

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 795 010**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)
A61K 39/245 (2006.01)
A61K 39/165 (2006.01)
A61K 35/768 (2015.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/42 (2007.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61K 35/763 (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2016 PCT/IB2016/000993**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.03.2017 WO17037523**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2016 E 16840890 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3310383**

54 Título: **Composiciones y métodos para la embolización viral**

30 Prioridad:

19.06.2015 US 201562182383 P

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

20.11.2020

73 Titular/es:

SILLAJEN, INC. (100.0%)
307 Hyowon Industry-University Cooperation
Building Busandaehak-ro 30 Beon-gil
Geumjeong-gu
Busan 609-735, KR

72 Inventor/es:

HWANG, TAE, HO;
LEE, NAM, HEE;
CHO, MONG;
JEON, UNGBAE y
BYUN, DOO, JIN

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 795 010 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

Composiciones y métodos para la embolización viral

5 Campo

La presente descripción se refiere a composiciones y métodos relacionados con la embolización transarterial con virus oncolíticos.

10 Antecedentes

15 La oclusión vascular terapéutica (embolización) es una técnica usada para tratar afecciones patológicas *in situ* mediante la inyección de un agente de oclusión (material embólico) dentro de un vaso. La embolización se realiza por medio de catéteres, lo que permite colocar agentes de oclusión particulados o geles (émbolos) en el sistema circulatorio. En la terapia de embolización activa, los agentes embólicos se formulan con agentes terapéuticos, tales como un fármaco o agente quimioterapéutico, lo que resulta en el bloqueo mecánico y en la administración *in situ* del agente terapéutico. En la terapia contra el cáncer se ha establecido, además, el uso de la embolización. Por ejemplo, los vasos sanguíneos que nutren los tumores cancerosos se bloquean deliberadamente mediante la inyección de un material embólico dentro del vaso. La oclusión vascular puede limitar la pérdida de sangre durante las intervenciones quirúrgicas, y contribuir a la necrosis tumoral y a la recesión. La combinación del agente de oclusión con un quimioterapéutico puede permitir el suministro del quimioterapéutico directamente al tumor sin un suministro sistémico significativo, lo que permite usar dosis más altas del quimioterapéutico.

25 La embolización transarterial (TAE) o la quimioembolización transarterial (TACE) se han usado ampliamente para tratar pacientes con tumores hipervasculares confinados al hígado o tumores donde el componente intrahepático es la principal fuente de morbilidad y mortalidad. Las TAE/TACE se consideran cuidados paliativos eficaces para tumores no resecables o como un adyuvante para controlar los tumores recurrentes postoperatorios (Camma y otros, (2002) *Radiology*, 224:47-54; Llovet y otros, (2002) *Lancet* 359:1734-1739; Jelic y otros, (2010) *Ann Oncol.* 21 Suppl 5:v59-v64). Se han usado diversos agentes de embolización y quimioterapéuticos, aunque no se ha demostrado una clara superioridad para ningún régimen o quimioterapia en particular (Nakamura y otros, (1994) *Cancer Chemother Pharmacol* 33 Suppl:S89-S92; Bruix y otros, (2004) *Gastroenterology* 127:S179-S188).

35 En paralelo, para el tratamiento del cáncer se están desarrollando virus oncolíticos. Por ejemplo, los virus oncolíticos de replicación selectiva son prometedores para el tratamiento del cáncer (Kirn y otros, (2001) *Nat. Med.*, 7(7):781-787). Estos virus pueden causar la muerte de las células tumorales a través de efectos oncolíticos dependientes de la replicación directa y/o de la expresión de los genes virales (Kirn y otros, (2001) *Nat. Med.*, 7(7):781-787). Además, los virus son capaces de potenciar la inducción de la inmunidad antitumoral mediada por células dentro del huésped (Todo y otros, (2001) *Cancer Res.*, 61:153-161; Sinkovics y otros, (2000) *J. Clin. Viro.*, 16:1-15). Además, estos virus pueden modificarse genéticamente para expresar transgenes terapéuticos dentro del tumor con el propósito de potenciar la eficacia antitumoral (Hermiston, (2000) *J. Clin. Invest.*, 105:1169-1172).

45 Sin embargo, existen limitaciones importantes para este enfoque terapéutico. Aunque puede demostrarse un grado de selectividad tumoral natural para algunas especies de virus, aún se necesitan nuevos enfoques para modificar genéticamente y/o mejorar la selectividad tumoral para virus oncolíticos con el propósito de maximizar la seguridad y la eficacia. Esta selectividad es particularmente importante cuando se usa la administración intravenosa, y cuando a estos virus se adicionan genes terapéuticos potencialmente tóxicos para mejorar la potencia antitumoral; la expresión génica deberá limitarse estrictamente en los tejidos normales. Además, es altamente conveniente aumentar la potencia antitumoral a través de mecanismos adicionales tales como la inducción de inmunidad antitumoral o el direccionamiento hacia la vasculatura asociada al tumor. Por lo tanto, son necesarias terapias más eficaces y menos tóxicas para el tratamiento del cáncer.

50 Se han realizado intentos iniciales para combinar la terapia viral oncolítica con la embolización. En modelos tumorales se ha evaluado una forma oncolítica del virus de la estomatitis vesicular (VSV) (Altomonte y otros, (2008) *Hepatology* 48:1864-1873). El VSV fue un candidato ideal para evaluar con embolización. El VSV, un miembro de la familia de los *rabdoviridae*, es un virus de ARN de sentido negativo de 180 nm de largo y 75 nm de ancho. El VSV entra y se libera a partir de las superficies basolaterales de las células polarizadas. La liberación basolateral del VSV le permite infectar fácilmente los tejidos subyacentes, que incluye los tejidos tumorales (Basak y otros, (1989) *J. Virology*, 63(7):3164-3167). Además, el tamaño pequeño del VSV, particularmente el diámetro de 75 nm de su eje más pequeño, permite su paso a través de las uniones defectuosas entre las células de los vasos sanguíneos, lo que permite la infección de los tejidos subyacentes y a lo largo de la superficie basolateral de las células de los vasos sanguíneos. Debido a su tamaño pequeño y su brote a través de la superficie basal, un experto en la técnica podría esperar una infección exitosa del tejido tumoral durante la embolización viral del VSV.

65 Dadas las características ideales del VSV, es difícil extrapolar a otros virus oncolíticos. Por ejemplo, los virus que tienen un diámetro a lo largo de su eje más pequeño que es más grande que las uniones entre las células de los vasos sanguíneos pueden no ser capaces de pasar desde el torrente sanguíneo a los tejidos circundantes. De manera similar,

los virus que se liberan desde el lado apical de las células polares se limitan, típicamente, a la infección a lo largo de las células epiteliales de revestimientos (Basak y otros, (1989) *J. Virology*, 63(7):3164-3167). Cuando tales virus infectan una célula de vaso sanguíneo endotelial polar, los virus que se replican simplemente podrían liberarse nuevamente hacia el torrente sanguíneo en lugar de hacia el tejido subyacente si se liberan apicalmente. El virus vaccinia es un ejemplo de un virus que tiene una serie de características indeseables de las que podrían esperarse se evitara una embolización eficaz. El virus vaccinia (VV), un miembro de la familia de los poxvirus, es un virus grande de aproximadamente 360 nm por 250 nm de tamaño. El virus vaccinia infecta, preferentemente, a través de la superficie basolateral de las células polares, pero su progenie viral se libera a partir de la superficie apical (Vermeer y otros, (2007) *J. Virology*, 81(18):9891-9899). Un virus que se libera apicalmente a partir de las células endoteliales polares que crean las paredes de los vasos sanguíneos está en riesgo de ser arrastrado por el torrente sanguíneo. Además, debido a su gran tamaño, el virus vaccinia tendría dificultades para pasar a través de las uniones celulares entre las células de las paredes de los vasos sanguíneos para llegar a la superficie basolateral de las células endoteliales y posteriormente infectar los tejidos subyacentes en cualquier cantidad sustancial. En función de su ciclo de vida y tamaño, podría no extrapolarse de los resultados del VSV al virus vaccinia oncolítico, u otros virus grandes o virus que se liberan a partir de la superficie apical, para de esa manera, ser capaces de lograr una penetración significativa en un tumor durante la embolización vascular.

Ohtake S. y otros, "Heat-stable measles vaccine produced by spray drying", *Vaccine*, vol. 28, no. 5, 3 febrero 2010, p. 1275-1284, describen una vacuna contra el sarampión, en polvo, estable al calor, el virus del sarampión formulado en una mezcla de sacarosa-trehalosa que comprende gelatina.

El documento US2003/0211165 A1 muestra microesferas adecuadas para la embolización activa que comprenden un polímero biocompatible reticulado y sustancialmente hidrófilo y un componente activo que comprende un fármaco y/o vacuna.

Resumen

Algunos aspectos de esta invención se basan en el descubrimiento de que los virus vaccinia oncolíticos, a pesar del tamaño y de la liberación apical a partir de las células polarizadas, como un virus oncolítico ilustrativo, pueden usarse de una manera sorprendentemente eficaz en combinación con la terapia de embolización. Un aspecto de la invención incluye composiciones que comprenden un virus oncolítico Poxviridae o Herpesviridae y una micropartícula biocompatible o un agente de gel de polímero hidrófilo adecuado para la embolización activa, en donde la micropartícula biocompatible o un agente de gel de polímero hidrófilo se selecciona de la lista que consiste en: almidón degradable, alcohol polivinílico, espuma de gelatina, e hidrogel de alcohol polivinílico sulfonado.

En algunas modalidades, el virus oncolítico es un virus Poxviridae seleccionado del grupo que consiste en: virus vaccinia, virus del mixoma, y parapoxvirus. En algunas modalidades, el virus oncolítico es un virus vaccinia oncolítico. En algunas modalidades, el virus vaccinia oncolítico no comprende un gen de timidina quinasa activo. En algunas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus vaccinia oncolítico, el virus vaccinia oncolítico no comprende un gen del factor de crecimiento de vaccinia activo (VGF). En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus vaccinia oncolítico, el virus vaccinia oncolítico comprende transgenes que codifican luciferasa de Renilla, proteína fluorescente verde, β -galactosidasa, y β -glucuronidasa. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus vaccinia oncolítico, el virus vaccinia oncolítico es de una cepa Copenhagen, una cepa Western Reserve, una cepa Wyeth, o una cepa Lister. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus vaccinia oncolítico, el virus vaccinia oncolítico comprende, además, una o más de una proteína de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, una proteína de citosina desaminasa, y una proteína del receptor de somatostatina tipo 2. En algunas modalidades, el virus oncolítico es un virus Herpesviridae seleccionado del grupo que consiste en: virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, y citomegalovirus. En algunas modalidades, el virus oncolítico es un virus herpes simple 1. En determinadas modalidades, el virus del herpes simple 1 se deriva de la cepa JS-1. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus del herpes simple 1, el virus del herpes simple 1 tiene uno o más de: un gen ICP34.5 inactivado, un gen ICP45 inactivado, una inserción anterior del gen US11, un gen ICP6 inactivado, un gen del factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos humano, y un gen de nitroreductasa. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus del herpes simple 1, el virus del herpes simple 1 tiene un gen ICP34.5 inactivado, un gen ICP45 inactivado, y un gen del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos humano. En algunas modalidades, el virus oncolítico es un virus del mixoma. En algunas modalidades, el virus del mixoma se deriva de la cepa Lausana. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus del mixoma, el virus de mixoma tiene uno o más genes inactivados seleccionados de: M010L, M011L, M-T5, M151R, M001R, M152R, M153R, M154L, M156R, M008.1R, M008R, M007R, M006R, M005R, M004.1R, M004R, M003.2R, M003.1R, y M002R. En algunas modalidades, el virus oncolítico es un parapoxvirus. En algunas modalidades, el parapoxvirus se deriva de una cepa del virus orf. En algunas modalidades, la cepa orf se selecciona de OV NZ-2, OV NZ-7, y OV-SA00. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un parapoxvirus, el parapoxvirus tiene una inserción de uno o más genes del rango de huéspedes heterólogos. En algunas modalidades, los genes del rango de huéspedes heterólogos se seleccionan de SPI-1, SPI-2, KIL, C7L, p28/N1R, B5R, E3L, K3L, M-T2, M-T4, M-T5, M11L, M13L, M063, y F11L. En algunas modalidades no reivindicadas, el

virus oncolítico es el virus del Sarampión. En algunas modalidades no reivindicadas, el virus del Sarampión se deriva de una cepa de Edmonston, Moraten, Leningrado, Moscú, o Schwarz. En determinadas modalidades no reivindicadas, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores no reivindicadas que incluyen un virus del Sarampión, el virus del Sarampión tiene una inserción de un gen que codifica el simportador de yoduro de sodio tiroideo humano (NIS). En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, el virus oncolítico tiene al menos 0,1 µm de diámetro a lo largo de su eje más corto. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, el virus oncolítico tiene al menos 0,2 µm de diámetro a lo largo de su eje más corto. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo se seleccionan de la lista que consiste en: almidón degradable, alcohol polivinílico, espuma de gelatina, e hidrogel de alcohol polivinílico sulfonado. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las micropartículas del agente de micropartículas biocompatibles están entre 100 µm y 2000 µm, entre 150 µm y 350 µm, entre 150 µm y 200 µm, entre 200 µm y 250 µm de tamaño, entre 250 µm y 300 µm, o entre 300 µm y 350 µm de tamaño. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles varían en tamaño de aproximadamente 0 µm a aproximadamente 100 µm, de aproximadamente 0 µm a aproximadamente 50 µm, o de aproximadamente 0 µm a aproximadamente 25 µm. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles tienen una diferencia promedio de diámetro de 100 µm o menos, aproximadamente 50 µm o menos, aproximadamente 25 µm o menos, aproximadamente 10 µm o menos o aproximadamente 5 µm o menos. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles son agregados de partículas que están entre 10 y 200 µm o entre 10 y 100 µm. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un agente de gel de polímero hidrófilo, el agente de gel de polímero hidrófilo comprende partículas que están entre 10 y 200 µm o entre 10 y 100 µm. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo es un agente embólico temporal o un agente embólico permanente.

Otro aspecto de la invención incluye composiciones que comprenden un virus oncolítico de al menos 0,1 µm de diámetro a lo largo del eje más corto del virus y una micropartícula biocompatible o gel de polímero hidrófilo adecuado para la embolización activa. En algunas modalidades, el virus oncolítico tiene al menos 0,15 µm, o al menos 0,2 µm de diámetro a lo largo de su eje más corto. En algunas modalidades, el virus oncolítico es de 0,1-0,2 µm, de 0,2-0,3 µm, de 0,3-0,4 µm, de 0,4-0,5 µm, de 0,5-0,6 µm, de 0,6-0,7 µm, de 0,1-0,7 µm, de 0,15-0,7 µm, o de 0,2-0,7 µm de diámetro a lo largo del eje más corto del virus. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo se seleccionan de la lista que consiste en: almidón degradable, alcohol polivinílico, espuma de gelatina, e hidrogel de alcohol polivinílico sulfonado. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las micropartículas del agente de micropartículas biocompatibles están entre 100 µm y 2000 µm, entre 150 µm y 350 µm, entre 150 µm y 200 µm, entre 200 µm y 250 µm de tamaño, entre 250 µm y 300 µm, o entre 300 µm y 350 µm de tamaño. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles varían en tamaño de aproximadamente 0 µm a aproximadamente 100 µm, de aproximadamente 0 µm a aproximadamente 50 µm, o de aproximadamente 0 µm a aproximadamente 25 µm. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles tienen una diferencia promedio de diámetro de 100 µm o menos, aproximadamente 50 µm o menos, aproximadamente 25 µm o menos, aproximadamente 10 µm o menos o aproximadamente 5 µm o menos. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles son agregados de partículas que están entre 10 y 200 µm o entre 10 y 100 µm. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un agente de gel de polímero hidrófilo, el agente de gel de polímero hidrófilo comprende partículas que están entre 10 y 200 µm o entre 10 y 100 µm. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo es un agente embólico temporal o un agente embólico permanente.

Aún otro aspecto de la invención incluye composiciones que comprenden un virus oncolítico que brota de una superficie apical de una célula polarizada infectada y una micropartícula biocompatible o un agente de gel de polímero hidrófilo adecuado para la embolización activa. En determinadas modalidades, el virus oncolítico tiene al menos 0,1 µm de diámetro a lo largo de su eje más corto. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, el virus oncolítico tiene al menos 0,2 µm de diámetro a lo largo de su eje más corto. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las micropartículas del agente de micropartículas biocompatibles están entre 100 µm y 2000 µm, entre 150 µm y 350 µm, entre 150 µm y 200 µm, entre 200 µm y 250 µm de tamaño, entre 250 µm y 300 µm, o entre 300 µm y 350 µm de tamaño. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles varían en tamaño de aproximadamente 0 µm a aproximadamente 100 µm, de aproximadamente 0 µm a aproximadamente 50 µm, o de aproximadamente 0 µm a aproximadamente 25 µm. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles tienen una diferencia promedio de diámetro de 100 µm o menos, aproximadamente 50 µm o menos, aproximadamente 25 µm o menos, aproximadamente 10 µm o menos o

aproximadamente 5 µm o menos. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles son agregados de partículas que están entre 10 y 200 µm o entre 10 y 100 µm. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un agente de gel de polímero hidrófilo, el agente de gel de polímero hidrófilo comprende partículas que están entre 10 y 200 µm o entre 10 y 100 µm. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo es un agente embólico temporal o un agente embólico permanente.

