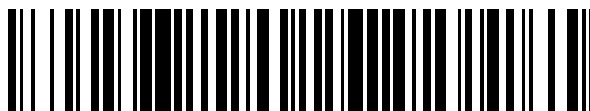


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 015**

51 Int. Cl.:

A61P 35/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2011** **PCT/US2011/024397**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011** **WO11100468**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2011** **E 11742816 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019** **EP 2533806**

54 Título: **Métodos y materiales para tratar el cáncer**

30 Prioridad:

10.02.2010 US 303222 P

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

07.05.2020

73 Titular/es:

**MAYO FOUNDATION FOR MEDICAL EDUCATION
AND RESEARCH (50.0%)
200 First Street S.W.
Rochester, MN 55905, US y
LEEDS UNIVERSITY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MELCHER, ALAN;
SELBY, PETER;
VILE, RICHARD, G.;
KOTTKE, TIMOTHY, J. y
PULIDO, JOSE, S.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 759 015 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

Métodos y materiales para tratar el cáncer

Antecedentes

1. Campo técnico

- 5 Este documento se refiere a métodos y materiales implicados en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, este documento proporciona métodos y material para usar bibliotecas de ácidos nucleicos para tratar el cáncer.

2. Información de antecedentes

- 10 El cáncer es una enfermedad grave que afecta a muchas personas cada año. En general, hay varios métodos comunes para tratar el cáncer: cirugía, quimioterapia, terapia de radiación, inmunoterapia y terapia biológica. Cuando se diagnostica inicialmente el cáncer, un especialista de cáncer tal como un oncólogo puede proporcionar a un paciente diversas opciones de tratamiento del cáncer. Típicamente, un oncólogo recomendará el mejor plan de tratamiento basado en el tipo de cáncer, cuánto se ha extendido, y otros factores importantes como la edad y salud general del paciente.

- 15 Bridle, BW, et al. describen en *Molecular Therapy*, vol. 17, nº 10, 2009, en páginas 1814-1821, el virus de la estomatitis vesicular como un nuevo vector de vacuna para el cáncer para estimular la inmunidad antitumoral que se puede llevar a un refuerzo rápido con adenovirus.

Resumen

La presente invención se define por la reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones dependientes representan otras realizaciones de la invención.

- 20 Este documento proporciona métodos y materiales relacionados con el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, este documento proporciona métodos y materiales para usar bibliotecas de ácidos nucleicos para tratar el cáncer. Como se describe en la presente memoria, se puede usar una biblioteca de ácidos nucleicos para suministrar un gran número de antígenos (p. ej., polipéptidos) que están presentes en el cáncer particular, o en el órgano o tejido origen del cáncer, a un mamífero de modo que el sistema inmunitario del mamífero puede desarrollar una respuesta inmunitaria contra esos antígenos (p. ej., polipéptidos) que son expresados por el cáncer, haciendo así que el cáncer remita. Por ejemplo, una biblioteca de expresión de ADNc diseñada para expresar polipéptidos de un cáncer particular, o del órgano o tejido origen del cáncer, se puede modificar genéticamente en virus (p. ej., un virus oncolítico), y después los virus genéticamente modificados se pueden administrar a un paciente de modo que los polipéptidos son expresados. Esta expresión resultante de los polipéptidos específicos del cáncer, órgano o tejido en presencia de la inflamación montada contra el virus puede causar una reacción inmunitaria dirigida contra el cáncer, haciendo así que el cáncer remita.

- 35 Si el cáncer cambia de alguna manera y posteriormente son expresados nuevos antígenos, entonces se puede administrar al mamífero la misma biblioteca de ácidos nucleicos o una biblioteca diferente de ácidos nucleicos (p. ej., una biblioteca de ácidos nucleicos generada a partir de las células del cáncer cambiado). En estos casos, el mamífero puede desarrollar una respuesta inmunitaria contra esos antígenos (p. ej., polipéptidos) que son expresados por el cáncer cambiando, haciendo así que el cáncer remita.

- 40 En general, un aspecto de este documento presenta una composición para usar en un método para tratar el cáncer presente en un mamífero. El método comprende administrar al mamífero una biblioteca de ácidos nucleicos en condiciones en donde los miembros ácidos nucleicos de la biblioteca de ácidos nucleicos son expresados en el mamífero, reduciendo así el número de células de cáncer viables presentes en el mamífero. El mamífero puede ser un ser humano. La administración puede ser una administración intratumoral o intravenosa. La biblioteca de ácidos nucleicos puede ser una biblioteca de ADNc. La biblioteca de ácidos nucleicos se puede administrar al mamífero usando un virus. El virus puede ser un virus oncolítico. El virus puede ser un virus de la estomatitis vesicular. Los miembros ácidos nucleicos pueden ser moléculas de ADNc, en donde cada molécula de ADNc codifica un polipéptido. La biblioteca de ácidos nucleicos puede comprender una pluralidad de miembros ácidos nucleicos diferentes, y en donde cada uno de la pluralidad de miembros ácidos nucleicos diferentes puede codificar un polipéptido de mamífero diferente. Los polipéptidos de mamífero diferentes pueden ser polipéptidos de un miembro de la misma especie que el mamífero. Los polipéptidos de mamífero diferentes pueden ser polipéptidos de un miembro de una especie diferente que la especie del mamífero. Los polipéptidos de mamífero diferentes pueden ser polipéptidos del mamífero. Los polipéptidos de mamífero diferentes pueden ser polipéptidos del cáncer. Los polipéptidos de mamífero diferentes pueden ser polipéptidos de un órgano o tejido que es un órgano o tejido origen del cáncer. El cáncer puede ser cáncer de próstata, y los polipéptidos de mamífero diferentes pueden ser polipéptidos expresados por células prostáticas. El cáncer puede ser cáncer de pulmón, y los polipéptidos de mamífero diferentes pueden ser polipéptidos expresados por células del pulmón. El cáncer puede ser cáncer de piel, y los polipéptidos de mamífero diferentes pueden ser polipéptidos expresados por células de la piel. La biblioteca de ácidos nucleicos puede comprender una colección de más de 10^4 miembros ácidos nucleicos diferentes, y en donde

cada uno de los 10^4 miembros ácidos nucleicos diferentes puede codificar un polipéptido de mamífero diferente. La biblioteca de ácidos nucleicos puede comprender una colección de más de 10^5 miembros ácidos nucleicos diferentes, y en donde cada uno de los 10^5 miembros ácidos nucleicos diferentes puede codificar un polipéptido de mamífero diferente. La biblioteca de ácidos nucleicos puede comprender una colección de más de 10^6 miembros ácidos nucleicos diferentes, y en donde cada uno de los 10^6 miembros ácidos nucleicos diferentes puede codificar un polipéptido de mamífero diferente. La biblioteca de ácidos nucleicos puede comprender una colección de más de 10^7 miembros ácidos nucleicos diferentes, y en donde cada uno de los 10^7 miembros ácidos nucleicos diferentes puede codificar un polipéptido de mamífero diferente. La biblioteca de ácidos nucleicos se puede administrar al mamífero en combinación con un adyuvante. El adyuvante se puede seleccionar del grupo que consiste en un polipéptido HSP70, un virus de la estomatitis vesicular, BCG, un virus vaccinia y un adenovirus.

Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria para la práctica de la invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, controlará la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos que acompañan y la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y dibujos y a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

La figura 1 es una fotografía de un gel de una biblioteca de expresión de ADNc de próstata humana, amplificada por PCR. Se usó un plásmido Template Bioexpress para llevar los ADNc.

