mamífero (Macejak y Sarnow, 1991). Se pueden vincular elementos IRES a marcos abiertos de lectura heterólogos. Se pueden transcribir juntos múltiples marcos abiertos de lectura, cada uno separado por un IRES, lo que crea mensajes policistrónicos. En virtud del elemento IRES, cada marco abierto de lectura es accesible a ribosomas, para lograr una traducción eficaz. Se pueden expresar eficazmente múltiples genes utilizando un único promotor/intensificador para transcribir un único mensaje (véanse las patentes de EE. UU. 5.925.565 y 5.935.819, incorporadas aquí por referencia).

## 3. Sitios de clonación múltiple

Los vectores pueden incluir un sitio de clonación múltiple (MCS, por sus siglas en inglés), que es una región de ácido nucleico que contiene múltiples sitios de enzima de restricción, de los cuales puede utilizarse cualquiera, junto con tecnología recombinante convencional, para digerir el vector (véanse Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998, y Cocea, 1997, incorporados aquí por referencia). La "digestión con enzimas de restricción" se refiere a la escisión catalítica de una molécula de ácido nucleico con una enzima que funciona solamente en ubicaciones específicas dentro de una molécula de ácido nucleico. Muchas de estas enzimas de restricción están disponibles comercialmente. El uso de tales enzimas es ampliamente entendido por los expertos en la materia. Con frecuencia se linealiza o se fragmenta un vector utilizando una enzima de restricción que corta en el interior de la MCS para permitir que secuencias exógenas queden ligadas al vector. "Ligadura" se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico, que pueden o no ser contiguos entre sí. Las técnicas que implican enzimas de restricción y reacciones de ligadura son bien conocidas por los expertos en la materia de la tecnología recombinante.

## 4. Sitios de corte y empalme

La mayoría de las moléculas de ARN eucariótico transcritas sufrirán corte y empalme de ARN a fin de eliminar intrones de los transcritos primarios. Los vectores que contienen secuencias eucariotas genómicas pueden requerir sitios de corte y empalme de donantes y/o aceptores para asegurar el procesamiento apropiado del transcrito para la expresión proteica (véase Chandler *et al.*, 1997, incorporado aquí por referencia).

## 5. Señales de terminación

Los vectores o constructos de la presente invención comprenderán generalmente al menos una señal de terminación. Una "señal de terminación" o "terminador" está compuesto por las secuencias de ADN implicadas en la terminación específica de un transcrito de ARN mediante una ARN polimerasa. Así pues, en ciertas realizaciones, se contempla una señal de terminación que ponga fin a la producción de un transcrito de ARN. Puede necesitarse *in vivo* un terminador para alcanzar niveles de mensaje deseables.

En sistemas eucarióticos, la región terminadora puede comprender también secuencias específicas de ADN que permitan la escisión específica de sitio del nuevo transcrito, con el fin de exponer un sitio de poliadenilación. Esto señala a una polimerasa endógena especializada que agregue un tramo de aproximadamente 200 restos de A (poliA) al extremo 3' del transcrito. Las moléculas de ARN modificadas con esta cola de poliA parecen ser más estables y se traducen más eficazmente. Por consiguiente, en otras realizaciones que implican eucariotas se prefiere que el terminador comprenda una señal para la escisión del ARN, y es más preferido que la señal del terminador promueva la poliadenilación del mensaje. El terminador y/o los elementos del sitio de poliadenilación pueden servir para intensificar los niveles del mensaje y/o minimizar la lectura desde el casete a otras secuencias.

Los terminadores contemplados para el uso en la invención incluyen cualquier terminador de transcripción conocido descrito en la presente memoria o conocido por un experto ordinario en la materia, entre ellos, pero sin limitación, por ejemplo las secuencias de terminación de genes, por ejemplo el terminador de la hormona de crecimiento bovina o secuencias de terminación víricas, por ejemplo el terminador de SV40. En ciertas realizaciones, la señal de terminación puede ser una falta de secuencia transcribible o traducible, por ejemplo debida a un truncamiento de la secuencia.

6. Señales de poliadenilación

En la expresión, particularmente la expresión eucariótica, normalmente se incluirá una señal de poliadenilación para efectuar la poliadenilación adecuada del transcrito. No se considera crucial la naturaleza de la señal de poliadenilación para la práctica exitosa de la invención, y/o se puede emplear cualquier secuencia de este tipo.

5 Realizaciones preferidas incluyen la señal de poliadenilación de SV40 y/o la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, que es conveniente y/o de la que se sabe que funciona bien en diversas células diana. La poliadenilación puede acrecentar la estabilidad del transcrito o bien puede facilitar el transporte citoplasmático.

7. Orígenes de replicación

10 Para propagar un vector en una célula hospedante, el mismo puede contener uno o más orígenes de sitios de replicación (a menudo abreviados "ori"), que son una secuencia de ácido nucleico específica en la que se inicia la replicación. Como alternativa, si la célula hospedante es una levadura se puede emplear una secuencia de replicación autónoma (ARS, por sus siglas en inglés).

8. Marcadores seleccionables y rastreables

15 En ciertas realizaciones de la invención, mediante la inclusión de un marcador en el vector de expresión se pueden identificar *in vitro* o *in vivo* células que contienen un constructo de ácido nucleico de la presente invención. Dichos marcadores confieren un cambio identificable a la célula que permite una fácil identificación de las células que contienen el vector de expresión. En general, un marcador seleccionable es uno que confiere una propiedad que permite la selección. Un marcador seleccionable positivo es uno en el que la presencia del marcador permite su selección, mientras que un marcador seleccionable negativo es uno en el que su presencia evita su selección. Un ejemplo de un marcador seleccionable positivo es un marcador de resistencia a fármacos.

20 Usualmente, la inclusión de un marcador de selección por fármaco ayuda a la clonación e identificación de transformantes, por ejemplo los genes que confieren resistencia a la neomicina, puromicina, higromicina, DHFR, GPT, zeocina e histidinol, son marcadores seleccionables útiles. Además de marcadores que confieren un fenotipo que permite la discriminación de transformantes basada en la implementación de condiciones, también se contemplan otros tipos de marcadores, entre ellos marcadores rastreables, tales como GFP, cuya base es el análisis colorimétrico. Como alternativa, se pueden utilizar enzimas rastreables tales como la timidina cinasa (tk) del virus del herpes simple o la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Un experto en la materia también sabría cómo emplear marcadores inmunológicos, posiblemente junto con el análisis FACS. No se cree que sea importante el marcador utilizado, siempre que sea capaz de ser expresado simultáneamente con el ácido nucleico que codifica un producto génico. El experto en la materia conoce bien ejemplos adicionales de marcadores seleccionables y rastreables.

E. Células hospedantes

35 En la presente memoria se pueden usar indistintamente el término "célula" y las expresiones "línea celular" y "cultivo celular". Todos estos términos y expresiones incluyen también a su progenie, que es todas y cada una de las generaciones posteriores. Se entiende que puede ocurrir que toda la progenie no sea idéntica, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. En el contexto de la expresión de una secuencia heteróloga de ácido nucleico, "célula hospedante" se refiere a una célula procariota o eucariota, e incluye cualquier organismo transformable capaz de replicar un vector y/o de expresar un gen heterólogo codificado por un vector. Una célula hospedante puede utilizarse, y así ha sido, como un receptor para vectores o virus (que no pueden considerarse vectores si no expresan polipéptidos exógenos). Una célula hospedante puede "transfectarse" o "transformarse", lo que hace referencia a un proceso mediante el cual se transfiere o se introduce en la célula hospedante ácido nucleico exógeno, por ejemplo una secuencia que codifica una proteína modificada. Una célula transformada incluye la célula sujeto primaria y su progenie.

45 Las células hospedantes pueden derivarse de procariotas o de eucariotas, incluidas células de levadura, células de insecto y células de mamífero, dependiendo de si el resultado deseado es la replicación del vector o la expresión de parte o la totalidad de las secuencias de ácido nucleico codificadas por el vector. Están disponibles numerosas líneas celulares y cultivos para su uso como células hospedantes, y se pueden obtener a través de la American Type Culture Collection (ATCC, Colección americana de cultivos tipo), que es una organización que sirve como archivo de cultivos vivos y materiales genéticos ([www.atcc.org](http://www.atcc.org)). Un experto en la materia puede asignar un hospedante apropiado basándose en la estructura principal del vector y el resultado deseado. Por ejemplo, se puede introducir un plásmido o un cósmido en una célula hospedante procariota para la replicación de muchos vectores. Las células bacterianas utilizadas como células hospedantes para la replicación y/o expresión de vectores incluyen DH5 $\alpha$ , JM109 y KC8, así como una serie de hospedantes bacterianos comercialmente disponibles tales como SURE $\text{\textcircled{C}}$  Competent Cells y SOLOPACK $\text{\textsuperscript{TM}}$  Gold Cells (STRATAGENE $\text{\textcircled{C}}$ , La Jolla, Calif.). Como alternativa, se podrían emplear como células hospedantes para virus fagos células bacterianas tales como *E. coli* LE392. Las células de levadura apropiadas incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces pombe* y *Pichia pastoris*.

55 Los ejemplos de células hospedantes eucariotas para la replicación y/o expresión de un vector incluyen HeLa, NIH3T3, Jurkat, 293, Cos, CHO, Saos y PC12. Están disponibles numerosas células hospedantes de diversos tipos celulares y organismos, y un experto en la materia las conocerá. De manera similar, se puede emplear un vector

vírico junto con una célula hospedante eucariota o procariota, particularmente una que sea permisiva para la replicación o expresión del vector.

5 Algunos vectores pueden emplear secuencias de control que permiten la replicación y/o expresión tanto en células procariotas como en células eucariotas. Un experto en la materia entenderá además las condiciones bajo las cuales incubar todas las células hospedantes descritas en lo que antecede, a fin de mantenerlas y permitir la replicación de un vector. También son entendidas y conocidas las técnicas y condiciones que permitirían la producción a gran escala de vectores, así como la producción de los ácidos nucleicos codificados por los vectores y sus polipéptidos, proteínas, o péptidos afines.

#### F. Métodos de transferencia génica

10 Se cree que los métodos adecuados para la administración de ácido nucleico con el fin efectuar la expresión de composiciones de la presente invención incluyen virtualmente cualquier método mediante el cual se pueda introducir un ácido nucleico (por ejemplo ADN, incluidos vectores víricos y no víricos) en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, tal como se describe en la presente memoria o como un experto en la materia conocerá. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, la administración directa de ADN, por ejemplo mediante inyección (patentes de EE. UU. 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859, todas ellas incorporadas aquí por referencia), incluida la microinyección (Harland y Weintraub, 1985; patente de EE. UU. 5.789.215, incorporada aquí por referencia); mediante electroporación (patente de EE.UU. n.º 5.384.253, incorporada aquí por referencia); mediante precipitación con fosfato de calcio (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); mediante el uso de DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985);  
15 mediante carga sónica directa (Fechheimer *et al.*, 1987); mediante transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982, Fraley *et al.*, 1979, Nicolau *et al.*, 1987, Wong *et al.*, 1980, Kaneda *et al.*, 1989, Kato *et al.*, 1991); mediante bombardeo con microproyectiles (solicitudes PCT n.ºs. WO 94/09699 y 95/06128; patentes de EE. UU., 5.610.042; 5.322.783, 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880, todas ellas incorporadas aquí por referencia); mediante agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppeler *et al.*, 1990; patentes de EE. UU. 5.302.523 y 5.464.765, todo ello incorporado aquí por referencia); mediante transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes de EE. UU. 5.591.616 y 5.563.055, incorporadas ambas aquí por referencia); o mediante transformación de protoplastos mediada por PEG (Omirlullah *et al.*, 1993; patentes de EE. UU. 4.684.611 y 4.952.500, todo ello incorporado aquí por referencia); mediante captación de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus *et al.*, 1985). Mediante la aplicación de técnicas como las mencionadas se pueden transformar de manera estable o  
20 25 30 transitoria orgánulos, células, tejidos u organismos.

#### G. Componentes y restos lipídicos

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden uno o más lípidos asociados a un ácido nucleico, una molécula de aminoácido, por ejemplo un péptido, u otro compuesto de molécula  
35 pequeña. En cualquiera de las realizaciones tratadas en la presente memoria, la molécula puede ser, o bien un polipéptido de poxvirus o bien un modulador polipeptídico de poxvirus, por ejemplo un ácido nucleico que codifique la totalidad o parte de un polipéptido de poxvirus o bien, como alternativa, una molécula de aminoácidos que codifique la totalidad o parte del modulador polipeptídico de poxvirus. Un lípido es una sustancia que es característicamente insoluble en agua y puede ser extraída con un disolvente orgánico. Los compuestos así  
40 específicamente descritos en la presente memoria son entendidos por los expertos en la materia como lípidos, y están comprendidos por las composiciones y los métodos de la presente invención. Un componente lipídico y un componente no lipídico pueden unirse entre sí, ya sea de forma covalente o de forma no covalente.

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

Una molécula de ácido nucleico o molécula de aminoácido, por ejemplo un péptido, asociada a un lípido puede ser dispersada en una solución que contenga un lípido, disuelta con un lípido, emulsionada con un lípido, mezclada con un lípido, combinada con un lípido, unida covalentemente a un lípido, contenida como suspensión en un lípido o asociada de cualquier otro modo con un lípido. Una composición asociada a lípido o lípido/poxvirus de la presente invención no está limitada a ninguna estructura particular. Por ejemplo, también puede ser simplemente entremezclada en una solución, formando posiblemente agregados que no sean uniformes en tamaño o en forma. En otro ejemplo, pueden estar presentes en una estructura de tipo bicapa, en forma de micelas o con una estructura "colapsada". En otro ejemplo no limitante, se contempla también un complejo de lipofectamina (Gibco BRL)-poxvirus o Superfect (Qiagen)-poxvirus.  
50 55

En ciertas realizaciones, una composición lipídica puede comprender aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5%, aproximadamente 6%, aproximadamente 7%, aproximadamente 8%, aproximadamente 9%, aproximadamente 10%, aproximadamente 11%, aproximadamente 12%, aproximadamente 13%, aproximadamente 14%, aproximadamente 15%, aproximadamente 16%,

aproximadamente 17%, aproximadamente 18%, aproximadamente 19%, aproximadamente 20%, aproximadamente 21%, aproximadamente 22%, aproximadamente 23%, aproximadamente 24%, aproximadamente 25%, aproximadamente 26%, aproximadamente 27%, aproximadamente 28%, aproximadamente 29%, aproximadamente 30%, aproximadamente 31%, aproximadamente 32%, aproximadamente 33%, aproximadamente 34%,  
 5 aproximadamente 35%, aproximadamente 36%, aproximadamente 37%, aproximadamente 38%, aproximadamente 39%, aproximadamente 40%, aproximadamente 41%, aproximadamente 42%, aproximadamente 43%, aproximadamente 44%, aproximadamente 45%, aproximadamente 46%, aproximadamente 47%, aproximadamente 48%, aproximadamente 49%, aproximadamente 50%, aproximadamente 51%, aproximadamente 52%,  
 10 aproximadamente 53%, aproximadamente 54%, aproximadamente 55%, aproximadamente 56%, aproximadamente 57%, aproximadamente 58%, aproximadamente 59%, aproximadamente 60%, aproximadamente 61%, aproximadamente 62%, aproximadamente 63%, aproximadamente 64%, aproximadamente 65%, aproximadamente 66%, aproximadamente 67%, aproximadamente 68%, aproximadamente 69%, aproximadamente 70%, aproximadamente 71%, aproximadamente 72%, aproximadamente 73%, aproximadamente 74%, aproximadamente 75%, aproximadamente 76%, aproximadamente 77%, aproximadamente 78%, aproximadamente 79%,  
 15 aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, aproximadamente 100%, o cualquier intervalo derivable de lo citado, de un componente particular lipídico, de tipo lipídico o no lipídico tal como un fármaco, proteína, azúcar, ácidos nucleicos u otro material descrito en la presente memoria o que sería conocido por un experto en la materia. En un ejemplo no limitante, una composición lipídica puede comprender de aproximadamente 10% a aproximadamente 20% de lípidos neutros y de aproximadamente 33% a aproximadamente 34% de un cerebrósido y aproximadamente 1% de colesterol. En otro ejemplo no limitante, un liposoma puede comprender de  
 25 aproximadamente 4% a aproximadamente 12% de terpenos, donde aproximadamente 1% de la micela es específicamente licopeno, dejando que aproximadamente 3% a aproximadamente 11% del liposoma comprendan otros terpenos; y de aproximadamente 10% a aproximadamente 35% de fosfatidilcolina y aproximadamente 1% de un fármaco. Por tanto, se contempla que las composiciones lipídicas de la presente invención puedan comprender cualquiera de los lípidos, tipos de lípidos u otros componentes en cualquier combinación o intervalo en porcentaje.

#### 30 IV. Ejemplos

Se ofrecen los siguientes ejemplos con el fin de ilustrar diversas realizaciones de la invención, pero no pretenden limitar la presente invención en forma alguna. Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas que se mencionan, así como aquellos objetos, fines y ventajas inherentes en la presente memoria. Los presentes ejemplos, junto con los  
 35 procedimientos descritos en la presente memoria, son actualmente representativos de realizaciones preferidas, son ilustrativos y no se pretende que constituyan limitaciones respecto al alcance de la invención.

Se realizaron estudios preclínicos en modelos murinos de HCC para evaluar los mecanismos del cierre vascular inducido por JX-594 y la reperusión posterior. Se evaluó el potencial de sorafenib para bloquear la reperusión. En un ensayo clínico de fase 2 se trató con JX-594 a pacientes de HCC, mediante inyección intratumoral cada dos  
 40 semanas durante tres ciclos. Se evaluaron por DCE-MRI (obtención de imágenes por resonancia magnética realzada con contraste dinámico) y DW-MRI el tamaño, el flujo sanguíneo y la densidad del tumor al inicio, en el día 5 y en la semana 8. Dos pacientes con reperusión parcial del tumor en la semana 8 iniciaron terapia estándar con sorafenib, y se realizaron escaneos DCE-MRI secuenciales.