Aún otro aspecto de la invención incluye composiciones que comprenden un virus oncolítico y una micropartícula biocompatible o un agente de gel de polímero hidrófilo adecuado para la embolización activa, en donde la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo aumentan la producción viral de las células tumorales cultivadas in vitro en al menos un 50 %. En algunas modalidades, la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo aumentan la producción viral de las células tumorales cultivadas in vitro en al menos 75 %, al menos 100 %, al menos 150 %, al menos 200 % o al menos 300 %. En algunas modalidades, la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo aumentan la producción viral de las células tumorales cultivadas in vitro entre un 50 % y un 400 %, entre un 75 % y un 400 %, entre un 100 % y un 400 %, entre un 150 % y un 400 %, entre 200 % y 400 %, o entre 300 % y 400 %. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, la composición comprende un virus oncolítico Poxviridae o Herpesviridae y una micropartícula biocompatible o un agente de gel de polímero hidrófilo adecuado para la embolización activa. En algunas modalidades, el virus oncolítico es un virus Poxviridae seleccionado del grupo que consiste en: virus vaccinia, virus del mixoma, y parapoxvirus. En algunas modalidades, el virus oncolítico es un virus vaccinia oncolítico. En algunas modalidades, el virus vaccinia oncolítico no comprende un gen de timidina quinasa activo. En algunas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus vaccinia oncolítico, el virus vaccinia oncolítico no comprende un gen del factor de crecimiento de vaccinia activo (VGF). En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus vaccinia oncolítico, el virus vaccinia oncolítico comprende transgenes que codifican luciferasa de Renilla, proteína fluorescente verde, β-galactosidasa, y β-glucuronidasa. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus vaccinia oncolítico, el virus vaccinia oncolítico es de una cepa Copenhagen, una cepa Western Reserve, una cepa Wyeth, o una cepa Lister. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus vaccinia oncolítico, el virus vaccinia oncolítico comprende, además, una o más de una proteína de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, una proteína de citosina desaminasa, y una proteína del receptor de somatostatina tipo 2. En algunas modalidades, el virus oncolítico es un virus Herpesviridae seleccionado del grupo que consiste en: virus del herpes simple 1, virus del herpes simple 2, y citomegalovirus. En algunas modalidades, el virus oncolítico es un virus herpes simple 1. En determinadas modalidades, el virus del herpes simple 1 se deriva de la cepa JS-1. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus del herpes simple 1, el virus del herpes simple 1 tiene uno o más de: un gen ICP34.5 inactivado, un gen ICP45 inactivado, una inserción anterior del gen US11, un gen ICP6 inactivado, un gen del factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos humano, y un gen de nitroreductasa. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus del herpes simple 1, el virus del herpes simple 1 tiene un gen ICP34.5 inactivado, un gen ICP45 inactivado, y un gen del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos humano. En algunas modalidades, el virus oncolítico es un virus del mixoma. En algunas modalidades, el virus del mixoma se deriva de la cepa Lausana. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus del mixoma, el virus de mixoma tiene uno o más genes inactivados seleccionados de: M010L, M011L, M-T5, M151R, M001R, M152R, M153R, M154L, M156R, M008.1R, M008R, M007R, M006R, M005R, M004.1R, M004R, M003.2R, M003.1R, y M002R. En algunas modalidades, el virus oncolítico es un parapoxvirus. En algunas modalidades, el parapoxvirus se deriva de una cepa del virus orf. En algunas modalidades, la cepa orf se selecciona de OV NZ-2, OV NZ-7, y OV-SA00. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un parapoxvirus, el parapoxvirus tiene una inserción de uno o más genes del rango de huéspedes heterólogos. En algunas modalidades, los genes del rango de huéspedes heterólogos se seleccionan de SPI-1, SPI-2, KIL, C7L, p28/N1R, B5R, E3L, K3L, M-T2, M-T4, M-T5, M11L, M13L, M063, y F11L. En algunas modalidades no reivindicadas, el virus oncolítico es el virus del Sarampión. En algunas modalidades no reivindicadas, el virus del Sarampión se deriva de una cepa de Edmonston, Moraten, Leningrado, Moscú, o Schwarz. En determinadas modalidades no reivindicadas, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un virus del Sarampión, el virus del Sarampión tiene una inserción de un gen que codifica el simportador de yoduro de sodio tiroideo humano (NIS). En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, el virus oncolítico tiene al menos 0,1 µm de diámetro a lo largo de su eje más corto. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, el virus oncolítico tiene al menos 0,2 µm de diámetro a lo largo de su eje más corto. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo se seleccionan de la lista que consiste en: almidón degradable, alcohol polivinílico, espuma de gelatina, e hidrogel de alcohol polivinílico sulfonado. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las micropartículas del agente de micropartículas biocompatibles están entre 100 µm y 2000 µm, entre 150 µm y 350 µm, entre 150 µm y 200 µm, entre 200 µm y 250 µm de tamaño, entre 250 µm y 300 µm, o entre 300 µm y 350 µm de tamaño. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles varían en tamaño de aproximadamente 0 µm a aproximadamente 100 µm, de aproximadamente 0 µm a aproximadamente 50 µm, o de aproximadamente 0 µm a

aproximadamente 25 μm . En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles tienen una diferencia promedio de diámetro de 100 μm o menos, aproximadamente 50 μm o menos, aproximadamente 25 μm o menos, aproximadamente 10 μm o menos o aproximadamente 5 μm o menos. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles son agregados de partículas que están entre 10 y 200 μm o entre 10 y 100 μm . En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores que incluyen un agente de gel de polímero hidrófilo, el agente de gel de polímero hidrófilo comprende partículas que están entre 10 y 200 μm o entre 10 y 100 μm . En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo es un agente embólico temporal o un agente embólico permanente.

Otro aspecto de la invención incluye los métodos para la embolización activa de un sitio vascular en un mamífero, que comprende introducir en el sitio vascular del mamífero las composiciones de cualquiera de los cuatro aspectos anteriores y cualquiera de sus modalidades y combinaciones de modalidades. En determinadas modalidades, el sitio vascular está en un tumor, suministra sangre al tumor, o está próximo al tumor. En algunas modalidades, el tumor está en el hígado. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades de procedimiento, el tumor es un tumor primario o un tumor secundario. En determinadas modalidades, el tumor secundario es un melanoma maligno metastatizado. En algunas modalidades, el tumor está en el hígado. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades de procedimiento, el mamífero es un humano. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades de procedimiento, se introduce un agente de contraste en la vasculatura. En determinadas modalidades, el agente de contraste se selecciona de: metrizamida, iopamidol, iodixanol, iohexol, iopromida, iobtiridol, iomeprol, iopentol, iopamiron, ioxilan, iotrolan, gadodiamida, gadoteridol, iotrol, ioversol, o combinaciones de estos.

Aún otro aspecto de la invención incluye métodos para tratar el cáncer mediante la reducción de la masa tumoral, que comprenden introducir en un sitio vascular de un mamífero las composiciones de cualquiera de los cuatro aspectos relacionados con la composición anterior y cualquiera de sus modalidades y combinaciones de modalidades, en donde el método induce necrosis en al menos el 75 % de la masa tumoral embolizada. En determinadas modalidades, el método induce necrosis en al menos el 85 % de la masa tumoral embolizada, al menos el 90 % de la masa tumoral embolizada, o incluso al menos el 95 % de la masa tumoral embolizada. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, el sitio vascular está en un tumor, suministra sangre al tumor, o está próximo al tumor. En algunas modalidades, el tumor está en el hígado. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades de procedimiento, el tumor es un tumor primario o un tumor secundario. En determinadas modalidades, el tumor secundario es un melanoma maligno metastatizado. En algunas modalidades, el tumor está en el hígado. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades de procedimiento, el mamífero es un humano. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades de procedimiento, se introduce un agente de contraste en la vasculatura. En determinadas modalidades, el agente de contraste se selecciona de: metrizamida, iopamidol, iodixanol, iohexol, iopromida, iobtiridol, iomeprol, iopentol, iopamiron, ioxilan, iotrolan, gadodiamida, gadoteridol, iotrol, ioversol, o combinaciones de estos.

Aún otro aspecto de la invención incluye los métodos para la embolización activa de un sitio vascular en un mamífero, que comprende introducir en el sitio vascular del mamífero una composición que comprende un virus oncolítico y una micropartícula biocompatible o un agente de gel de polímero hidrófilo adecuado para la embolización activa, en donde el mamífero un día después de la etapa de introducción tiene menos de 10 ufp del virus oncolítico por mL de sangre. En determinadas modalidades, las composiciones pueden ser cualquiera de los cuatro aspectos relacionados con la composición anterior y cualquiera de sus modalidades y combinaciones de modalidades. En determinadas modalidades, el mamífero un día después de la etapa de introducción tiene menos de 5 ufp del virus oncolítico por mL de sangre o incluso menos de 2 ufp del virus oncolítico por mL de sangre. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades anteriores, el sitio vascular está en un tumor, suministra sangre al tumor, o está próximo al tumor. En algunas modalidades, el tumor está en el hígado. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades de procedimiento, el tumor es un tumor primario o un tumor secundario. En determinadas modalidades, el tumor secundario es un melanoma maligno metastatizado. En algunas modalidades, el tumor está en el hígado. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades de procedimiento, el mamífero es un humano. En determinadas modalidades, que pueden combinarse con cualquiera de las modalidades de procedimiento, se introduce un agente de contraste en la vasculatura. En determinadas modalidades, el agente de contraste se selecciona de: metrizamida, iopamidol, iodixanol, iohexol, iopromida, iobtiridol, iomeprol, iopentol, iopamiron, ioxilan, iotrolan, gadodiamida, gadoteridol, iotrol, ioversol, o combinaciones de estos.

Debe entenderse que una, algunas, o todas las propiedades de las diversas modalidades descritas en la presente descripción pueden combinarse para formar otras modalidades de la presente descripción. Estos y otros aspectos de la descripción serán evidentes para un experto en la técnica.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la producción viral de células HuH-7 infectadas con el virus JX-594 incubado previamente con Lipiodol, Adriamicina y/o Gelfoam. La producción viral se midió en sobrenadantes del cultivo celular recolectados a las 24

(Figuras 1A y B) y 48 (Figuras 1C y D) horas después de la infección a una MOI de 100 (Figuras 1A y C) o 1 (Figuras 1B y D).

La Figura 2 muestra un cronograma experimental (Figura 2A) y un plan de análisis y recolección de tejidos (Figura 2B) para la emboloterapia transcáteter con Pexa-Vec formulado con Gelfoam en un modelo de tumor de hígado en conejo.

La Figura 3 muestra imágenes representativas de CT y tinción histológica del tejido hepático de un animal de control (Figura 3A) y un animal tratado con Pexa-Vec formulado en Gelfoam (Figura 3B). La Figura 3C muestra una imagen de angiografía representativa de los conductos biliares de un animal tratado con Pexa-Vec formulado en Gelfoam.

Las Figuras 3D&E muestran imágenes representativas teñidas con H&E de la unión entre el hígado normal y los tejidos tumorales (Figura 3D) y el parénquima hepático normal (Figura 3E) en un animal tratado con Pexa-Vec formulado en Gelfoam.

La Figura 4 muestra un cronograma experimental para estudios de eficacia y farmacocinética (PK) de TAVE versus viroterapia oncolítica y embolización en un modelo de tumor en conejo.

Descripción detallada de las modalidades preferidas

Determinados aspectos de las invenciones descritas en la presente descripción se basan en el sorprendente descubrimiento de que el virus vaccinia oncolítico puede administrarse eficazmente mediante técnicas de embolización transarterial a pesar de su gran tamaño y de la infección basolateral subóptima y de la liberación apical a partir de las células epiteliales, tales como las células que forman las paredes de los vasos sanguíneos. En base a este sorprendente descubrimiento, puede extrapolarse fácilmente a otros virus oncolíticos del mismo tamaño y más pequeños y a otros virus oncolíticos de ciclos de vida subóptimos similares. Los ejemplos de virus oncolíticos incluyen virus de ADN bicatenarios, tales como virus *Poxviridae* y virus del herpes, virus mayores que 100 nm a lo largo de su eje más pequeño, y virus que brotan de la membrana apical de las células polares, tales como las células endoteliales de los vasos sanguíneos.

Determinados aspectos de las invenciones descritas en la presente descripción se basan en otras mejoras sorprendentes sobre la inyección tumoral directa de la técnica anterior y la embolización oncolítica transarterial del VSV que incluye, sin limitación, la falta de virus oncolítico de las composiciones y métodos reivindicados que se filtran en el torrente sanguíneo. Preferentemente, después de introducir o administrar el virus oncolítico como se describe en la presente descripción, el sujeto tendrá un día después de la administración menos de 10 ufp del virus oncolítico por mL de sangre, menos de 5 ufp del virus oncolítico por mL de sangre, o menos de 2 ufp del virus oncolítico por mL de sangre.

Un aspecto de la embolización con los virus oncolíticos como se describe en esta descripción es reducir la masa tumoral mediante la destrucción de células tumorales mediada por virus mucho más eficazmente que a través de la embolización transarterial o de la inyección tumoral directa del virus oncolítico solo. En modalidades preferidas, la embolización con los virus oncolíticos como se describe en esta descripción reduce la masa tumoral mediante el uso de la destrucción de células tumorales mediada por virus mucho más eficazmente que a través de cualquier embolización transarterial, quimioembolización transarterial, radioembolización transarterial, o inyección tumoral directa de virus oncolítico solo. Los virus oncolíticos de la descripción, cuando se administran con un agente embolizante, se retienen en el microambiente tumoral, lo que permite una mayor infección viral de las células cancerosas y evita que el virus oncolítico ingrese al torrente sanguíneo. La oclusión vascular transitoria y la replicación viral posteriormente resultan en necrosis tumoral en todo el microambiente tumoral, no solo en el entorno tumoral local a la vasculatura, por lo que se 'reduce' la masa tumoral sin daño observable en el tejido sano circundante. En modalidades preferidas, el método de reducción de volumen resulta en una necrosis de al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de la masa tumoral embolizada. En un aspecto, la descripción proporciona composiciones que contienen un virus oncolítico y una micropartícula biocompatible o un gel de polímero hidrófilo, adecuados para la embolización activa. En otro aspecto, la descripción proporciona un método para la embolización activa de un sitio vascular en un mamífero mediante la introducción en la vasculatura de un mamífero de un virus oncolítico y una micropartícula biocompatible o gel de polímero hidrófilo adecuados para la embolización activa.

Virus Oncolíticos

Las composiciones y los métodos descritos en esta descripción implicarán virus oncolíticos distintos del VSV. Los ejemplos de virus oncolíticos incluyen virus de ADN bicatenarios tales como el virus de la viruela y el virus del herpes. Un virus oncolítico preferido es el virus vaccinia. En un aspecto, el virus oncolítico brota de una superficie apical de una célula polarizada infectada. En una modalidad preferida, el virus oncolítico que brota de una superficie apical de una célula polarizada infectada es el virus vaccinia oncolítico. En otro aspecto, que puede combinarse con cualquiera de los aspectos anteriores, el virus oncolítico tiene al menos 0,1 µm de diámetro a lo largo del eje más corto del virus. En una modalidad, el virus oncolítico tiene al menos 0,1 µm, al menos 0,15 µm o al menos 0,2 µm de diámetro a lo largo de su eje más corto. El virus oncolítico puede ser de 0,1-0,2 µm, de 0,2-0,3 µm, de 0,3-0,4 µm, de 0,4-0,5 µm, de 0,5-0,6 µm, de 0,6-0,7 µm, de 0,1-0,7 µm, de 0,15-0,7 µm, o de 0,2-0,7 µm de diámetro a lo largo del eje más corto del virus.

A. Virus Vaccinia Oncolítico

5 En una modalidad preferida, el virus oncolítico es un virus Poxviridae, tal como el virus vaccinia oncolítico. El virus vaccinia (VV) es un virus envuelto, complejo, que tiene un genoma lineal de ADN bicatenario de aproximadamente 190K pb, y codifica aproximadamente 250 genes. El virus vaccinia es un virus grande de aproximadamente 360 nm por 250 nm de tamaño. El virus vaccinia es bien conocido por su papel como una vacuna que erradicó la viruela. Después de la erradicación de la viruela, los científicos exploraron el uso de vaccinia como una herramienta para el suministro de genes en los tejidos biológicos en la terapia génica y en las aplicaciones de ingeniería genética.

10 El virus vaccinia infecta, preferentemente, a través de la superficie basolateral de las células, pero su progenie viral se libera desde la superficie apical. Las células polarizadas incluyen, sin limitación, células epiteliales, células endoteliales, células inmunitarias, osteoclastos, neuronas, y fibroblastos.

15 El virus vaccinia y otros poxviridae son únicos entre los virus de ADN, ya que se replican solo en el citoplasma de la célula huésped. Por lo tanto, se requiere el gran genoma para codificar varias enzimas y proteínas necesarias para la replicación del ADN viral. Durante la replicación, el virus vaccinia produce numerosas formas infecciosas que difieren en sus membranas externas: el virión intracelular maduro (IMV), el virión intracelular envuelto (IEV), el virión envuelto asociado a células (CEV) y el virión envuelto extracelular (EEV). El IMV es la forma infecciosa más abundante y se cree que es responsable de la propagación entre los huéspedes. Por otro lado, se cree que el CEV desempeña un papel en la propagación de célula a célula y se cree que el EEV es importante para la diseminación a largo plazo dentro del organismo huésped. Las formas anteriores son meramente ilustrativas de las formas para el virus vaccinia oncolítico con el propósito de usar en las composiciones y los métodos en esta descripción.

20 Puede usarse cualquier cepa oncolítica del virus vaccinia como el componente del virus vaccinia de la combinación de la presente descripción. En modalidades preferidas, el virus vaccinia oncolítico de las composiciones y métodos de la presente descripción es una cepa Copenhagen, Western Reserve o Wyeth. Pueden usarse fácilmente otras cepas que incluyen, por ejemplo, cepas que circulan en Corea.

25 El virus vaccinia oncolítico de la presente descripción puede modificarse genéticamente para expresar una proteína extraña tal como el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos, o GM-CSF. El GM-CSF es una proteína secretada por los macrófagos que estimula a las células madre a producir granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, y basófilos) y macrófagos. El GM-CSF humano está glicosilado en los residuos de aminoácidos 23 (leucina), 27 (asparagina), y 39 (ácido glutámico) (ver la patente de los EE.UU. núm. 5,073,627).

30 El virus vaccinia oncolítico puede modificarse genéticamente para que carezca de uno o más genes funcionales para aumentar la selectividad del virus contra el cáncer. En un aspecto, el virus vaccinia oncolítico puede modificarse genéticamente para carecer de actividad de timidina quinasa (TK). Un virus vaccinia deficiente en TK requiere trifosfato de timidina para la síntesis de ADN, lo que conduce a una replicación preferencial en las células en división (particularmente las células cancerosas). En otro aspecto, el virus vaccinia oncolítico puede modificarse genéticamente para carecer del factor de crecimiento del virus vaccinia (VGF). Esta proteína secretada se produce temprano en el proceso de infección, y actúa como un mitógeno para preparar las células circundantes para la infección. En otro aspecto, el virus vaccinia oncolítico puede modificarse genéticamente para carecer tanto de la actividad de VFG como de TK. En otros aspectos, el virus vaccinia oncolítico puede modificarse genéticamente para carecer de uno o más genes involucrados en evadir la respuesta del interferón del huésped (IFN) tal como E3L, K3L, B18R, o B8R. En algunas modalidades, el virus vaccinia oncolítico es una cepa Western Reserve o Wyeth y carece de un gen funcional de TK. En otras modalidades, el virus vaccinia oncolítico es una cepa Western Reserve que carece de un gen B18R y/o B8R funcional.

35 En algunas modalidades, el virus vaccinia oncolítico carece de un gen funcional de TK y expresa GM-CSF humano. En una modalidad preferida, el virus vaccinia oncolítico es un virus vaccinia oncolítico de la cepa Wyeth que carece de un gen TK funcional y expresa GM-CSF humano.

40 En una modalidad particularmente preferida, el virus vaccinia oncolítico es JX-594. El JX-594 es un virus vaccinia recombinante, competente en replicación, derivado de la cepa vaccinia de la Junta de Salud de Nueva York que se vendió comercialmente como Dryvax® (Laboratorios Wyeth), que ahora se conoce comúnmente como virus vaccinia de la cepa Wyeth. El JX-594 se obtuvo mediante la inserción de los genes para el GM-CSF humano y la B-galactosidasa de *E. coli* en el gen de la timidina quinasa (TK) del virus (bajo el control de los promotores sintéticos temprano-tardío y p7.5, respectivamente), de esta manera el gen TK se torna inactivo. Se ha demostrado que la inactivación del gen TK disminuye la virulencia del virus vaccinia y aumenta la replicación específica en el tumor. El JX-594 ha demostrado replicación y expresión de GM-CSF, asociada con respuestas tumorales en pacientes en ensayos clínicos a través de la administración intratumoral e intravenosa a dosis de hasta 1×10^9 ufp/dosis.