La figura 2 contiene dos gráficas que representan el nivel de IL-17 (pg/ml) o IFN- γ (pg/ml) producido por esplenocitos de los ratones indicados después de incubación con células TC2 (relación E:T = 100:1). Los virus de la estomatitis vesicular que contienen una biblioteca de ADNc de próstata humana se denominan en general OSOVIASAL (el virus oncolítico específico de órgano incorporaba la biblioteca de antígenos específica alterada). Las bandas 1-3 son resultados de esplenocitos de ratones a los que se inyectó PBS por vía intraprostática. Las bandas 4-6 son resultados de esplenocitos de ratones a los que se inyectó PBS. Las bandas 7-12 son resultados de esplenocitos de ratones a los que se inyectó VSV-GFP. Las bandas 13-18 son resultados de esplenocitos de ratones a los que se inyectó OSOVIASAL. Las bandas 19-21 son resultados de células tumorales TC2 solo.

La figura 3 es un diagrama de un protocolo de administración para probar el uso de una biblioteca de ácidos nucleicos para tratar el cáncer.

La figura 4 es una gráfica que representa curvas de supervivencia para ratones con cáncer de próstata TC2 subcutáneo y tratados como se indica para los grupos A, B, C, D y E. Cada grupo contiene siete ratones.

La figura 5 es una gráfica que representa el nivel de IL-17 (pg/ml) producido por esplenocitos de ratones tratados como se indica después de incubación con un lisado de melanoma B16 (bandas 1, 5, 9 y 13), un lisado de tumor de próstata TrampC2 (bandas 2, 6, 10 y 14), un lisado de próstata de ratón normal (bandas 3, 7, 11 y 15), o un lisado de páncreas de ratón normal (bandas 4, 8, 12 y 16). No se observó diferencia en el nivel de IFN γ entre esos grupos. it = inyecciones intratumorales; iv = inyecciones intravenosas.

La figura 6 contiene fotografías (4x) de tumores TC2 después de tratamiento intravenoso con VSV-GFP o OSOVIASAL, que inducían la remisión tumoral con signos mínimos de prostatitis autoinmunitaria. Los tumores TC2 que sufrieron remisión y volvieron a crecer in vivo presentaban una morfología muy diferente de los tumores TC2 tratados con VSV-GFP o de control.

La figura 7 contiene fotografías (10x) de tumores TC2 después de tratamiento intravenoso con VSV-GFP u OSOVIASAL, que inducían la remisión tumoral con signos mínimos de prostatitis autoinmunitaria.

La figura 8 contiene fotografías de tumores TC2 después de tratamiento intravenoso con VSV-GFP u OSOVIASAL, que inducían la remisión tumoral con signos mínimos de prostatitis autoinmunitaria.

Las figuras 9A y 9B contienen fotografías de tumores TC2 después de tratamiento intravenoso con PBS u OSOVIASAL. La inyección intraprostática directa de OSOVIASAL inducía signos clínicos de prostatitis.

La figura 10 es un diagrama de un experimento diseñado para evaluar la capacidad de OSOVIASAL en combinación con HSP70 recombinante para estimular la liberación de IL-17.

La figura 11 es una gráfica que representa la cantidad de IL-17 liberada (pg/ml) de esplenocitos y células de ganglios linfáticos infectadas con OSOVIASAL en presencia de HSP70 recombinante después de exposición a un lisado de células de cáncer de próstata (lisado de células TC2; C1), un lisado de células de melanoma (lisado de células B16;

C2), un lisado de células prostáticas de ratón normales (C3), un lisado de células pancreáticas de ratón normales (C4), o sin lisado (C5).

La figura 12 es una gráfica que representa curvas de supervivencia para ratones con cáncer de melanoma B16ova subcutáneo y tratados con OSOVITAL-ova o VSV-GFP.

5 Descripción detallada

Este documento proporciona métodos y materiales relacionados con el uso de biblioteca de ácidos nucleicos para tratar el cáncer. Por ejemplo, este documento proporciona métodos y materiales para usar biblioteca de ácidos nucleicos para reducir el número de células de cáncer viable en un mamífero y/o para aumentar el tiempo de supervivencia de un mamífero con cáncer. Se puede tratar cualquier tipo de cáncer de modo que el número de células de cáncer viables en el mamífero se reduce y/o aumenta el tiempo de supervivencia del mamífero con cáncer. Por ejemplo, el cáncer de próstata, cáncer de piel (p. ej., melanoma), cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer pancreático y cáncer colorrectal se pueden tratar como se describe en la presente memoria.

La expresión "biblioteca de ácidos nucleicos" como se usa en la presente memoria, se refiere a una colección de moléculas de ácido nucleico donde la colección incluye al menos aproximadamente 10^2 moléculas de ácido nucleico diferentes. Por ejemplo, una biblioteca de ácidos nucleicos descrita en la presente memoria puede incluir al menos aproximadamente 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , o más moléculas de ácido nucleico diferentes. En algunos casos, una biblioteca de ácidos nucleicos usada como se describe en la presente memoria puede ser una biblioteca de ADNc. Por ejemplo, una biblioteca de ácidos nucleicos puede tener al menos aproximadamente 10^2 moléculas de ADNc diferentes. Cada molécula de ADNc diferente puede codificar un polipéptido diferente. En general, una biblioteca de ácidos nucleicos proporcionada en la presente memoria se puede diseñar para expresar sus miembros ácidos nucleicos (p. ej., ADNc) de modo que se puede producir una colección de al menos 10^2 polipéptidos diferentes. Los polipéptidos pueden ser polipéptidos de longitud completa como se encuentran en las células fuente usadas para generar la biblioteca de ácidos nucleicos o pueden ser partes de dichos polipéptidos de longitud completa. Por ejemplo, dichas partes de polipéptidos de longitud completa pueden ser polipéptidos que tienen más de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o más restos de aminoácidos de los polipéptidos de longitud completa.

En general, una biblioteca de ácidos nucleicos (p. ej., una biblioteca de ácidos nucleicos de expresión) se puede obtener a partir del cáncer que se va a tratar o se puede obtener a partir de un órgano o tejido o célula (órgano/tejido/célula) origen del tipo de cáncer que se va a tratar. Por ejemplo, cuando se trata el cáncer de piel (p. ej., melanoma), se puede usar una biblioteca de ADNc creada a partir de células de piel normales. Cuando se trata un cáncer pancreático, se puede crear una biblioteca de ADNc a partir de células pancreáticas normales. En algunos casos, se puede obtener una biblioteca de ácidos nucleicos a partir de una célula embrionaria o línea celular. Una biblioteca de células embrionarias puede proporcionar muchos antígenos asociados a tumor puesto que muchos antígenos asociados a tumor también son antígenos expresados de forma embrionaria que se convierten en reactivados para la expresión en células tumorales. En algunos casos, la vacunación con una biblioteca de ácidos nucleicos de células embrionarias puede permitir la vacunación eficaz mayor y por encima de la lograda con la vacunación contra antígenos específicos de tejido.