Se demostró cierre vascular tumoral en un modelo murino de HCC tras la administración por vía IT o IV de JX-594. El cierre vascular era dependiente de la replicación vírica; la expresión de mGM-CSF del virus y la infiltración de neutrófilos intensificaron el efecto. Se demostró con el tiempo reperusión del borde tumoral y se correlacionó con niveles incrementados de VEGF en el tumor. El tratamiento adyuvante con sorafenib inhibió la angiogénesis y condujo a una eficacia antitumoral significativamente mejor que cualquiera de los agentes solo. Los pacientes de HCC tratados con JX-594 mostraron un cierre vascular tumoral agudo y necrosis tanto en tumores inyectados como  
 50 no inyectados en el hígado. La terapia adyuvante con sorafenib después de la evaluación de la semana 8 dio lugar a una drástica y duradera necrosis tumoral y cierre vascular en dos pacientes. Las revisiones de los escaneos MRI seriados de pacientes con HCC tratados solamente con sorafenib demostraron que estos hallazgos eran específicos para pacientes tratados previamente con JX-594.

Dado que los tumores poseen una elevada tasa de mutación y, por lo tanto, pueden presentar un alto grado de heterogeneidad que conduzca a respuestas mixtas frente a cualquier terapia, puede ser útil combinar ciertos agentes anticáncer con mecanismos de acción alternativos. Para determinar si la combinación de la terapia con virus oncolítico y sorafenib era segura y efectiva, se realizaron experimentos preclínicos *in vitro* e *in vivo*.

#### Ejemplo 1

Datos *in vitro* - sorafenib inhibe JX-594

Se ensayó JX-594 en combinación con sorafenib, en la línea celular de HCC humano PLC/PRF/5. La línea celular PLC/PRF/5 de HCC humano sostiene la replicación de JX-594. Sin embargo, cuando se añadió sorafenib (10  $\mu$ M), ya fuese 2 horas antes de la infección con JX-594, durante la misma o 2 horas después de la misma, el tamaño del estallido disminuyó hasta en 100 veces (Figura 1). También se ensayó JX-594 en combinación con sorafenib en la línea celular de cáncer de ovario humano A2780 y la línea HepG2 de HCC humano.

Cultivo celular y preparación de sorafenib: Se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC) las líneas celulares tumorales humanas A2780 (de ovario) y HepG2 (de HCC). Se cultivaron las células en DMEM complementado con FBS al 10% y pen./estrep. al 1%. Se cultivaron las células a 37°C en una incubadora humidificada que contenía CO<sub>2</sub> al 5%. Para el uso *in vitro*, se disolvió sorafenib en DMSO (Sigma-Aldrich Corp.) a una concentración de 1 mg/ml y luego se diluyó hasta la concentración final adecuada (100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1.000 ng/ml y 2.500 ng/ml) en DMEM con suero fetal de bovino al 10%. El DMSO en la solución final no excedía de 0,2% (v/v).

Formación de placas, ensayo de estallido y viabilidad celular: Se sembraron células A2780 o HepG2 en bandejas de 6 pocillos a razón de  $4 \times 10^5$  células/pocillo y se dejaron durante una noche. Después se añadieron a cada pocillo 100 UFP de JX-594, y se permitió la infección durante 2 horas. Al final de la infección, se retiró el medio y se añadió una cobertura de DMEC con carboximetilcelulosa al 3% que contenía sorafenib a concentraciones finales de 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0 y 2,5  $\mu$ g/ml. Tres días más tarde, se tiñeron las bandejas con violeta cristal y se contaron las placas. Paralelamente, para evaluar la replicación (tamaño de estallido), se prepararon bandejas de 6 pocillos como se ha indicado más arriba. En lugar de teñir y contar placas, se cosecharon células de cada pocillo para purificar el virus. Se lisaron las células mediante 3 ciclos de congelación y descongelación seguidos de sonicación, antes de que se añadieran diluciones en serie del lisado vírico crudo a las células A2780, para valorar el virus mediante ensayo de placas. Además, para evaluar los efectos directos del sorafenib sobre la viabilidad celular, se extendieron las células en bandejas de 96 pocillos y se incubaron solamente con sorafenib. La viabilidad celular se determinó por medio de un ensayo colorimétrico basado en la reducción, mediada por células vivas, de la sal de tetrazolio a cromógeno de formazano (Cell Counting Kit-8, Donjindo Laboratories, Kumamoto, Japón).

Resultados: Concentraciones de sorafenib inferiores a los niveles citotóxicos pueden inhibir el crecimiento vírico y la replicación en líneas celulares tumorales A2780 y HEPG2 (Figura 2). Experimentos adicionales han demostrado que sorafenib ha inhibido la replicación de JX-594 en otras líneas de HCC humano, entre ellas SNU423, SNU398, SNU475, SNU449, SNU387 y la línea U2OS de osteosarcoma humano.

El sorafenib es un inhibidor multicinasa, y es capaz de inhibir la vía de transducción de señal Ras (RAS/RAF/MEK/ERK) mediante la inhibición de las serina/treonina cinasas intracelulares Raf-1 y B-Raf. La activación de la ruta Ras/Raf se produce comúnmente en el cáncer y conduce a la activación transcripcional de genes que responden a E2F, entre ellos genes de fase S tales como timidina cinasa (TK) (Hengstschlager *et al.*, 1994). JX-594 es virus de vaccinia atenuado por inactivación del gen TK vírico. Esta mutación está diseñada para proporcionar una replicación selectiva en células con altos niveles de TK celular (es decir, células cancerosas con rutas anormalmente activadas que conducen a la activación constitutiva de E2F). Aunque, por lo tanto, sorafenib y JX-594 están ambos diseñados para dirigirse a células cancerosas con la vía de Ras activada, la administración simultánea de las terapias *in vitro* puede conducir a la inhibición de la replicación vírica que dependa de una ruta Ras activada.

## Ejemplo 2

### Datos *in vivo* - sorafenib intensifica JX-594

Contrariamente a los hallazgos *in vitro*, los modelos de eficacia preclínica han demostrado que la combinación de sorafenib y JX-594 muestra mejor eficacia que cualquiera de los agentes solo.

Sorafenib potencia la actividad de JX-594 contra tumores primarios CT26 murinos *in vivo*: Se ensayó la combinación de JX-594 y sorafenib en un modelo murino inmunocompetente de células de tumor colorrectal CT26 implantadas subcutáneamente. Se inyectaron a ratones Balb/c, por vía subcutánea,  $3 \times 10^5$  células CT26 y, al cabo de 11 días, se inició el tratamiento con sorafenib solo (10 mg/kg cada día por vía oral (p.o.) durante 2 semanas), JX594 solo ( $10^8$  UFP por vía IV 3 veces por semana durante 1 semana), o combinado (JX594 antes de sorafenib, o sorafenib antes de JX594) (n = 4 por grupo) (Figura 3, recuadro superior). Los animales testigo recibieron solamente PBS. Se utilizó para este experimento una versión de JX-594 que expresa GM-CSF murino. Se midieron los tumores dos veces por semana hasta el punto final. Se muestran las proporciones supervivientes dentro de cada grupo de estudio en cada punto temporal posterior al tratamiento (Figura 3, recuadro central). Se muestran los volúmenes tumorales medios dentro de cada grupo de estudio en cada punto temporal posterior al tratamiento (Figura 3, recuadro inferior). Comparado con JX-594 solo, JX-594 en combinación con sorafenib mejoró la supervivencia y redujo la carga tumoral. JX-594 en combinación con sorafenib también redujo la carga tumoral en comparación con los animales que recibieron solamente sorafenib. El régimen preferido fue JX-594 seguido de sorafenib.

Sorafenib potencia la actividad de JX-594 contra nódulos pulmonares de melanoma B16 murino *in vivo*: Se ensayó la combinación de JX-594 y sorafenib en un modelo murino inmunocompetente de tumores de melanoma B16. Se

inyectaron a ratones C57BL/6, por vía IV,  $3 \times 10^5$  células B16-F10-LacZ y se trató a los animales con sorafenib solo (HD: 10 mg/kg, LD: 50 µg/kg p.o. cada día durante 2 semanas), JX594 solo ( $10^7$  UFP por vía IV 3 veces por semana durante 1 semana), o en combinación (sorafenib LD o HD antes de JX-594 por vía IV) (n = 5 por grupo) (Figura 4, recuadro superior). Al final del tratamiento se sacrificaron los ratones y se fijaron y se tñeron los pulmones para detectar nódulos superficiales de B16 (n = 5 por grupo). Se muestra para cada grupo el número medio de nódulos tumorales al final del estudio (Figura 4). En el grupo con sorafenib 50 µg/kg p.o. + JX-594 se produjo una reducción significativa de tumores B16 en comparación con el grupo con JX-594 solo o el grupo con sorafenib solo.

Sorafenib potencia la actividad de JX-594 contra el modelo de xenoinjerto de HCC humano *in vivo*: Se implantaron a ratones SCID tumores de xenoinjerto de carcinoma hepatocelular humano HepG2 subcutáneos. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de aproximadamente 12-14 mm de diámetro máximo, se asignaron al azar los ratones a uno de seis grupos de tratamiento (n = 8 por grupo) (1) PBS solo, (2) sorafenib solo (dosis intraperitoneal diaria estándar de 400 µg), (3) JX-594 solo (tratamiento intravenoso de  $10^7$  UFP semanales, con un total de seis dosis), (4) tratamiento simultáneo con JX-594 y sorafenib, (5) sorafenib seguido de JX-594 y (6) JX-594 (2 dosis) seguido de sorafenib.

El tamaño de tumor se midió usando un compás, y se sacrificaron de manera eutanásica los ratones cuando las cargas tumorales alcanzaron el límite permitido para fines éticos. El régimen con JX-594 seguido de sorafenib fue superior al testigo o al agente solo, en términos de crecimiento tumoral y de tiempo de progresión hasta tumor. Además, esta secuencia fue superior a sorafenib seguido de JX-594 y al tratamiento simultáneo (Figura 5).

#### A. Estudios preclínicos de cierre vascular en modelo de tumor de HCC

Métodos experimentales, experimento piloto: El experimento piloto se diseñó para demostrar que JX-594 seguido de sorafenib induce cierre vascular agudo en el modelo HepG2. Se emplearon tres grupos (n = 5 animales cada uno). El Grupo 1 recibió solamente PBS; el grupo 2 recibió una dosis única de  $10^6$  UFP de JX-594 administrada por vía intravenosa (IV); y el Grupo 3 recibió una dosis única de  $10^6$  UFP de JX-594 administrada intratumoralmente (IT). Se recogieron muestras de suero en el día 5 (D5) para medir los niveles de VEGF y de GM-CSF. Antes del sacrificio eutanásico, se inyectaron a los ratones microesferas fluorescentes para permitir la visualización de la perfusión tumoral. El tumor resecado se dividió en tres porciones para el análisis: 1) Muestra congelada de manera instantánea para medir los niveles de proteína VEGF; 2) Preparación de muestra embebida en OCT de secciones de tumor congelado, para visualizar microesferas y marcador vascular CD31; y 3) Muestra fijada en formalina/embebida en parafina, para análisis histológico.

Métodos experimentales, estudio de vascularidad: El estudio analizó los efectos a largo plazo sobre la vascularización y evaluó la eficacia de JX-594 +/- sorafenib en el modelo HepG2. Se implantaron subcutáneamente tumores HepG2 (línea de HCC humano) en ratones atómicos. Se asignaron aleatoriamente los animales a siete grupos de tratamiento (n = 5 por grupo) para ensayar los agentes solos y en combinación. Los grupos se trataron con JX-594 ( $10^6$  UFP intratumoralmente, días 1 (D1) y 8 (D8)) y/o sorafenib (400 µg por vía intraperitoneal (i.p.), diariamente entre los días D15-D29) o bien PBS (testigo), con el programa detallado en la Figura 6. Los tumores se midieron usando un compás dos veces por semana. Se recogieron muestras de suero los días D1, D8, D15, D22 y D29 para medir los niveles de VEGF y GM-CSF. El sacrificio de los ratones se realizó los días D22 o D35. Antes del sacrificio eutanásico, se inyectaron a los ratones microesferas fluorescentes para permitir la visualización de la perfusión tumoral. El tumor resecado se dividió en tres porciones para el análisis: 1) Muestra congelada de manera instantánea para medir los niveles de proteína VEGF; 2) Preparación de muestra embebida en OCT de secciones de tumor congelado, para visualizar microesferas y marcador vascular CD31; y 3) Muestra fijada en formalina/embebida en parafina, para análisis histológico

Resultados: Se contaron los vasos en secciones de tumor en OCT teñidas con CD31; se presenta (en la Figura 6) el número medio de vasos en 3 campos con una ampliación de 200 aumentos. El sorafenib solo causó una disminución transitoria en el número de vasos (día 29), pero el recuento de vasos aumentó nuevamente con el tiempo (día 35). Sin embargo, en animales que recibieron JX-594 seguido de sorafenib, el número de vasos en el día D35 era menor comparado con el grupo de sorafenib solo, lo que sugiere que la combinación tiene un efecto más duradero sobre la vasculatura tumoral.

#### B. Datos clínicos

JX-594 es un poxvirus oncolítico específico, primero en su clase, diseñado para replicarse selectivamente en células cancerosas y destruirlas. La oncólisis directa más la expresión del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) también estimula el cierre vascular del tumor en modelos de tumores animales. Se evaluó el cierre vascular del tumor tras la terapia con JX-594 en pacientes con carcinoma hepatocelular. Además, se estudió la viabilidad de la terapia antiangiogénica adyuvante con sorafenib para prevenir la reperfusión posterior a JX-594 en estudios tanto preclínicos como clínicos de carcinoma hepatocelular (HCC).

Métodos: Se realizaron estudios preclínicos en modelos murinos de HCC para evaluar los mecanismos del cierre vascular inducido por JX-594 y la reperfusión posterior. Se evaluó el potencial de sorafenib para bloquear la reperfusión. En un ensayo clínico de fase 2 se trató con JX-594 a pacientes de HCC, mediante inyección

intratumoral cada dos semanas durante tres ciclos. Se evaluaron por DCE-MRI (obtención de imágenes por resonancia magnética realizada con contraste dinámico) y DW-MRI el tamaño del tumor, el flujo sanguíneo y la densidad al inicio, en el día 5 y en la semana 8. Cinco pacientes con reperusión parcial del tumor en la semana 8 iniciaron terapia estándar con sorafenib, y se realizaron escaneos DCE-MRI secuenciales.

5 Hallazgos: Se produce cierre vascular tumoral en el modelo murino de HCC tras la administración IT o IV de JX-594. El cierre vascular era dependiente de la replicación vírica; la expresión de mGM-CSF del virus y la infiltración de neutrófilos acrecentaron el efecto. Se demuestra con el tiempo reperusión del borde tumoral y se correlaciona con niveles incrementados de VEGF en el tumor. El tratamiento adyuvante con sorafenib inhibió la angiogénesis y condujo a una eficacia antitumoral significativamente mejorada con respecto a cualquiera de los agentes solo. Los  
10 pacientes con HCC tratados con JX-594 mostraron cierre vascular tumoral agudo y necrosis tanto en tumores inyectados como no inyectados en el hígado. La terapia adyuvante con sorafenib después de la evaluación de la semana 8 dio lugar a una drástica y duradera necrosis tumoral y cierre vascular en al menos tres pacientes. Las revisiones de los escaneos MRI seriados de 15 pacientes con HCC tratados solo con sorafenib demostraron que estos hallazgos se habían reforzado y acrecentado en el caso de pacientes tratados previamente con JX-594.

15 JX-594 provoca cierre vascular agudo y necrosis en tumores de HCC, y sensibiliza el HCC frente a la terapia posterior con sorafenib. Son recomendables ensayos controlados aleatorizados de JX-594 seguidos por sorafenib, frente a solo sorafenib. Los regímenes de terapia secuencial con poxvirus oncolíticos seguidos por agentes antiangiogénicos son prometedores.

20 Introducción: El poxvirus oncolítico específico JX-594 se replica selectivamente en células cancerosas, dando como resultado la producción de progenie vírica, la necrosis de células tumorales, la liberación y la diseminación dentro de los tejidos tumorales. JX-594 también está modificado para expresar el transgén GM-CSF con el fin de intensificar la inmunidad antitumoral resultante de la oncólisis. La estructura básica de vaccinia es intrínsecamente selectiva frente a tumores a causa de la dependencia de la ruta EGFR-ras y de la resistencia tumoral a interferones. El índice terapéutico inherente se amplifica mediante la delección de TK; la replicación de JX-594 es dependiente de la TK  
25 celular, que es empujada a niveles altos por anomalías del ciclo celular en el cáncer. Los resultados de un ensayo clínico de fase 1 con JX-594 en pacientes con tumores hepáticos refractarios demostraron seguridad, eficacia y prueba de concepto mecanística para la replicación de JX-594, su diseminación sistémica y la expresión de GM-CSF biológicamente activo. Estudios preclínicos recientemente publicados han demostrado que la terapia con virus oncolítico también puede inducir el cierre vascular agudo del tumor (Breitbach *et al.*, 2007).

30 Los inventores contemplan que el poxvirus oncolítico JX-594 provoca el cierre vascular del tumor, y que la expresión de GM-CSF por el virus intensifica el reclutamiento y activación de neutrófilos, lo que conduce a un aumento de los efectos antivascuales. Después de los estudios preclínicos, los inventores evalúan el cierre vascular del tumor en pacientes con HCC, un tipo de tumor que es hipervascular. Los estudios preclínicos y clínicos han demostrado la posibilidad de una progresión posterior de un borde tumoral vascularizado.

35 El sorafenib es un inhibidor de multikinasa oral aprobado para el tratamiento del carcinoma de células renales (RCC, por sus siglas en inglés) y el carcinoma hepatocelular (HCC). El sorafenib inhibe receptores de tirosina cinasa (VEGF-R, PDGF-R) superficiales y serina/treonina cinasas (Raf-1, B-Raf) intracelulares y, por lo tanto, es un agente anticáncer multimecanístico. El sorafenib puede afectar a las células tumorales directamente a través de la inhibición de la ruta de señalización Ras (RAS/RAF/MEK/ERK) que habitualmente está activada en las células cancerosas y  
40 promueve la proliferación celular. El sorafenib también puede reducir el crecimiento tumoral a través de sus efectos antiangiogénicos resultantes de la inhibición de VEGF-R. Sutent (sunitinib/SU11248) es otra terapia anticancerosa dirigida que inhibe las acciones del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y presenta efectos antiangiogénicos. Está aprobado para el tratamiento de carcinoma de células renales y tumor de estroma gastrointestinal (GIST).

45 Los inventores contemplan que la reperusión posterior a JX-594 resulta bloqueada por el agente antiangiogénico sorafenib, que está aprobado para uso en pacientes con HCC, o Sutent, que está aprobado para uso en pacientes con RCC. Los autores de la presente invención han puesto a prueba esta hipótesis en modelos preclínicos de HCC y en cinco pacientes una vez completada terapia con JX-594.