45 En algunas modalidades, el virus vaccinia oncolítico es el SJ103 β (también conocido como vvDD-CDSR). El virus vvDD-CDSR es un virus vaccinia oncolítico selectivo de replicación, con delecciones dobles en los genes TK y factor de crecimiento de vaccinia (VGF). El vvDD-CDSR se obtiene mediante la inserción de citosina desaminasa (CD), receptor de somatostatina humana tipo 2 (SSTR2) y gpt en el gen TK de la cepa Western Reserve (WR) del virus Vaccinia (bajo el control de los promotores sintéticos temprano-tardío, sintético tardío, y p7.5, respectivamente). La β -galactosidasa de *E. coli* se inserta con recombinación homóloga en el gen VGF. Se ha demostrado que la inactivación tanto del gen TK

como del VGF disminuye la virulencia del virus vaccinia por seguridad, así como también potencia la replicación específica en el tumor en beneficio de la selectividad. La inactivación de uno o ambos puede lograrse mediante tales inserciones, mediante mutaciones que inactivan y/o delección parcial o completa del gen. En algunas modalidades, el virus vaccinia oncolítico es wDD. El vvDD es un virus vaccinia oncolítico selectivo de replicación con doble disrupción de los genes TK y VGF, de la cepa parental WR. La inactivación de ambos genes aumenta la especificidad del tumor para la replicación viral y atenúa el virus en beneficio de la seguridad. En algunas modalidades, el virus vaccinia oncolítico es el SJ-102. El SJ-102 es un virus vaccinia recombinante competente en la replicación, derivado de la cepa Wyeth-calf adaptado de la cepa del Departamento de Salud de la Ciudad de Nueva York. La cepa parental Wyeth del virus vaccinia se modificó genéticamente mediante la inserción de gpt y de la proteína fluorescente verde (GFP) en el locus TK para producir el virus SJ-102. El gpt es un marcador de selección, controlado bajo el promotor viral temprano-tardío p7.5 y confiere resistencia a un inhibidor de la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa. El GFP es otro marcador de selección visual y se controla bajo un promotor sintético temprano-tardío pSE/L. En algunas modalidades, el virus vaccinia oncolítico es el SJ-103. El virus vaccinia parental para el virus recombinante SJ-103 es la cepa Western Reserve (WR). La cepa Western Reserve se deriva de la cepa Wyeth mediante varios pasos en ratones para mejorar la selectividad tumoral en una línea celular de ratón y aumentar el efecto oncolítico in vitro. El gen de la timidina quinasa (TK) de la cepa WR se interrumpe al insertar gpt y la proteína verde fluorescente (GFP) para producir el virus SJ-103. El gpt se controla bajo el promotor viral temprano-tardío p7.5 y la GFP se controla bajo un promotor sintético temprano-tardío pSE/L. En algunas modalidades, el virus vaccinia oncolítico es WR TK(-). El virus vaccinia parental para el virus recombinante WR TK(-) es la cepa Western Reserve (WR). El gen de la timidina quinasa de la cepa WR se interrumpe en WR TK(-) mediante la inserción de un marcador de selección. En algunas modalidades, el virus vaccinia oncolítico es una variante de la cepa Lister del Instituto de Preparaciones Virales (LIVP). En algunas modalidades, el virus vaccinia oncolítico es GL-ONC1 (Genelux), también conocido como GLV-1h68 o RVGL21. El GL-ONC1 es un virus vaccinia atenuado modificado genéticamente de la cepa LIVP que transporta los transgenes que codifican la luciferasa de Renilla, la proteína verde fluorescente (ambas insertadas en el locus F14.5L), la β -galactosidasa (insertada en el locus J2R, que codifica la timidina quinasa), y B-glucuronidasa (insertada en el locus A56R, que codifica la hemaglutinina). En algunas modalidades, el virus vaccinia oncolítico es WR Δ B18R luc+. El WR Δ B18R luc+ es el virus vaccinia WR con el gen B18R delecionado y un gen de luciferasa insertado en el gen TK.

El virus vaccinia puede propagarse mediante el uso de los métodos descritos por Earl y Moss (Ausubel y otros, (1994) Current Protocols in Molecular Biology, páginas 16.15.1 a 16.18.10) o los métodos descritos en la publicación de la OMPI Núm. WO2013/022764.

B. Otros poxvirus

El género Orthopoxvirus es relativamente más homogéneo que otros miembros de la subfamilia Chordopoxvirinae e incluye 11 especies distintas pero estrechamente relacionadas, que incluyen las especies de virus tales como el virus vaccinia, el virus variola (agente causal de la viruela), el virus de la viruela de las vacas, el virus de la viruela del búfalo, el virus de la viruela del mono, el virus de la viruela del ratón y la viruela del caballo, así como también otras (ver Moss, (1996) Fields Virology, 3:3637-2672). Determinadas modalidades de la presente descripción, como se describe en la presente descripción, pueden extenderse a otros miembros del género Orthopoxvirus, así como también a los géneros Parapoxvirus, Avipoxvirus, Capripox-virus, Leporipoxvirus, Suipoxvirus, Molluscipoxvirus, y Yatapoxvirus. Un género de la familia de los poxvirus se define generalmente por medios serológicos que incluyen la neutralización y la reactividad cruzada en animales de laboratorio. Varios miembros del género Orthopoxvirus, así como también otros miembros de la subfamilia Chordovirinae, utilizan moléculas inmunomoduladoras, ejemplos de las cuales se proporcionan en la presente descripción, para contrarrestar las respuestas inmunitarias de un organismo huésped. Por lo tanto, la presente descripción descrita en la presente descripción no se limita al virus vaccinia, sino que puede aplicarse a varios virus.

Virus del Mixoma

En una modalidad, el virus oncolítico para usar en las composiciones y los métodos de esta descripción es el virus del Mixoma. El virus del mixoma ("MV") es el agente causante de la mixomatosis en conejos. El MV pertenece al género Leporipoxvirus de la familia Poxviridae, el más grande de los virus de ADN. El MV induce una enfermedad benigna en su huésped natural, el conejo *Sylvilagus* en las Américas. Sin embargo, es un poxvirus virulento y específico del huésped que causa una enfermedad mortal en conejos europeos, caracterizada por lesiones que se encuentran sistémica y específicamente alrededor de las áreas mucosas. (Cameron C, Hota-Mitchell S, Chen L, Barrett J, Cao J X, Macaulay C, Wilier D, Evans D, McFadden G. Virology 1999, 264(2): 298-318; Kerr P & McFadden G. Viral Immunology 2002, 15(2): 229-246).

El MV es un virus grande con un genoma de ADN bicatenario de 163 kb que se replica en el citoplasma de las células infectadas (B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, Eds., Virology Lippincott Raven Press, Nueva York, 2da ed., 1996). Se conoce que el MV codifica una diversidad de proteínas secretadas y asociadas a las células que se han implicado en la regulación negativa de las respuestas inmunitarias e inflamatorias del huésped y en la inhibición de la apoptosis de las células infectadas por virus. El MV puede ser captado por todas las células somáticas humanas. El MV puede infectar y matar las células cancerosas, que incluye las células tumorales humanas.

El virus del Mixoma puede ser cualquier virus que pertenezca a la especie de virus de la viruela Leporipoxvirus que sea competente en la replicación. El virus del Mixoma puede ser una cepa de tipo silvestre del virus del Mixoma o puede ser una cepa modificada genéticamente del virus del Mixoma.

5 El genoma del virus del Mixoma puede modificarse fácilmente para expresar uno o más transgenes terapéuticos mediante el uso de técnicas estándar de biología molecular conocidas por el experto, y descritas, por ejemplo, en Sambrook y otros, ((2001) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3ra ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press). Un experto será capaz de determinar fácilmente qué partes del genoma viral del Mixoma pueden delecionarse de manera que el virus aún sea capaz de una infección productiva. Por ejemplo, las regiones no esenciales del genoma viral que pueden delecionarse pueden deducirse de la comparación de la secuencia del genoma viral publicada con los genomas de otros virus bien caracterizados (ver, por ejemplo, C. Cameron, S. Hota-Mitchell, L. Chen, J. Barrett, J.-X. Cao, C. Macaulay, D. Willer, D. Evans, and G. McFadden, *Virology* (1999) 264: 298-318)).

15 En algunas modalidades, el virus del Mixoma oncolítico es el vMyxIac: una cepa de Lausana recombinante que contiene el gen *lacZ* de *E. coli* insertado en un sitio inocuo entre los marcos abiertos de lectura M010L y M011L. En algunas modalidades, el virus del Mixoma oncolítico es vMyxT5KO, un virus recombinante con copias del gen M-T5 sustituido por *lacZ*. En algunas modalidades, el virus del Mixoma oncolítico es el SG33, también conocido como CNM 1-1594. El virus SG33 contiene una delección de aproximadamente 15 kb en la porción derecha de su genoma. En comparación con una cepa de Lausana de referencia, los genes M151R y M001R solo se eliminan parcialmente, lo que produce proteínas truncadas inactivas. Los genes M152R, M153R, M154L, M156R, así como también los genes para el ITR derecho M008.1R, M008R, M007R, M006R, M005R, M004.1R, M004R, M003.2R, M003.1R, y M002R se delecionan completamente. Otra alteración entre el genoma de la cepa SG33 y la de la cepa Lausanne de referencia está al nivel del gen M011L (posiciones 14125-13628 en el genoma de la cepa Lausanne), que codifica un inhibidor de la apoptosis (M11L, GenBank NP_051725). Es posible usar un virus del Mixoma modificado atenuado que exprese un gen conveniente (por ejemplo, un gen terapéutico del tipo de timidina quinasa de herpesvirus o FCU1, que se produce a partir de la fusión entre los genes que codifican la citosina desaminasa y la fosforribosiltransferasa de uracilo) (ERBS y otros, *Cancer Gene Therapy*, 15, 18-28, 2008). Los virus del Mixoma modificados atenuados para expresar un gen de interés se describen en FR2736358.

30 Parapoxvirus

En una modalidad, el virus oncolítico para usar en las composiciones y los métodos de esta descripción es el Parapoxvirus. El virus Parapoxvirus orf es un poxvirus que induce lesiones cutáneas agudas en diferentes especies de mamíferos, que incluye los humanos. El virus Parapoxvirus orf infecta de manera natural a las ovejas, las cabras y los humanos a través de la piel rota o dañada, se replica en las células epidérmicas en regeneración e induce lesiones pustulares que se convierten en costras. El virus parapoxvirus orf codifica el gen OV20.0L que está involucrado en el bloqueo de la actividad PKR. El virus parapoxvirus orf es incapaz de replicarse en células que no tienen una vía Ras activada. Un virus oncolítico más preferido es un "virus parapoxvirus orf atenuado" o "virus parapoxvirus orf modificado", en el que el producto o productos génicos que evitan la activación de PKR están ausentes, inhibidos o mutados de manera que no se bloquea la activación de PKR. Preferentemente, el gen OV20.0L no se transcribe. Tales virus parapoxvirus orf atenuados o modificados no podrían replicarse en células normales que no tienen una ruta Ras activada, pero son capaces de infectar y replicarse en células que tienen una ruta Ras activada.

45 En algunas modalidades, el Parapoxvirus oncolítico es una cepa de virus orf seleccionada de OV NZ-2 (Nueva Zelanda-2), OV NZ-7 (Nueva Zelanda-7) y OV-SA00. En algunas modalidades, el Parapoxvirus oncolítico es un virus orf recombinante (ORFV) que contiene uno o más genes del rango de huésped heterólogo, en donde dichos genes permiten la replicación del virus en las células humanas. Los genes del rango de huésped heterólogo pueden incluir, sin limitación, SPI-1, SPI-2, KIL, C7L, p28/N1R, B5R, E3L, K3L, M-T2, M-T4, M-T5, M11L, M13L, M063, y F11L.

50 C. Herpesvirus

Virus del herpes simple

55 En un aspecto, la descripción proporciona una composición que contiene un virus oncolítico y una micropartícula biocompatible o gel de polímero hidrófilo adecuado para la embolización activa. En una modalidad, el virus oncolítico es un virus Herpesviridae, tal como el virus del herpes simple 1 (HSV-1) o el virus del herpes simple 2 (HSV-2). Los virus herpesviridae humanos incluyen el virus del herpes simple 1 ("HSV-1"), el virus del herpes simple 2 ("HSV-2"), el citomegalovirus humano ("HCMV"), el virus de Epstein-Barr ("EBV"), el sarcoma de Kaposi ("HHV-8"), roseolovirus-6A ("HHV-6A") y roseolovirus-6B ("HHV-6B").

60 El virión HSV es un virus envuelto, grande (120 a 300 nm de diámetro), con una cápside icosaédrica. Tiene ADN bicatenario con un genoma que codifica al menos 70 polipéptidos. Esta gran cantidad de información reguladora permite al virus controlar su propia expresión génica y modificar múltiples eventos complejos dentro de la célula infectada. El virus del herpes simple ingresa al huésped mediante el contacto directo, se propaga solo a un tejido diana, se propaga dentro del huésped a través del flujo axonal neuronal, se dirige a los ganglios de la raíz dorsal y después de la recuperación del

huésped de una infección aguda, permanece latente en el tejido diana. La propagación limitada hace que el HSV sea un buen candidato para un virus oncolítico.

5 En el HSV, las mutaciones que permiten la actividad oncolítica selectiva incluyen la mutación a los genes que codifican ICP34.5, ICP6 y/o timidina quinasa (TK), preferentemente ICP34.5. Tales mutaciones en el gen que codifica ICP34.5 en las cepas del HSV de laboratorio se describen en Chou y otros, 1990, Maclean y otros, 1991, aunque puede usarse cualquier mutación en la que ICP34.5 no sea funcional. Por consiguiente, en una cepa de HSV, los virus se modifican, preferentemente, de manera que carezcan de uno o más de un gen que codifica ICP34.5 funcional, un gen que codifica ICP6 funcional, un gen que codifica la glicoproteína H funcional, un gen que codifica timidina quinasa funcional; o en una cepa no HSV, el virus carece de un gen funcional equivalente a uno de dichos genes del HSV. Con mayor preferencia, el virus carece de un gen que codifica ICP34.5 funcional. Además, pueden hacerse otras modificaciones. En particular, el virus del HSV puede modificarse de manera que carece de un gen ICP47 funcional. Esto se debe a que ICP47 habitualmente funciona para bloquear la presentación del antígeno en las células infectadas con HSV, por lo que su interrupción conduce a un virus que no confiere a las células tumorales infectadas propiedades particulares que podrían proteger a tales células infectadas con HSV del sistema inmunitario del huésped. Además, el virus HSV puede modificarse para expresar el gen humano GM-CSF. El GM-CSF secretado o liberado de cualquier otra manera puede atraer células dendríticas al tumor lo que mejora la respuesta inmunitaria contra las células tumorales.

20 Cuando el virus de la invención es un virus del herpes simple, el virus puede derivarse, por ejemplo, de las cepas HSV1 o HSV2, o derivados de estas, preferentemente HSV1. Una cepa HSV-1 preferida es JS-1, que puede modificarse mediante la inactivación de los genes ICP34.5 e ICP47 y la adición del GM-CSF humano (*por ejemplo*, Senzer y otros, JCO (2009) 27(34): 5763-5771). En algunas modalidades, el HSV-1 de tipo silvestre se obtiene de la ATCC (VR-735) y no se realiza la modificación genética. En algunas modalidades, la cepa HSV-1 es MP (cepa mutante del virus del Herpes Simple tipo 1). En algunas modalidades, el virus HSV-1 es Talimogene laherparepvec, también conocido como OncoVEX GMCSF o T-VEC (AMGEN). El T-VEC se produjo mediante la modificación de la cepa parental HSV-1 JS-1 para atenuar el virus y aumentar la selectividad por las células cancerosas. La cepa JS-1 se modificó mediante la delección de los genes ICP34.5 e ICP47 (para prevenir la infección de las células no tumorales y permitir la presentación del antígeno, respectivamente), la inserción temprana del gen US11 (para aumentar la replicación y la capacidad oncolítica), y la inserción del gen humano GM-CSF (para aumentar la respuesta inmunitaria antitumoral). En algunas modalidades, el virus HSV-1 oncolítico es HSV1716, también conocido como SEPREHVIR. La cepa HSV1716 contiene una delección del gen ICP34.5, lo que permite la replicación selectiva en las células tumorales. En algunas modalidades, el virus HSV-1 es HSV1716NTR, un virus oncolítico generado mediante la inserción de la enzima nitroreductasa (NTR) en el virus HSV1716 como una estrategia de terapia de profármaco enzimático dirigido a genes (GDEPT). En algunas modalidades, el virus HSV-1 es G207, un virus oncolítico derivado mediante la delección del gen ICP34.5 e inactivación del gen ICP6 mediante la inserción del gen LacZ de E. coli en una cepa parental F. de HSV-1 de laboratorio. En algunas modalidades, el virus HSV-1 es NV1020, un virus oncolítico derivado mediante la delección de una copia del gen ICP34.5.

40 Los derivados incluyen recombinantes entre tipos que contienen ADN de las cepas HSV1 y HSV2. Tales recombinantes entre tipos se describen en la técnica, por ejemplo, en Thompson y otros, (1998) y Meignier y otros, (1988). Un derivado puede tener la secuencia de un genoma de HSV1 o HSV2 modificado mediante las sustituciones de nucleótidos, por ejemplo de 1, 2 o 3 hasta 10, 25, 50 o 100 sustituciones. El genoma de HSV1 o HSV2 puede modificarse de forma alternativa o adicionalmente mediante una o más inserciones y/o delecciones y/o mediante una extensión en uno o ambos extremos.

45 Citomegalovirus

En una modalidad, el virus oncolítico para usar en las composiciones y métodos de la descripción es el citomegalovirus. El citomegalovirus (CMV), también conocido como herpesvirus humano 5 (HHV-5), es un virus del herpes clasificado como un miembro de la subfamilia beta de herpesviridae. De acuerdo con los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, la infección por CMV se encuentra de manera bastante ubicua en la población humana, y se estima que entre el 40 y el 80 % de la población adulta de los Estados Unidos se ha infectado. El virus se transmite principalmente a través de fluidos corporales y con frecuencia se transmite de las madres embarazadas al feto o al recién nacido. En la mayoría de las personas, la infección por CMV es latente, aunque la activación del virus puede provocar fiebre alta, escalofríos, fatiga, dolores de cabeza, náuseas, y esplenomegalia.