En algunos casos, una biblioteca de ácidos nucleicos puede ser una colección de al menos aproximadamente 10^2 moléculas de ácido nucleico diferentes del mamífero que se va a tratar (p. ej., una biblioteca de autoexpresión) o puede ser una colección de al menos aproximadamente 10^2 moléculas de ácido nucleico diferentes de un miembro de la misma especie que el mamífero que se va a tratar (p. ej., una biblioteca de expresión alogénica). Por ejemplo, cuando se trata el cáncer de pulmón en un ser humano A, se puede obtener tejido de pulmón normal de un ser humano B y usarlo para hacer una biblioteca de ADNc de tejido de pulmón que se puede administrar al ser humano A. En muchos casos, una biblioteca de ácidos nucleicos puede ser una colección de al menos aproximadamente 10^2 moléculas de ácido nucleico diferentes de un miembro de una especie de mamífero que es diferente de la especie del mamífero que se va a tratar (p. ej., biblioteca de expresión xenogénica). Por ejemplo, cuando se trata el cáncer de próstata en un ser humano, se puede obtener tejido de próstata normal de un mamífero no humano (p. ej., un mono, perro, gato, vaca, cerdo, oveja, cabra, ratón o rata) y usar para hacer una biblioteca de ADNc de tejido de próstata de mamífero no humano que se puede administrar al ser humano.

Se puede usar cualquier método adecuado para hacer una biblioteca de ácidos nucleicos. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de clonación molecular y PCR comunes para hacer una biblioteca de ADNc diseñada para expresar moléculas de ADNc. Se puede usar cualquier método adecuado para suministrar una biblioteca de ácidos nucleicos (p. ej., una biblioteca de ácidos nucleicos de expresión) a un mamífero. Por ejemplo, una biblioteca de ácidos nucleicos se puede suministrar como plásmidos o se puede incorporar en virus (p. ej., virus oncolíticos tales como virus de la estomatitis vesicular, virus vaccinia o virus adenovirus), bacterias o células que se suministran a un mamífero. Los ejemplos de virus que se pueden usar para suministrar biblioteca de ácidos nucleicos a mamíferos que tienen cáncer incluyen, sin limitación, virus de la estomatitis vesicular, adenovirus, virus vaccinia, retrovirus y lentivirus.

Se puede usar cualquier método adecuado para administrar una biblioteca de ácidos nucleicos a un mamífero que tiene cáncer. Por ejemplo, una biblioteca de ácidos nucleicos puede estar en forma de plásmidos que se formulan

con un vehículo farmacéuticamente aceptable para crear una composición farmacéutica para administrar a un ser humano con cáncer. En algunos casos, una biblioteca de ácidos nucleicos puede estar en forma de una población de virus (p. ej., una población de virus de la estomatitis vesicular) que se formula con un vehículo farmacéuticamente aceptable para crear una composición farmacéutica para administrar a un ser humano con cáncer. En estos casos, cada miembro de virus de la población de virus puede contener un miembro de ácido nucleico diferente de la biblioteca de ácidos nucleicos. Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, liposomas y otros lípidos. La composición farmacéutica puede incluir un adyuvante tal como polipéptidos HSP70 (GenBank nº gi 38327039 o 38327038), BCG (bacilo de Calmette-Guérin), o toxina de Coley. En algunos casos, una composición farmacéutica que contiene una biblioteca de ácidos nucleicos puede carecer de suero (p. ej., suero bovino tal como suero de ternero fetal).

Una biblioteca de ácidos nucleicos (p. ej., población de virus que contienen la biblioteca) o una composición que contiene una biblioteca de ácidos nucleicos, se puede administrar directamente a células de cáncer (p. ej., por administración intratumoral) o se puede administrar por vía sistémica (p. ej., administración intravenosa, intraperitoneal, intrapleural o intraarterial). Se puede administrar cualquier cantidad adecuada de material a un mamífero. Por ejemplo, la cantidad de material administrada a un mamífero puede ser suficientemente grande para suministrar al menos una copia de cada miembro ácido nucleico de la biblioteca de ácidos nucleicos. Por ejemplo, cuando se usa una biblioteca que tiene 10^4 miembros ácidos nucleicos incorporada en virus, entonces el número total de virus administrados al mamífero puede estar en el intervalo de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^8 . En algunos casos, la cantidad de material administrada a un mamífero puede ser una cantidad que es menor que la cantidad necesaria para suministrar al menos una copia de cada miembro ácido nucleico de la biblioteca de ácidos nucleicos. Por ejemplo, cuando se usa una biblioteca que tiene 10^6 miembros ácidos nucleicos incorporada en virus, entonces el número total de virus administrados al mamífero puede estar en el intervalo de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^5 .

La invención se describirá con más detalle en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1 - Uso de bibliotecas de ADNc específicas de órgano expresadas por virus oncolíticos para tratar el cáncer

Se amplificaron por PCR bibliotecas de ADNc de tejido de próstata humana y tumores recurrentes de próstata de ratón y se clonaron en el virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Figura 1). Brevemente, la biblioteca de ADNc se amplificó con cebadores para permitir la clonación direccional en el genoma del VSV entre los sitios de restricción Xho1 y Nhe1 entre los genes G y L. Se generaron virus por cotransfección de células Vero con genes auxiliares virales y la polimerasa T7 codificada por vaccinia. Se recogieron los virus de las células transfectadas después de 48-72 horas, y todos los virus se amplificaron durante uno o dos ciclos en células Vero. Se obtuvieron títulos de virus de 10^7 a 10^8 ufp/ml (tituladas en células BHK por ensayo de dilución limitante). Aunque sin estar limitados por ningún modo de acción particular, es posible que la biblioteca de ADNc expresada en virus pueda abarcar epítomos de la mayoría de los antígenos normales que pueden servir como inmunógenos para el rechazo del cáncer, dispensado así la necesidad de muerte directa del tejido normal. Además, la inmunogenicidad del propio VSV podría hacer la función de un adyuvante.

Para este estudio, se usaron un total de 18 ratones. Se usaron tres ratones en cada grupo (A1, A2, B1, B2, C1 y C2). A los ratones de A1 y A2 se les inyectó PBS por vía intraprostática. A los ratones de B1 y B2 se les inyectó por vía intraprostática virus de la estomatitis vesicular diseñado para expresar la proteína fluorescente verde (VSV-GFP). A los ratones de C1 y C2 se les inyectó por vía intraprostática virus de la estomatitis vesicular que contenía la biblioteca de ADNc de próstata humana (VSV-Ag). Se dieron a cada ratón 50 µl de virus diluido en PBS en un título final de $\sim 10^6$ virus por inyección intravenosa con un total de 6 inyecciones separadas por dos días cada una. Los ratones se sacrificaron el día 40-60 después de sembrar el tumor, y se evaluó en los esplenocitos células T la liberación de IL-17 (interleuquina-17) e IFN γ (interferón-gamma) cuando se cocultivaban con células tumorales TC2. La secreción de niveles significativos de citoquinas en respuesta a la estimulación con células TC2 indicaba que los esplenocitos contenían subconjuntos de células T reactivas con especificidad para las células de tumor de próstata. Solo los esplenocitos de ratones a los que se inyectó VSV-Ag presentaban reactividad con las células de cáncer de próstata murina TC2 (Figura 2).

En un estudio in vivo, se inyectaron a 35 ratones células de cáncer de próstata TC2 por vía subcutánea (sc) el día uno. Cuando el cáncer de próstata sc era palpable, aproximadamente el día 7, los ratones se dividieron en cinco grupos (A, B, C, D y E) de ratones con siete ratones en cada grupo, y se llevaron a cabo las siguientes inyecciones (Figura 3): inyección intratumoral de VSV-GFP (Grupo A), inyección intratumoral de VSV-Ag (OSOVIALSAL de la biblioteca de antígenos de próstata humana; Grupo B), inyección intratumoral de VSV-GFP HI (inactivado con calor; Grupo C), inyección intravenosa de VSV-Ag (Grupo D), e inyección intravenosa de VSV-GFP (Grupo E). Las inyecciones se realizaron cada dos días para un total de 6 inyecciones. Se evaluaron en los ratones la supervivencia y autoinmunidad, y en el momento del sacrificio, se evaluó la reactividad de las células T (esplenocitos) a través de la liberación de IL-17 e IFN γ .