### C. Materiales y métodos

50 Aprobaciones e inscripción en el estudio: Los protocolos del estudio y los formularios de consentimiento informado fueron aprobados por la FDA de EE. UU., la FDA de Corea y los comités Institutional Review (de revisión institucional) e Infection Control (de control de infecciones) del Pusan National University Hospital, en Busan, Corea del Sur. El protocolo ha sido registrado a través de la web en clinicaltrials.gov.

55 Selección de pacientes: los pacientes firmaron el consentimiento informado, de acuerdo con las directrices de buena práctica clínica (GCP, por sus siglas en inglés). Los criterios de inclusión incluían tumor o tumores hepatocelulares inyectables e irsecables en el interior del hígado (HCC primario) que habían progresado a pesar del tratamiento con terapias estándar (refractarios al tratamiento), función hematopoyética normal (recuento de leucocitos  $>3 \times 10^9$  células/L, hemoglobina  $>100$  g/L, recuento de plaquetas  $>60 \times 10^9$  células/L) y función del órgano (incluida creatinina

≤132,6 μmol/L, aspartato aminotransferasa (AST)/alanina aminotransferasa (ALT) ≤2,5 del límite normal superior, clase Child-Pugh A o B), esperanza de vida ≥16 semanas y estado funcional de Karnofsky (KPS) ≥70. Los criterios de exclusión incluían tumores extrahepáticos, tumores con diámetro máximo >10 cm, riesgo acrecentado de complicaciones de vacunación (por ejemplo, inmunosupresión, eczema), tratamiento con agentes inmunosupresores o agentes para tratamiento del cáncer dentro de las 4 semanas precedentes, ascitis en progreso rápido, embarazo o lactancia.

Fabricación y preparación de JX-594: JX-594 es una cepa de vaccinia Wyeth modificada por inserción de los genes *CSF2* y *LacZ* humanos en la región génica *TK* bajo el control del promotor temprano-tardío sintético y del promotor p7.5, respectivamente. El material para ensayo clínico (CTM, por sus siglas en inglés) se generó de acuerdo con las directrices de buenas prácticas de fabricación (GMP) en células Vero, y se purificó mediante centrifugación en gradiente de sacarosa. La relación genoma/UFP era aproximadamente 70:1. Se formuló JX-594 en solución salina tamponada con fosfato, con glicerol al 10% y cloruro de sodio 138 mM, a pH 7,4. Las pruebas finales del control de calidad para la liberación del producto incluían ensayos de esterilidad, endotoxina y potencia. También se ensayó el CTM en cuanto a concentración de proteína GM-CSF, y resultó negativo (límite inferior de detección <14.000 pg/ml). Se diluyó JX-594 en solución salina normal al 0,9%, en un volumen equivalente al 25% del volumen total estimado del tumor o los tumores diana.

Procedimiento de tratamiento con JX-594, todos los pacientes por vía IT excepto 11301 (paciente con Sutent): Se asignaron al azar pacientes con HCC irsecable para recibir uno de los dos niveles de dosis (10<sup>8</sup> o 10<sup>9</sup> UFP). Se administró JX-594 mediante inyección intratumoral guiada por imágenes utilizando una aguja de inyección Quadrafuse de múltiples puntas en el caso de tumores aproximadamente esféricos, y mediante una aguja PEIT (para inyección percutánea de etanol, de múltiples poros, HAKKO Medicals, Tokio, Japón) de calibre 21, en el caso de tumores de forma irregular. Se inyectó en los tumores (n = 1-5) cada dos semanas durante tres ciclos. Los mismos tumores inyectados en el ciclo 1 fueron inyectados posteriormente en cada ciclo.

Terapia con sorafenib y evaluación de la respuesta tumoral posterior a JX-594: Los pacientes completaron el ensayo clínico por vía IT de JX-594 al cabo de 8 semanas en el estudio. Algunos pacientes (pacientes 1702, 1705, 1002, 1712, 1713) pasaron a recibir tratamiento estándar con sorafenib (400 mg dos veces al día p.o.). El seguimiento de los tumores en estos pacientes se realizó mediante obtención de imágenes por DCE-MRI, utilizando los mismos procedimientos que se habían utilizado para evaluar la respuesta al tratamiento con JX-594.

Procedimiento de tratamiento con JX-594, pacientes tratados con JX-594 por vía IV seguido de JX-594 por vía IT seguido de sorafenib: Pacientes con HCC irsecable recibieron dos dosis de niveles de JX-594 (10<sup>9</sup> UFP). Para la primera dosis (Día 1), se administró JX-594 por infusión intravenosa durante 60 minutos. Para la segunda y tercera dosis (Día 8 y Día 22), se administró JX-594 mediante inyección intratumoral guiada por imágenes utilizando una aguja de inyección Quadrafuse con múltiples puntas en el caso de tumores aproximadamente esféricos, o mediante una aguja PEIT (para inyección percutánea de etanol, de múltiples poros, HAKKO Medicals, Tokio, Japón) de calibre 21, en el caso de tumores de forma irregular. A partir del día 25, los pacientes iniciaron el tratamiento con sorafenib oral (400 mg dos veces al día p.o.). Los pacientes con tejido tumoral viable recibieron una inyección de JX-594 por vía IT en la semana 12 (el tratamiento con sorafenib se interrumpió temporalmente 2-3 días antes de esta inyección de refuerzo, durante la misma y 4-5 días después). La obtención de imágenes (CT, DCE-MRI y/o PET-CT) se realizó al inicio del estudio, en el día 25, en la semana 6 y/o en la semana 12 para evaluar la respuesta.

Tratamiento con JX-594, paciente 11301 (paciente con Sutent): El paciente 11301 padecía un carcinoma de células renales que había metastatizado al hígado. Los tumores hepáticos se trataron mediante inyección intratumoral utilizando una aguja PEIT de calibre 21. El paciente recibió un total de 4 dosis de JX-594 (10<sup>9</sup> UFP/dosis) administradas con tres semanas de diferencia (= 4 ciclos). Después de cada dos ciclos de tratamiento, se realizó un escaneo por CT (tomografía computarizada, por sus siglas en inglés) realzada con contraste, y la evaluación de la respuesta en la semana 6 se realizó utilizando los criterios RECIST y de Choi. El paciente experimentó una enfermedad estable (SD) conforme a los criterios RECIST y una respuesta Choi (disminución de 42% en HU) (Park *et al.*, 2008).

Tratamiento con Sutent: Posteriormente, el paciente 11301 progresó y pasó a recibir tratamiento con Sutent. El paciente recibió 3 tandas de 50 mg/día (4 semanas seguidas, 2 semanas de descanso) y después 3 tandas de 37,5 mg/día (4 semanas seguidas, 2 semanas de descanso), y se le mantuvo con una pauta de 25 mg/día (2 semanas seguidas, 1-2 semanas de descanso).

Evaluación de la vascularización del tumor y de la respuesta: Se realizó DCE-MRI (obtención de imágenes por resonancia magnética realzadas con contraste dinámico) durante el cribado (al inicio), en el día 5 (opcional) y en la semana 8. Para los pacientes que seguían con sorafenib, se realizó DCE-MRI 4 y/u 8 semanas después del inicio del tratamiento con sorafenib. La DCE-MRI evalúa el tamaño del tumor, la vascularización y la necrosis. Se utilizó la DCE-MRI inicial o del cribado como referencia a partir de la cual se determina el tiempo hasta la progresión y las tasas de respuesta. La DCE-MRI del día 5 (opcional) se utilizó para evaluar los efectos tempranos, tales como el cierre vascular agudo. El estado de progresión tumoral y la o las respuestas tumorales a JX-594 fueron evaluados radiológicamente mediante RECIST modificado y criterios de Choi modificados en la consulta de la semana 8. Uno o varios radiólogos con experiencia en la evaluación de carcinoma hepatocelular en escaneos MRI realizaron una

revisión independiente de las imágenes. Para evaluar los tumores intrahepáticos se determinó, basándose en RECIST modificado, la proporción de sujetos con una respuesta antitumoral "completa" o "parcial" objetiva, así como la respuesta determinada conforme a criterios de Choi modificados (definida como una disminución  $\geq 10\%$  en la suma de los diámetros más largos y/o disminución  $\geq 15\%$  de la intensidad media de la señal del tumor en MRI).

- 5 Respuesta tumoral conforme a RECIST modificado: Las modificaciones a RECIST para medir la respuesta tumoral y la progresión tumoral fueron las siguientes. Se midieron el o los nuevos tumores que se desarrollaron dentro del hígado durante o después del tratamiento. Se incluyó su diámetro máximo en la suma de los diámetros máximos de todos los tumores intrahepáticos. Sin embargo, no se consideró a los nuevos tumores dentro del hígado evidencia *per se* de progresión. La razón de esta modificación de los criterios RECIST es la siguiente. La infección por JX-594 de una masa tumoral que originalmente era radiográficamente indetectable puede hacer que el tumor parezca ser nuevo y/o en progresión debido a la inflamación y/o la necrosis; sin embargo, estos cambios no representan una verdadera progresión tumoral. Además, debido a que la finalidad del tratamiento era controlar la carga tumoral intrahepática, se anotaron (y se registraron por ubicación) los nuevos tumores detectados extrahepáticamente en el abdomen, pero no se incluyeron en la determinación de la respuesta global. Así, la respuesta o progresión tumoral se determinó por la suma de los diámetros más largos de los tumores intrahepáticos medibles, y se determinó de la siguiente manera: Respuesta completa (CR, por sus siglas en inglés): desaparición de todos los tumores. Respuesta parcial (PR): al menos 30% de disminución en la suma de los diámetros más largos (LD) de los tumores, tomando como referencia la suma inicial de los LD. Enfermedad progresiva (PD): al menos 20% de aumento en la suma de los LD de los tumores, tomando como referencia la suma inicial de los LD. Enfermedad estable (SD): ni contracción suficiente para ser calificada como PR ni aumento suficiente para ser calificada como PD, tomando como referencia la suma inicial de los LD.

- Respuesta tumoral mediante criterios de Choi modificados: Los criterios de respuesta de Choi tienen en cuenta los cambios en la densidad tumoral además del diámetro tumoral (contrariamente a RECIST) y se han publicado datos que respaldan su utilidad (Choi *et al.*, 2004). Los primeros estudios han demostrado que los tumores hepáticos tratados con JX-594 pueden desarrollar necrosis interna significativa sin una disminución concomitante en el tamaño de los mismos, tal como fue descrito en tumores de estroma gastrointestinal por Choi *et al.* (2004). Por consiguiente, se han medido también los tumores intrahepáticos y se ha evaluado la respuesta utilizando un criterio de Choi modificado. La modificación de los criterios es necesaria, ya que la modalidad de obtención de imágenes utilizada para medir la respuesta tumoral fue la DCE-MRI. Al no tener la MRI un sistema estandarizado de mediciones de densidad de contraste similar a las unidades Hounsfield (HU, por sus siglas en inglés) en la CT, se realizó una comparación de la mejora porcentual de los tumores al inicio y después del tratamiento, utilizando mediciones de intensidad de señal (SI) de la región de interés (ROI). Se utilizó la DCE-MRI inicial o del cribado como referencia para determinar la respuesta. Se definió una respuesta por criterios Choi modificados como una disminución  $\geq 10\%$  en la suma de los diámetros más largos de todos los tumores inyectados y/o una disminución  $\geq 15\%$  de la intensidad media de la señal en MRI del tumor o tumores inyectados. La intensidad de señal (SI) media de MRI se midió como porcentaje de tumor.

- Protocolos para obtención imágenes MRI: Se someterá a cada paciente a MRI del abdomen, incluida la obtención de imágenes por resonancia magnética realizada con contraste dinámico (DCE-MRI), en los puntos temporales prescritos por el protocolo. La obtención de imágenes se realizará en un sistema MR de 1,5 T o 3,0 T empleando una bobina de disposición para cuerpo o torso emplazada de forma que se consiga una cobertura completa de imágenes del hígado con el paciente en posición supina. Se puede colocar sobre el hígado una almohadilla dieléctrica.

- Por lo general, los parámetros de la obtención de imágenes se fijan entre las consultas de seguimiento del paciente. Aunque las secuencias que siguen enumeran un intervalo de parámetros aceptables, una vez que se ha realizado el escaneo inicial del paciente, se deben emplear esos parámetros en todas las exploraciones posteriores. Además, cada paciente debe ser escaneado empleando el mismo escáner MRI.

- Se abrirá una vía intravenosa antes del examen, con un catéter del mayor calibre posible colocado en una vena periférica, con solución salina normal funcionando en el modo KVO (del inglés "keep vein open", o "mantener abierta la vena"). Alternativamente, en caso de pacientes con vías PICC o puertos de catéter venoso externo que sean compatibles con inyectores automatizados de contraste, se pueden usar estos para el acceso venoso. Se administrará contraste de quelato de gadolinio extracelular mediante inyección en bolo intravenoso a una dosis de 0,1 mmol/kg y una velocidad de 2 cm<sup>3</sup>/segundo mediante un inyector automatizado, seguido de una inyección inmediata de 20 cm<sup>3</sup> de solución salina. Se anotará en el registro clínico (en inglés, CRF) cualquier variación de la velocidad de inyección o la dosis, o bien la extravasación de contraste.

- 55 Protocolo de obtención de imágenes para sistemas MR de 1,5 teslas: Se realizarán las siguientes secuencias de pulsos:

- Obtención de imágenes precontraste: (1) Axiales 2D en fase y fase opuesta T1: imágenes axiales en doble fase, por eco en gradiente deteriorado (SPGR), ponderadas en T1 (TR (tiempo de repetición): el más corto posible; TE (tiempo de eco): 2,1 y 4,2; ángulo de inclinación (FA): 80-90 grados, grosor de corte 5-7 mm, separación entre cortes máximo 1 mm; codificaciones de fase 160 - 192, interpoladas a 256 x 256; campo de visión (FOV) optimizado para el

hábito corporal del paciente, 300-450 mm. (2) Axiales 2D T2 por FSE: TR: 3.500-5.000 ms (efectivo); TE: 60-88 ms; codificaciones de fase: 160 - 256 x 256; campo de visión optimizado para el hábito corporal del paciente, 300-450 mm; grosor de corte, 5-7 mm; separación entre cortes máximo 1 mm; las imágenes se deben realizar con supresión de grasa. Se recomienda el disparo por respiración u otras técnicas de supresión del movimiento.

- 5 DCE-MRI: (3) Obtención de imágenes dinámicas 3D T1: se realizan un total de 6 series de esta secuencia: un precontraste, 4 poscontrastes inmediatos y un conjunto de imágenes retrasadas 5 minutos. Los parámetros para las adquisiciones en 3D con supresión de grasa ponderadas en T1 son los siguientes: TR = 2,0-4,5 ms; TE = 1,42-2,0 ms; ángulo de inclinación 8-12°; codificaciones de fase 160-192, interpoladas a 512 x 512; campo de visión optimizado para el hábito corporal del paciente, 300-450 mm; grosor de corte interpolado 1,5-3 mm; grosor de bloque para garantizar la cobertura completa del hígado.

10 Para determinar el momento de la primera adquisición realizada con contraste (fase arterial hepática), se administrará un bolo de prueba de 1-2 ml de material de contraste y se establecerá el tiempo de circulación (tiempo hasta el realce arterial máximo) como tiempo de retraso de la adquisición. De manera alternativa, también se puede utilizar *software* de temporización automatizada para determinar el realce de la fase arterial, si está disponible. Las cuatro secuencias dinámicas poscontraste se realizarán con una separación temporal de 40 segundos entre cada adquisición. También se adquirirá una secuencia retardada adicional a los 5 minutos tras la inyección (haciendo un total de 5 secuencias poscontraste). Todas las adquisiciones se realizarán con respiración suspendida, ya sea en inspiración o en expiración, según las prácticas de la institución. No se realiza ningún cambio de ajuste fino en el sistema entre las secuencias precontraste y poscontraste. Se anotará en el registro clínico cualquier variación con respecto a este protocolo de obtención de imágenes.

15 Protocolo de obtención de imágenes para sistemas MR de 3,0 teslas: Se realizarán las siguientes secuencias de pulsos:

20 Obtención de imágenes precontraste: (1) Axiales 2D en fase (IP) y fuera de fase (OP) ponderadas en T1: eco en gradiente deteriorado (SPGR) de doble fase en dos fases (SPGR). FOV: optimizado para el hábito corporal, 300-450 mm; TR: mínimo para cubrir el hígado; TE: por defecto en fase y en fase opuesta; ángulo de inclinación: 80-90 grados; grosor de corte: 5-7 mm; separación: 0-1 mm (se prefiere una separación de 0 mm); matriz de frecuencias: 320; codificaciones de fase: 160-224, interpoladas a 512 x 512; saturación de grasa: desactivada; ancho de banda: configuración predeterminada.

25 (2) Axiales 2D por SSFSE ponderadas en T2. FOV: úsese el mismo que en (1), más arriba; TR: el TR efectivo más corto para obtener imágenes de la totalidad del hígado; TE efectivo: 60-88 ms; grosor de corte: úsese el mismo que en (1); separación: úsese la misma que (1); matriz de frecuencias: 320; codificaciones de fase: 160-224, interpoladas a 512 x 512; saturación de grasa: desactivada.

30 (3) Axiales 2D por FSE ponderadas en T2. Aquí se puede utilizar tanto la respiración libre con disparo por respiración o la obtención de imágenes con respiración contenida. No obstante, estará estandarizada dentro los exámenes de cada paciente. Por ejemplo, si un paciente es escaneado al inicio utilizando disparo por respiración, todos los exámenes de MR posteriores utilizarán disparo por respiración con esta secuencia. Si se utiliza el disparo por respiración, se debe emplear una longitud de tren de ecos de 12-20, y también deben obtenerse suficientes excitaciones/adquisiciones para conseguir una relación señal/ruido óptima. Si se obtienen imágenes en T2 con respiración contenida, empléese una longitud de tren de ecos de 24-32 y 1 adquisición. FOV: úsese el mismo que en (1), más arriba. TR efectivo: 3.500-5.000; grosor de corte: úsese el mismo que en (1); separación: úsese la misma que en (1); matriz de frecuencias: 320; codificaciones de fase: 160-224, interpoladas a 512 x 512; saturación de grasa: activada. DCE- MRI.