55 Aunque la mayoría de las infecciones humanas por CMV son asintomáticas, las infecciones por CMV en individuos inmunocomprometidos (tales como los pacientes VIH positivos, pacientes con trasplante alogénico y pacientes con cáncer) o personas cuyo sistema inmunitario no se ha desarrollado aun completamente (tales como los recién nacidos) pueden ser particularmente problemáticas (Mocarski y otros, Cytomegalovirus, in Field Virology, 2701-2772, Editor: Knipes and Howley, 2007). La infección por CMV en tales individuos puede causar morbilidad severa, que incluye neumonía, hepatitis, encefalitis, colitis, uveítis, retinitis, ceguera, y neuropatía, entre otras afecciones perjudiciales. Además, la infección por CMV durante el embarazo es una causa principal de defectos congénitos (Adler, 2008 J. Clin Virol, 41:231; Arvin y otros, 2004 Clin Infect Dis, 39:233; Revello y otros, 2008 J Med Virol, 80:1415). El CMV infecta varias células *in vivo*, que incluye monocitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células endoteliales, células epiteliales, fibroblastos, neuronas, células de músculo liso, hepatocitos, y células del estroma (Plachter y otros, 1996, Adv. Virus Res. 46:195). Aunque los aislamientos clínicos de CMV se replican en una diversidad de tipos celulares, las cepas de

laboratorio AD 169 (Elek & Stem, 1974, Lancet 1:1) y Towne (Plotkin y otros, 1975, Infect. Immun. 12:521) se replican casi exclusivamente en fibroblastos (Hahn y otros, 2004, J. Virol. 78:10023). La restricción en el tropismo, que resulta de los pases seriados y la eventual adaptación del virus en fibroblastos, se estipula como un marcador de atenuación (Gerna y otros, 2005, J. Gen. Virol. 86:275; Gerna y otros, 2002, J. Gen. Virol. 83:1993; Gerna y otros, 2003, J. Gen. Virol. 84:1431; Dargan y otros, 2010, J. Gen. Virol. 91:1535). Las mutaciones que causan la pérdida del tropismo por las células epiteliales, células endoteliales, leucocitos y células dendríticas en cepas de laboratorio del CMV humano se han mapeado en tres marcos abiertos de lectura (ORF): UL128, UL130, y UL131 (Hahn y otros, 2004, J. Virol. 78:10023; Wang and Shenk, 2005 J. Virol. 79:10330; Wang and Shenk, 2005 Proc Natl Acad Sci USA. 102:18153). Los estudios bioquímicos y de reconstitución muestran que UL128, UL130 y UL131 se ensamblan en un andamio gH/gL para formar un complejo pentamérico gH (Wang and Shenk, 2005 Proc Natl Acad Sci USA. 102:1815; Ryckman et al, 2008 J. Virol. 82:60). La restauración de este complejo en viriones restablece el tropismo epitelial viral en las cepas de laboratorio (Wang and Shenk, 2005 J. Virol. 79:10330). Se sospecha que la pérdida del tropismo endotelial y epitelial es una deficiencia en las vacunas evaluadas anteriormente tal como Towne (Gerna y otros, 2002, J. Gen. Virol. 83:1993; Gerna y otros, 2003, J. Gen. Virol. 84:1431). Los anticuerpos neutralizantes en sueros de sujetos humanos con infección natural por CMV tienen una actividad más de 15 veces más alta contra la entrada del virus en células epiteliales que con respecto a la entrada del virus en los fibroblastos (Cui y otros, 2008 Vaccine 26:5760). Los humanos con infección primaria desarrollan rápidamente anticuerpos neutralizantes contra la entrada del virus al endotelio y epitelio, pero solo desarrollan lentamente anticuerpos neutralizantes contra la entrada del virus a los fibroblastos (Gerna y otros, 2008 J. Gen. Virol. 89:853). Además, la actividad neutralizante contra la entrada del virus al epitelio y endotelio está ausente en los sueros de la respuesta inmunitaria de sujetos humanos que recibieron la vacuna Towne (Cui y otros, 2008 Vaccine 26: 5760). Más recientemente, se describió un panel de anticuerpos monoclonales humanos de cuatro donantes con infección por HCMV, y los clones neutralizantes más potentes del panel reconocieron los antígenos del complejo pentamérico gH (Macagno y otros, 2010 J. Virol. 84:1005).

25 D. *Virus del Sarampión*

En una modalidad no reivindicada, el virus oncolítico para usar en las composiciones y los métodos de esta descripción es el virus del Sarampión. Los viriones del Sarampión son grandes y pleitrópicos con diámetros de hasta ~ 550 nm. El virus del Sarampión es un virus de ARN de cadena negativa cuyo genoma codifica seis productos proteicos, las proteínas N (nucleocápsida), P (fosfoproteína cofactor de polimerasa), M (matriz), F (fusión), H (hemaglutinina) y L (ARN polimerasa grande). La proteína H es una glucoproteína de superficie que media la unión del virus del sarampión a su receptor, CD46 (Dorig, y otros, Cell 75: 295-305, 1993). La proteína F es responsable de la fusión célula a célula después de que se haya producido la unión viral. El virus del Sarampión tiene un tropismo natural por las células linfoides y, en particular, por las células linfoides cancerosas.

La selectividad tumoral del virus se debe a restricciones intracelulares del ciclo de vida del virus que inhiben fuertemente la propagación del virus en células no transformadas, pero que se anulan por factores celulares presentes en las células neoplásicas (Robbins, y otros, Virology 106: 317-326, 1980; Robbins, Intervirology 32: 204-208, 1991). La infectividad del Sarampión de las células linfoides causa un efecto citopático muy característico. Las células gigantes multinucleadas se desarrollan durante la replicación del virus del sarampión en los ganglios linfáticos como resultado de la fusión célula a célula en masa (Warthin, Arch. Pathol. 11: 864-874, 1931). En el cultivo de tejidos, la infección con el virus del sarampión puede causar la fusión de una monocapa completa de células. Los antígenos F y H se encuentran en la superficie de las células infectadas. Por lo tanto, las células que están infectadas por el virus del sarampión y cuyas membranas expresan las proteínas F y H se vuelven altamente fusogénicas y pueden causar la fusión no solo de otras células infectadas sino también de las células vecinas que no están infectadas (Norrby and Oxman, "Measles Virus." En Virology, 1990, B. N. Fields, y otros, eds. Nueva York, Raven Press, Ltd., pp 1013-1044). La expresión de antígenos virales en la superficie de una célula tumoral puede mediar, además, una respuesta inmunitaria específica al tumor.

Puede obtenerse una cepa de virus atenuada mediante el pase seriado del virus en cultivo celular (por ejemplo, en células no humanas), hasta que se identifique un virus que sea inmunogénico pero no patógeno. Si bien el virus de tipo silvestre causará una infección fatal en los monos típicos, las cepas de vacuna no lo hacen. En los humanos, la infección con cepas virales de tipo silvestre generalmente no es mortal, pero se asocia con la enfermedad clásica del sarampión. La enfermedad clásica del sarampión incluye un período de latencia de 10-14 días, seguido de un síndrome de fiebre, coriza, tos, y conjuntivitis, seguido de la aparición de una erupción maculopapular y manchas de Koplik (pequeñas manchas rojas, de forma irregular y centros azul blanquecino que se encuentran dentro de la boca). El inicio de la erupción coincide con la aparición de una respuesta inmunitaria y con el comienzo de la eliminación del virus. En contraste, las personas que reciben una vacuna atenuada del virus del sarampión no muestran los síntomas clásicos de sarampión. La atenuación se asocia con una disminución de la replicación viral (medida *in vivo* por la incapacidad de causar sarampión en los monos), disminución de la viremia, y la incapacidad para inducir efectos citopatológicos en los tejidos (por ejemplo, la fusión célula a célula, las células multinucleadas). Sin embargo, estos cambios biológicos no se han asociado a ningún cambio genético único en el genoma del virus.

Una cepa atenuada del virus del sarampión que se ha evaluado clínicamente como una vacuna contra la infección por sarampión se usó para proporcionar una dosis eficaz que limitará y/o causará la regresión de un grupo de células cancerosas, tales como un tumor. La forma atenuada del virus Moraten se ha usado en todo el mundo como una vacuna y tiene un excelente historial de seguridad (Hilleman, y otros, J. Am. Med. Assoc. 206: 587-590, 1968). Por consiguiente,

en una modalidad de la invención, la cepa de Moraten se usa para proporcionar una dosis eficaz. La vacuna Moraten está disponible comercialmente en Merck® y se proporciona liofilizada en un vial que, cuando se reconstituye a 0,5 mL, comprende 103 ufp/mL. Una vacuna contra la cepa Moraten Berna está disponible en el Instituto Suizo de Sueros y Vacunas de Berna.

5 En otra modalidad no reivindicada de la invención, se usa la cepa Edmonston-B (MV-Edm) de vacuna contra el virus del sarampión (Enders and Peebles, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86: 277-286, 1954). El virus de la cepa MV-Edm crece eficientemente en células tumorales, pero su crecimiento se restringe severamente en cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica humana, fibroblastos dérmicos normales, y células vasculares de músculo liso. Una forma de la cepa Edmonston atenuada de Enders, se comercializa por Merck (Attenuvax®). En algunas modalidades, el virus del sarampión es MV-NIS. El MV-NIS es un virus del sarampión que codifica el simportador de yoduro de sodio tiroideo humano (MV-NIS). El virus del sarampión para MV-NIS es una cepa Edmonston (ED) oncolítica atenuada. El MV-NIS es destructivo selectivamente para las células plasmáticas de mieloma y a partir de las células infectadas con MV-NIS pueden obtenerse imágenes mediante la absorción de yodo 123 (I-123).

10 Otras cepas atenuadas del virus del sarampión se incluyen, además, dentro del alcance de la invención no reivindicada, tales como las cepas Leningrado-16, y Moscú-5 (Sinitsyna, y otros, Res. Virol. 141(5): 517-31, 1990), la cepa Schwarz (Fourrier, y otros, *Pediatric* 24(1): 97-8, 1969), la cepa 9301B (Takeda, y otros, *J. VIROL.* 72/11: 8690-8696), la cepa AIK-C (Takehara, y otros, *Virus Res* 26 (2): 167-75, 1992 November), y las descritas en Schneider-Shaulies, y otros, *PNAS* 92(2): 3943-7, 1995.

15 En otra modalidad no reivindicada de la invención, el virus del sarampión se proporciona en una composición que comprende una mezcla de virus oncolíticos atenuados. En una modalidad, se usa la vacuna contra las paperas, el sarampión y la rubéola (MMR). La vacuna MMR se introdujo en los Estados Unidos en 1972 y en el Reino Unido en 1998. Las preparaciones disponibles comercialmente de la vacuna MMR pueden obtenerse de Merck, Pasteur Merieux Connaught, o SmithKline Beecham, y además, contienen la cepa Moraten del virus del sarampión atenuado a un título mínimo de 1 UFP/mL. En otra modalidad no reivindicada de la invención, el virus del sarampión se proporciona en una composición que comprende la cepa de sarampión Edmonston Zagreb (una cepa atenuada que se obtiene de la cepa Edmonston-enders) y la cepa de rubéola Wistar RA 27/3 (Instituto Suizo de Sueros y Vacunas de Berna). Debería ser evidente para los expertos en la técnica que cualquier vacuna de sarampión evaluada clínicamente es aceptable para usar en la invención, y está comprendida dentro del alcance de la invención.

20 En otra modalidad no reivindicada de la invención, los virus del sarampión recombinantes que comprenden modificaciones genéticas se derivan del virus del sarampión de tipo silvestre para generar virus atenuados, por ejemplo, virus que tienen una alta inmunogenicidad (medida por seroconversión del 70-100 %) y no patogénicos (por ejemplo, no producen los síntomas clásicos del sarampión, como se discutió anteriormente). En una modalidad de la invención, las modificaciones genéticas se introducen mediante mutagénesis aleatoria de un plásmido que comprende la secuencia de un virus del sarampión de tipo silvestre. Las secuencias de los aislamientos de tipo silvestre se describen en la patente de los EE.UU. núm. 5,578,448.

25 En otra modalidad no reivindicada de la invención, los cistrones particulares en el genoma del virus del sarampión son seleccionados para modificar genes cuya expresión se asocia con la atenuación (Schneider-Shaulies, y otros, *PNAS* 92(2): 3943-7, 1995; Takeda, y otros, *J. Virol.* 1998 72/11 (8690-8696)). Por lo tanto, en una modalidad de la invención, se genera una cepa de virus de sarampión recombinante que comprende una mutación puntual única o mutaciones puntuales múltiples no contiguas en cualquiera de una proteína H, una proteína V, una proteína C, y combinaciones de estas. En otra modalidad adicional de la invención, se identifican variantes naturales del virus del sarampión de tipo silvestre o atenuado (por ejemplo, tales como de cultivos de virus de pacientes infectados) que tienen al menos una mutación puntual en su genoma.

30 Modificaciones Genéticas de Virus Oncolíticos

En determinadas modalidades, los virus oncolíticos para usar en las composiciones y los métodos de esta descripción pueden modificarse para mejorar la eficacia, seguridad u otras características del virus. Los virus son inactivados, inhibidos o eliminados frecuentemente por moléculas inmunomoduladoras tales como los interferones (- α , - β , - γ) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF) (Moss, 1996). La inactivación puede lograrse mediante la inactivación de un gen viral, que puede lograrse mediante la inserción(es) en el gen, mediante mutaciones de inactivación en el gen y/o mediante delección parcial o completa del gen. Los tejidos del huésped y las células inflamatorias/inmunitarias a menudo secretan estas moléculas en respuesta a una infección viral. Estas moléculas pueden tener efectos antivirales directos y/o efectos indirectos a través del reclutamiento y/o activación de células inflamatorias y linfocitos. Dada la importancia de estos mecanismos de eliminación inmunológica, los virus han evolucionado para expresar productos génicos que inhiben la inducción y/o función de estas citocinas/quimiocinas e interferones. Por ejemplo, el virus vaccinia (VV; y algunos otros poxvirus) codifica la proteína secretada vCKBP (B29R) que se une e inhibe las quimiocinas CC (dos cisteínas adyacentes) (por ejemplo, RANTES, eotaxina, MIP-1-alfa) (Alcami y otros, 1998). Algunas cepas de VV también expresan una proteína viral secretada que se une e inactiva el TNF (por ejemplo, Lister A53R) (Alcami y otros, 1999). La mayoría de las cepas de poxvirus tienen genes que codifican proteínas secretadas que se unen e inhiben la función de los interferones- α/β (por

ejemplo, B18R) o interferón- γ (B8R). La vC12L es una proteína de unión a IL-18 que evita que la IL-18 induzca la activación del IFN- γ y de las células NK/células T citotóxicas.

5 La mayoría de las investigaciones sobre virulencia de poxvirus se han realizado en ratones. Muchas, pero no todas, de estas proteínas son activas en ratones (B18R, por ejemplo, no lo es). En situaciones en las que estas proteínas son activas contra las versiones murinas de la citocina diana, la eliminación de estos genes conduce a una virulencia reducida y una mayor seguridad con VV mutantes con deleciones de, o mutaciones funcionales en estos genes. Además, la respuesta inflamatoria/inmunitaria y la eliminación viral de estos mutantes a menudo aumentan en comparación con la cepa del virus parental que expresa la proteína inhibidora. Por ejemplo, la eliminación de la familia T1/35kDa de proteínas secretadas por poxvirus (proteínas de unión/inhibidoras de quimiocinas) puede conducir a un marcado aumento en la infiltración de leucocitos en los tejidos infectados por virus (Graham y otros, 1997). La deleción del gen vC12L en VV conduce a una reducción de los títulos virales/toxicidad después de la administración intranasal en ratones; además, la actividad de linfocitos T citotóxicos y de células NK aumenta junto con la inducción del IFN- γ (Smith y otros, 2000). La eliminación del gen T7 del virus del Mixoma (capaz de unirse al IFN- γ y a una amplia gama de quimiocinas) resulta en una virulencia reducida y un aumento significativo de la inflamación/infiltración tisular en un modelo de toxicidad (Upton y otros, 1992; Mossman y otros, 1996). La eliminación del gen M-T2 del virus del mixoma resultó en una virulencia reducida en un modelo de conejo (Upton y otros, 1991). La deleción del producto del gen B18R anti-interferón α/β condujo, además, a una mayor sensibilidad viral al aclaramiento mediado por IFN, títulos reducidos en tejidos normales y virulencia reducida (Symons y otros, 1995; Colamonici y otros, 1995; Alcami y otros, 2000). En resumen, estos productos génicos virales funcionan para disminuir la respuesta inmunitaria antiviral y la infiltración de células inflamatorias en tejidos infectados por el virus. La pérdida de la función de la proteína a través de la deleción/mutación conduce a una disminución de la virulencia y/o al aumento de las propiedades proinflamatorias del virus dentro de los tejidos del huésped. Ver PCT/US2003/025141.

25 Las citocinas y las quimiocinas pueden tener potentes efectos antitumorales (Vicari y otros, 2002; Homey y otros, 2002). Estos efectos pueden ser directamente en las propias células tumorales (por ejemplo, el TNF) o pueden ser indirectos a través de los efectos en las células no cancerosas. Un ejemplo de esto último es el TNF, que puede tener efectos antitumorales al causar toxicidad en los vasos sanguíneos asociados a los tumores; esto conduce a una pérdida de flujo sanguíneo hacia el tumor seguido de necrosis tumoral. Además, las quimiocinas pueden actuar para reclutar (y en algunos casos activar) células efectoras inmunitarias tales como neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y/o linfocitos. Estas células efectoras inmunitarias pueden causar la destrucción del tumor mediante diversos mecanismos. Estos mecanismos incluyen la expresión de citocinas antitumorales (por ejemplo, el TNF), expresión de ligando de fas, expresión de perforinas y granzimas, reclutamiento de células asesinas naturales, etcétera. La respuesta inflamatoria puede conducir, eventualmente, a la inducción de inmunidad sistémica específica al tumor. Finalmente, muchas de estas citocinas (por ejemplo, el TNF) o quimiocinas pueden actuar sinérgicamente con quimioterapia o radioterapia para destruir los tumores.

35 La administración sistémica clínicamente eficaz de versiones recombinantes de estas proteínas inmunoestimuladoras no es factible debido a (1) la inducción de toxicidad grave con la administración sistémica y (2) la expresión local dentro del tejido tumoral es necesaria para estimular la infiltración local y los efectos antitumorales. Se necesitan enfoques para lograr altas concentraciones locales de estas moléculas dentro de las masas tumorales al mismo tiempo que se minimizan los niveles en la circulación sistémica. Los virus pueden modificarse genéticamente para expresar genes de citocinas o quimiocinas en un intento de potenciar su eficacia. La expresión de estos genes a partir de vectores selectivos de replicación tiene ventajas potenciales sobre la expresión de vectores no replicativos. La expresión de virus replicativos puede resultar en concentraciones locales más altas dentro de las masas tumorales; además, la replicación de virus puede ayudar a inducir la inmunidad antitumoral mediante la destrucción/oncólisis de las células tumorales y la liberación de antígenos tumorales en un entorno proinflamatorio. Sin embargo, existen numerosas limitaciones para este enfoque. Surgen serias preocupaciones de seguridad por la posibilidad de liberación al medio ambiente de un virus competente para la replicación (aunque selectivo de tumor) con un gen que puede ser tóxico si se expresa localmente en altas concentraciones. Por lo tanto, los virus que expresan potentes genes proinflamatorios a partir de su genoma pueden presentar riesgos de seguridad para el paciente tratado y para el público en general. Incluso con los virus selectivos de replicación que expresan estos genes y que se dirigen al tumor, la expresión génica puede ocurrir en tejidos normales, lo que resulta en toxicidad. Además, las limitaciones de tamaño impiden la expresión de genes múltiples y/o grandes a partir de virus tales como el adenovirus; estas moléculas definitivamente actuarán más eficazmente en combinación. Finalmente, muchos de los virus oncolíticos en uso expresan proteínas antiinflamatorias y, por lo tanto, estos virus contrarrestarán la inducción de un medio proinflamatorio dentro de la masa tumoral infectada. El resultado será inhibir la inducción de la inmunidad antitumoral, efectos antivascuales y sensibilización a la quimioterapia/radioterapia.

Agentes Embólicos

60 En las composiciones y los métodos de esta descripción pueden usarse numerosas micropartículas biocompatibles o agentes de gel de polímero hidrófilo. En una modalidad preferida, las micropartículas biocompatibles o los agentes de gel de polímero hidrófilo se seleccionan de: micropartículas de almidón degradables, micropartículas de alcohol polivinílico, micropartículas de espuma de gelatina, y micropartículas de hidrogel de alcohol polivinílico sulfonado. En un aspecto, la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo aumenta la producción viral de las células tumorales cultivadas *in vitro* en al menos 50 %, al menos 75 %, al menos 100 %, al menos 150 %, al menos 200 % o al menos 300 %. En un aspecto relacionado, la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo aumenta la

producción viral de las células tumorales cultivadas *in vitro* entre 50 % y 400 %, entre 75 % y 400 %, entre 100 % y 400 %, entre 150 % y 400 %, entre 200 % y 400 %, o entre 300 % y 400 %.