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meyer pusieron de manifiesto una diferencia notable en la supervivencia en los Grupos B y D (VSV-Ag administrado por vía intratumoral o intravenosa) con los otros grupos (Figura 4). El tiempo de supervivencia de 50% era aproximadamente 20 días para los otros grupos, mientras que era aproximadamente 40 días para el Grupo B (VSV-Ag intratumoral) y aproximadamente 50 días para el grupo D (VSV-Ag iv). La histología de los tumores puso de manifiesto la remisión tumoral notable en los Grupos B y D con signos mínimos de prostatitis autoinmunitaria (Figuras 6-9).

Se ensayó la reactividad de los esplenocitos de cuatro ratones de cada grupo del Grupo A, Grupo B, Grupo D y Grupo E frente a dianas de lisado de melanoma B16, dianas de lisado de tumor de próstata TC2, dianas de lisado de próstata de ratón normal y dianas de lisado de páncreas de ratón normal. Solo el grupo D presentaba reactividad contra el lisado de TC2 con liberación de IL-17 (Figura 5). Estos resultados demuestran que una expresión de autoantígenos alterada mediante virus que expresan una biblioteca de ácidos nucleicos puede producir reacción contra el cáncer pero no contra tejidos normales u otros cánceres. Estos resultados también demuestran que la expresión de bibliotecas de ácidos nucleicos se puede usar para tratar el cáncer (p. ej., cáncer de próstata).

En resumen, la inyección (p. ej., intravenosa) de VSV que codifica una biblioteca de ADNc de próstata normal dio como resultado la remisión de tumores de próstata murinos en ratones inmunocompetentes. Las remisiones eran inmunomediadas, en oposición a inducidas por oncolisis viral. Se observó inflamación transitoria en la próstata normal, pero no había prueba evidente de autoinmunidad a largo plazo. Los ratones en los que los tumores eran rechazados desarrollaron potentes respuestas de Th17 contra células de tumor de próstata, así como tejidos de próstata normales. Además, los tumores que remitieron inicialmente, pero no se curaron, volvieron a aparecer de forma agresiva, con un aspecto histológico y perfil antigénico notablemente diferente a las células tumorales implantadas inicialmente, lo que sugería que la vacunación mediada por la biblioteca de ADNc imponía una inmunoselección rigurosa tras los tumores. Este planteamiento dispensaba la necesidad de inducir daño directo a tejidos normales in situ, permitía la inmunoselección in vivo de amplia variedad para antígenos que es probable que sean dianas eficaces para respuestas tanto autoinmunitarias como antitumorales, y establecía el uso de virus (p. ej., virus oncolíticos) como adyuvantes inmunitarios para la inmunoterapia del cáncer. Los resultados proporcionados en la presente memoria demuestran además que la combinación de la inducción de reactividad autoinmunitaria contra antígenos específicos de tejidos normales (p. ej., polipéptidos) con la alta inmunogenicidad, la presentación de antígenos inducida por adyuvante puede ser una inmunoterapia del cáncer con éxito.

Ejemplo 2 - Uso de una proteína de choque térmico, HSP70 en combinación con bibliotecas de ADNc específicas de órgano expresadas por virus oncolíticos para tratar el cáncer

Se usaron virus de la estomatitis vesicular que contenían una biblioteca de ADNc de tejido de próstata humana (OSOVIALSAL de la biblioteca de antígenos de próstata humana) en combinación con HSP70 recombinante (Sigma-Aldrich, St Louis, Producto nº H7283) para evaluar la capacidad de combinación para aumentar las respuestas de IL-17. Brevemente, se sembraron células de ganglios linfáticos y esplenocitos mezclados de ratones C57BL/6 con 10^6 células por pocillo. Después de una incubación, las células se infectaron con los virus de la estomatitis vesicular que contenían la biblioteca de ADNc de tejido de próstata humano (MDI = 1) en presencia de 10 µg/ml de HSP70 recombinante. 72 y 144 horas después de la siembra inicial, se añadieron células adicionales (10^6 células por pocillo) a cada pocillo (Figura 10). Además, 72 y 144 horas después de la infección inicial, se llevaron a cabo infecciones adicionales en presencia de HSP70 recombinante (Figura 10). 72 horas después de la tercera infección las células se incubaron con (a) un lisado de células de cáncer de próstata (lisado de células TC2), (b) un lisado de células de melanoma (lisado de células B16), (c) un lisado de células de próstata de ratón normales, (d) un lisado de células de páncreas de ratón normales, o (e) sin lisado, durante 48 horas. Después de 48 h de incubación, se evaluó en las células por ELISA la liberación de IL-17. Los lisados de células de cáncer de próstata y de células de próstata normales produjeron una respuesta de IL-17 notable en esplenocitos en comparación con la respuesta medida para células expuestas a los otros lisados (Figura 11). Estos resultados demuestran que la adición de HSP-70 a VSV que expresan ADNc a la próstata aumentaba la respuesta autoinmunitaria de IL-17 tanto contra tejidos de tumores como de órganos normales.

Ejemplo 3 - Uso de una biblioteca de ADNc específica de tumor expresada por virus oncolíticos para tratar el cáncer

Se hizo una biblioteca de ADNc usando ácido nucleico de células tumorales de melanoma B16ova de ratón y se clonaron en virus de la estomatitis vesicular (VSV). La biblioteca de VSV se denominó OSOVITAL-ova.

En un estudio in vivo, se inyectaron a ratones C57BL/6 células de tumor de melanoma B16ova por vía subcutánea (sc) el día uno. Cuando el cáncer de melanoma subcutáneo era palpable, los ratones se dividieron en dos grupos (OSOVITAL-ova y VSV-GFP) de ratones con siete ratones en cada grupo, y se realizaron las siguientes inyecciones: inyección intratumoral de OSOVITAL-ova e inyección intratumoral de VSV-GFP. Las inyecciones se realizaron cada dos días para un total de 6 inyecciones. Se evaluó la supervivencia de los ratones.

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meyer pusieron de manifiesto una diferencia notable en la supervivencia para mamíferos tratados con OSOVITAL-ova en comparación con mamíferos tratados con VSV-GFP (Figura 12). Estos resultados demuestran que las bibliotecas de ADNc de células de cáncer construidas en un virus tales como el VSV, pueden inducir respuestas significativas contra células de cáncer presentes en un mamífero.