35 (4) Axiales 3D por eco en gradiente deteriorado (SPGR), ponderadas en T1. FOV: úsese el mismo que en (1), más arriba; TR: 2-5 ms; TE: 1,4-2,5; ángulo de inclinación: 8-15; grosor de corte: 1,5-3 mm interpolados; grosor de bloque: para cubrir todo el hígado; matriz de frecuencias: 288-320; codificaciones de fase: 160-224, interpoladas a 512 x 512; saturación de grasa: activada. Número de escaneos: 5 en total (1 escaneo precontraste y 4 poscontraste, seguidos de un quinto escaneo a los 5 minutos tras la inyección de contraste). Todos los escaneos se realizan con respiración suspendida, ya sea al final de la espiración o al final de la inspiración, conforme a la práctica estándar en la institución.

40 D. Datos de ensayos clínicos: Cierre vascular en el Día 5 en tumores y tumores de carcinoma colorrectal tras el tratamiento con JX-594

45 Se había observado con anterioridad cierre vascular agudo, medido por CT en perfusión, en tumores tratados directamente con JX-594 mediante inyección intratumoral (Liu *et al.*, 2008). Los inventores han aplicado el análisis por DCE-MRI para apreciar la reducción de la perfusión de tumores con el fin de seguir el curso del cierre vascular y la necrosis tumoral en respuesta al tratamiento con JX-594. De los 16 pacientes inscritos en un nuevo ensayo clínico con escaneo DCE-MRI opcional el día 5, se realizó este escaneo en 13 pacientes, y existen ejemplos adicionales de cierre vascular en pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) (Figura 7).

En los ejemplos de HCC analizados con anterioridad, parecía que era necesaria la inyección directa en el tumor para provocar una perfusión tumoral reducida (Figura 1, Liu *et al.*, 2008). A partir de estos datos, no se había predicho que se produjese cierre vascular en tumores no inyectados como respuesta a la aplicación distante de JX-594. Ahora, por primera vez, los inventores han demostrado que no es necesario inyectar cada tumor para conseguir esta respuesta, y que los tumores distantes no inyectados también pueden mostrar cierre vascular (Figuras 8 y 9).

Además, los inventores han demostrado que JX-594 puede provocar cierre vascular en tumores distintos de HCC, como se ha evidenciado en un paciente con metástasis asentadas en el hígado de carcinoma colorrectal (CRC), un tipo de tumor considerado menos vascularizado que el HCC (Figura 9) y, por ello, con menor probabilidad de incurrir en alteraciones vasculares.

10 Ejemplo 1703: El paciente 1703 padecía carcinoma hepatocelular y fue inscrito en un ensayo clínico de fase 2 con JX-594. Se inyectó JX-594 ( $10^9$  UFP/dosis) en un gran tumor único. Al cabo de cinco días, la DCE-MRI mostró cierre vascular agudo (recuadros superiores en blanco y negro) (Figura 9). Los recuadros inferiores muestran un ejemplo del análisis por segmentación utilizado para cuantificar el grado de cierre vascular/necrosis tumoral (paneles inferiores) (Figura 7).

15 Ejemplo 1708: El paciente 1708 padecía carcinoma hepatocelular, con múltiples tumores presentes en el hígado, y fue inscrito en un ensayo clínico de fase 2 con JX-594. Se inyectó JX-594 en algunos de los tumores hepáticos, pero no en todos (dosis total  $10^8$  UFP/dosis). Al cabo de cinco días, la DCE-MRI mostró necrosis aguda/cierre vascular en tumores asentados en el hígado, tanto inyectados como no inyectados. La Figura 8 muestra dos planos de visión, incluyendo imágenes anteriores y posteriores al tratamiento con JX-594.

20 Ejemplo 0204: El paciente 0204 padecía carcinoma colorrectal, con metástasis presentes en el hígado, pulmones y ganglios linfáticos y fue inscrito en un ensayo clínico de fase 2 con JX-594. Se inyectó JX-594 en algunas de las metástasis hepáticas, pero no en todas (dosis total  $10^9$  UFP/dosis). Al cabo de cinco días, la DCE-MRI mostró necrosis aguda/cierre vascular en tumores asentados en el hígado, tanto inyectados como no inyectados (Figura 9).

E. Datos de ensayos clínicos: JX-594 potencia la terapia anti-VEGF con sorafenib y Sutent

25 Cinco pacientes que habían mostrado reperfusión en la semana 8 después de completar el tratamiento con JX-594 recibieron posteriormente la dosis estándar de sorafenib (400 mg dos veces al día). Se observaron respuestas Choi mejoradas (Tabla A). Estas respuestas habían mejorado con respecto a cualquier respuesta Choi inicial al tratamiento con JX-594 solo (Figuras 11, 12 y 13).

Tabla A: Respuesta Choi mejorada en pacientes tratados con JX-594 seguido de sorafenib.

Paciente	Nivel de dosis	Respuesta RECIST a JX-594, semana 8	Respuesta Choi a JX-594, semana 8	Respuesta Choi a sorafenib
1702	$10^9$ UFP/dosis	SD (iny.) PD (nueva)	no evaluable	Choi+
1705	$10^8$ UFP/dosis	PD	Choi+ -36%	Choi+
1002	$10^9$ UFP/dosis	SD (iny.) PD (nueva)	Choi+ -121%	a determinar
1712	$10^9$ UFP/dosis	PD	Choi+ -33%	Choi+
1713	$10^9$ UFP/dosis	PD	Choi-	a determinar

30 Ejemplo de "grupo testigo" solamente con sorafenib (se incluye Figura): Históricamente, la tasa de respuesta RECIST a sorafenib es solo de 1-2% (Llovet *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009). Para conseguir un grupo testigo local evaluado según los criterios de Choi, se evaluaron en cuanto a respuesta Choi pacientes con HCC que no habían recibido JX-594 pero que habían recibido sorafenib. En el hospital en donde se habían tratado 4 de los 5 pacientes de JX-594, otros 26 pacientes habían recibido sorafenib en el mismo período. 7 pacientes fallecieron antes de la evaluación de respuesta, y se evaluaron en cuanto a respuesta Choi 15 pacientes. Solo 2 de los pacientes que habían recibido exclusivamente sorafenib mostraron una respuesta Choi+ (26 en total; 15 evaluados en cuanto a respuesta Choi). Cabe señalar que estos dos pacientes habían recibido radioterapia a la vez que terapia con sorafenib. En comparación, los dos pacientes que habían recibido terapia con JX-594 antes de la terapia con sorafenib durante este período presentaron una respuesta Choi+ (Figura 10), una mejora sorprendente y extraordinaria en el efecto de sorafenib sobre tumores.

En un ensayo clínico solamente con sorafenib que utilizaba escaneos por MRI para evaluar la necrosis tumoral, algunas masas hepáticas mostraron necrosis tumoral central, con un aumento moderado en la necrosis tumoral media de 9,8% al inicio hasta 27% tras varias tandas de tratamiento (Abou-Alfa *et al.*, 2006).

45 Ejemplo 1702: El paciente 1702 padecía carcinoma hepatocelular y fue inscrito en un ensayo clínico de fase 2 con JX-594, recibiendo tres dosis intratumorales de JX-594 ( $10^9$  UFP/dosis, administradas con dos semanas de

diferencia). Aunque este paciente no era evaluable para la respuesta a JX-594 utilizando criterios de Choi modificados, los escaneos de la semana 8 mostraron enfermedad estable (SD) en tumores inyectados pero enfermedad progresiva (PD) debido a la aparición de nuevos tumores usando criterios RECIST modificados. En consecuencia, el paciente 1702 pasó a recibir una tanda estándar de tratamiento con sorafenib durante 8 semanas (200 mg dos veces al día p.o.). Los escáneres por DCE-MRI tomados a las 4 y 8 semanas tras el inicio del tratamiento con sorafenib mostraron necrosis tumoral aguda. La Figura muestra tres planos diferentes, con imágenes a la izquierda de 4 semanas tras el tratamiento con sorafenib e imágenes a la derecha de 8 semanas tras el tratamiento con sorafenib (Figura 11).

Ejemplo 1705: El paciente 1705 padecía carcinoma hepatocelular y fue inscrito en un ensayo clínico de fase 2 con JX-594. Cinco días después de la primera dosis de JX-594, una marcada reducción en la perfusión, según la DCE-MRI, confirmó que se había producido cierre vascular en los tumores (recuadros superiores). Una vez completada la administración de JX-594 (tres dosis intratumorales de  $10^8$  UFP/dosis, administradas con dos semanas de diferencia), los escaneos de la semana 8 mostraron una respuesta conforme a los criterios de Choi modificados (-36%), pero enfermedad progresiva (PD) según los criterios RECIST modificados. En consecuencia, el paciente 1705 pasó a recibir una tanda estándar de tratamiento con sorafenib durante 4 semanas (400 mg dos veces al día p.o.). Los escáneres por DCE-MRI tomados a las 4 semanas mostraron necrosis tumoral aguda (recuadro inferior derecho) (Figura 12, Figura 15, Figura 16).

Ejemplo 1712: El paciente 1712 padecía carcinoma hepatocelular y fue inscrito en un ensayo clínico de fase 2 con JX-594. Una vez completada la administración de JX-594 (tres dosis intratumorales de  $10^9$  UFP/dosis, administradas con dos semanas de diferencia), los escaneos de la semana 8 mostraron una respuesta conforme a los criterios de Choi modificados (-33%), pero enfermedad progresiva (PD) según los criterios RECIST modificados. El paciente 1712 recibió una tanda estándar de tratamiento con sorafenib durante 4 semanas (400 mg dos veces al día p.o.). Los escáneres por DCE-MRI tomados a las 4 semanas mostraron necrosis tumoral aguda (Figura 13).

Ejemplo 11301, paciente con Sutent: Sutent es otro tratamiento dirigido contra el cáncer, aprobado para el carcinoma de células renales (RCC), que inhibe la actividad de VEGF y la angiogénesis. El paciente 11301 padecía CCR con metástasis en el hígado y fue inscrito en un ensayo clínico de Fase 1 con JX-594 para el tratamiento de tumores asentados en el hígado. Una vez completadas 2 tandas de administración de JX-594 (dosis intratumorales de  $10^9$  UFP/dosis, administradas con tres semanas de diferencia), la evaluación de la semana 6 mostró enfermedad estable según RECIST. El paciente recibió dos tandas más de tratamiento con JX-594, pero una masa hepática y una masa abdominal grande (14 cm) progresaron. En consecuencia, el paciente 1705 pasó a recibir terapia con Sutent. El pronóstico para el paciente era malo en base a la baja hemoglobina y al grado de metástasis hepáticas (Motzer *et al.*, 2006). Sorprendentemente, se produjo una respuesta completa en todos los tumores del paciente (Figura 14). El escaneo PET de cuerpo completo no mostró señal. La supervivencia post-JX-594 es superior a 3 años (el paciente todavía está vivo). En comparación, la tasa histórica de respuesta completa de RCC a Sutent solo, en tumores mayores de 10 cm, es 0%. Menos del 5% de los pacientes con CCR con mal pronóstico tienen una supervivencia de 3 años.

Ejemplo JX16-HCC-03, paciente con IV + IT + IT + sorafenib: El paciente JX16-HCC-03 padecía carcinoma hepatocelular y fue inscrito en un ensayo clínico de fase 2 con JX-594. Una vez completada la administración de JX-594 (una dosis intravenosa y dos dosis intratumorales), el paciente recibió sorafenib. Los escáneres de DCE-MRI mostraron pérdida de perfusión 10 días después del inicio de sorafenib en un tumor extrahepático no inyectado (Figura 18).

## Referencias

Las siguientes referencias, en la medida en que ofrecen detalles ilustrativos de procedimientos u otros detalles complementarios a los aquí expuestos, se citan específicamente en la presente memoria.

- 45 Patente de EE.UU. 4.554.101
- Patente de EE.UU. 4.683.202
- Patente de EE.UU. 4.684.611
- Patente de EE.UU. 4.952.500
- Patente de EE.UU. 5.073.627
- 50 Patente de EE.UU. 5.302.523
- Patente de EE.UU. 5.322.783
- Patente de EE.UU. 5.384.253
- Patente de EE.UU. 5.399.363
- Patente de EE.UU. 5.464.765
- 55 Patente de EE.UU. 5.466.468
- Patente de EE.UU. 5.538.877
- Patente de EE.UU. 5.538.880
- Patente de EE.UU. 5.543.158
- Patente de EE.UU. 5.550.318
- 60 Patente de EE.UU. 5.563.055

- Patente de EE.UU. 5.580.859  
 Patente de EE.UU. 5.589.466  
 Patente de EE.UU. 5.591.616  
 Patente de EE.UU. 5.610.042  
 5 Patente de EE.UU. 5.633.016  
 Patente de EE.UU. 5.641.515  
 Patente de EE.UU. 5.656.610  
 Patente de EE.UU. 5.702.932  
 Patente de EE.UU. 5.736.524  
 10 Patente de EE.UU. 5.739.169  
 Patente de EE.UU. 5.780.448  
 Patente de EE.UU. 5.789.215  
 Patente de EE.UU. 5.798.339  
 Patente de EE.UU. 5.801.005  
 15 Patente de EE.UU. 5.824.311  
 Patente de EE.UU. 5.824.348  
 Patente de EE.UU. 5.830.880  
 Patente de EE.UU. 5.846.225  
 Patente de EE.UU. 5.846.233  
 20 Patente de EE.UU. 5.846.945  
 Patente de EE.UU. 5.925.565  
 Patente de EE.UU. 5.928.906  
 Patente de EE.UU. 5.935.819  
 Patente de EE.UU. 5.945.100  
 25 Patente de EE.UU. 5.981.274  
 Patente de EE.UU. 5.994.624
- Abou-Alfa GK, Schwartz L, Ricci S, Amadori D, Santoro A, Figer A, De Greve J, Douillard JY, Lathia C, Schwartz B,  
 Taylor I, Moscovici M, Saltz LB. (2006) Phase II study of sorafenib in patients with advanced hepatocellular  
 30 carcinoma. *J Clin Oncol* 24(26):4293-300.  
 Alcami y Smith, *Cell.*, 71(1):153-167, 1992.  
 Alcami *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 80:949-959, 1999.  
 Alcami *et al.*, *Sem. Virol.*, 5:419-427, 1998.  
 Alcami *et al.*, *Virology*, 74(23):11230-11239, 2000.  
 35 Almendro *et al.*, *J. Immunol.*, 157(12):5411-5421, 1996.  
 Arap *et al.*, *Cancer Res.*, 55(6):1351-1354, 1995.  
 Arness *et al.*, *Am. J. Epidemiol.*, 160:642-51, 2004.  
 Austin-Ward y Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.  
 Ausubel *et al.*, en: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 16.15.1-16.18.10, 1996.  
 40 Bajorin *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 6(5):786-792, 1988.  
 Bakhshi *et al.*, *Cell*, 41(3):899-906, 1985.  
 Blasco y Moss, *J. Virology*, 66(7): 4170-4179, 1992.  
 Blasco *et al.*, *J. Virology*, 67(6):3319-3325, 1993.  
 Boyd *et al.*, *Cell*, 79:341-351, 1994.  
 45 Bretibach, C.J., Paterson, J.M., Lemay, C.G., *et al.* (2007) Targeted Inflammation During Oncolytic Virus Therapy  
 Severely Compromises Tumor Blood Flow. *Mol Ther* 15(9):1686-1693.  
 Brizel, *Semin. Radiat. Oncol.*, 8(4):237-246, 1998.  
 Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.  
 Caldas *et al.*, *Cancer Res.*, 54:3568-3573, 1994.  
 50 Carbonelli *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 177(1):75-82, 1999.  
 Cebon *et al.*, *Br. J. Haematol.*, 80(2):144-150, 1992.  
 Chandler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(8):3596-601, 1997.  
 Chen y Okayama, *Mol. Cell Biol.*, 7(8):2745-2752, 1987.  
 Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J,  
 55 Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z. (2009) Efficacy and safety of sorafenib in  
 patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-  
 blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 10(1):25-34.  
 Cheng *et al.*, *Cancer Res.*, 54(21):5547-5551, 1994.  
 Choi *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 25(13):1753-1759, 2007.  
 60 Choi H, Charnsangavej C, de Castro Faria S *et al.* (2004) CT evaluation of the response of gastrointestinal stromal  
 tumors after imatinib mesylate treatment: a quantitative analysis correlated with FDG PET findings. *American  
 Journal of Roentgenology* 183:1619-1628.  
 Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.  
 Cleary y Sklar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82(21):7439-7443, 1985.  
 65 Cleary *et al.*, *J. Exp. Med.*, 164(1):315-320, 1986.  
 Cocea, *Biotechniques*, 23(5):814-816, 1997.