Las micropartículas biocompatibles o los agentes de gel de polímero hidrófilo ("agentes embólicos") pueden ser temporales o permanentes. Los agentes embólicos temporales ilustrativos incluyen gelfoam, colágeno, y trombina. Los agentes embólicos permanentes ilustrativos incluyen partículas, tales como partículas de alcohol polivinílico (PVA) y emboesferas, bobinas, tales como bobinas comprimible, inyectables, desmontables, mecánicas, electrolíticas, e hidrolíticas, agentes líquidos, tales como pegamento, ónix, alcohol, y ALGEL™ (un hidrogel, polímero a base de azúcar derivado del alginato), y otros agentes, que incluyen los tapones de ampolla, el dispositivo oclusivo vascular Gian-turco-Griffka (GGVOD), y los globos desmontables. Pueden usarse diferentes agentes embólicos en dependencia del tamaño del vaso a embolizar, de la longitud conveniente de la oclusión del vaso después de la embolización, y de si el tejido embolizado debe permanecer viable después de la oclusión. Dado el uso extensivo de la embolización, un radiólogo intervencionista experto no tendría dificultad en seleccionar el tipo apropiado de agente, el rango de tamaño del agente, etcétera, para lograr la embolización conveniente. La oclusión de vasos es útil en escenarios clínicos tales como lesiones traumáticas y hemorragias, o cuando se desean procedimientos repetidos de embolización, tal como puede ser deseable en la embolización tumoral con virus oncolíticos como se describe en esta descripción.

En una modalidad, la micropartícula biocompatible o los agentes de gel de polímero hidrófilo son micropartículas de espuma de gelatina. La espuma de gelatina ilustrativa incluye Gelfoam, producido por Alicon/Scion Medical Technologies. Gelfoam es una sustancia biológica hecha de gelatina de piel purificada, y se formula en láminas estériles o como un polvo. Gelfoam se ha usado en aplicaciones de embolización durante más de 30 años, y es un agente embólico versátil y de bajo costo. Gelfoam ralentiza el flujo sanguíneo al causar obstrucción mecánica. El polvo de Gelfoam consiste en partículas que varían en tamaño de 150-1000 µm y pueden agregarse para formar conglomerado de partículas más grandes tras la absorción de agua. Las láminas de Gelfoam pueden cortarse en numerosos tamaños y formas diferentes y formularse con otros agentes acuosos tras la inyección, en dependencia de la aplicación conveniente. La suspensión de Gelfoam que contiene un agente de contraste y una esponja Gelfoam puede usarse para formar un "molde" de vasos embolizados proximales, mientras que los torpedos o cubos de Gelfoam pueden usarse para vasos más grandes. Gelfoam ocluye temporalmente los vasos al ralentizar el flujo sanguíneo, aumentar la formación de trombos, y funcionar como un andamio para los coágulos.

En una modalidad, las micropartículas biocompatibles o los agentes de gel de polímero hidrófilo son micropartículas de almidón degradables. Las micropartículas de almidón degradables (DSM) ilustrativas son partículas EMBOCEPTS producidas por Pharmaceut y partículas SPHEREX producidas por Mangle Life Sciences. Las partículas EMBOCEPTS (Amilómero como la sustancia activa) son partículas reticuladas compuestas de almidón de patata hidrolizado. Estas partículas son adecuadas para la embolización temporal, ya que tienen una vida media de aproximadamente 35 minutos y son degradables. Las partículas SPHEREX están compuestas de micropartículas DSM-S, esterilizadas y suspendidas en solución salina. Las micropartículas de almidón pueden prepararse a partir de una solución acuosa de almidón a base de amilopectina purificada de peso molecular reducido mediante la formación de una emulsión de gotas de almidón en una fase externa de solución de polímero, que convierte las gotas de almidón en un gel, y secando las partículas de almidón. Una cubierta de control de liberación se aplica, además, opcionalmente a las partículas. Las micropartículas biodegradables, después de la administración parenteral, se disuelven en el cuerpo para formar sustancias endógenas, en última instancia, por ejemplo, glucosa. La biodegradabilidad puede determinarse o examinarse mediante incubación con una enzima adecuada, por ejemplo, alfa-amilasa, *in vitro*. La biodegradabilidad puede examinarse, además, mediante la inyección parenteral de las micropartículas, por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular, y mediante el examen histológico del tejido en función del tiempo. Las micropartículas de almidón biodegradables desaparecen normalmente del tejido en unas pocas semanas y generalmente en una semana. En aquellos casos en los que las micropartículas de almidón están recubiertas con una cubierta de control de liberación, por ejemplo un recubrimiento, esa cubierta generalmente es la que determina la tasa de biodegradabilidad, que después, a su vez, determina cuándo la alfa-amilasa llega a ser disponible para la matriz de almidón.

En una modalidad, las micropartículas biocompatibles o los agentes de gel de polímero hidrófilo son micropartículas de alcohol polivinílico (PVA). Las micropartículas ilustrativas de alcohol polivinílico son producidas por Boston Scientific Corporation (Natick, MA). Las partículas de PVA están hechas de una lámina de espuma de PVA que se seca al vacío y se raspa en partículas. Las partículas se filtran con tamices y están disponibles en tamaños que varían de 100 µm a 1100 µm. Las partículas de alcohol polivinílico son irregulares en tamaño y forma, lo que promueve la agregación. Después de la suspensión, las partículas de PVA pueden ser oblongas, ovales, irregulares, afiladas y anguladas con pequeños fragmentos después de la suspensión. Las partículas de alcohol polivinílico suministran oclusión permanente mediante la adhesión a las paredes de los vasos y mediante el bloqueo de los vasos más pequeño dentro de los que ellas pasan. La oclusión de PVA produce reacciones inflamatorias, necrosis vascular local, y fibrosis vascular posterior.

En una modalidad, las micropartículas biocompatibles o los agentes de gel de polímero hidrófilo son micropartículas de hidrogel de alcohol polivinílico sulfonado. Las micropartículas de hidrogel de alcohol polivinílico sulfonado ilustrativas son Perlas-DC producidas por Biocompatibles (Reino Unido, Surrey, Reino Unido). Las perlas-DC son productos de micropartículas embólicas basadas en un hidrogel de alcohol polivinílico que se ha modificado con grupos sulfonatos. Las Perlas-DC tienen la capacidad de secuestrar activamente compuestos de antraciclina en su forma de sal, tal como la doxorubicina HCl, de la solución y liberarla de manera controlada y sostenida. Puede agregarse un fármaco

inmediatamente antes de la embolización, lo que permite un procedimiento de una sola etapa en el que el fármaco y el dispositivo se suministran al mismo tiempo, lo que resulta en un suministro local sostenido del fármaco.

5 Como se mencionó anteriormente, un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente el tamaño apropiado de la micropartícula biocompatible o los agentes de gel de polímero hidrófilo en base a, entre otros factores, el tamaño de la vasculatura tumoral y la naturaleza de la embolización conveniente. En una modalidad preferida, la micropartícula biocompatible o los agentes de gel de polímero hidrófilo tienen un tamaño entre 100 μm y 2000 μm . En una modalidad preferida, la micropartícula biocompatible o los agentes de gel de polímero hidrófilo tienen un tamaño de entre 150 μm y 350 μm . En una modalidad, la micropartícula biocompatible o los agentes de gel de polímero hidrófilo tienen un tamaño de entre 150 μm y 200 μm . En una modalidad, la micropartícula biocompatible o los agentes de gel de polímero hidrófilo tienen un tamaño de entre 200 μm y 250 μm . En una modalidad, la micropartícula biocompatible o los agentes de gel de polímero hidrófilo tienen un tamaño de entre 250 μm y 300 μm . En una modalidad, la micropartícula biocompatible o los agentes de gel de polímero hidrófilo tienen un tamaño de entre 300 μm y 350 μm .

15 En determinadas modalidades, las micropartículas biocompatibles o los agentes de gel de polímero hidrófilo son de tamaño uniforme. Esto significa que la diferencia de diámetro entre partículas individuales es de aproximadamente 0 μm a aproximadamente 100 μm , de aproximadamente 0 μm a aproximadamente 50 μm , o de aproximadamente 0 μm a aproximadamente 25 μm . En algunas modalidades, las micropartículas tienen diferencias de diámetro de 100 μm o menos, aproximadamente 50 μm o menos, aproximadamente 25 μm o menos, aproximadamente 10 μm o menos o aproximadamente 5 μm o menos.

Métodos de Embolización

25 En un aspecto, la descripción proporciona un método para la embolización activa de un sitio vascular en un mamífero mediante la introducción en la vasculatura de un mamífero de un virus oncolítico de la descripción y una micropartícula biocompatible o gel de polímero hidrófilo adecuado para la embolización activa. En un aspecto, la descripción proporciona un método para la embolización activa de un sitio vascular en un mamífero mediante la introducción en la vasculatura de un mamífero de un virus oncolítico de al menos 0,1 μm de diámetro a lo largo del eje más corto y una micropartícula biocompatible o gel de polímero hidrófilo adecuado para la embolización activa. En un aspecto, la descripción proporciona un método para la embolización activa de un sitio vascular en un mamífero mediante la introducción en la vasculatura de un mamífero de un virus oncolítico que brota de una superficie apical de una célula polarizada infectada y una micropartícula biocompatible o gel de polímero hidrófilo adecuado para la embolización activa. En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar el cáncer mediante la reducción de una masa tumoral, que comprende introducir en la vasculatura de un mamífero un virus oncolítico y una microesfera biocompatible o un agente de gel de polímero hidrófilo adecuado para la embolización activa. Una vez más, la replicación viral y la oclusión vascular transitoria resultan posteriormente en la necrosis tumoral, lo que 'reduce' la masa tumoral sin daño observable en el tejido sano circundante. En modalidades preferidas, el método de reducción resulta en necrosis de al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 85 % de la masa tumoral embolizada.

40 La introducción de la micropartícula biocompatible o agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y las composiciones de la presente descripción, típicamente, se realizan mediante la inyección en vasos sanguíneos cerca y alrededor de los tumores. En determinadas modalidades, las micropartículas biocompatibles o los agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y las composiciones de la presente descripción se introducen mediante un catéter. En otras modalidades, la micropartícula biocompatible o los agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y las composiciones de la presente descripción se introducen mediante inyección por un catéter conectado a una jeringa. En algunas modalidades, la introducción es dentro de un vaso sanguíneo que alimenta directamente un tumor o una porción de un tumor. En otras modalidades, la introducción es directamente en el sitio de acción, por ejemplo dentro de un vaso sanguíneo en el extremo proximal del tumor. La micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo de acuerdo con la presente descripción puede introducirse ya cargado con el virus oncolítico (es decir, las composiciones de la presente descripción). En otras modalidades, las micropartículas biocompatibles o agentes de gel de polímero hidrófilo se introducen en combinación con el virus oncolítico, en donde el virus se introduce antes, simultáneamente o después de la introducción de la micropartícula biocompatible o agentes de gel de polímero hidrófilo. Cuando se introducen, las micropartículas biocompatibles o los agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y las composiciones de la presente descripción son adecuados para inyección. En modalidades específicas, la micropartícula biocompatible o los agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y las composiciones de la presente descripción son estériles.

60 Las micropartículas biocompatibles o los agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y las composiciones de la presente descripción pueden administrarse mediante el uso de un catéter o microcatéter. El catéter que suministra las micropartículas biocompatibles o agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y las composiciones de la presente descripción puede ser un catéter médico de diámetro pequeño. Los materiales del catéter compatibles con las micropartículas biocompatibles o agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y las composiciones de la presente descripción pueden incluir polietileno, fluoropolímeros y silicona. Una vez que se coloca un catéter, la micropartícula biocompatible o los agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y/o las composiciones de la presente descripción se introducen lentamente a través de los catéteres, típicamente, con la ayuda de guía fluoroscópica. Las micropartículas biocompatibles o agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y las composiciones de la

presente descripción pueden introducirse directamente en los vasos sanguíneos críticos o pueden introducirse aguas arriba de los vasos diana. La cantidad de micropartículas biocompatibles o agentes de gel de polímero hidrófilo o las composiciones de la presente descripción introducidas durante un procedimiento de embolización será una cantidad suficiente para causar embolización, por ejemplo, para reducir o detener el flujo sanguíneo a través de los vasos diana.

5 La cantidad de micropartículas biocompatibles o agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y las composiciones de la presente descripción suministradas pueden variar en dependencia de, por ejemplo, el tamaño total o área de la vasculatura a embolizar y del tamaño y la naturaleza del tumor. Después de la embolización, puede realizarse otra arteriografía para confirmar que se completó el procedimiento. El flujo arterial seguirá presente, en cierta medida, en el tejido corporal sano próximo a la embolización, mientras que el flujo hacia el tejido enfermo o diana está bloqueado.

10 Además, al paciente puede administrársele un vasodilatador (por ejemplo, adenosina) de antemano, simultáneamente, o posteriormente, para facilitar el procedimiento.

Un experto en la técnica médica o de embolización comprenderá y apreciará cómo las micropartículas biocompatibles o los agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y las composiciones de la presente descripción, como se describen en la presente descripción, pueden usarse en diversos procesos de embolización mediante la guía de un mecanismo de suministro a un sitio vascular del cuerpo conveniente, y mediante el suministro de una cantidad de micropartículas biocompatibles o agentes de gel de polímero hidrófilo, virus oncolíticos o composiciones de la presente descripción al sitio, para causar restricción, oclusión, llenado, o taponamiento de uno o más vasos convenientes y la reducción o detención del flujo sanguíneo a través de los vasos. Los factores que pueden considerarse, controlarse, o ajustarse para aplicar el proceso a cualquier proceso de embolización particular pueden incluir la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo, el virus oncolítico y/o la composición de la presente descripción elegidos (por ejemplo, para tener en cuenta las imágenes, el seguimiento, y la detección de un sustrato de partículas radiopacas); las micropartículas biocompatibles o los agentes de gel de polímeros hidrófilos, los virus oncolíticos y las composiciones de la presente descripción suministradas al sitio del cuerpo; el método de suministro, que incluye el equipo particular utilizado (por ejemplo, el catéter) y el método y la ruta usada para colocar el extremo de dispensación del catéter en el sitio conveniente del cuerpo, etcétera. Cada uno de estos factores se apreciará por un experto en la técnica, y pueden manejarse fácilmente para aplicar los métodos descritos a innumerables procesos de embolización.

En una modalidad, los tumores hepáticos primarios y metastásicos pueden tratarse mediante el uso de la terapia de embolización de la presente descripción. El tumor hepático puede ser un tumor primario o secundario. El tumor secundario puede ser, por ejemplo, un tumor de melanoma maligno metastatizado. Brevemente, un catéter se inserta preferentemente a través de la arteria femoral y se avanza hacia la arteria hepática conduciéndolo a través del sistema arterial bajo guía fluoroscópica. El catéter avanza hacia el árbol arterial hepático tanto como sea necesario para permitir el bloqueo completo de los vasos sanguíneos que irrigan el tumor(es), mientras se evitan la mayor cantidad posible de ramas arteriales que irrigan las estructuras normales. Idealmente, esta será una rama segmentaria de la arteria hepática, pero podría ser que toda la arteria hepática distal al origen de la arteria gastroduodenal, o incluso múltiples arterias separadas, necesitarán ser bloqueada en dependencia de la extensión del tumor y de su suministro individual de sangre. Una vez que se alcanza la posición conveniente del catéter, la arteria se emboliza mediante la introducción de las micropartículas biocompatibles o agentes de gel de polímero hidrófilo, los virus oncolíticos y las composiciones de la presente descripción a través del catéter arterial hasta que cesa el flujo en la arteria que será bloqueada. La oclusión de la arteria puede confirmarse mediante la inyección de contraste radiopaco a través del catéter y mediante la demostración, preferentemente por fluoroscopia, de que el vaso que previamente se llenaba de contraste ya no lo hace. El mismo procedimiento puede repetirse con cada arteria de alimentación que será ocluida.

45 Terapia de Combinación

En algunas modalidades, se usa un agente terapéutico adicional en combinación con los métodos de Viroembolización Arterial Transcatéter ("TAVE") de la presente descripción. Los agentes terapéuticos adicionales incluyen, sin limitación, inhibidores de tirosina quinasa (sunitinib, sorafenib), radioterapia, y quimioterapia tradicional. Después de la TAVE pueden administrarse agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, 2-3 semanas después de la TAVE. En algunas modalidades, la TAVE es precedida por la administración de un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, a la TAVE le sigue la administración de un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, la TAVE ocurre simultáneamente con la administración de un agente terapéutico adicional. En algunas modalidades, la administración secuencial de la TAVE y de un agente terapéutico adicional se repite en múltiples ciclos.

55 Métodos de Visualización

En algunas modalidades, se usa un agente de contraste para visualizar la vasculatura antes de realizar una embolización activa. La visualización del agente de contraste permite guiar y monitorear el paso del catéter dentro de la vasculatura, lo que permite la embolización activa dentro de los vasos sanguíneos convenientes. El agente de contraste puede rastrearse y monitorearse por métodos conocidos, que incluye la radiografía y la fluoroscopia. El agente de contraste puede ser cualquier material capaz de potenciar el contraste en una modalidad de imagen conveniente (por ejemplo, resonancia magnética, rayos X (por ejemplo CT), ultrasonido, magnetotomografía, imágenes de impedancia eléctrica, imágenes de luz (por ejemplo, microscopía confocal e imágenes de fluorescencia) e imagen nuclear (por ejemplo, gammagrafía, SPECT y PET)). Los agentes de contraste son bien conocidos en la técnica de embolización y en las prácticas médicas similares,

cualquiera de una diversidad de tales agentes de contraste es adecuado para usar en la formulación y en los métodos de la presente descripción.

5 En algunas modalidades, el agente de restricción es radiopaco; en particular, un material radiopaco que exhibe radiopacidad permanente, por ejemplo, un metal u óxido metálico. La radiopacidad permanente es diferente a otros agentes que mejoran el contraste o materiales radiopacos usados en la embolización o en las aplicaciones médicas similares que son biodegradados o pierden su efectividad (radiopacidad) durante un determinado período, por ejemplo, días o semanas, tal como de 7 a 14 días. (Ver, por ejemplo, PCT/GB98/02621). Los materiales radiopacos permanentes a menudo son preferibles porque pueden monitorearse o rastrearse todo el tiempo que permanecen en el cuerpo, mientras que otros agentes no permanentes para potenciar el contraste o los materiales radiopacos tienen un tiempo limitado durante el cual pueden detectarse y rastrearse.

15 Los materiales radiopacos incluyen materiales paramagnéticos (por ejemplo, radicales libres persistentes o con mayor preferencia compuestos, sales y complejos de especies de metales paramagnéticos, por ejemplo, iones de metales de transición o lantánidos); compuestos, sales o complejos de átomos pesados (es decir, número atómico de 37 o más), (por ejemplo, compuestos de metales pesados, compuestos yodados, etcétera); compuestos, sales, o complejos que contienen radionúclidos, (por ejemplo, sales, compuestos o complejos de isótopos metálicos radiactivos o compuestos orgánicos de yodo radiactivo); y partículas superparamagnéticas (por ejemplo, óxido de metal o partículas de óxido mezcladas, particularmente óxidos de hierro). Los metales paramagnéticos preferidos incluyen Gd (III), Dy (III), Fe (II), Fe (III), Mn (III) y Ho (III), y especies paramagnéticas de Ni, Co y Eu. Los metales pesados preferidos incluyen Pb, Ba, Ag, Au, W, Cu, Bi y lantánidos, tales como Gd.