Otras realizaciones

Debe entenderse que aunque la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una biblioteca de ácidos nucleicos codificada por un virus oncolítico para usar en un método de tratamiento de cáncer presente en un mamífero,
5 en donde dicha biblioteca de ácidos nucleicos comprende una pluralidad de miembros ácidos nucleicos diferentes, en donde cada uno de dicha pluralidad de miembros ácidos nucleicos diferentes codifica un polipéptido de mamífero diferente, y en donde los polipéptidos de mamífero diferentes son polipéptidos de dicho cáncer o de un órgano o tejido que es un órgano o tejido origen de dicho cáncer y
10 en donde la composición se administra en condiciones en donde los miembros ácidos nucleicos de dicha biblioteca de ácidos nucleicos son expresados en dicho mamífero, reduciendo así el número de células de cáncer viables presentes en dicho mamífero.
2. La composición para usar de la reivindicación 1, en donde dicha biblioteca de ácidos nucleicos es una biblioteca de ADNc.
3. La composición para usar de la reivindicación 1, en donde dicho virus oncolítico es un virus de la estomatitis vesicular.
- 15 4. La composición para usar de la reivindicación 1, en donde dichos miembros ácidos nucleicos son moléculas de ADNc, en donde cada molécula de ADNc codifica un polipéptido.
5. La composición para usar de la reivindicación 1, en donde dicha biblioteca de ácidos nucleicos se administra a dicho mamífero en combinación con un adyuvante, en particular en donde dicho adyuvante se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido HSP70, un virus de la estomatitis vesicular, BCG, un virus vaccinia y un adenovirus.
- 20 6. La composición para usar de la reivindicación 1, en donde dichos polipéptidos de mamífero diferentes son polipéptidos de un miembro de la misma especie que dicho mamífero, o de un miembro de una especie diferente que la especie de dicho mamífero.
7. La composición para usar de la reivindicación 1, en donde dichos polipéptidos de mamífero diferentes son polipéptidos de dicho mamífero.
- 25 8. La composición para usar de la reivindicación 1, en donde dicho cáncer es cáncer de próstata, y dichos polipéptidos de mamífero diferentes son polipéptidos expresados por células de próstata, o
en donde dicho cáncer es cáncer de pulmón, y dichos polipéptidos de mamífero diferentes son polipéptidos expresados por células de pulmón, o
30 en donde dicho cáncer es cáncer de piel, y dichos polipéptidos de mamífero diferentes son polipéptidos expresados por células de piel.
9. La composición para usar de la reivindicación 1, en donde dicha biblioteca de ácidos nucleicos comprende una colección de más de 10^4 miembros ácidos nucleicos diferentes, y en donde cada uno de dichos 10^4 miembros ácidos nucleicos diferentes codifica un polipéptido de mamífero diferente, o
35 en donde dicha biblioteca de ácidos nucleicos comprende una colección de más de 10^5 miembros ácidos nucleicos diferentes, y en donde cada uno de dichos 10^5 miembros ácidos nucleicos diferentes codifica un polipéptido de mamífero diferente, o
en donde dicha biblioteca de ácidos nucleicos comprende una colección de más de 10^6 miembros ácidos nucleicos diferentes, y en donde cada uno de dichos 10^6 miembros ácidos nucleicos diferentes codifica un polipéptido de mamífero diferente, o
- 40 en donde dicha biblioteca de ácidos nucleicos comprende una colección de más de 10^7 miembros ácidos nucleicos diferentes, y en donde cada uno de dichos 10^7 miembros ácidos nucleicos diferentes codifica un polipéptido de mamífero diferente.
10. La composición para usar de la reivindicación 1, en donde dicha composición carece de suero.