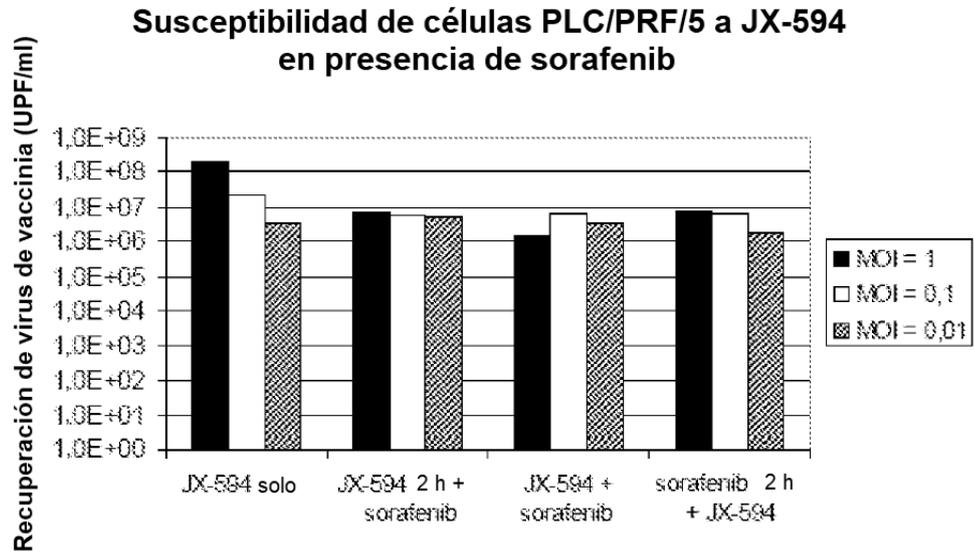
- Colamonici *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 270:15974-15978, 1995.  
 Culver *et al.*, *Science*, 256(5063):1550-1552, 1992.  
 Curran, *Seminars Radiation Oncol.*, 8(4Suppl):2-4, 1998.  
 Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.  
 5 Dillman, *Cancer Biother. Radiopharm.*, 14(1):5-10, 1999.  
 Dobbelstein y Shenk, *J. Virology*, 70:6479-6485, 1996.  
 Durrant y Spendlove, *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2(7):959-66, 2001.  
 Eliopoulos *et al.*, *Oncogene*, 11(7):1217-28, 1995.  
 Erlandsson, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 104(1):1-18, 1998.  
 10 Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA,  
 Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM (2007)  
 Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007 Jan 11;356(2):125-34  
 Feuchheimer *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 84:8463-8467, 1987.  
 Fraley *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3348-3352, 1979.  
 15 GenBank, número de accesoión NC001559  
 Gnant *et al.*, *Ann Surg*, 230(3):352-360, 1999.  
 Gnant *et al.*, *Cancer Res.*, 59(14):3396-403, 1999.  
 Gnant *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91(20):1744-1750, 1999.  
 Goebel *et al.*, *Virology*, 179(1):247-266, 517-563, 1990.  
 20 Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190, 1985.  
 Graham y Van Der Eb, *Virology*, 52:456-467, 1973.  
 Graham *et al.*, *Virology*, 229(1):12-24, 1997.  
 Gross *et al.*, *Genes Dev.*, 13(15):1899-911, 1999.  
 Gross *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274:1156-1163, 1999.  
 25 Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.  
 Harland y Weintraub, *J. Cell Biol.*, 101(3):1094-1099, 1985.  
 Heise *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 6(6):499-504, 1999.  
 Heise *et al.*, *Cancer Res.*, 59(11):2623-2628, 1999.  
 Hellstrand *et al.*, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.  
 30 Hengstschlager, M., *et al.* 1994. Different regulation of thymidine kinase during the cell cycle of normal versus DNA  
 tumor virus-transformed cells. *J. Biol. Chem.* **269**:13836-13842.  
 Hermiston, *J. Clin. Invest.*, 105:1169-1172, 2000.  
 Ho *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 27:7765-7769, 1998.  
 Homey *et al.*, *Nature. Rev. Immunol.*, 2:175-184, 2002.  
 35 Hui y Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.  
 Hussussian *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):15-21, 1994.  
 Ikeda *et al.*, *Nat. Med.*, 5(8):881-7, 1999.  
 Inouye e Inouye, *Nucleic Acids Res.*, 13:3101-3109, 1985.  
 Irie y Morton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(22):8694-8698, 1986.  
 40 Irie *et al.*, *Lancet.*, 1(8641):786-787, 1989.  
 Isaacs *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(2):628-32, 1992.  
 Johnson y Hamdy, *Oncol. Rep.*, 5(3):553-557, 1998.  
 Ju *et al.*, *Gene Ther.*, 7(19):1672-1679, 2000.  
 Ju *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 59(3):241-250, 2000.  
 45 Kaeppler *et al.*, *Plant Cell Reports*, 9:415-418, 1990.  
 Kamb *et al.*, *Nat. Genet.*, 8(1):23-26, 1994.  
 Kamb *et al.*, *Science*, 267:436-440, 1994.  
 Kaneda *et al.*, *Science*, 243:375-378, 1989.  
 Kato *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:3361-3364, 1991.  
 50 Kay *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94(9):4686-4691, 1997.  
 Kerr *et al.*, *Br. J. Cancer*, 26(4):239-257, 1972.  
 Kettle *et al.*, *J. Gen. Virology*, 78:677-685, 1997.  
 Kirn *et al.*, *Nat. Med.*, 7:781-787, 2001.  
 Kolmel, *J. Neurooncol.*, 38(2-3):121-125, 1998.  
 55 Kraus *et al.*, *FEBS Lett.*, 428(3):165-170, 1998.  
 Kulesh *et al.*, *J. Clin. Microbiol.*, 42(2):601-609, 2004.  
 Kyte y Doolittle, *J. Mol. Biol.*, 157(1):105-132, 1982.  
 Lareyre *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 274(12):8282-8290, 1999.  
 Lee *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238(2):462-467, 1997.  
 60 Levenson *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 9(8):1233-1236, 1998.  
 Liebermann, *Oncogene*, 17(10):1189-94, 1998.  
 Liu, T.C., Hwang, T.H., Park, B.H., Bell, J. y Kirn, D.H. (2008) The targeted oncolytic poxvirus JX-594 demonstrates  
 antitumoral, antivascular, and anti-HBV activities in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Ther*  
 16(9):1637-42.  
 65 Llovet J, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, Cosme de Oliveira A, Santoro A, Raoul J-L, Forner A,  
 Schwartz M, Porta C, Aezem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz J-F, Borbath I, Haussinger D, Giannaris

- T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. (2008) Sorafenib in advanced Hepatocellular Carcinoma (HCC). *N Engl J Med* 359:378-90.
- Macejak y Sarnow, *Nature*, 353:90-94, 1991.
- Magi-Galluzzi *et al.*, *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, 20(5):343-350, 1998.
- 5 Mangray y King, *Front Biosci.*, 3:D1148-1160, 1998.
- Marsters *et al.*, *Recent Prog. Horm. Res.*, 54:225-234, 1999.
- Mastrangelo *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 6(5):409-422, 1999.
- Mastrangelo *et al.*, *Cancer Treat Res.*, 94:35-50, 1998.
- Mayer *et al.*, *Radiat. Oncol. Investig.*, 6(6):281-288, 1998.
- 10 McCart *et al.*, *Gene Ther.*, 7(14):1217-23, 2000.
- Mitchell *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.*, 690:153-166, 1993.
- Mitchell *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 8(5):856-869, 1990.
- Mori *et al.*, *Cancer Res.*, 54(13):3396-3397, 1994.
- Morton *et al.*, *Arch. Surg.*, 127:392-399, 1992.
- 15 Moss, en: *Fields Virology.*, Fields (Ed.), Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia, 2637-2672, 1996.
- Mossman *et al.*, *Virology*, 215(1):17-30, 1996.
- Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR, Redman BG, Margolin KA, Merchan JR, Wilding G, Ginsberg MS, Bacik J, Kim ST, Baum CM, Michaelson MD. (2006) Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA*. 295(21):2516-24
- 20 Mougin *et al.*, *Ann. Biol. Clin.*, (Paris) 56(1): 21-8, 1998.
- Mumby y Walter, *Cell Regul.*, 2(8):589-98, 1991.
- Natoli *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, 56(8):915-20, 1998.
- Nicolau y Sene Nobori *et al.*, 1994
- Nomoto *et al.*, *Gene*, 236(2):259-271, 1999.
- 25 Ochi *et al.*, *Am. J. Gastroenterol.*, 93(8):1366-1368, 1998.
- Ohara, *Gan To Kagaku Ryoho*, 25(6): 823-828, 1998.
- Okamoto *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91(23):11045-11049, 1994.
- Omirulleh *et al.*, *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-428, 1993.
- Orlow *et al.*, *Cancer Res*, 54(11):2848-2851, 1994.
- 30 Park BH, Hwang TH, *et al.* (2008) Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncology* 9: 533-42.
- Solicitud PCT WO 94/09699
- Solicitud PCT WO 95/06128
- Pelletier y Sonenberg, *Nature*, 334(6180):320-325, 1988.
- 35 Pietras *et al.*, *Oncogene*, 17(17):2235-2249, 1998.
- Puhlmann *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 7:66-73, 2000.
- Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- Ravindranath y Morton, *Intern. Rev. Immunol.*, 7: 303-329, 1991.
- Remington's *Pharmaceutical Sciences* 15<sup>a</sup> ed., 1035-1038 y 1570-1580, 1990.
- 40 Rippe, *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
- Rosel *et al.*, *J. Virol.*, 60(2):436-449, 1986.
- Rosenberg *et al.*, *Ann. Surg.* 210(4):474-548, 1989.
- Rosenberg *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 319:1676, 1988.
- Sambrook *et al.*, en: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- 45 Saraiva y Alcami, *J. Virology*, 75(1):226-33, 2001.
- Serrano *et al.*, *Nature*, 366:704-707, 1993.
- Serrano *et al.*, *Science*, 267(5195):249-252, 1995.
- Sinkovics y Horvath, *J. Clin. Viro.*, 16:1-15, 2000.
- 50 Smith *et al.*, *Immunol. Rev.*, 159:137-154, 1997.
- Smith *et al.*, *J. Clin. Oncol.*, 18:2046-2052, 2000.
- Smith *et al.*, *Neuron.*, 20:1093-1102, 1998.
- Solyanik *et al.*, *Cell. Prolif.*, 28(5):263-278, 1995.
- Spriggs *et al.*, *Cell*, 71(1):145-52, 1992.
- 55 Stokke *et al.*, *Cell. Prolif.*, 30(5):197-218, 1997.
- Symons *et al.*, *Cell*, 81:551-560, 1995.
- Todo *et al.*, *Cancer Res.*, 61:153-161, 2001.
- Tsujimoto y Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83(14):5214-5218, 1986.
- Tsujimoto *et al.*, *Nature*, 315:340-343, 1985.
- 60 Tsujimoto *et al.*, *Science*, 228(4706):1440-1443, 1985.
- Tsumaki *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273(36):22861-22864, 1998.
- Upton *et al.*, *Science*, 258(5086):1369-1372, 1992.
- Upton *et al.*, *Virology*, 184(1):370-82, 1991.
- Vanderplasschen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(13):7544-7549, 1998.
- 65 Vicari y Caus, *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13:143-154, 2002.
- Vogelstein y Kinzler, *Cell*, 70(4):523-6, 1992.

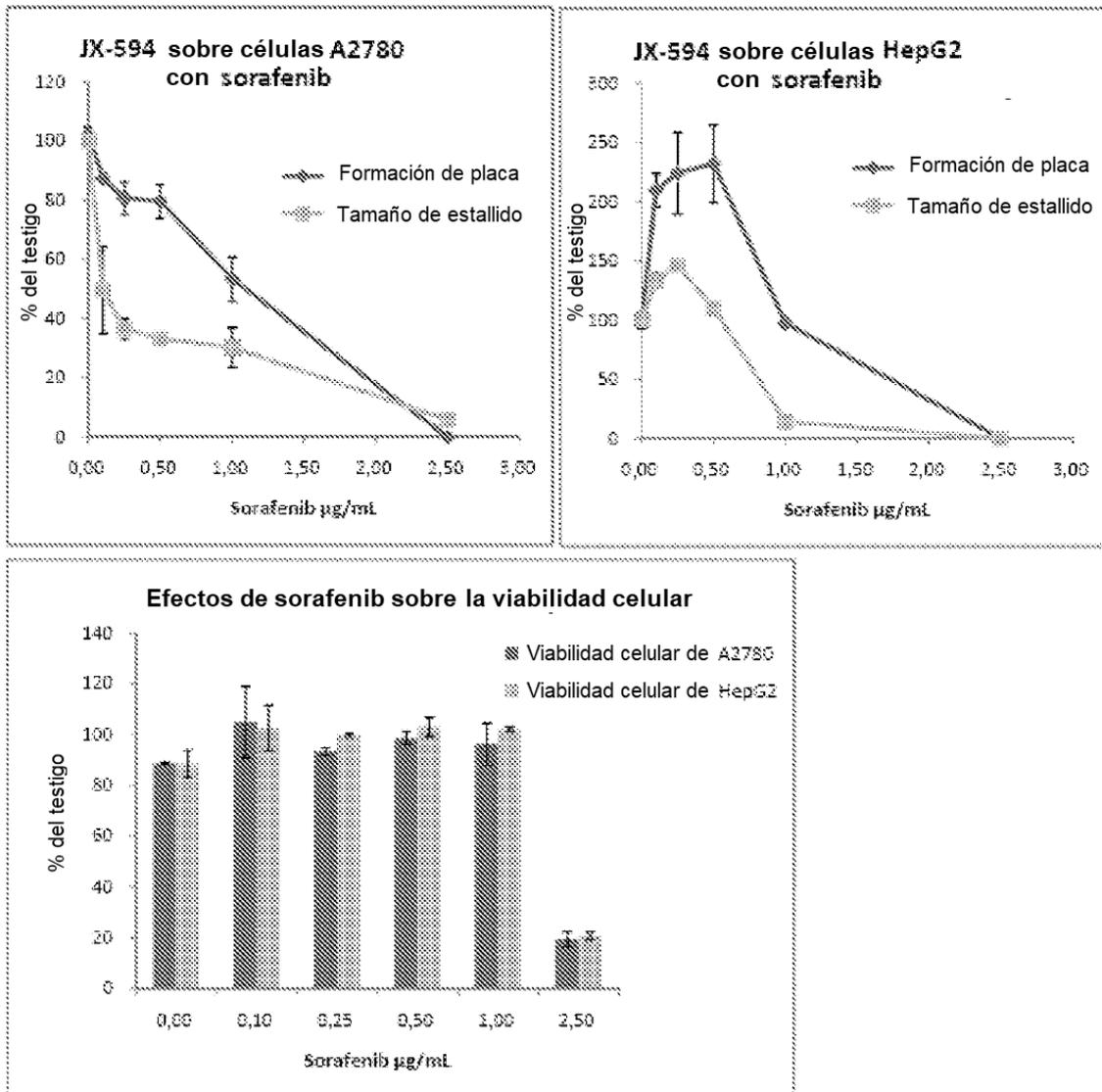
- Wallach *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 17:331-367, 1999.  
Wold *et al.*, *J. Virol.*, 52:307-313, 1984.  
Wold *et al.*, *Trends Microbiol.*, 2:437-443, 1994.  
Wong *et al.*, *Gene*, 10:87-94, 1980.  
5 Wu *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 233(1):221-226, 1997.  
Zhao-Emonet *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1442(2-3):109-119, 1998.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El inhibidor antiangiogénico de tirosina cinasa sorafenib para uso en un método para tratar cáncer metastásico en un sujeto, habiendo sido sometido previamente el sujeto a una terapia con virus de vaccinia, en donde el virus de vaccinia es un virus de vaccinia que expresa GM-CSF y carece de un gen funcional de timidina cinasa, en donde el inhibidor antiangiogénico de tirosina cinasa se administra como máximo 13 semanas después de la terapia con virus de vaccinia, y en donde el virus de vaccinia se ha administrado intravascularmente, o tanto intravascularmente como intratumoralmente.
- 10 2. El inhibidor antiangiogénico de tirosina cinasa para uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de tirosina cinasa antiangiogénico se administra después de determinar mediante obtención no invasiva de imágenes del tumor si el tumor está experimentando revascularización.
3. El inhibidor antiangiogénico de tirosina cinasa para uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor antiangiogénico de tirosina cinasa está destinado a ser administrado al menos 5, 6, 7 u 8 semanas después de la administración del virus de vaccinia.
- 15 4. El inhibidor antiangiogénico de tirosina cinasa para uso según la reivindicación 2, en donde la obtención no invasiva de imágenes del tumor se selecciona de obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI) y MRI resaltada por contraste dinámico (dce-MRI).
5. El inhibidor antiangiogénico de tirosina cinasa para uso según la reivindicación 1, en donde el cáncer metastásico es un cáncer metastásico del hígado.