25 La cantidad del agente potenciador del contraste usada debería ser suficiente para permitir la detección del émbolo según sea conveniente. Preferentemente, la composición del agente embolizante puede comprender de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 por ciento en peso de agente de contraste. La diferencia en la concentración del material radiopaco es la siguiente: por ejemplo, en modalidades preferidas, la mezcla inversa de polímero termosensible contiene aproximadamente 50 % en volumen de la solución del agente de contraste radiopaco, en donde los agentes de contraste preferidos, por ejemplo, Omnipaque o Visipaque, no son iónicos. Para la detección por MRI, la concentración del agente de detección de MR es, preferentemente, aproximadamente 1 % en peso.

30 Los ejemplos de agentes de contraste adecuados para usar en la presente descripción incluyen, sin limitación, metrizamida, iopamidol (Isovue™ o Iopamiron™), iodixanol (Visipaque™), iohexol (Omnipaque™), iopromida (Ultravist™), iobitridol, iomeprol, iopentol, iopamiron, ioxilan, iotrolan, gadodiamida, gadoteridol, iotrol, ioversol (Optiray™) o combinaciones de estos.

35 **EJEMPLOS**

Los siguientes son ejemplos de los métodos y las composiciones de la presente descripción. Se entiende que pueden practicarse diversas otras modalidades, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

40 Ejemplo 1: Evaluación de la estabilidad y la replicación viral del virus vaccinia JX-594

45 La estabilidad del virus vaccinia oncolítico JX-594 en combinación con otros agentes usados para la quimioembolización transarterial (TACE) se evaluó *in vitro*. El JX-594 es un virus vaccinia recombinante competente en replicación derivado del virus vaccinia de la cepa Wyeth. El JX-594 se obtuvo mediante la inserción de los genes para el GM-CSF humano y la β -galactosidasa de *E. coli* en el gen de la timidina quinasa (TK) del virus (bajo el control de los promotores sintéticos temprano-tardío y p7.5, respectivamente), de esta manera el gen TK se torna inactivo. Se ha demostrado que la inactivación del gen TK disminuye la virulencia del virus vaccinia y aumenta la replicación específica en el tumor.

50 **Métodos**

El virus vaccinia JX-594 se mezcló con Lipiodol, Adriamicina y/o Gelfoam de acuerdo con los grupos de tratamiento resumidos en la Tabla 1.

55 Tabla 1: Grupos de tratamiento de JX-594 y condiciones de incubación.

Grupo	Condiciones de incubación
1. JX-594	10 min a RT antes de añadirlos a las células
2. JX-594 + Lipiodol	10 min a RT antes de añadirlos a las células
3. JX-594 + Lipiodol + Adriamicina	10 min a RT antes de añadirlos a las células
4. Lipiodol + Adriamicina	Tratamiento previo de las células 1 hora, adición de JX-594
5. JX-594 + Gelfoam	10 min a RT antes de añadirlos a las células

6. Lipiodol + Adriamicina	Tratamiento previo de las células 1 hora, mezclar JX-594 + Gelfoam e incubar durante 10 minutos a RT antes de añadirlos a las células
---------------------------	---

5

Las mezclas descritas en la columna "Grupo" de la Tabla 1 se incubaron durante los periodos de tiempo indicados antes de la adición a las células (línea celular HuH-7). Para preparar los inóculos virales, el JX-594 purificado mediante almohadilla de sacarosa se agitó vigorosamente durante 30 segundos a plena potencia. La cantidad designada de la suspensión de JX-594 se diluyó en DMEM que contenía suero bovino fetal al 2,5 % (medio de infección). La adriamicina en polvo (clorhidrato de doxorubicina, SIGMA-ALDRICH®), Lipiodol® (Guerbet) y Gelfoam (Alicon®, Hangzhou Alicon Pharm SCI & TEC Co., Ltd) se disolvieron en el mismo medio de infección para preparar la solución madre de Adriamicina, Lipiodol, y Gelfoam. Para los grupos 2, 3, 5, y 6, el JX-594 se mezcló con Adriamicina, Lipiodol y/o Gelfoam y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de la infección. Para los grupos números 4 y 6, las células se trataron previamente con Lipiodol y Adriamicina durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se adicionaron 200 µL de inóculo mezclado a cada pocillo de una placa de cultivo de tejidos de 24 pocillos y se incubó durante 2 horas para la absorción viral a 37 °C en una incubadora de CO₂ humidificada.

Las células se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 1 o 100. Después de 2 horas de absorción viral, las células se lavaron dos veces con 500 µl de DMEM que contenía suero bovino fetal al 2,5 %. Las placas se incubaron durante 24 o 48 horas a 37 °C en una incubadora de CO₂ humidificada. Los reactivos usados para los cultivos virales, junto con sus respectivas concentraciones y fuentes, se resumen en la Tabla 2. Las células HuH-7 se adquirieron del banco de células JCRB (Colección Japonesa de Recursos Biológicos para la Investigación, Osaka, Japón) y se cultivaron en medios de crecimiento completo (DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 %). Las células se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO₂ humidificada.

El sobrenadante del cultivo celular se recolectó a las 24 y 48 horas después de la infección, y se midió la producción viral (ufp/mL). Las células infectadas se cosecharon mediante el raspado de la placa con un émbolo de goma de una jeringa de 1 mL. La suspensión celular recolectada se sometió a lisis mediante tres ciclos de congelación y descongelación. Para medir la cantidad de partículas virales infecciosas, se realizó un ensayo en placa con el lisado de las células cosechadas. Para el ensayo en placa, las células U-2 OS se expandieron y se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos. Las placas se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO₂ humidificada, durante 16 a 20 horas antes de la titulación viral. Antes de la infección, las células HuH-7 lisadas se diluyeron en serie en medio DMEM sin suero. Se adicionaron 900 µL de medio libre de suero DMEM a cada pocillo después de aspirar el medio de crecimiento completo y se adicionaron 100 µL de cada inóculo diluido en serie. Para la absorción viral, las placas se incubaron a 37 °C en una incubadora de CO₂ humidificada, durante 2 horas. Después de 2 horas, los inóculos se cambiaron a 3 mL de DMEM que contenía 1,5 % de carboximetilcelulosa, suplementado con 2 % de suero fetal bovino y 1 % de penicilina-estreptomicina. Las placas se incubaron nuevamente a 37 °C en una incubadora de CO₂ humidificada, durante 3 días (72 ± 6 horas), hasta que se formaron placas visibles. Al final del periodo de incubación de 3 días, se aspiró la superposición y las células U-2 OS se tiñeron con 1 mL de solución de cristal violeta al 0,1 % durante una hora. Se contó el número de placas después de eliminar la solución de cristal violeta y se calculó el título de cada lisado. Los reactivos usados para el ensayo de placa se resumen en la Tabla 3.

Tabla 2: Reactivos usados durante los cultivos virales de JX-594.

45

Reactivo	Concentración	Fuente
JX-594 (PexaVec)	2,75x10 ⁹ ufp/mL	Sillajen Lot #: 20140420
Adriamicina (Clorhidrato de Doxirubicina)	10ug/mL	Sigma
Lipiodol Ultra Fluid (ésteres etílicos de ácidos grasos yodados de aceite de semilla de amapola)	2 % y 100 %	Guerbet, Francia
Gelfoam 150 mm - 350 mm (Agente Embólico De Partículas De Esponja de Gelatina)	1mg/mL	Alicon Pharm SCI & TEC CO.,LTD
DMEM	NA	Hyclone Cat#SH30243.01
Suero bovino fetal	2,5 %	Hyclone Cat#SH30919.03

60

Tabla 3: Reactivos usados para ensayos de placa viral.

Reactivo (para el ensayo de placa)	Concentración Final	Fuente
DMEM (líquido)	NA	Hyclone Cat#SH30243.01
DMEM (polvo)	1 X	gibco Cat#12800-017
Suero bovino fetal	2 %	Hyclone Cat#SH30919.03
Carboximetilcelulosa	1,5 %	Sigma Cat#C-5678
penicilina-estreptomicina	1 %	Hyclone Cat#SV30010
Cristal violeta	0,1 %	Sigma Cat#C-6158

Resultados

La producción viral celular aumentó a las 24 y 48 horas cuando el virus JX-594 se incubó con Gelfoam antes de la infección (Figuras 1A-D). Por el contrario, la incubación con Lipiodol y/o Adriamicina, con y sin Gelfoam, disminuyó la producción viral a las 24 horas (Figuras 1A y B). A las 48 horas, la incubación con Lipiodol al 2 % solo o en combinación con Adriamicina y Gelfoam disminuyó la producción viral a una MOI de 1, mientras que la incubación con Adriamicina sola disminuyó la producción viral a una MOI de 1 y 100 (Figuras 1C y D). Estos resultados indican que Gelfoam, sorprendentemente, aumenta la replicación viral de JX-594, *in vitro*, en casi tres veces. Por el contrario, Adriamicina y Lipiodol disminuyen la replicación viral de JX-594, *in vitro*. Estudios anteriores demostraron que la adición de agentes embólicos no tiene impacto en la producción viral de virus más pequeños con liberación basolateral, tal como el VSV, como lo indican las curvas de crecimiento viral similares cuando se cultiva con y sin un agente embólico (Altomonte y otros, (2008) Hepatology 48:1864-1873). Por lo tanto, los agentes embólicos básicos son compatibles con virus oncolíticos más grandes y/o virus oncolíticos con liberación apical, tales como los virus vaccinia y, sorprendentemente, incluso mejoran la producción viral. Sin estar limitado por la teoría, el aumento en la producción viral puede explicar por qué los métodos de embolización de la descripción son eficaces incluso con virus oncolíticos grandes y con virus que brotan desde la superficie apical, tal como el virus vaccinia.

Ejemplo 2: Detección en suero del virus JX-594

Se evaluó la presencia de virus en sangre periférica después de la embolización de conejos con JX-594 formulado con Gelfoam.

Métodos

Tres conejos blancos, normales, de Nueva Zelanda (Biogenomics, Seoul, Korea; Samtako, Oh San, Corea del Sur), sin implantación tumoral VX2, se embolizaron con JX-594 formulado en Gelfoam. Se realizó la emboloterapia con guía fluoroscópica. La angiografía se realizó habitualmente con un enfoque transauricular, y se siguieron métodos detallados (Chang y otros, (2011) J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187). Se canularon las arterias auriculares centrales derecha e izquierda para determinar qué lado era ventajoso para realizar la angiografía de la arteria hepática.

Para la anestesia, se inyectaron por vía intramuscular 1,5 mL de una mezcla 2:3 de xilazina y tiletamina/zolazepam en el muslo posterior. Después de la anestesia, el conejo se colocó en posición supina sobre una mesa fluoroscópica. El afeitado del cabello era innecesario para el acceso arterial transauricular. El pelo corto en el sitio de punción se afeitó con una podadora eléctrica. Las orejas de los conejos se lavaron con alcohol para su esterilización. La arteria auricular central se perfora percutáneamente en una de las orejas del conejo con una aguja de Angiocath calibre 18 insertada en la dirección retrógrada. Después de hacer avanzar la vaina de plástico de la aguja de Angiocath, se retiró la aguja interna del estilete y se conectó el centro de la vaina de plástico con la tapa de una llave de tres vías. La funda de plástico se fijó mediante esparadrapo.

Después de aplicar una tapa perforada modificada al centro de la funda de plástico, se introdujeron un microcatéter de 2,0 F (Progreat, Terumo, Tokio, Japón) y un cable guía de 0,016 pulgadas (Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japón) en la arteria auricular central por los radiólogos intervencionistas. Se infundió aproximadamente 1 mL del agente de contraste para obtener una hoja de ruta desde la arteria carótida extracraneal hasta la aorta torácica. El cable guía se avanzó cuidadosamente hacia la aorta torácica descendente, y después se seleccionó la arteria hepática apropiada manipulando el cable guía. Después de colocar la punta del microcatéter en la arteria hepática apropiada, la angiografía de la arteria hepática se realizó mediante inyección manual del agente de contraste.

Se preparó una mezcla de 1X10⁸ UFP Pexa-Vec (SillaJen, Busan, Corea) y partículas de Gelfoam de 150 µm - 350 µm (Alicon, China). La mitad de un vial de Gelfoam se disolvió en 5 mL de medio de contraste y 5 mL de solución salina normal, y esta mezcla se combinó con 1 mL de Pexa-Vec. El punto final de la embolización fue cuando se logró una oclusión del vaso alimentador tumoral. Después de la selección del vaso con el microcatéter, la embolización se realizó mediante el uso de 1,5 mL de la mezcla preparada de partículas de Pexa-Vec y Gelfoam. Después de retirar el microcatéter y la vaina de plástico de la arteria auricular central, el sitio de punción se comprimió manualmente.

Se recolectó una muestra de sangre periférica en los puntos de tiempo indicados. La muestra de sangre se recolectó de un vaso sanguíneo de la oreja y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos para separar el suero. El ADN en 200 µL de suero se extrajo mediante el uso de un Mini Kit de Sangre de ADN QIAamp siguiendo las instrucciones del fabricante (Blood and Body Fluid Spin Protocol). Brevemente, se adicionaron 20 µL de proteasa en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL y se adicionaron 200 µL de suero. Se adicionaron 200 µL de tampón de lisis AL (QIAGEN, Cat # 19075) y el tubo se incubó a 56 °C durante 10 minutos. Se adicionaron 200 µL de etanol absoluto a la muestra y la mezcla se transfirió a la columna de centrifugación QIAamp. Una vez que la muestra se centrifugó a 6000 x g durante 1 minuto, la columna se lavó dos veces con los tampones de lavado proporcionados AW1 (QIAGEN, Cat#19081) y AW2 (QIAGEN, Cat#19072). El ADN se eluyó en 200 µL de tampón de elución AE (QIAGEN, Cat # 10977). El análisis de qPCR se realizó con el gen de la ADN polimerasa de vaccinia, E9L, mediante el uso de un sistema de PCR en tiempo real 7300 (Applied Biosystems, modelo: PRI SM7300). Las condiciones de qPCR se muestran en la Tabla 4. Se midió la cantidad viral media. El límite de detección fue 5.

Tabla 4: Condiciones de qPCR

Reactivo	Descripción o Fuente	Volumen para reacción simple
Cebador (F)	5'-GAA CAT TTT TGG CAG AGA GAGCC-3'	1,0 µL
Cebador (R)	5'-CAA CTC TTA GCC GAA GCG TATGAG-3'	1,0 µL
Sonda	6'FAM-CAG GCT ACC AGT TCA A-MGBNFQ-3'	1,0 µL
Mezcla maestra universal de PCR TaqMan 2X	Roche, Parte#4304437	10,0 µL
ddH ₂ O	Invitrogen, Cat#10977-015	2,0 µL
Molde	ADN extraído	5,0 µL
Etapa	Temperatura	Hora
Desnaturalización	95 °C	15 segundos
Hibridación/ Extensión	60 °C	1 minuto
50 ciclos, 2 horas y 10 minutos en total		

Resultados

Todos los valores de detección viral en suero (expresados como número de copia) estaban por debajo del límite de detección (Tabla 5). En la tabla 5, ND se refiere a un valor que no se detectó (valor = 0), mientras que <LOD indica un valor que estaba por debajo del límite de detección. Estos resultados indican que el virus administrado por emboloterapia se localiza solo en el tumor y no sale de la sangre del tumor hacia otros tejidos o hacia el torrente sanguíneo. Por el contrario, estudios previos demostraron que el virus JX-594 puede detectarse dentro del torrente sanguíneo después de la inyección directamente en el tumor. Además, estudios previos que usaron el virus VSV demostraron que el VSV es detectable en el torrente sanguíneo 1 día después de la embolización viral, lo que indica que los agentes embólicos no retienen bien los virus más pequeños y, por lo tanto, pueden llegar a los tejidos fuera del tumor (Shinozaki y otros, (2004) Mol Therapy 9:368-376).

La falta de virus JX-594 administrado mediante emboloterapia detectable dentro de la circulación sistémica es bastante sorprendente. Estos resultados indican que la embolización con JX-594 representa una mejora de seguridad con respecto a la inyección directa de JX-594 en el tumor o la embolización con un virus más pequeño, tal como el VSV. El JX-594 generalmente se considera seguro, pero otros virus oncolíticos podrían dañar o destruir tejidos sanos en otras partes del cuerpo. El virus JX-594 administrado a través de la emboloterapia viral puede no transportarse fuera del tumor y, por lo tanto, no es capaz de dañar o destruir tejidos sanos. Por lo tanto, la emboloterapia viral con JX-594 es una alternativa más segura con respecto a la inyección directa en el tumor y a la emboloterapia viral con un virus más pequeño, tal como el VSV. Nuevamente, sin estar limitados por la teoría, los virus más pequeños, tal como el VSV, pueden no retenerse adecuadamente por los agentes embólicos.

Tabla 5: Niveles séricos del virus

	Antes de la inyección	después de la inyección	10 minutos	30 minutos	1 hora	4 horas	D1	D2
Conejo 1	<LOD	<LOD	0	0	0	0	0	0

Conejo 2	0	0	0	0	0	0	0	0
Conejo 3	0	<LOD	<LOD	0	<LOD	0	0	0

5

Ejemplo 3: Viroembolización Arterial Transcatéter con Pexa-Vec y Gelfoam

El impacto de Gelfoam en la viroembolización arterial transcatéter con el virus vaccinia oncolítico JX-594 (PexaVec) se evaluó en un modelo de tumor hepático VX2 en conejo.

10

Métodos

Preparación Animal

15

En este estudio se usaron cuatro conejos blancos, sanos, de Nueva Zelanda (Biogenomics, Seúl, Korea; Samtako, Oh San, Corea del Sur), que pesaron 2,5-3 kg cada uno.

20

La cepa de carcinoma VX2 se mantuvo por medio de trasplantes sucesivos en la extremidad posterior de un conejo portador. Para la anestesia, se inyectaron por vía intramuscular 2,5-3 mL de una mezcla 2:3 de xilazina (Rompun; Bayer Corea, Seúl, Corea) y tiletamina/zolazepam (Zoletil; Virbac, Carros, Francia) en el muslo posterior. A través de una incisión abdominal en la línea media, se implantaron 0,1 mL de carcinoma VX2 picado (2-3 mm³) en el parénquima subcapsular del lóbulo medial izquierdo del hígado. Catorce días después de la implantación del tumor, cuando los tumores tenían 15-30 mm de diámetro, los animales se usaron para los experimentos.

25

Un día antes de la emboloterapia con PexaVec, se realizó una tomografía computarizada (TC) (Somatom definition AS; Siemens Medical Systems, Erlangen, Alemania) con los animales en posición de decúbito o prono. La TC no mejorada se realizó para cubrir todo el hígado (colimación de 1,5 mm, 1,5 inclinación, e intervalo de reconstrucción de 1 mm). Para la TC mejorada con material de contraste, se inyectaron 13 mL de material de contraste a una velocidad de 0,5 mL/s a través de la vena auricular. Con la técnica de seguimiento de bolo, se obtuvo una exploración de la fase arterial y venosa portal hepática en intervalos de 5 segundos y 16 segundos (Yoon y otros, (2003) Radiology 229:126-31).

30

En el escáner TC se midió la ubicación y el tamaño del tumor. El volumen (V) del tumor se calculó de acuerdo con la ecuación $V = L \times S^2/2$, donde L es el diámetro más largo y S es el diámetro más corto del tumor (Okada y otros, (1995) Br J Cancer 71:518-524; Watanabe y otros, (1994) Oncology 52:76-81.31).

35

Viroembolización Arterial Transcatéter con PexaVec

40

Dos semanas después de la implantación del carcinoma VX2 en el hígado, se realizó la emboloterapia con guía fluoroscópica. La angiografía se realizó habitualmente con un enfoque transauricular, y se siguieron métodos detallados (Chang y otros, (2011) J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187). Se canularon las arterias auriculares centrales derecha e izquierda para determinar qué lado era ventajoso para realizar la angiografía de la arteria hepática.