Figura 1

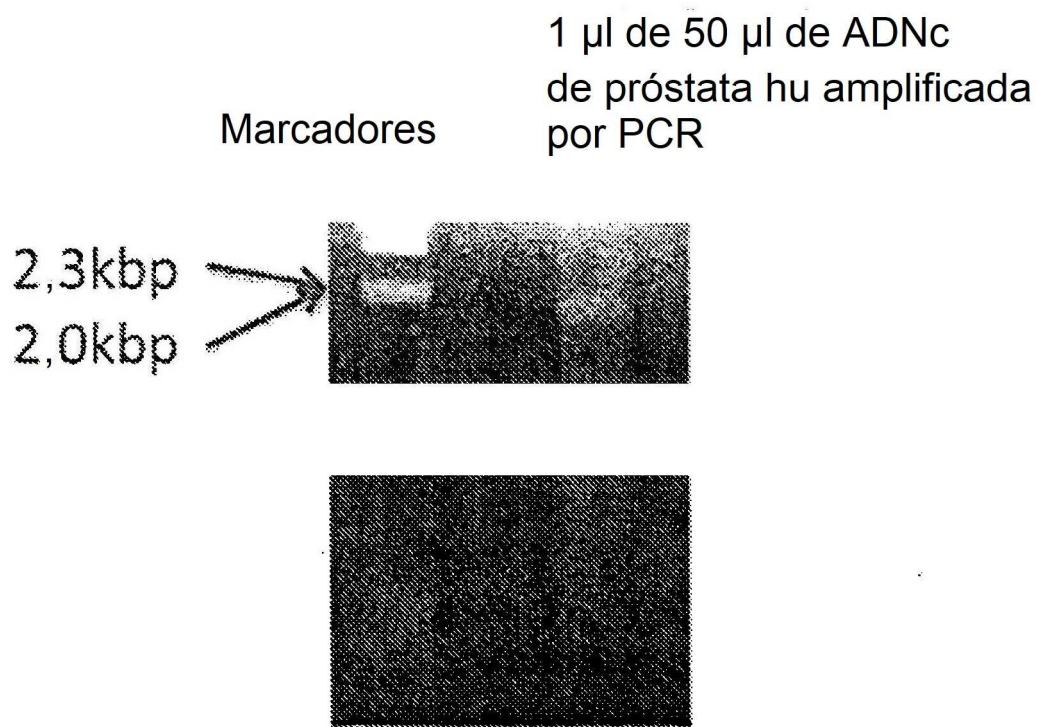


Figura 2

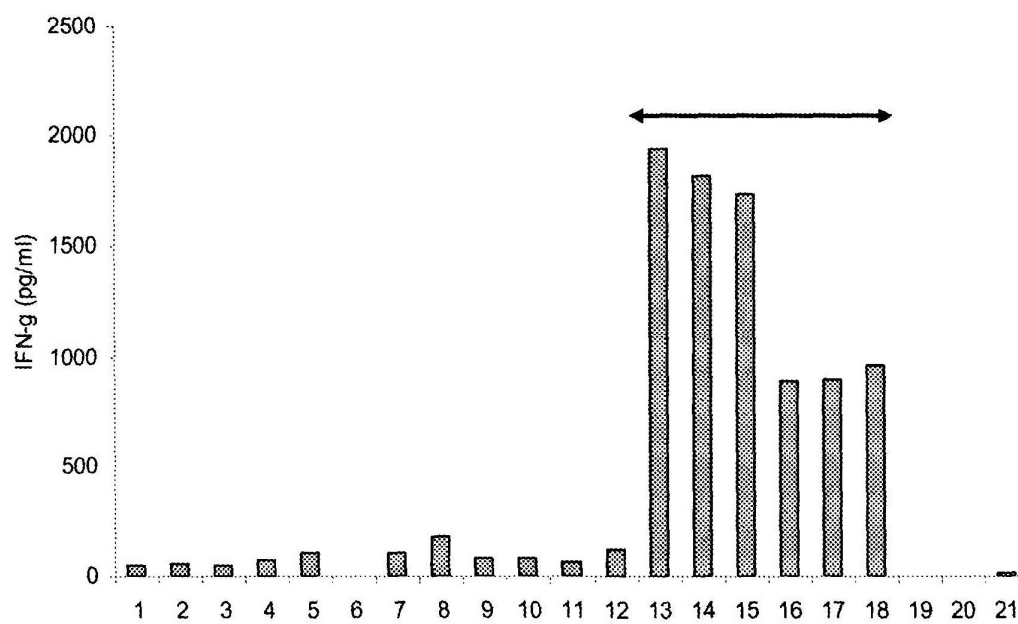
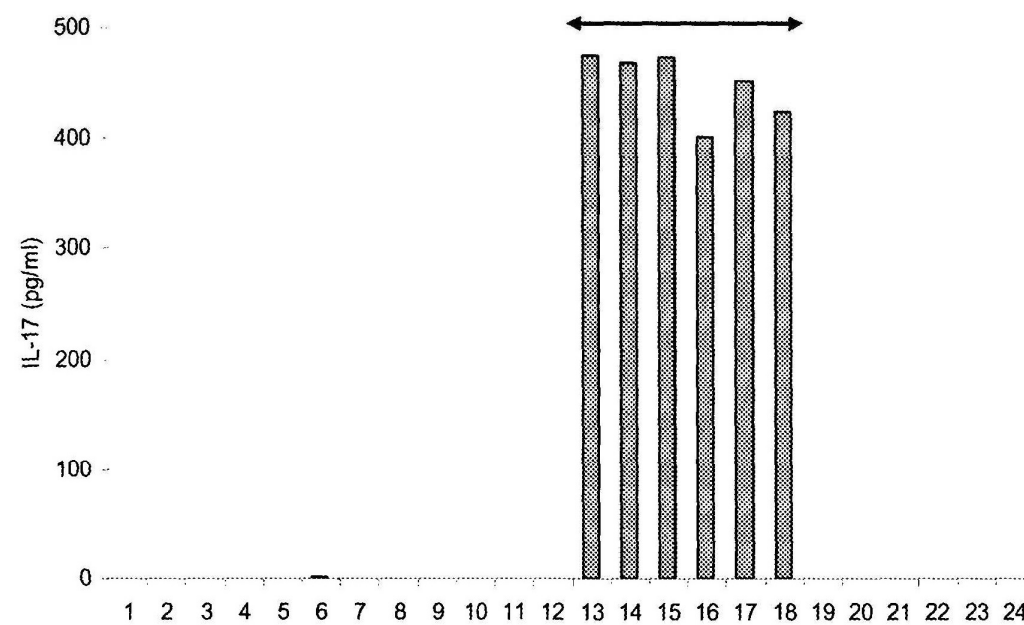