**FIG. 1**



**FIG. 2**

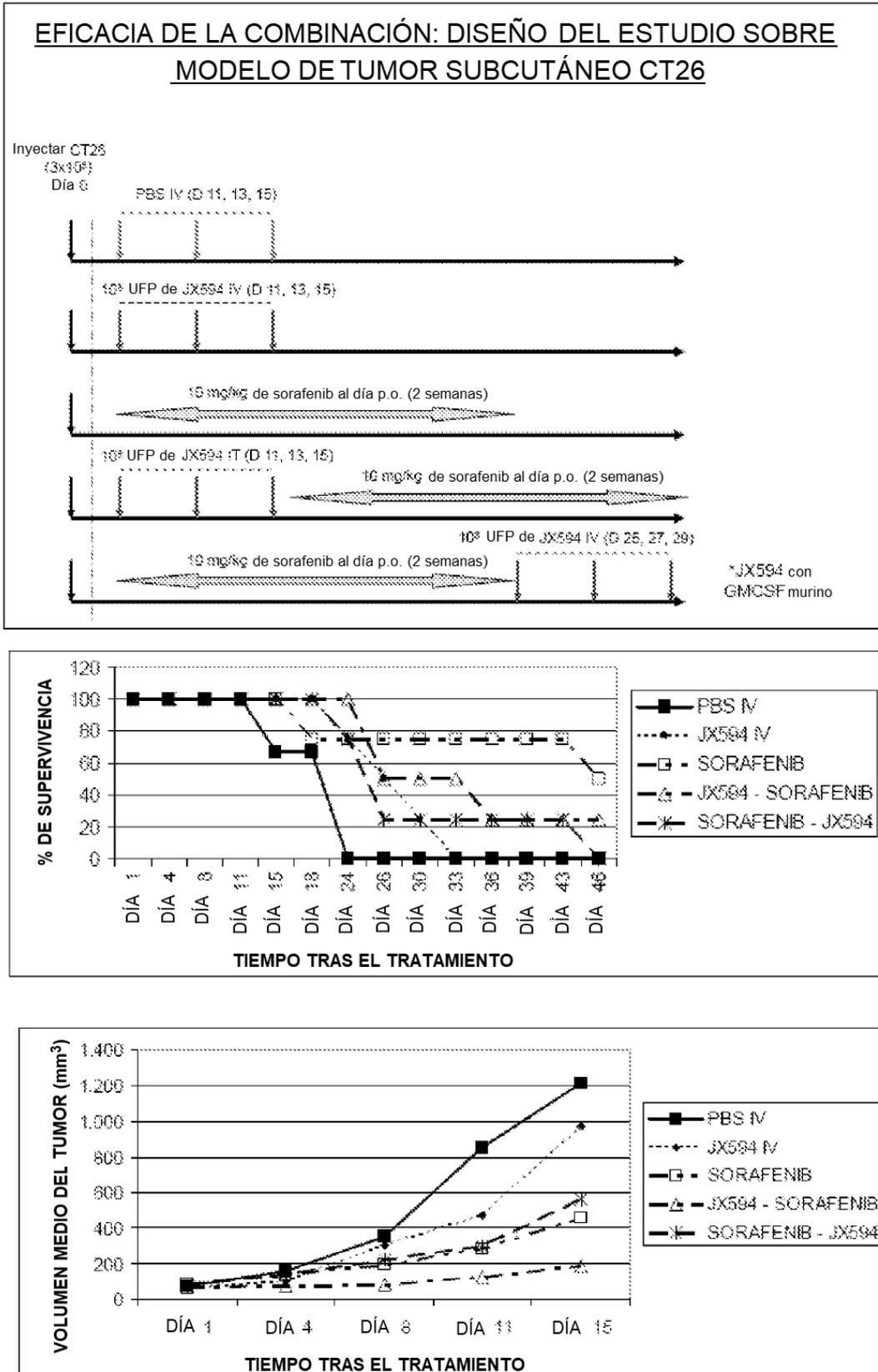
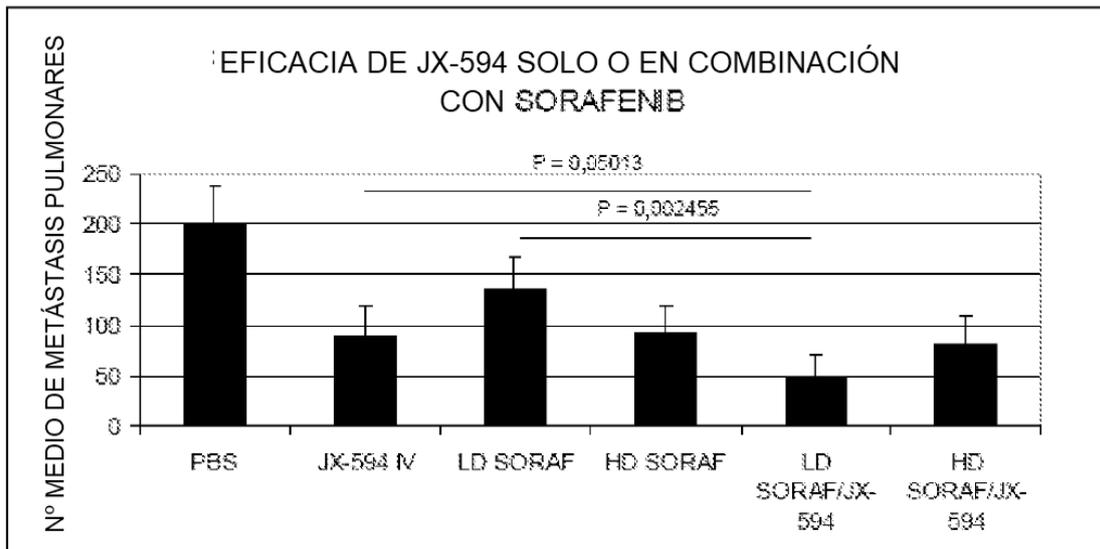
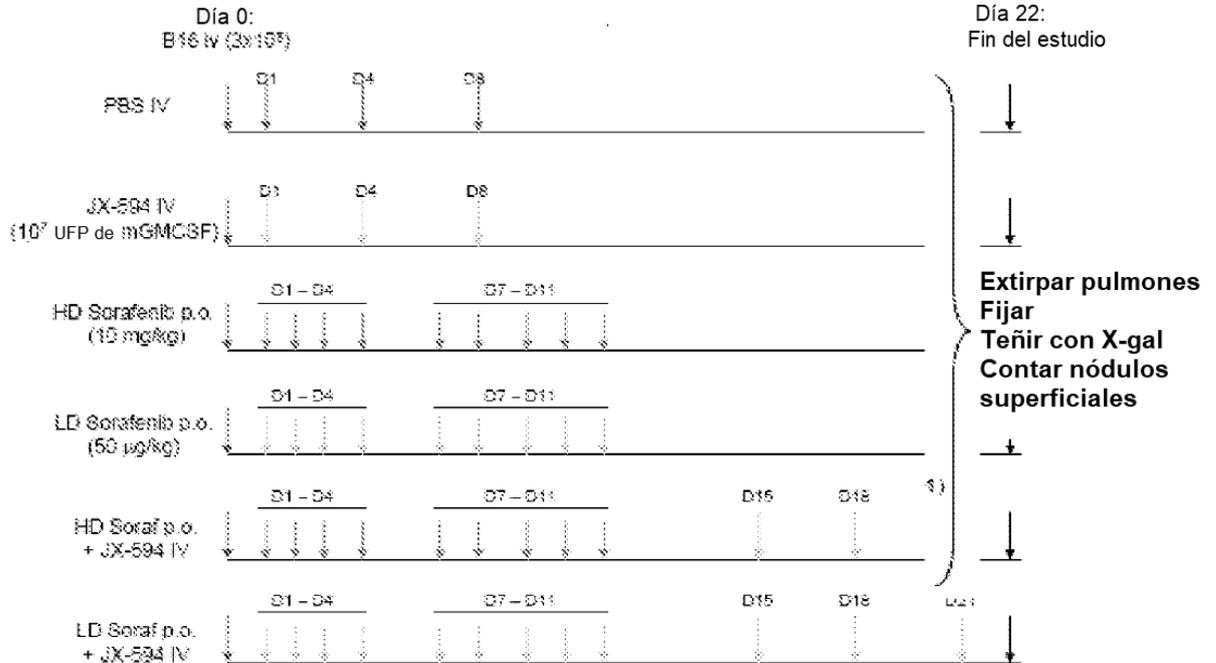


FIG. 3

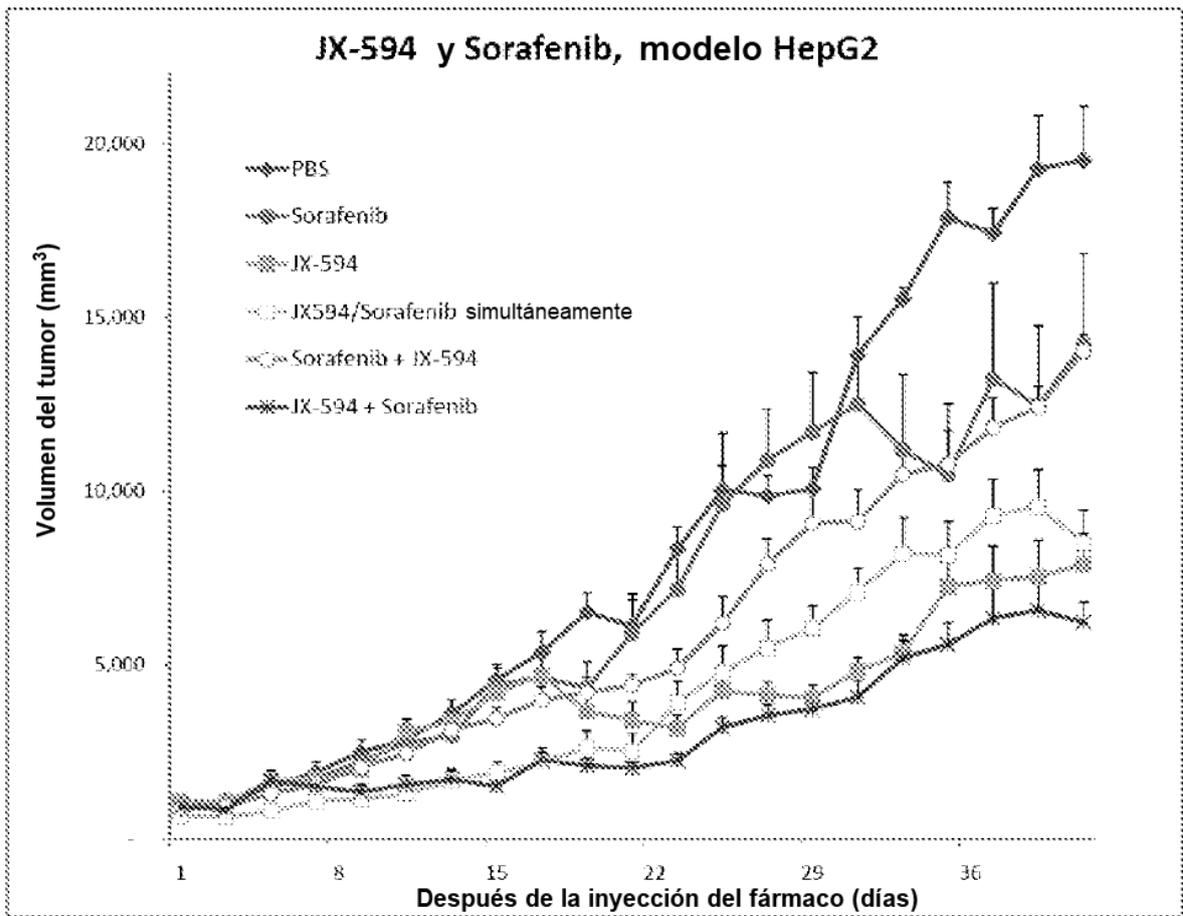
**EFICACIA DE LA COMBINACIÓN: MODELO DE PULMÓN B16**

**DISEÑO DEL ESTUDIO II**



**FIG. 4**

Grupo	Fármaco y dosis	Tratamiento (días)	Número
1	PBS	todos los días	8
2	Sorafenib (400 µg)	todos los días	8
3	JX-594 (10 <sup>7</sup> UFP)	días 1, 8, 15, 22, 29, 36	8
4	JX-594 (10 <sup>7</sup> UFP) con sorafenib (40 µg)	JX-594: 1, 8, 15, 22, 29, 36 con sorafenib: todos los días	8
5	sorafenib (400 µg) seguido de JX-594 (10 <sup>7</sup> UFP)	sorafenib: todos los días (1-14) seguido de JX-594: 15, 22, 29, 36	8
6	JX-594 (10 <sup>7</sup> UFP) seguido de sorafenib (400 µg)	JX-594: días 1, 8 seguido de sorafenib: todos los días comenzando el día 15	8



**FIG. 5**

Grupo	Día del sacrificio	Virus	Sorafenib	PBS
testigo con PBS	día 22	-	-	+
JX-594 seguido de sorafenib	día 22	+	+	-
JX-594 solo	día 22	+	-	-
sorafenib solo	día 22	-	+	-
JX-594 seguido de sorafenib	día 35	+	+	-
JX-594 solo	día 35	+	-	-
sorafenib solo	día 35	-	+	-

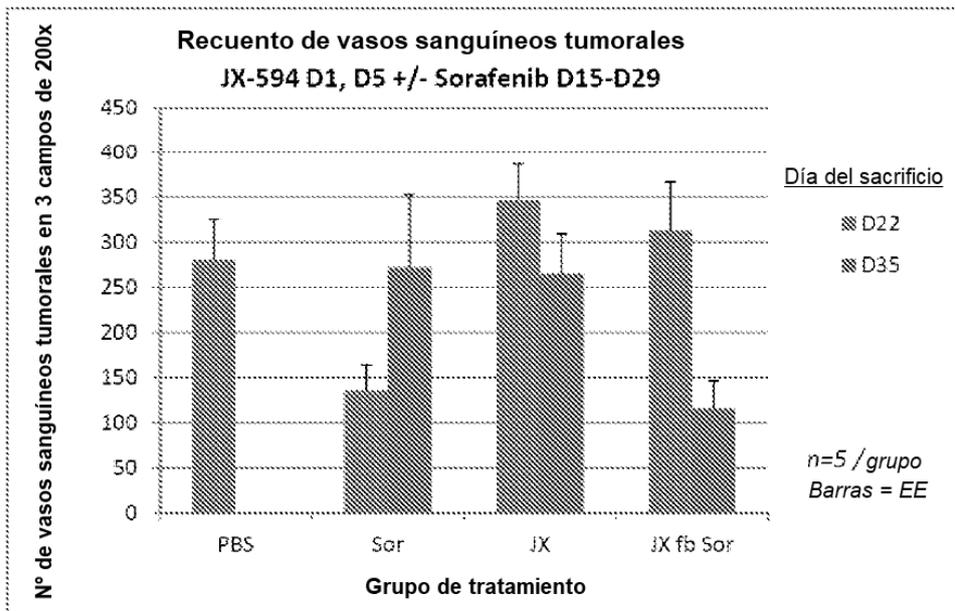
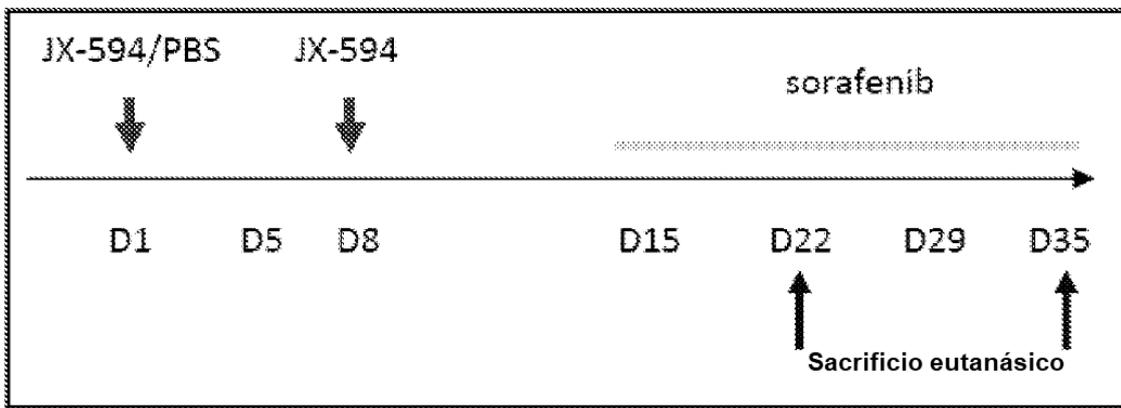


FIG. 6

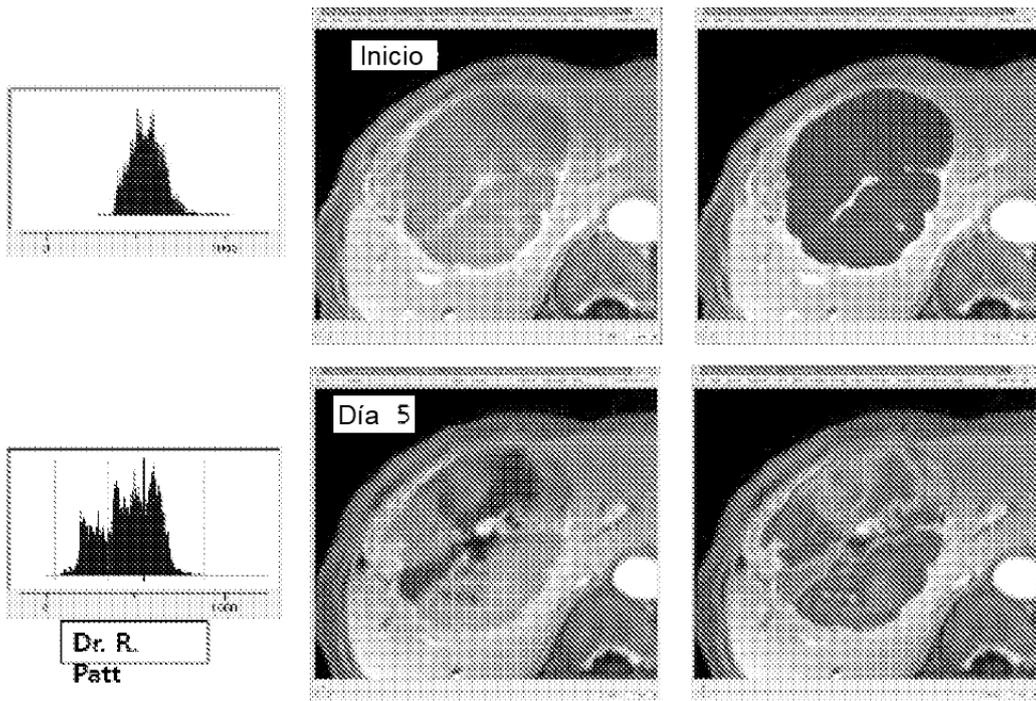
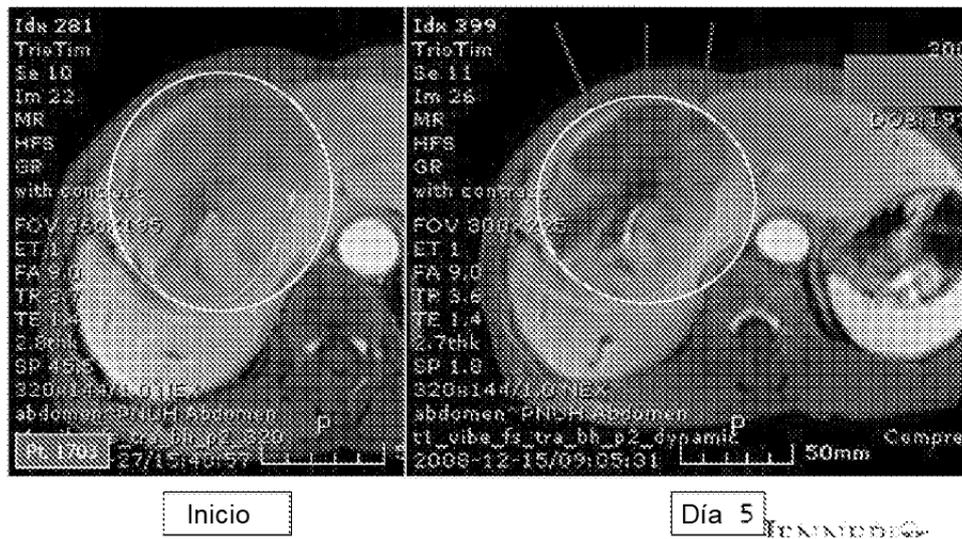
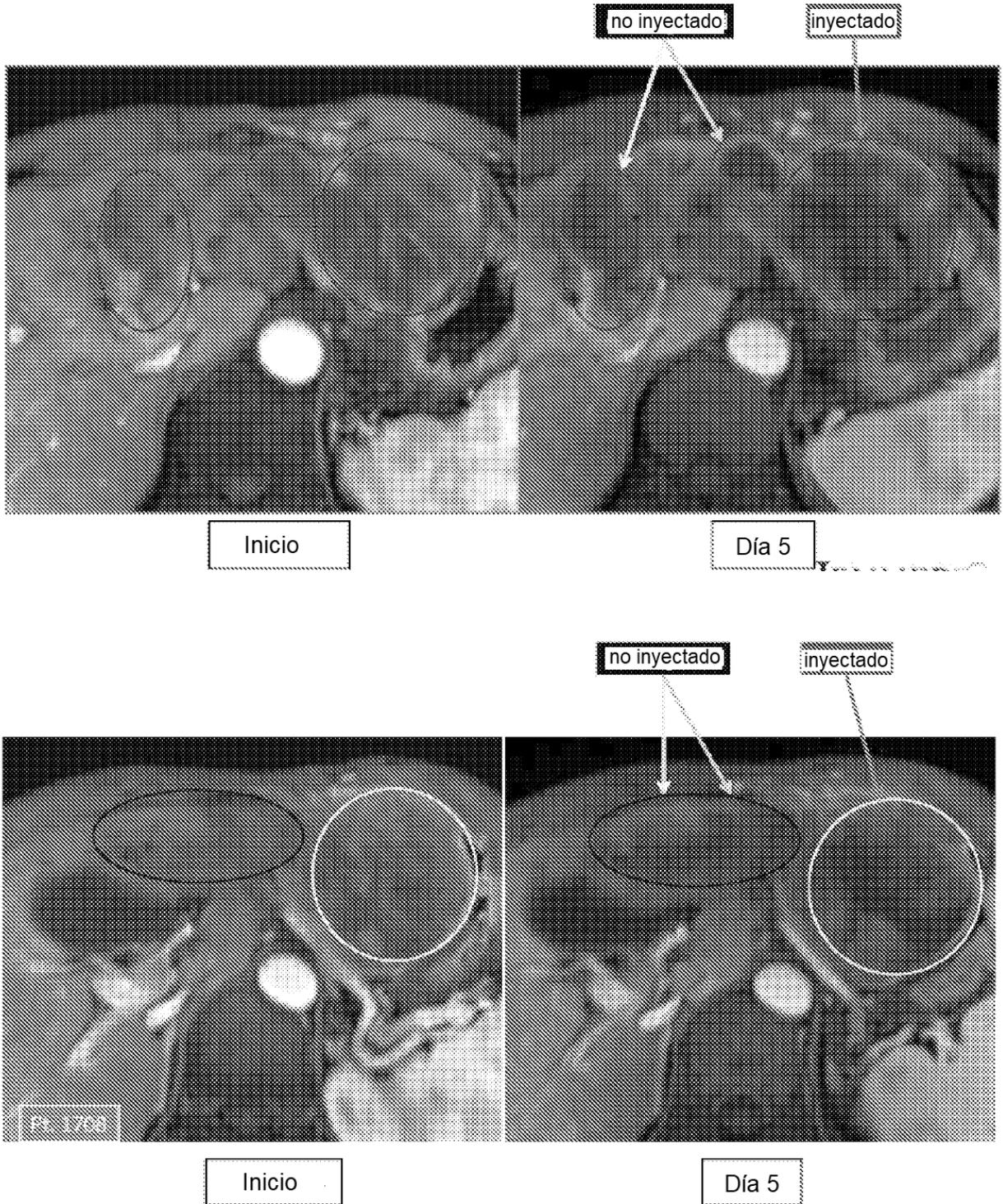