45

Para la anestesia, se inyectaron por vía intramuscular 1,5 mL de una mezcla 2:3 de xilazina y tiletamina/zolazepam en el muslo posterior. Después de la anestesia, el conejo se colocó en posición supina sobre una mesa fluoroscópica. El afeitado del cabello era innecesario para el acceso arterial transauricular. El pelo corto en el sitio de punción se afeitó con una podadora eléctrica. Las orejas de los conejos se lavaron con alcohol para su esterilización. La arteria auricular central se perfora percutáneamente en una de las orejas del conejo con una aguja de Angiocath calibre 18 insertada en la dirección retrógrada. Después de hacer avanzar la vaina de plástico de la aguja de Angiocath, se retiró la aguja interna del estilete y se conectó el centro de la vaina de plástico con la tapa de una llave de tres vías. La funda de plástico se fijó mediante esparadrapo.

50

Después de aplicar una tapa perforada modificada al centro de la funda de plástico, se introdujeron un microcatéter de 2,0 F (Progreat, Terumo, Tokio, Japón) y un cable guía de 0,016 pulgadas (Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japón) en la arteria auricular central por los radiólogos intervencionistas. Se infundió aproximadamente 1 mL del agente de contraste para obtener una hoja de ruta desde la arteria carótida extracraneal hasta la aorta torácica. El cable guía se avanzó cuidadosamente hacia la aorta torácica descendente, y después se seleccionó la arteria hepática apropiada manipulando el cable guía. Después de colocar la punta del microcatéter en la arteria hepática apropiada, la angiografía de la arteria hepática se realizó mediante inyección manual del agente de contraste.

55

60

Se preparó una mezcla de 1×10^8 UFP Pexa-Vec (SillaJen, Busan, Corea) y partículas de gelfoam de 150 µm - 350 µm (Caligel, Aicon, China). La mitad de un vial de gelfoam se disolvió en 5 cc de medio de contraste y 5 cc de solución salina normal, y esta mezcla se combinó con 1 cc de Pexa-Vec. El punto final de la embolización fue cuando se logró una oclusión del vaso alimentador tumoral. Después de la selección del tumor VX2 con microcatéter, la embolización se realizó mediante el uso de 1,5 cc de la mezcla preparada de Pexa-Vec y partículas de gelfoam. Los animales de control recibieron embolización solo con tampón Tris, Pexa-Vec, o Gelfoam. Después de retirar el microcatéter y la vaina de plástico de la

65

arteria auricular central, el sitio de punción se comprimió manualmente. La composición y los regímenes de dosificación para los cuatro grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: Grupos de tratamiento de Viroembolización Arterial Transcatéter.

Grupo #	Tratamiento	Tiempo de mezcla de los materiales	Dosis	Volumen (ul)	Ruta de inyección	# de Animales
1	10 mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
2	JX-594	NA	2x10 ⁸ ufp	100 ul	HAI	1
3	Gelfoam + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
4	JX-594 + Gelfoam	10 min	2x10 ⁸ ufp/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

Monitoreo de los Animales

Los animales se observaron para constatar la supervivencia, el tamaño del tumor, el peso corporal, y la apariencia de acuerdo con la Tabla 7. Un diagrama esquemático del cronograma experimental se muestra en la Figura 2A. Se realizaron escáneres TC inmediatamente antes de la embolización (día 0) y en el día 7. Se recolectó sangre en los días -1, 3, y 9. Los animales se sacrificaron el día 9 (32 días después del implante tumoral) y los tejidos se recolectaron para análisis (Figura 2B).

Tabla 7: Calendario del monitoreo de los animales

Supervivencia	Diaria
Tamaño del tumor	Cada dos días y justo antes del sacrificio
Peso corporal	Cada dos días
Apariencia	Cada dos días: pelaje áspero, deshidratación, dificultad para respirar, letargo. Si encuentra algo inusual, tome fotos e informe
Sacrificio	32 días después del implante tumoral
Registros digitales	Escáner ST en el día del procedimiento y en el día 7 después del procedimiento

Imágenes de los Tejidos

El tejido hepático recolectado de los animales tratados y de control se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E) para visualizar los tumores. Se realizaron escáneres TC con una unidad de TC de 128 secciones (Somatom Definition AS Plus; Siemens Healthcare) con los siguientes parámetros: voltajes de tubo de 120 kVp, corriente de tubo efectiva de 90 mA, campo de visión de 146 mm, y espesor de reconstrucción de 2 mm a intervalos de 2 mm. Se realizaron escáneres TC al inicio y 23 días después del inicio del tratamiento con suero en un subconjunto de animales. El protocolo de TC incluyó la adquisición de imágenes no mejoradas y la adquisición posterior de series de imágenes arteriales, venosas y de fase retardada después de la inyección intravenosa en bolo de 8 a 9 mL de material de contraste yodado no iónico (300 mg de yodo por mililitro de iohexol (Omnipaque; GE Healthcare AS), 2 mL/kg, 2,4 a 2,7 g de yodo) a una velocidad de 2 mL/s a través de una vena de la oreja. La imagen de la fase arterial se obtuvo 10 s después de lograr la mejora de la aorta descendente a 100 unidades de Hounsfield, medida con la técnica de seguimiento de bolo. La obtención de imágenes en fase venosa se obtuvo 10 s después de la finalización de la fase arterial, y la obtención de imágenes en fase retardada 70 s después de completar la fase venosa. Para obtener muestras histológicas, se sacrificaron los conejos portadores de VX2 por inhalación de CO₂. Posteriormente, se realizó una incisión quirúrgica en el abdomen para aislar los tejidos del hígado completo que se trataron en solución de formalina al 10 % durante 2 días. Después de realizar incisiones cuidadosas en todo el hígado cruzando las masas de , los tejidos se sumergieron en parafina. Después de la tinción de rutina con H&E, la observación histológica se realizó bajo el microscopio óptico a 100-200 x.

Resultados

Se observó una masa tumoral de VX2 mejorada, con una lesión viable, en los escáneres TC antes de la emboloterapia JX-594 (Figura 3A). El tejido VX2 viable (área brillante en la Figura 3A) está rodeado por parénquima hepático normal en tejido teñido histológicamente. El tejido VX2 mostró 40-50 % de necrosis sin ningún tratamiento, lo que indica necrosis

espontánea de la masa VX2. La masa tumoral se observó en imágenes de angiografía (círculo negro) antes de la inyección de la mezcla JX-594 Gelfoam a través de la arteria hepática izquierda (Figura 3C).

5 Sin embargo, después de la inyección arterial de la mezcla JX-594 Gelfoam, se observó necrosis tumoral completa (Figura 3B y Figura 3D) tanto en las imágenes de CT como de histología. El tejido tumoral altamente necrótico observado después de la emboloterapia con JX-594 se identificó en las imágenes histológicas por la falta de tinción de tejido rosa y la ausencia de núcleos teñidos visiblemente (Figura 3D). Estos resultados indican que una dosis única de emboloterapia con JX-594 produce la muerte completa del tumor. Es de destacar que, las imágenes histológicas demuestran tejido hepático sano e intacto fuera del tumor después de la emboloterapia con JX-594, como lo indica la tinción rosada intensa y los núcleos teñidos visiblemente en el lado izquierdo del panel (Figura 3D) y en toda la Figura 3E. Esto indica que no se produce daño al tejido hepático normal como resultado de la emboloterapia con JX-594, incluso en la unión entre el tumor y el tejido sano, ya que se observó una inflamación mínima en el área de unión del tumor y el parénquima normal (Figura 3D). Estos resultados destacan la exquisita especificidad de la emboloterapia con JX-594, ya que el virus se dirige exclusivamente al tumor, lo que conduce a una necrosis tumoral eficaz, sin dañar el tejido hepático sano. Por lo tanto, los métodos de embolización de la presente descripción representan un método seguro y al mismo tiempo eficaz para disminuir la carga tumoral.

20 Sin desear limitarse a la teoría, se cree que el agente embólico Gelfoam es efectivo para retener virus más grandes o virus que se liberan apicalmente a partir de las células polarizadas, tal como el virus vaccinia, en el lugar adecuado durante la emboloterapia. Esta localización sostenida en la interfaz del tumor, a su vez, contribuye a un mayor suministro y a una infección dirigida al tejido tumoral. Por el contrario, los virus más pequeños, tal como el VSV, son capaces de difundirse a través de los agentes embólicos y dispersarse lejos del tumor, lo que conduce a un suministro menos dirigido y a una menor infección en los tejidos tumorales. Nuevamente, sin estar limitado por la teoría, una mayor localización del virus en el tejido diana cuando se formula con Gelfoam puede explicar por qué los métodos de embolización de la descripción no solo son eficaces, sino sorprendentemente efectivos, incluso con grandes virus oncolíticos y virus que brotan de la superficie apical tal como el virus vaccinia.

30 Además, estos resultados enfatizan la eficacia robusta de los métodos de embolización de la presente descripción, ya que un solo tratamiento conduce a la necrosis tumoral completa, mientras que los métodos de quimioembolización transarterial utilizados previamente requieren tratamientos repetidos para erradicar los tumores eficazmente.

Ejemplo 4: Eficacia y Modulación PK del Virus Vaccinia Oncolítico después de la Viroembolización Arterial Transcatéter en Conejos

35 La eficacia de la viroembolización arterial transcatéter (TAVE) versus la viroterapia oncolítica y la embolización se evaluó en un modelo de tumor en conejo. La farmacocinética (PK) del virus inyectado se examinó midiendo el número de partículas virales en muestras de sangre periférica.

Métodos

40 En este estudio se usaron conejos blancos, hembras, de Nueva Zelanda (Biogenomics, Seúl, Corea; Samtako, Oh San, Corea del Sur), que pesaron 2,5-3 kg cada uno. La anestesia se realizó mediante la inyección de 2,5-3,0 mL de una mezcla 2:3 de Rompun y Zoletil por vía intramuscular en el muslo posterior. Se implantó el tejido tumoral de carcinoma VX2 picado (0,1 mL) en el parénquima subcapsular del lóbulo medial izquierdo del hígado a través de una incisión abdominal en la línea media, y se incubó durante 14-23 días hasta que el tumor alcanzó 15-30 mm de diámetro. En este estudio se utilizó la cepa vvDD-CDSR del virus vaccinia, purificada por almohadilla de sacarosa. La emboloterapia se realizó de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 3 mediante el uso de partículas de Gelfoam (SCION, Alicon, Hangzhou, China), de tamaño 150-350 μ m. Se usaron 100 mL de Iodixanol 320 mg/mL (VISIPAQUE, GE Healthcare, Cork, Irlanda) como agente de restricción durante la embolización. Los grupos de tratamiento, las dosificaciones, y el diseño del estudio se muestran en la Tabla 8 y en la **Figura 4**. Los tres grupos de tratamiento incluyen virus oncolítico (VO) solo, embolización transarterial (TAE) sola, y viroembolización transarterial (TAVE). La sangre se recolectó 1 día e inmediatamente antes del tratamiento, y 30 minutos, 4 horas, 1, 7, 14, 28 y 56 días después del tratamiento.

Tabla 8: Diseño del Estudio

grupo	# animal /género	Prescripción	Materia	Vehículo	Dosis, Volumen	Ruta de inyección
1	3/hembra (solo 2 por PK)	TAVE	vvDD-CDSR + Gelfoam	Sol. Salina normal	10mg gelfoam 1cc sol salina 1ccOV 1cc medio contraste	AI
2	3/hembra (solo 2 por PK)	OV solo	vvDD-CDSR	Sol. Salina normal	1×10^8 pfu/ml, 1ml	AI
3	3/hembra	TAE solo	Gelfoam	Sol. Salina normal	50 mg gelfoam 5cc medio contraste 5cc sol. salina	AI

Se realizaron recuentos sanguíneos completos (CBC) y ensayos de bioquímica en las muestras de sangre recolectadas (Tabla 9). Las partículas virales en las muestras de sangre se cuantificaron mediante PCR cuantitativa (Q-PCR). Las mediciones de los anticuerpos se realizaron antes de la embolización y a los 28 días después del tratamiento mediante el uso de 300 µl de plasma. Los escáneres TC se usaron para medir el tamaño del tumor antes y después de la emboloterapia. El monitoreo de los animales se realizó durante el estudio de acuerdo con la Tabla 10.

Tabla 9: Volumen de sangre requerido para el análisis

Ítem de Evaluación	Volumen de muestra requerido	Sangre completa requerida
CBC	1 mL, de sangre completa	1 mL
Bioquímica	1 mL, plasma	2 mL
qPCR	500uL, suero	1 mL

Tabla 10: Cronograma de monitoreo animal

Cronograma	Parámetro	Nota
Estudio previo	Observaciones clínicas	Anomalías visuales
Duración de la vida (cada dos días)	Observaciones clínicas	Morbilidad, Mortalidad, Signos Clínicos (pelaje, deshidratación, respiración, etcétera)
	Peso corporal	
	Supervivencia	
Antes del sacrificio	Observaciones clínicas	Signos clínicos, peso corporal

Ejemplo 5: Viroembolización Arterial Transcatéter con virus vDD-CDSR y Gelfoam

El impacto de Gelfoam en la emboloterapia transcatéter con el virus vaccinia oncolítico wDD-CDSR se evaluó en un modelo de tumor hepático VX2 en conejo.

Métodos

Preparación Animal

En este estudio se usaron cuatro conejos blancos, sanos, de Nueva Zelanda (Biogenomics, Seúl, Corea; Samtako, Oh San, Corea del Sur), que pesaron 2,5-3 kg cada uno.

La cepa de carcinoma VX2 se mantiene mediante trasplantes sucesivos en la extremidad posterior de un conejo portador. Para la anestesia, se inyectaron 2,5-3 mL de una mezcla 2:3 de xilacina (Rompun; Bayer Corea, Seúl, Corea) y tiletamina/zolazepam (Zoletil; Virbac, Carros, Francia) por vía intramuscular en el muslo posterior. A través de una incisión abdominal en la línea media, se implanta 0,1 mL de carcinoma VX2 picado (2-3 mm³) en el parénquima subcapsular del lóbulo medial izquierdo del hígado. Catorce días después de la implantación del tumor, cuando los tumores tienen un diámetro de 15-30 mm, los animales se usaron para los experimentos.

Un día antes de la emboloterapia con vDD-CDSR, se realizó una tomografía computarizada (TC) (Somatom definition AS; Siemens Medical Systems, Erlangen, Alemania) con los animales en posición prono o decúbito. La TC no mejorada se realiza para cubrir todo el hígado (colimación de 1,5 mm, 1,5 inclinación, e intervalo de reconstrucción de 1 mm). Para la TC mejorada con material de contraste, se inyectan 13 mL del material de contraste a una velocidad de 0,5 mL/s a través de la vena auricular. Con la técnica de seguimiento de bolo, se obtiene una exploración de la fase arterial y venosa portal hepática en intervalos de 5 segundos y 16 segundos (Yoon y otros, (2003) Radiology 229:126-31).

En el escáner TC se mide la ubicación y el tamaño del tumor. El volumen (V) del tumor se calculó de acuerdo con la ecuación $V = L \times S^2/2$, donde L es el diámetro más largo y S es el diámetro más corto del tumor (Okada y otros, (1995) Br J Cancer 71:518-524; Watanabe y otros, (1994) Oncology 52:76-81.31).

Viroembolización Arterial Transcatéter con vDD-CDSR

Dos semanas después de la implantación del carcinoma VX2 en el hígado, se realizó la emboloterapia con guía fluoroscópica. La angiografía se realiza habitualmente con un enfoque transauricular, y se siguen métodos detallados (Chang y otros, (2011) J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187). Las arterias auriculares centrales derecha e izquierda se canularon para determinar qué lado es ventajoso para realizar una angiografía de la arteria hepática.

Para la anestesia, se inyectaron por vía intramuscular 1,5 mL de una mezcla 2:3 de xilazina y tiletamina/zolazepam en el muslo posterior. Después de la anestesia, el conejo se coloca en posición supina sobre una mesa fluoroscópica. El afeitado del cabello es innecesario para el acceso arterial transauricular. El pelo corto en el sitio de punción se afeita con una podadora eléctrica. Las orejas de los conejos se frotan con alcohol para su esterilización. La arteria auricular central se perfora percutáneamente en una de las orejas del conejo con una aguja de Angiocath calibre 18 insertada en la dirección retrógrada. Después de hacer avanzar la vaina de plástico de la aguja de Angiocath, se retira la aguja interna del estilete y se tapa el centro de la vaina de plástico con la tapa de una llave de tres vías. La funda de plástico se fija mediante esparadrapo.

Después de aplicar una tapa perforada modificada al centro de la funda de plástico, se introdujeron un microcatéter 2,0-F (Progreat, Terumo, Tokio, Japón) y un cable guía de 0,016 pulgadas (Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japón) en la arteria auricular central por los radiólogos intervencionistas. Se infundió aproximadamente 1 mL del agente de contraste para obtener una hoja de ruta desde la arteria carótida extracraneal hasta la aorta torácica. El cable guía se avanzó cuidadosamente hacia la aorta torácica descendente, y después se seleccionó la arteria hepática apropiada manipulando el cable guía. Después de colocar la punta del microcatéter en la arteria hepática apropiada, la angiografía de la arteria hepática se realizó mediante inyección manual del agente de contraste.

Se preparó una mezcla de 1×10^8 UFP de vvDD-CDSR (Instituto de Investigación del Hospital de Ottawa (OHRI)) y partículas de gelfoam de 150 μm - 350 μm (Caligel, Aicon, China). Se disolvió un vial completo de gelfoam en 10 mL de solución salina normal con una jeringa de 20 mL y el extremo de la jeringa se insertó en un lado de la llave de paso de 3 vías. Se prepararon 10 mL de medio de contraste en una jeringa separada de 10 mL y se insertó en otro lado de la llave de paso de 3 vías. La mezcla de Gelfoam y solución salina y los medios de contraste se combinaron suavemente mediante el bombeo alternativo de los émbolos. Se tomaron 0,3 mL de la mezcla de gelfoam -solución salina- medio contraste con una jeringa de 1 mL y se mezcló con 1 cc de virus. El punto final de la embolización es cuando se logra una oclusión del vaso alimentador tumoral. Después de la selección del tumor VX2 con microcatéter, la embolización se realizó mediante el uso de 0,4 mL de la mezcla preparada de virus y partículas de gelfoam. Los animales de control reciben embolización solo con tampón Tris, virus, o Gelfoam. Después de retirar el microcatéter y la vaina de plástico de la arteria auricular central, el sitio de punción se comprime manualmente. La composición y los regímenes de dosificación para los cuatro grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11: Grupos de tratamiento de Viroembolización Arterial Transcatéter.

Grupo #	Tratamiento	Tiempo de mezcla de los materiales	Dosis	Volumen (ul)	Ruta de inyección	# de Animales
1	10 mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
2	vvDD-CDSR	NA	5×10^7 ufp	100 ul	HAI	1
3	Gelfoam + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
4	vvDD-CDSR + Gelfoam	10 min	5×10^7 ufp/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

Monitoreo de los Animales

Los animales se observaron para constatar la supervivencia, el tamaño del tumor, el peso corporal, y la apariencia de acuerdo con la Tabla 12. Se realizaron escáneres TC inmediatamente antes de la embolización (día 0) y en el día 7. Se recolectó sangre en los días -1, 3, y 9. Los animales se sacrificaron el día 9 (32 días después del implante tumoral) y los tejidos se cosechan para su análisis.