Figura 3

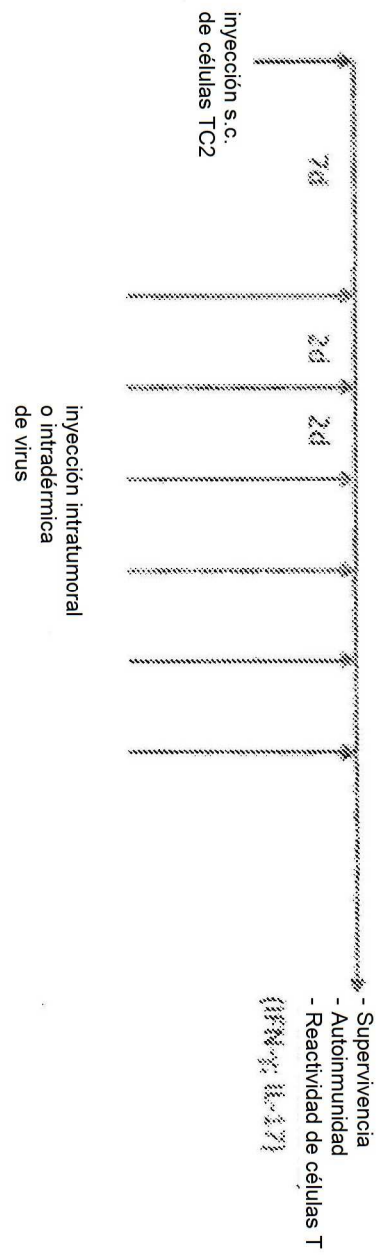


Figura 4

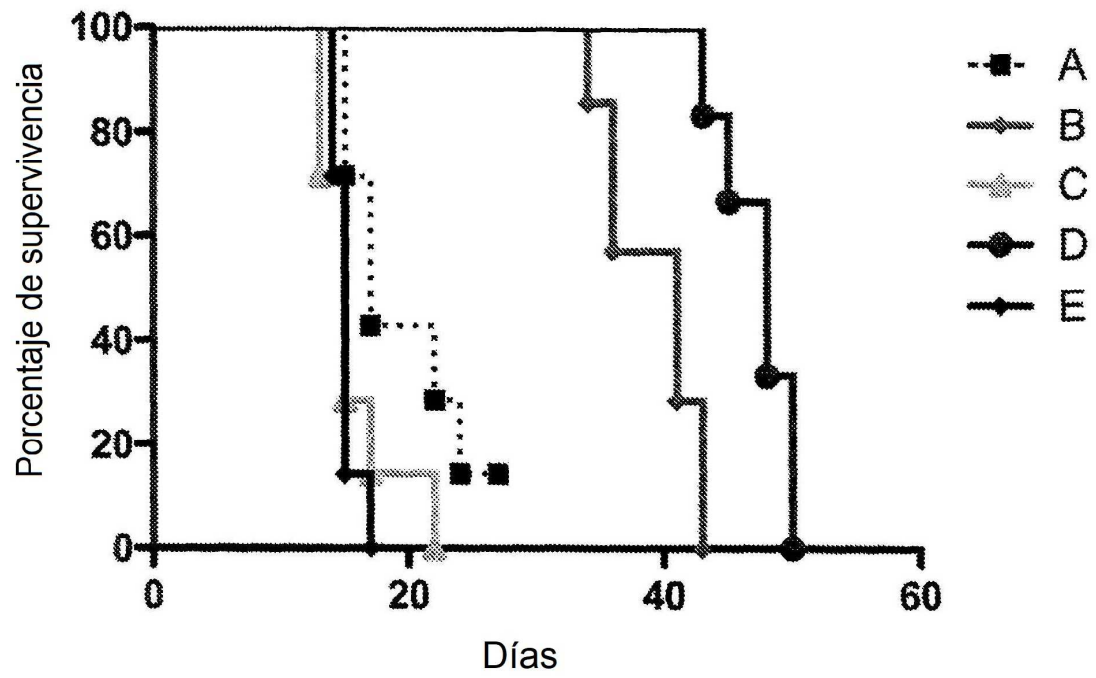


Figura 5

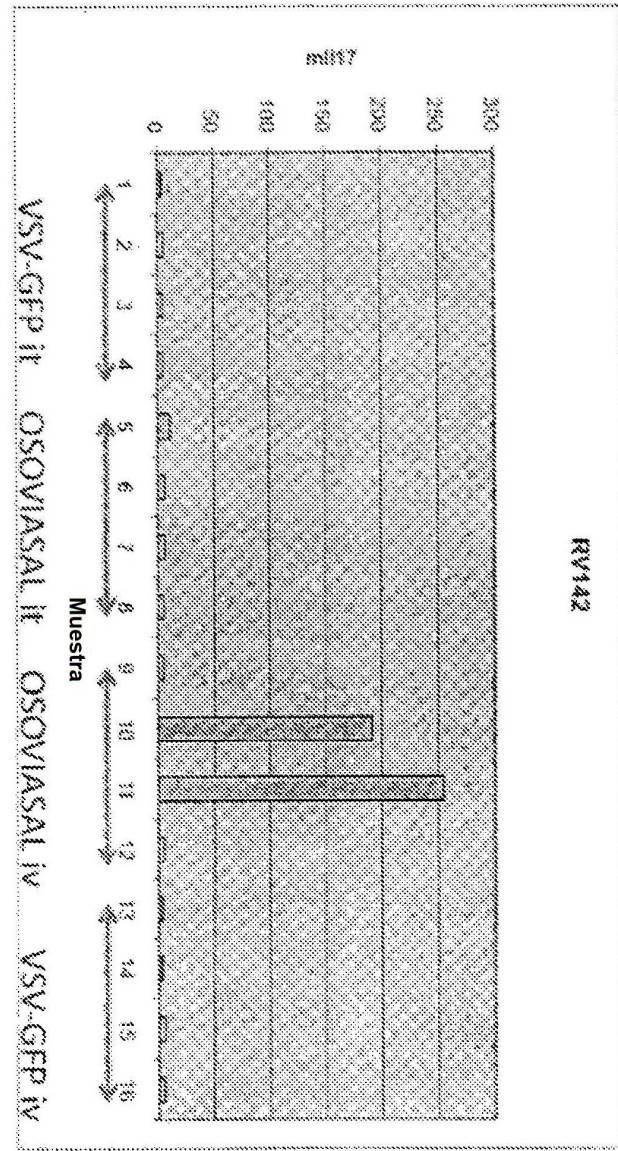


Figura 6



Tumor TC2 de ratón
tratado con VSV-GFP

4x



Tumor TC2 de ratón
tratado con OSOVIASAL

Figura 7

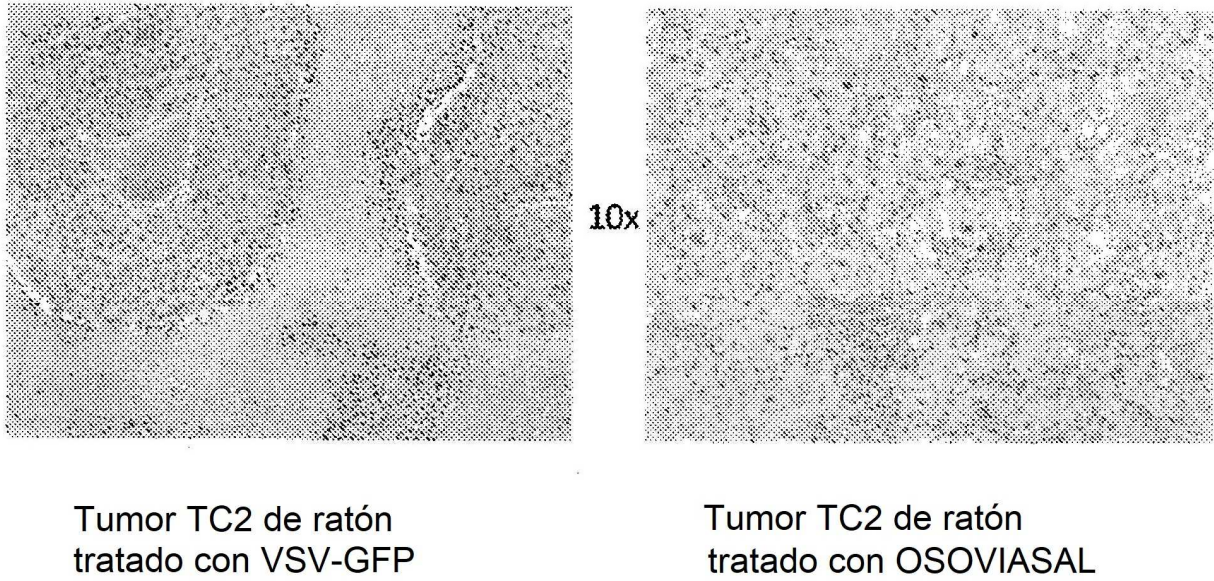
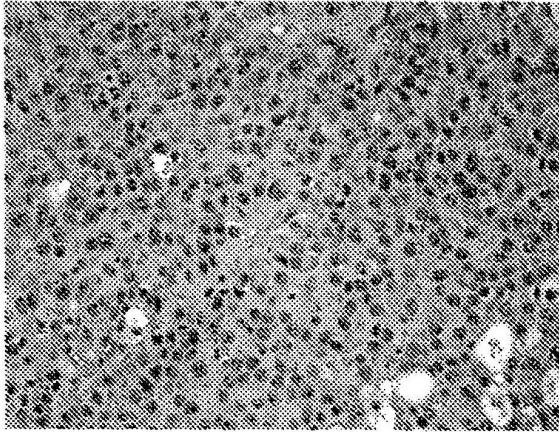
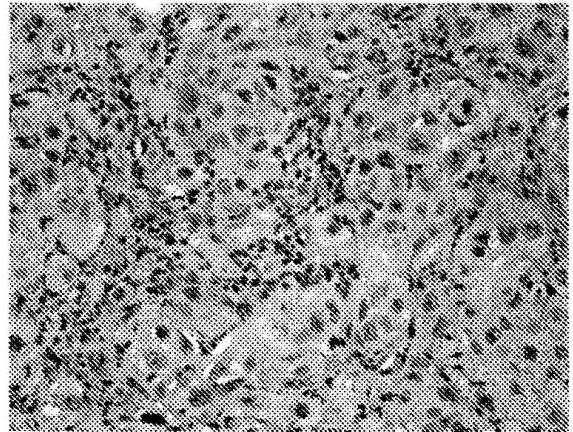


Figura 8



Tumor TC2 de ratón tratado
con VSV-GFP

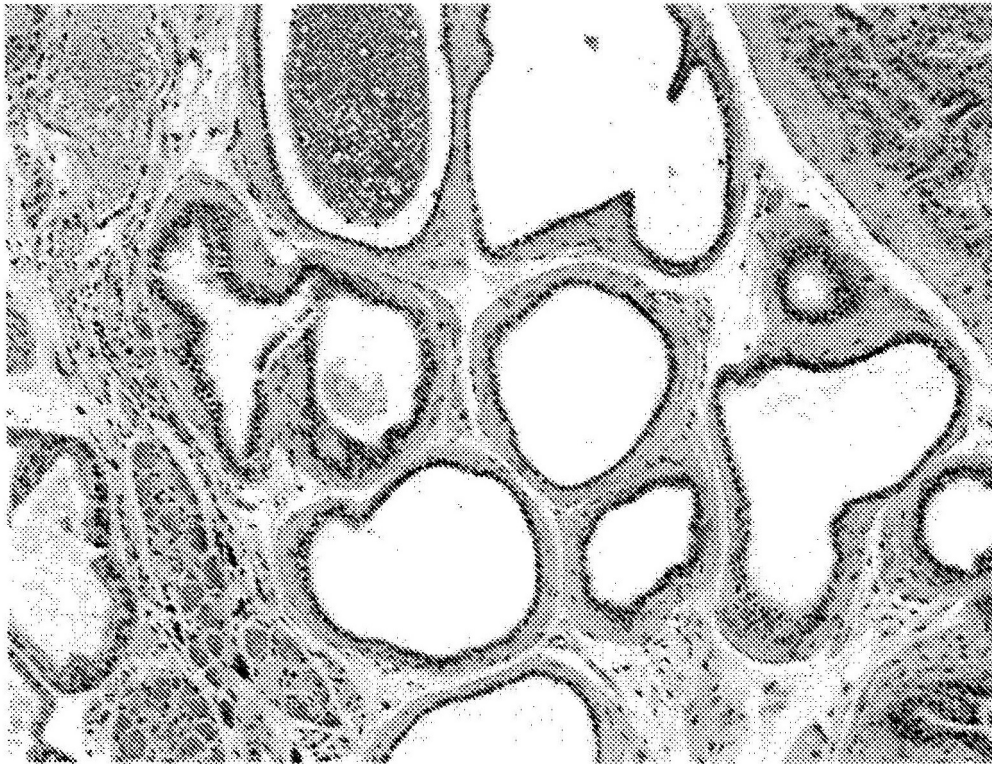
Láminas de células tumorales sin
infiltrado inflamatorio detectable