FIG. 7



**FIG. 8**

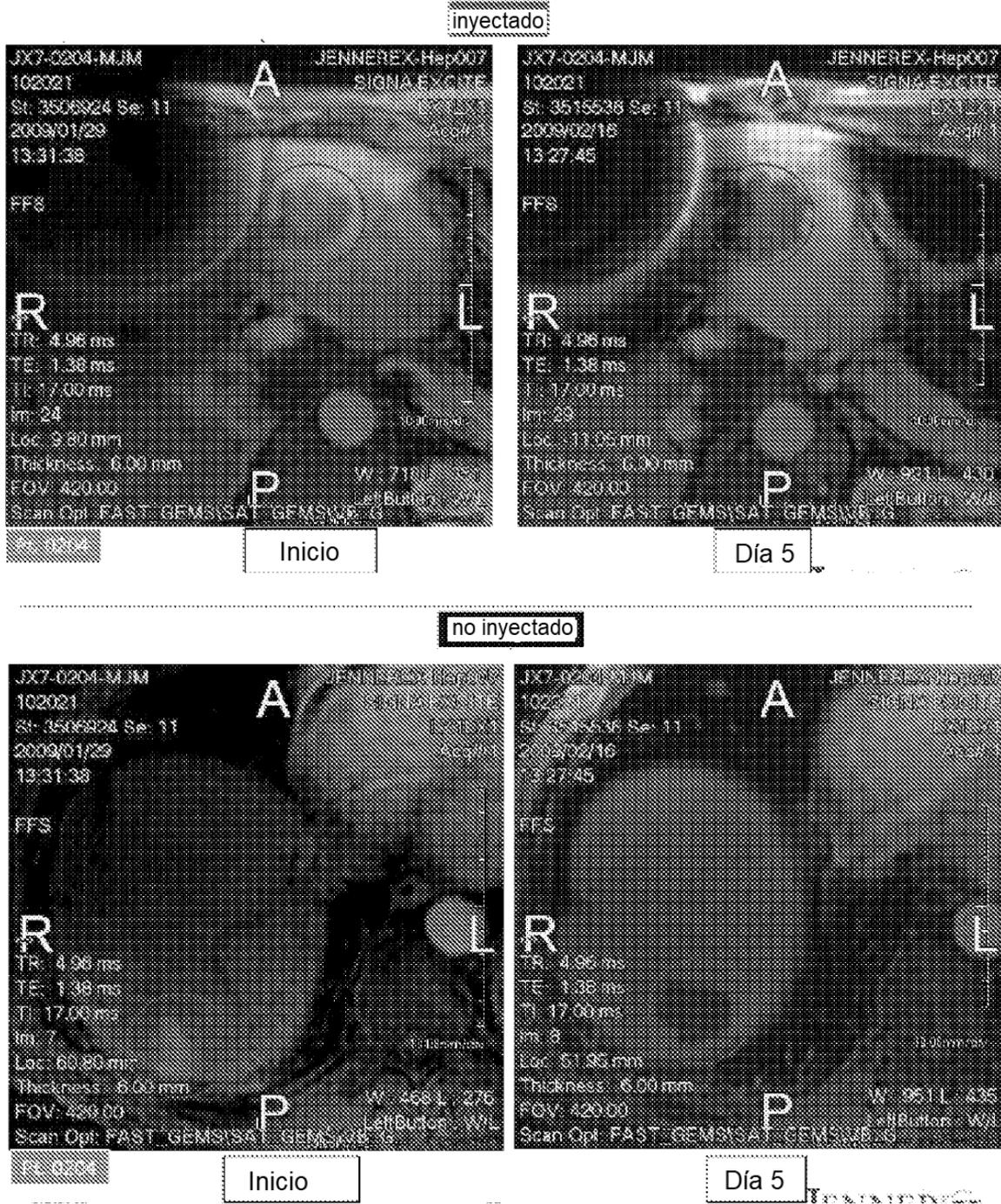


Figura 1

FIG. 9

Respuesta a sorafenib en PNUH: pacientes con MRI disponible fueron seleccionados para evaluar respuesta Choi

Ident.	Nombre Sexo	Edad	Fecha Dx	Metástasis	Invasión PV	Estadificación	Sorafenib Fx	Respuesta tumoral		
						TMN	BCLC	Dosis	Imagen	RECIST Choi
30404427	JHC F	51	09-2-13	bone	+	IV	C	09-2-17 400 bid MR	2009-04-21 PD	sin respuesta
95026312	JCK M	63	08-9-22	hueso	-	IV	C	09-2-24 200 bid	falleció	falleció
80718327	JHS M	48	08-12-12	hueso	-	IV	C	09-3-28 400 bid MR	2009-05-15 SD	sin respuesta
97040112	SEK M	73	06-5-23	sin metást.	+	IV	C	09-3-31 400 bid	falleció	falleció
50241107	JCL M	57	05-5-6	sin metást.	-	II	B	09-7-24 00 bid MR	2008-10-22 SD	sin respuesta
50731002	YSP F	43	06-1-13	sin metást.	-	IIIA	B	08-4-10 200 bid MR	2008-07-01 SD	sin respuesta
80116328	JJL M	44	09-3-2	sin metást.	+	IIIA	C	09-3-27 400 bid MR	no determinado	NA
90104181	GOL F	57	09-2-21	NL, pulmón	+	IV	C	09-3-34 00 bid	falleció	falleció
90101016	TOK M	40	09-3-4	sin metást.	+	IIIA	C	09-3-17 400 bid MR	2008-10-08 SD	sin respuesta
90005518	TBO F	62	09-2-11	sin metást.	-	IIIA	C	09-3-23 400 bid	falleció	falleció
80587527	JHS M	48	08-10-3	sin metást.	+	IIIA	C	08-10-15 200 bid MR	2009-01-22 PR	
80250728	DCK M	37	08-4-28	NL	+	IV	C	09-5-8 400 bid MR	2009-01-16 SD	
70435603	JVK M	50	04-12-03	sin metást.	-	I	A	09-2-11 300 bid MR	2008-05-01 SD	respuesta
90518719	SMI M	50	08-13-28	sin metást.	-	IIIA	B	09-5-24 00 bid MR	2009-05-26 SD	respuesta
80042500	JLT M	54	06-1-19	sin metást.	-	II	B	09-3-31 400 bid	no determinado	NA
50280964	DOK M	63	05-5-25	sin metást.	-	I	A	08-5-15 200 bid MR	2008-06-17 SD	sin respuesta
10188956	SYC M	55	06-7-5	sin metást.	-	I	A	08-10-30 200 bid MR	2009-02-24 PD	sin respuesta
20246145	JHY F	49	07-7-27	sin metást.	-	II	B	08-12-17 400 bid	falleció	falleció
50192971	GY M	67	08-10-30	sin metást.	+	IIIA	C	08-11-5 400 bid MR	2009-02-12 PD	sin respuesta
50651182	EHJ F	60	05-10-26	sin metást.	-	II	B	08-5-29 400 bid MR	2008-07-04 PD	sin respuesta
50687648	JHS M	43	05-12-1	sin metást.	-	I	A	08-5-14 00 bid MR	2008-07-28 PD	sin respuesta
60168685	SJA F	50	07-6-7	sin metást.	-	II	B	08-10-22 00 bid MR	2009-02-16 PD	sin respuesta
70295719	HL M	66	07-5-21	NL	-	IIIA	C	08-5-15 200 bid MR	2008-07-08 PD	sin respuesta
70723922	MHI M	56	07-12-30	sin metást.	-	IIIA	B	08-3-25 200 bid MR	2008-10-28 PD	sin respuesta
70733381	GCY M	56	07-12-28	NL	-	IV	C	08-8-10 200 bid	falleció	falleció
80188308	BYK F	69	08-2-28	sin metást.	+	IIIA	C	08-4-29 200 bid MR	2008-07-21 SD	sin respuesta
80222369	THK M	67	5-4-2002	sin metást.	-	II	B	08-4-30 400 bid MR	2008-08-19 PD	sin respuesta
80305822	JHK M	60	5-1-2007	sin metást.	-	II	B	08-10-30 400 bid MR	falleció	falleció

FIG. 10

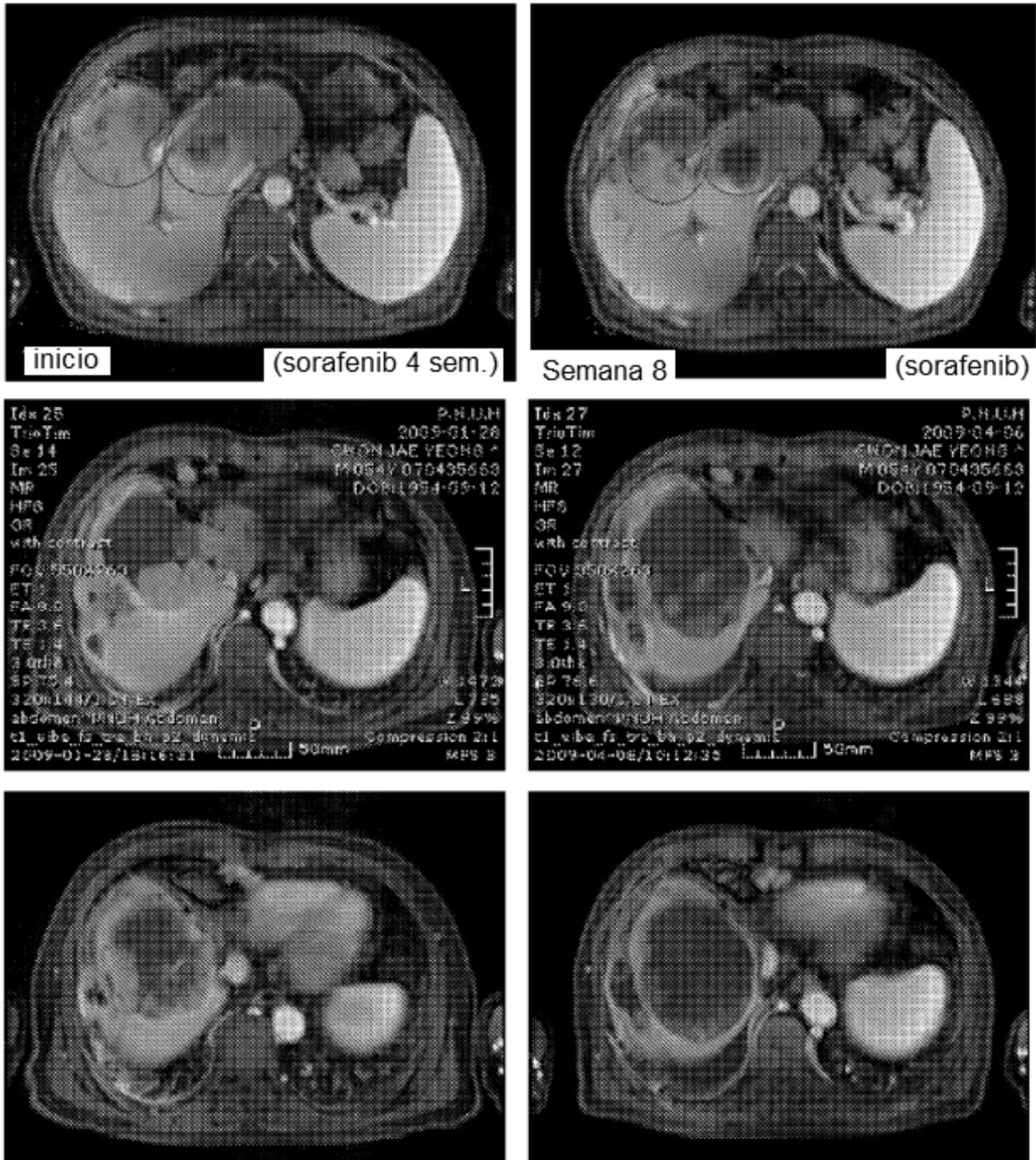
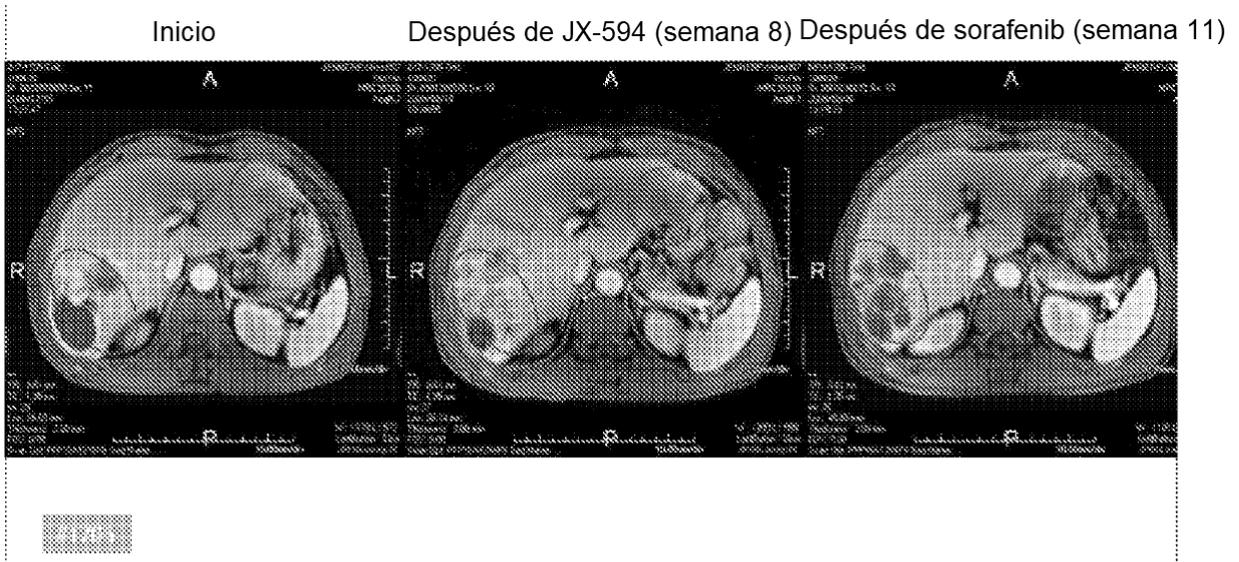


FIG. 11

Imágenes por DCE-MRI antes y 5 días después del tratamiento con JX-594:

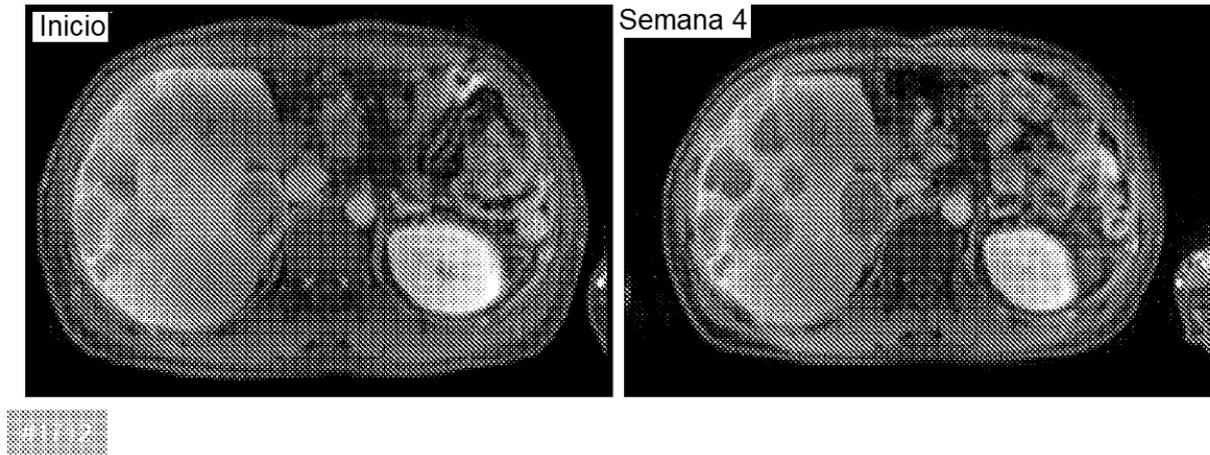


Imágenes por DCE-MRI antes y 4 semanas después del tratamiento con sorafenib:



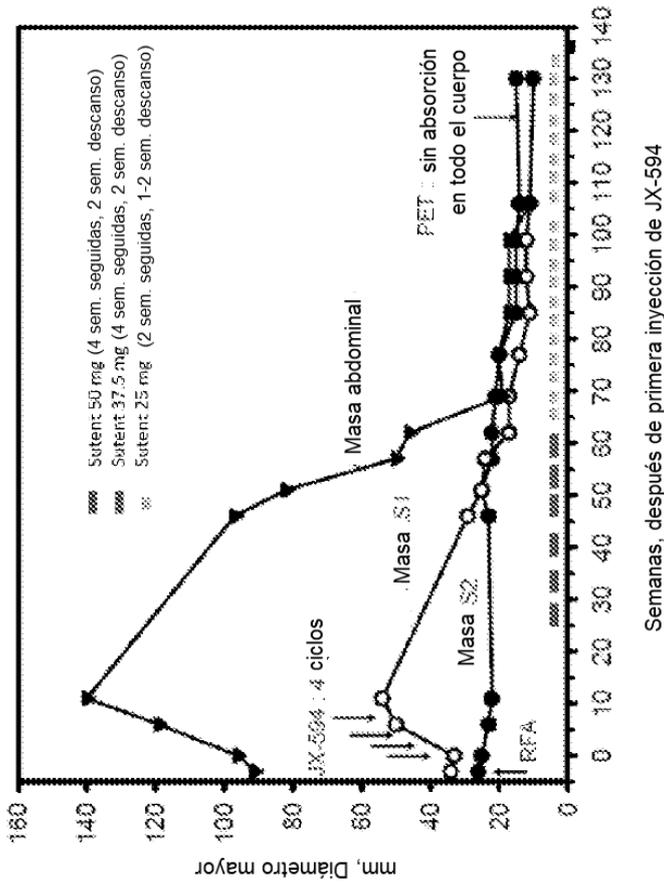
**FIG. 12**

**Imágenes por DCE-MRI antes y 4 semanas después del tratamiento con sorafenib:**

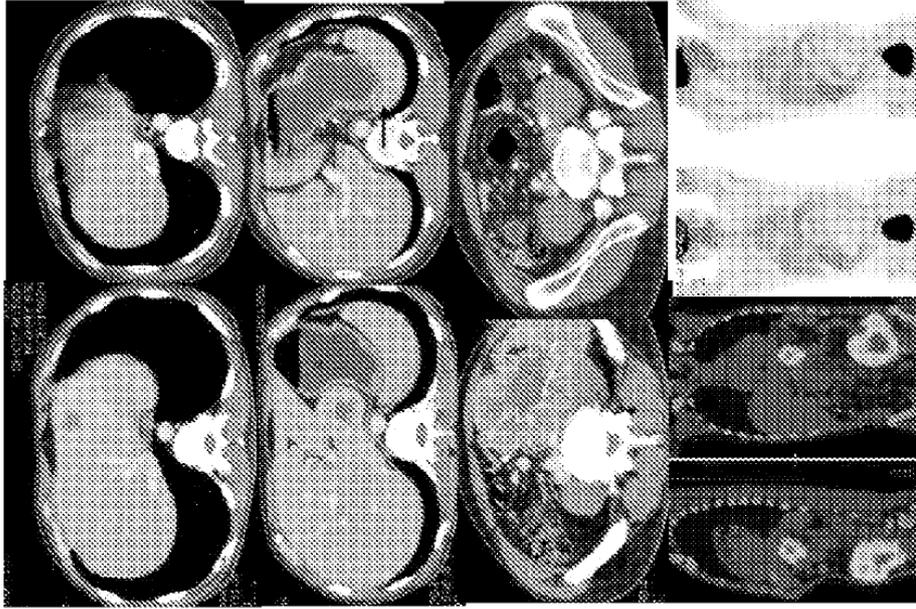


**FIG. 13**

**Diámetro del tumor con el tiempo**



Escaneos iniciales      Después de Sunitent



masa S1

masa S2

masa abdominal

Escaneos PET de cuerpo entero:

JX-594 4C : '06-12-26

Sunitent multiple : '08-12-31

**FIG. 14**

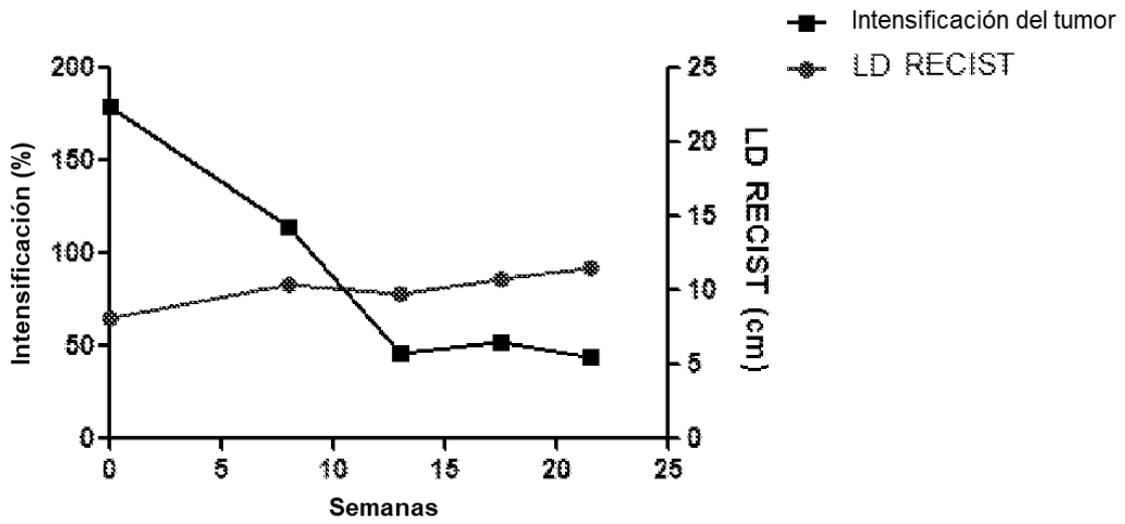
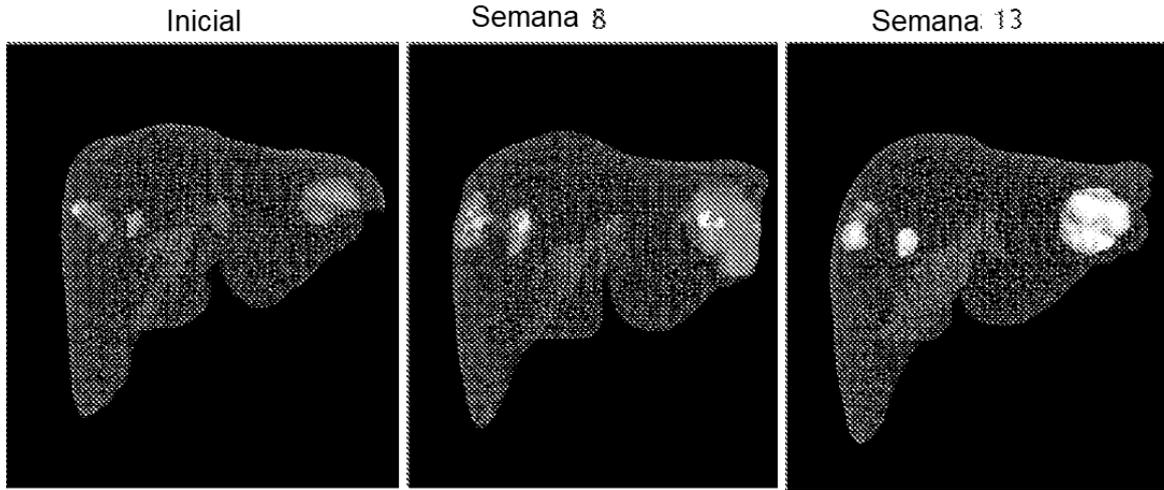
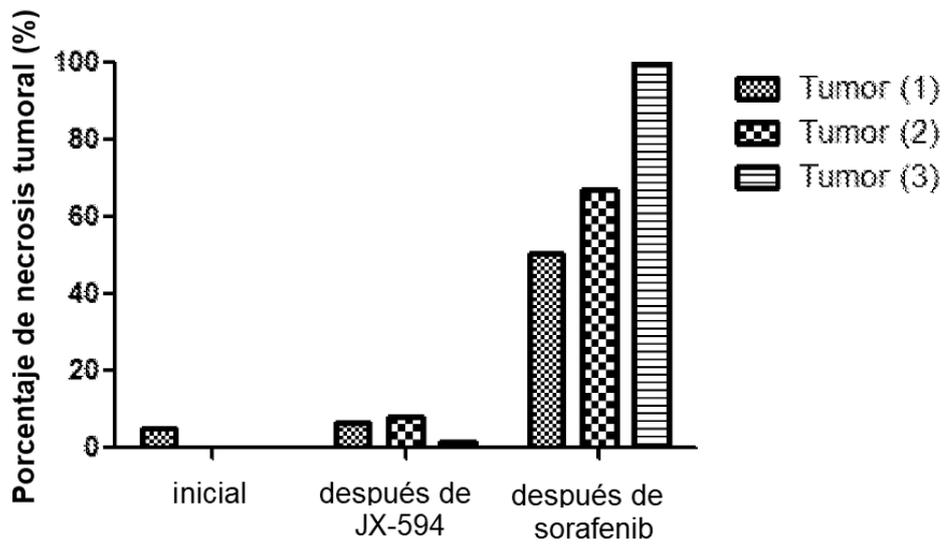


FIG. 15

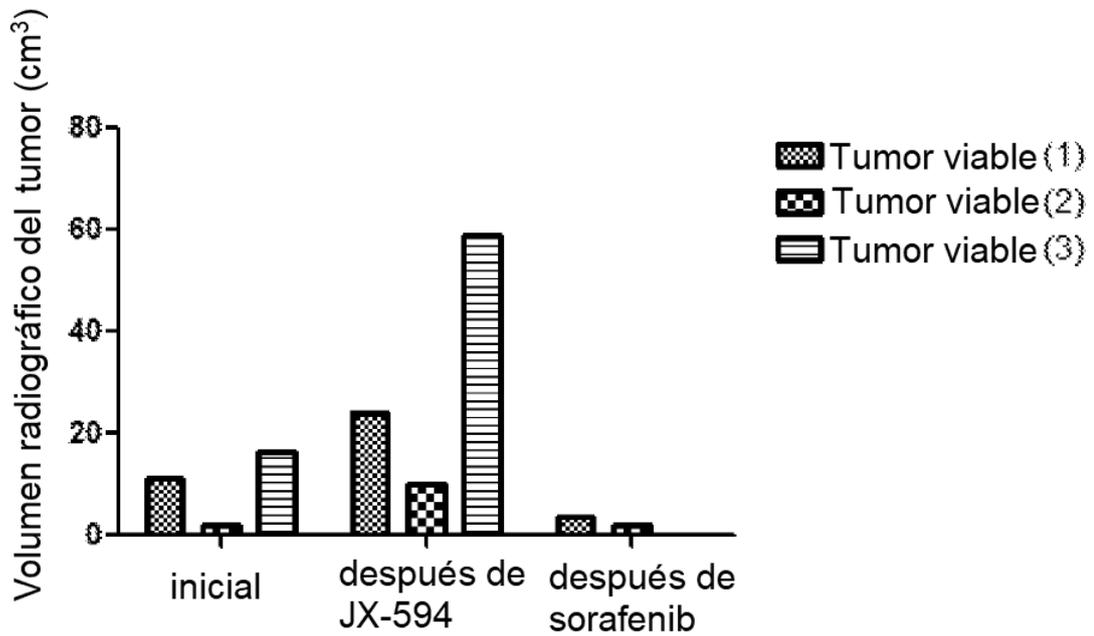
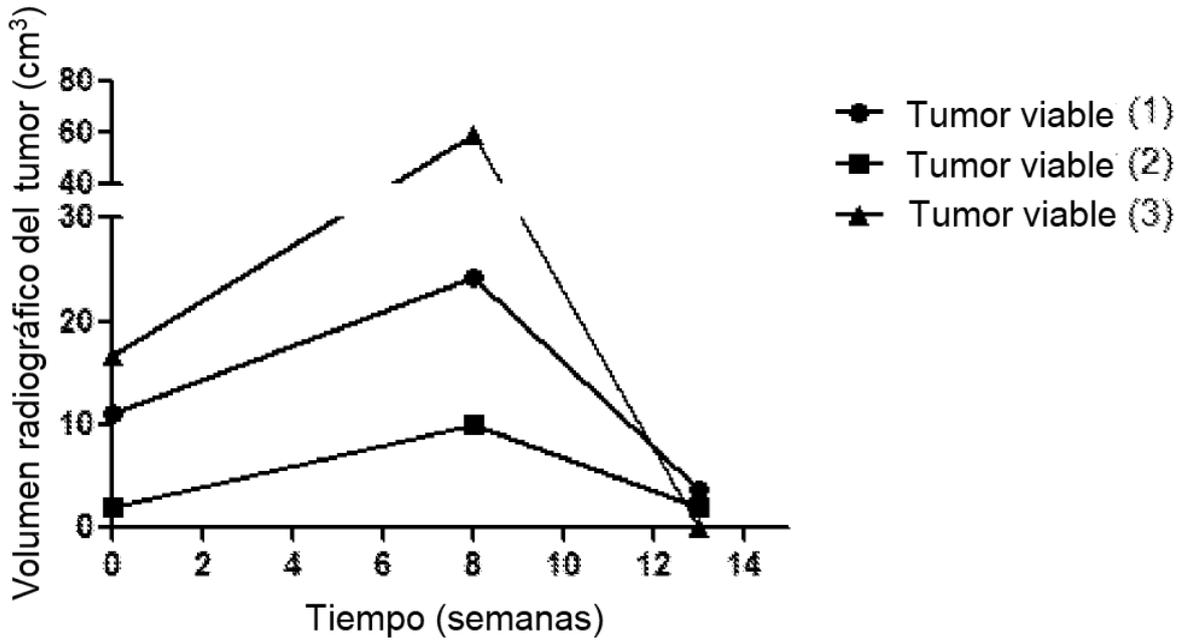
**Necrosis acrecentada evidente en reconstrucción 3D de tumores después de terapia con JX-594 y sorafenib:**



**Cuantificación de necrosis después de terapia con JX-594 y sorafenib:**

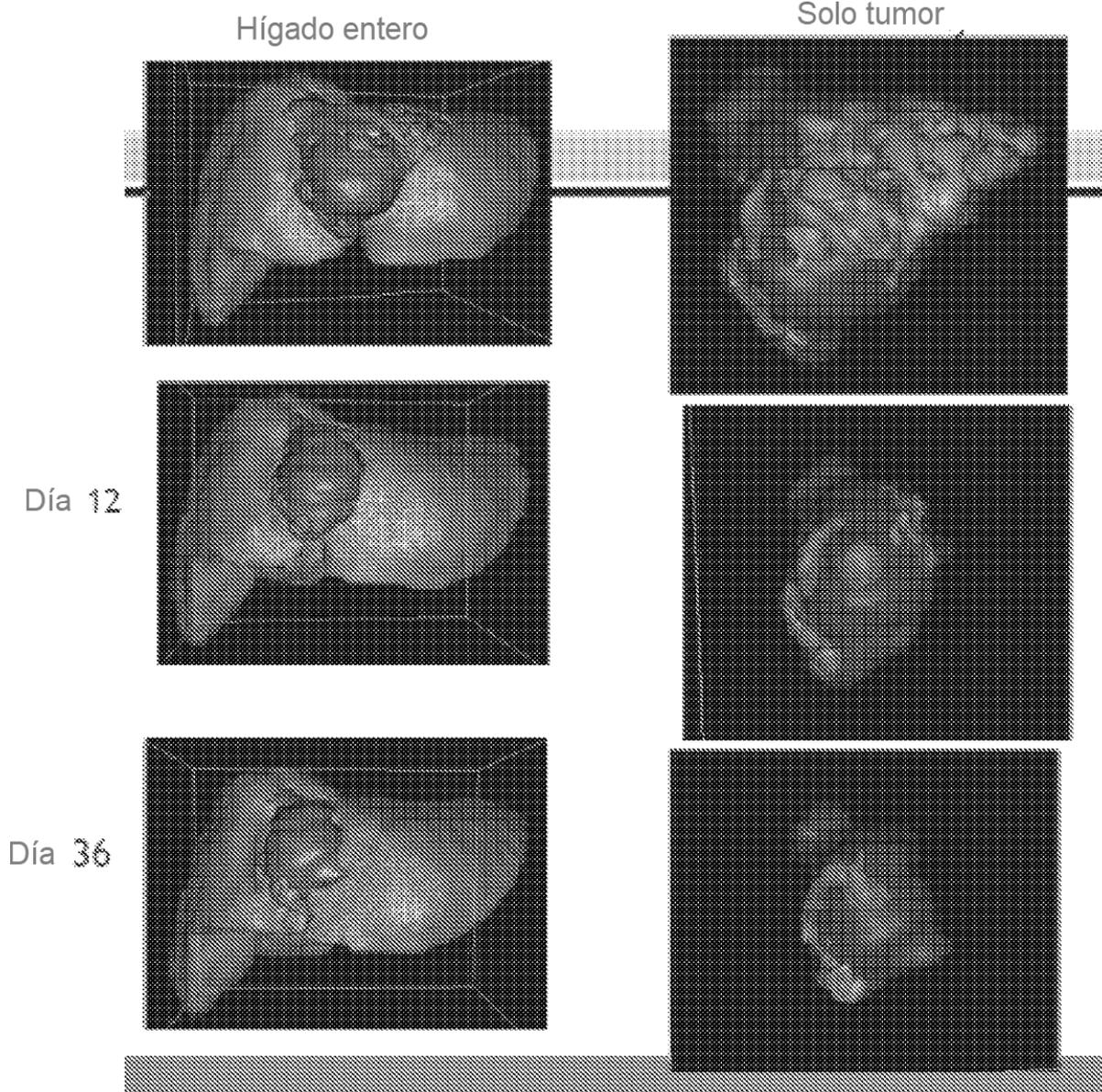


**FIG. 16**



**FIG. 17**

Paciente HEP016  
(HCC09)  
(sorafenib iniciado  
el día 25)



**FIG. 18**