Tumor TC2 de ratón tratado
con OSOVIASAL

Células tumorales dispuestas en nidos
Infiltrado intestinal extenso de
linfocitos

Figura 9A

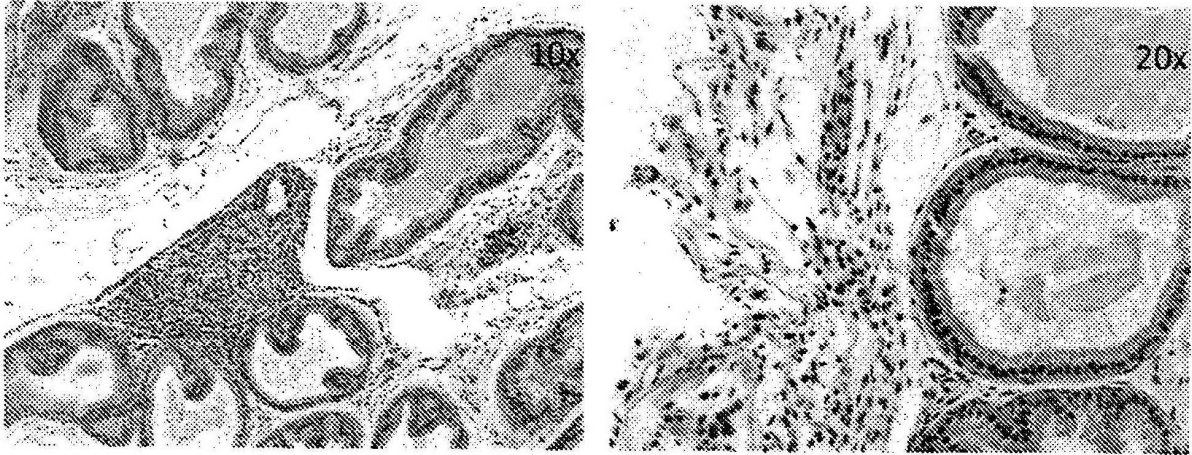


Inyección de control (PBS)

Límites normales

10x

Figura 9B



Inyección intraprostática de VSV-OSOVIASAL - Células linfoplasmáticas en tejido de estroma

Figura 10

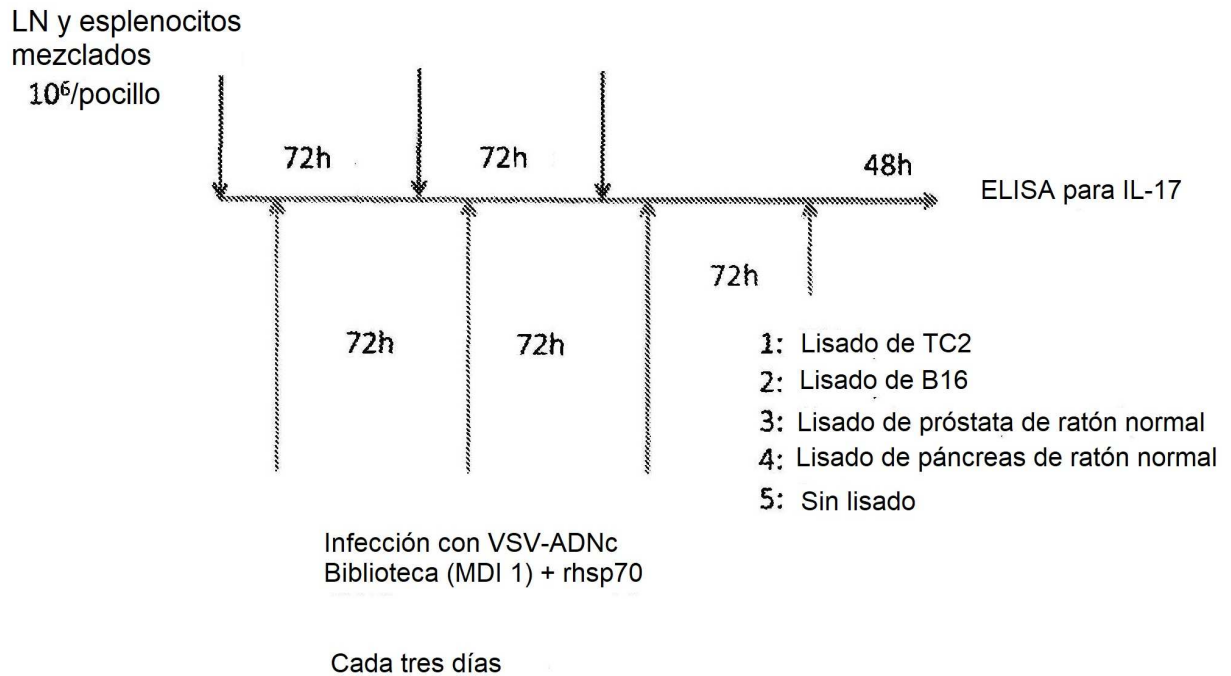


Figura 11

IL-17

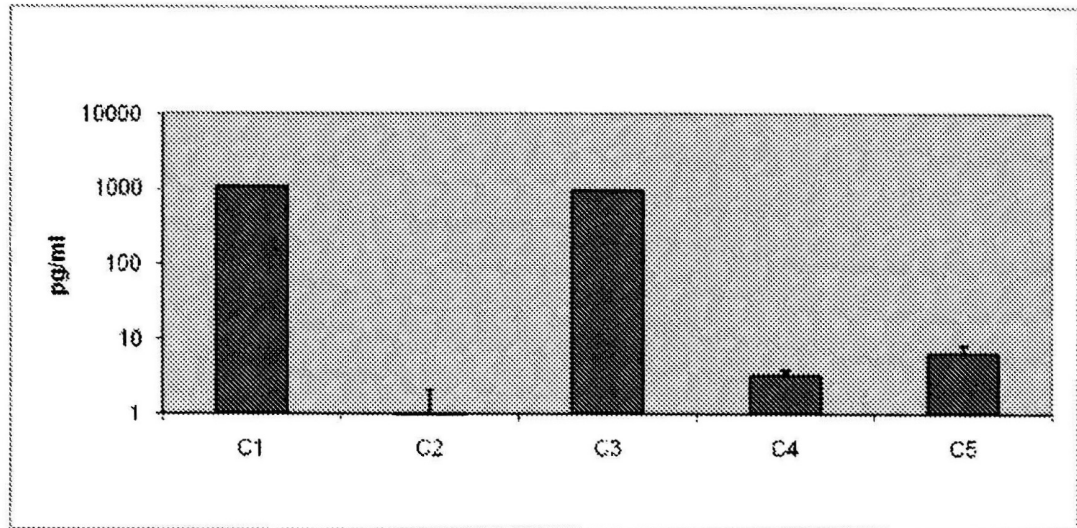


Figura 12