Tabla 12: Cronograma de monitoreo de los animales

Supervivencia	Diaria
Tamaño del tumor	Cada dos días y justo antes del sacrificio
Peso corporal	Cada dos días
Apariencia	Cada dos días: pelaje áspero, deshidratación, dificultad para respirar, letargo. Si encuentra algo inusual, tome fotos e informe
Sacrificio	32 días después del implante tumoral
Registros digitales	Escáner ST en el día del procedimiento y en el día 7 después del procedimiento

15

Imágenes de los Tejidos

El tejido hepático recolectado de los animales tratados y de control se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E) para visualizar los tumores. Se realizaron escáneres TC con una unidad de TC de 128 secciones (Somatom Definition AS Plus; Siemens Healthcare) con los siguientes parámetros: voltajes de tubo de 120 kVp, corriente de tubo efectiva de 90 mA, campo de visión de 146 mm, y espesor de reconstrucción de 2 mm a intervalos de 2 mm. Se realizaron escáneres TC al inicio y 23 días después del inicio del tratamiento con suero. El protocolo de CT incluye la adquisición de imágenes no mejoradas y la adquisición posterior de series de imágenes de fase arterial, venosa y retardada después de la inyección intravenosa en bolo de 8 a 9 mL del material de contraste yodado no iónico (300 mg de yodo por mililitro de iohexol (Omnipaque; GE Healthcare AS), 2 mL/kg, 2,4 a 2,7 g de yodo) a una velocidad de 2 mL/s a través de una vena de la oreja. La obtención de imágenes de la fase arterial se obtiene 10 s después de lograr la mejora de la aorta descendente a 100 unidades Hounsfield, medida con la técnica de seguimiento de bolo. La obtención de imágenes en fase venosa se obtiene 10 s después de completar la fase arterial, y la obtención de imágenes en fase retardada se obtiene 70 s después de completar la fase venosa. Para obtener muestras histológicas, los conejos portadores de VX2 se sacrifican por inhalación de CO₂. Posteriormente, se realizó una incisión quirúrgica en el abdomen para aislar los tejidos del hígado completo que se trataron en una solución de formalina al 10 % durante 2 días. Después de realizar incisiones cuidadosas en todo el hígado cruzando las masas de VX2, los tejidos se sumergieron en parafina. Después de la tinción de rutina con H&E, la observación histológica se realizó bajo el microscopio óptico a 100-200 x.

35 Ejemplo 6: Viroembolización Arterial Transcatéter con virus SJ-102 y Gelfoam

El impacto de Gelfoam en la emboloterapia transcatéter con el virus vaccinia oncolítico SJ-102 se evaluó en un modelo de tumor hepático VX2 en conejo.

40 Métodos

Preparación Animal

En este estudio se usaron cuatro conejos blancos, sanos, de Nueva Zelanda (Biogenomics, Seúl, Corea; Samtako, Oh San, Corea del Sur), que pesaron 2,5-3 kg cada uno.

La cepa de carcinoma VX2 se mantiene mediante trasplantes sucesivos en la extremidad posterior de un conejo portador. Para la anestesia, se inyectaron 2,5-3 mL de una mezcla 2:3 de xilacina (Rompun; Bayer Corea, Seúl, Corea) y tiletamina/zolazepam (Zoletil; Virbac, Carros, Francia) por vía intramuscular en el muslo posterior. A través de una incisión abdominal en la línea media, se implanta 0,1 mL de carcinoma VX2 picado (2-3 mm³) en el parénquima subcapsular del lóbulo medial izquierdo del hígado. Catorce días después de la implantación del tumor, cuando los tumores tienen un diámetro de 15-30 mm, los animales se usaron para los experimentos.

Un día antes de la emboloterapia con SJ-102, se realizó una tomografía computarizada (TC) (Somatom definition AS; Siemens Medical Systems, Erlangen, Alemania) con los animales en posición prono o decúbito. La TC no mejorada se realiza para cubrir todo el hígado (colimación de 1,5 mm, 1,5 inclinación, e intervalo de reconstrucción de 1 mm). Para la TC mejorada con material de contraste, se inyectan 13 mL del material de contraste a una velocidad de 0,5 mL/s a través de la vena auricular. Con la técnica de seguimiento de bolo, se obtiene una exploración de la fase arterial y venosa portal hepática en intervalos de 5 segundos y 16 segundos (Yoon y otros, (2003) Radiology 229:126-31).

En el escáner TC se mide la ubicación y el tamaño del tumor. El volumen (V) del tumor se calculó de acuerdo con la ecuación $V = L \times S^2/2$, donde L es el diámetro más largo y S es el diámetro más corto del tumor (Okada y otros, (1995) Br J Cancer 71:518-524; Watanabe y otros, (1994) Oncology 52:76-81.31).

65 Viroembolización Arterial Transcatéter con SJ-102

Dos semanas después de la implantación del carcinoma VX2 en el hígado, se realizó la emboloterapia con guía fluoroscópica. La angiografía se realiza habitualmente con un enfoque transauricular, y se siguen métodos detallados (Chang y otros, (2011) J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187). Las arterias auriculares centrales derecha e izquierda se canularon para determinar qué lado es ventajoso para realizar una angiografía de la arteria hepática.

5 Para la anestesia, se inyectaron por vía intramuscular 1,5 mL de una mezcla 2:3 de xilazina y tiletamina/zolazepam en el muslo posterior. Después de la anestesia, el conejo se coloca en posición supina sobre una mesa fluoroscópica. El afeitado del cabello es innecesario para el acceso arterial transauricular. El pelo corto en el sitio de punción se afeita con una podadora eléctrica. Las orejas de los conejos se frota con alcohol para su esterilización. La arteria auricular central se perfora percutáneamente en una de las orejas del conejo con una aguja de Angiocath calibre 18 insertada en la dirección retrógrada. Después de hacer avanzar la vaina de plástico de la aguja de Angiocath, se retira la aguja interna del estilete y se tapa el centro de la vaina de plástico con la tapa de una llave de tres vías. La funda de plástico se fija mediante esparadrapo.

15 Después de aplicar una tapa perforada modificada al centro de la funda de plástico, se introdujeron un microcatéter 2,0-F (Progreat, Terumo, Tokio, Japón) y un cable guía de 0,016 pulgadas (Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japón) en la arteria auricular central por los radiólogos intervencionistas. Se infundió aproximadamente 1 mL del agente de contraste para obtener una hoja de ruta desde la arteria carótida extracraneal hasta la aorta torácica. El cable guía se avanzó cuidadosamente hacia la aorta torácica descendente, y después se seleccionó la arteria hepática apropiada manipulando el cable guía. Después de colocar la punta del microcatéter en la arteria hepática apropiada, la angiografía de la arteria hepática se realizó mediante inyección manual del agente de contraste.

25 Se preparó una mezcla de 1×10^8 UFP de SJ-102 (generada a partir de la cepa Wyeth (ATCC)) y partículas de gelfoam de 150 μm - 350 μm (Caligel, Alicon, China). La mitad de un vial de gelfoam se disolvió en 5 cc de medio de contraste y 5 cc de solución salina normal, y esta mezcla se combinó con 1 cc de virus. El punto final de la embolización es cuando se logra una oclusión del vaso alimentador tumoral. Después de la selección del tumor VX2 con microcatéter, la embolización se realiza mediante el uso de 1,5 cc de una mezcla preparada de virus y partículas de gelfoam. Los animales de control reciben embolización solo con tampón Tris, virus, o Gelfoam. Después de retirar el microcatéter y la vaina de plástico de la arteria auricular central, el sitio de punción se comprime manualmente. La composición y los regímenes de dosificación para los cuatro grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13: Grupos de tratamiento de Viroembolización Arterial Transcatéter.

Grupo #	Tratamiento	Tiempo de mezcla de los materiales	Dosis	Volumen (ul)	Ruta de inyección	# de Animales
1	10 mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
2	SJ-102	NA	5x10 ⁷ ufp	100 ul	HAI	1
3	Gelfoam + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
4	SJ-102 + Gelfoam	10 min	5x10 ⁷ ufp/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

Monitoreo de los Animales

Los animales se observaron para constatar la supervivencia, el tamaño del tumor, el peso corporal, y la apariencia de acuerdo con la Tabla 14. Se realizaron escáneres TC inmediatamente antes de la embolización (día 0) y en el día 7. Se recolectó sangre en los días -1, 3, y 9. Los animales se sacrificaron el día 9 (32 días después del implante tumoral) y los tejidos se cosechan para su análisis.

Tabla 14: Calendario de monitoreo de los animales

Supervivencia	Diaria
Tamaño del tumor	Cada dos días y justo antes del sacrificio
Peso corporal	Cada dos días
Apariencia	Cada dos días: pelaje áspero, deshidratación, dificultad para respirar, letargo. Si encuentra algo inusual, tome fotos e informe
Sacrificio	32 días después del implante tumoral
Registros digitales	Escáner ST en el día del procedimiento y en el día 7 después del procedimiento

Imágenes de los Tejidos

El tejido hepático recolectado de los animales tratados y de control se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E) para visualizar los tumores. Se realizaron escáneres TC con una unidad de TC de 128 secciones (Somatom Definition AS Plus; Siemens Healthcare) con los siguientes parámetros: voltajes de tubo de 120 kVp, corriente de tubo efectiva de 90 mA, campo de visión de 146 mm, y espesor de reconstrucción de 2 mm a intervalos de 2 mm. Se realizaron escáneres TC al inicio y 23 días después del inicio del tratamiento con suero. El protocolo de CT incluye la adquisición de imágenes no mejoradas y la adquisición posterior de series de imágenes de fase arterial, venosa y retardada después de la inyección intravenosa en bolo de 8 a 9 mL del material de contraste yodado no iónico (300 mg de yodo por mililitro de iohexol (Omnipaque; GE Healthcare AS), 2 mL/kg, 2,4 a 2,7 g de yodo) a una velocidad de 2 mL/s a través de una vena de la oreja. La obtención de imágenes de la fase arterial se obtiene 10 s después de lograr la mejora de la aorta descendente a 100 unidades Hounsfield, medida con la técnica de seguimiento de bolo. La obtención de imágenes en fase venosa se obtiene 10 s después de completar la fase arterial, y la obtención de imágenes en fase retardada se obtiene 70 s después de completar la fase venosa. Para obtener muestras histológicas, los conejos portadores de VX2 se sacrifican por inhalación de CO₂. Posteriormente, se realizó una incisión quirúrgica en el abdomen para aislar los tejidos del hígado completo que se trataron en una solución de formalina al 10 % durante 2 días. Después de realizar incisiones cuidadosas en todo el hígado cruzando las masas de VX2, los tejidos se sumergieron en parafina. Después de la tinción de rutina con H&E, la observación histológica se realizó bajo el microscopio óptico a 100-200 x.

Ejemplo 7: Viroembolización Arterial Transcatéter con virus SJ-103 y Gelfoam

El impacto de Gelfoam en la emboloterapia transcatéter con el virus vaccinia oncolítico SJ-103 se evaluó en un modelo de tumor hepático VX2 en conejo.

Métodos

Virus SJ-103

El virus vaccinia atenuado SJ-103 se modificó genéticamente a partir de Western Reserve Vaccinia (ATCC VR-1354, TC adaptado) mediante la inserción de dos genes marcadores de selección en el gen de la timidina quinasa (TK) del virus, de esta manera el gen TK se torna inactivo. El gen de selección gpt, que confiere resistencia a un inhibidor de la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa, se colocó bajo el control de un promotor viral p7.5 temprano-tardío. Se colocó un gen marcador fluorescente GFP bajo el control de un promotor sintético temprano-tardío. Como resultado de la interrupción de TK, el virus SJ-103 se dirige selectivamente a las células cancerosas.

Preparación Animal

En este estudio se usaron cuatro conejos blancos, sanos, de Nueva Zelanda (Biogenomics, Seúl, Corea; Samtako, Oh San, Corea del Sur), que pesaron 2,5-3 kg cada uno.

La cepa de carcinoma VX2 se mantiene mediante trasplantes sucesivos en la extremidad posterior de un conejo portador. Para la anestesia, se inyectaron 2,5-3 mL de una mezcla 2:3 de xilacina (Rompun; Bayer Corea, Seúl, Corea) y tiletamina/zolazepam (Zoletil; Virbac, Carros, Francia) por vía intramuscular en el muslo posterior. A través de una incisión abdominal en la línea media, se implanta 0,1 mL de carcinoma VX2 picado (2-3 mm³) en el parénquima subcapsular del lóbulo medial izquierdo del hígado. Catorce días después de la implantación del tumor, cuando los tumores tienen un diámetro de 15-30 mm, los animales se usaron para los experimentos.

Un día antes de la emboloterapia con SJ-103, se realizó una tomografía computarizada (TC) (Somatom definition AS; Siemens Medical Systems, Erlangen, Alemania) con los animales en posición prono o decúbito. La TC no mejorada se realiza para cubrir todo el hígado (colimación de 1,5 mm, 1,5 inclinación, e intervalo de reconstrucción de 1 mm). Para la TC mejorada con material de contraste, se inyectan 13 mL del material de contraste a una velocidad de 0,5 mL/s a través de la vena auricular. Con la técnica de seguimiento de bolo, se obtiene una exploración de la fase arterial y venosa portal hepática en intervalos de 5 segundos y 16 segundos (Yoon y otros, (2003) Radiology 229:126-31).

En el escáner TC se mide la ubicación y el tamaño del tumor. El volumen (V) del tumor se calculó de acuerdo con la ecuación $V = L \times S^2/2$, donde L es el diámetro más largo y S es el diámetro más corto del tumor (Okada y otros, (1995) Br J Cancer 71:518-524; Watanabe y otros, (1994) Oncology 52:76-81.31).

Viroembolización Arterial Transcatéter con SJ-103

Dos semanas después de la implantación del carcinoma VX2 en el hígado, se realizó la emboloterapia con guía fluoroscópica. La angiografía se realiza habitualmente con un enfoque transauricular, y se siguen métodos detallados (Chang y otros, (2011) J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187). Las arterias auriculares centrales derecha e izquierda se canularon para determinar qué lado es ventajoso para realizar una angiografía de la arteria hepática.

5 Para la anestesia, se inyectaron por vía intramuscular 1,5 mL de una mezcla 2:3 de xilazina y tiletamina/zolazepam en el muslo posterior. Después de la anestesia, el conejo se coloca en posición supina sobre una mesa fluoroscópica. El afeitado del cabello es innecesario para el acceso arterial transauricular. El pelo corto en el sitio de punción se afeita con una podadora eléctrica. Las orejas de los conejos se frotran con alcohol para su esterilización. La arteria auricular central se perfora percutáneamente en una de las orejas del conejo con una aguja de Angiocath calibre 18 insertada en la dirección retrógrada. Después de hacer avanzar la vaina de plástico de la aguja de Angiocath, se retira la aguja interna del estilete y se tapa el centro de la vaina de plástico con la tapa de una llave de tres vías. La funda de plástico se fija mediante esparadrapo.

10 Después de aplicar una tapa perforada modificada al centro de la funda de plástico, se introdujeron un microcatéter 2,0-F (Progreat, Terumo, Tokio, Japón) y un cable guía de 0,016 pulgadas (Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japón) en la arteria auricular central por los radiólogos intervencionistas. Se infundió aproximadamente 1 mL del agente de contraste para obtener una hoja de ruta desde la arteria carótida extracraneal hasta la aorta torácica. El cable guía se avanzó cuidadosamente hacia la aorta torácica descendente, y después se seleccionó la arteria hepática apropiada manipulando el cable guía. Después de colocar la punta del microcatéter en la arteria hepática apropiada, la angiografía de la arteria hepática se realizó mediante inyección manual del agente de contraste.

20 Se preparó una mezcla de 1X10⁸ UFP de SJ-103 (generada a partir de la cepa WR (ATCC)) y partículas de gelfoam de 150 µm-350 µm (Caligel, Alicon, China). La mitad de un vial de gelfoam se disolvió en 5 cc de medio de contraste y 5 cc de solución salina normal, y esta mezcla se combinó con 1 cc de virus. El punto final de la embolización es cuando se logra una oclusión del vaso alimentador tumoral. Después de la selección del tumor VX2 con microcatéter, la embolización se realiza mediante el uso de 1,5 cc de una mezcla preparada de virus y partículas de gelfoam. Los animales de control reciben embolización solo con tampón Tris, virus, o Gelfoam. Después de retirar el microcatéter y la vaina de plástico de la arteria auricular central, el sitio de punción se comprime manualmente. La composición y los regímenes de dosificación para los cuatro grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15: Grupos de tratamiento de Viroembolización Arterial Transcatéter.

Grupo #	Tratamiento	Tiempo de mezcla de los materiales	Dosis	Volumen (ul)	Ruta de inyección	# de Animales
1	10 mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
2	SJ-103	NA	5x10 ⁷ ufp	100 ul	HAI	1
3	Gelfoam + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
4	SJ-103 + Gelfoam	10 min	5x10 ⁷ ufp/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

Monitoreo de los Animales

45 Los animales se observaron para constatar la supervivencia, el tamaño del tumor, el peso corporal, y la apariencia de acuerdo con la Tabla 16. Se realizaron escáneres TC inmediatamente antes de la embolización (día 0) y en el día 7. Se recolectó sangre en los días -1, 3, y 9. Los animales se sacrificaron el día 9 (32 días después del implante tumoral) y los tejidos se cosechan para su análisis.

Tabla 16: Calendario de monitoreo de animales

Supervivencia	Diaria
Tamaño del tumor	Cada dos días y justo antes del sacrificio
Peso corporal	Cada dos días
Apariencia	Cada dos días: pelaje áspero, deshidratación, dificultad para respirar, letargo. Si encuentra algo inusual, tome fotos e informe
Sacrificio	32 días después del implante tumoral
Registros digitales	Escáner ST en el día del procedimiento y en el día 7 después del procedimiento

65 Imágenes de los Tejidos

El tejido hepático recolectado de los animales tratados y de control se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E) para visualizar los tumores. Se realizaron escáneres TC con una unidad de TC de 128 secciones (Somatom Definition AS Plus; Siemens Healthcare) con los siguientes parámetros: voltajes de tubo de 120 kVp, corriente de tubo efectiva de 90 mA, campo de visión de 146 mm, y espesor de reconstrucción de 2 mm a intervalos de 2 mm. Se realizaron escáneres TC al inicio y 23 días después del inicio del tratamiento con suero. El protocolo de CT incluye la adquisición de imágenes no mejoradas y la adquisición posterior de series de imágenes de fase arterial, venosa y retardada después de la inyección intravenosa en bolo de 8 a 9 mL del material de contraste yodado no iónico (300 mg de yodo por mililitro de iohexol (Omnipaque; GE Healthcare AS), 2 mL/kg, 2,4 a 2,7 g de yodo) a una velocidad de 2 mL/s a través de una vena de la oreja. La obtención de imágenes de la fase arterial se obtiene 10 s después de lograr la mejora de la aorta descendente a 100 unidades Hounsfield, medida con la técnica de seguimiento de bolo. La obtención de imágenes en fase venosa se obtiene 10 s después de completar la fase arterial, y la obtención de imágenes en fase retardada se obtiene 70 s después de completar la fase venosa. Para obtener muestras histológicas, los conejos portadores de VX2 se sacrifican por inhalación de CO₂. Posteriormente, se realizó una incisión quirúrgica en el abdomen para aislar los tejidos del hígado completo que se trataron en una solución de formalina al 10 % durante 2 días. Después de realizar incisiones cuidadosas en todo el hígado cruzando las masas de VX2, los tejidos se sumergieron en parafina. Después de la tinción de rutina con H&E, la observación histológica se realizó bajo el microscopio óptico a 100-200 x.

Ejemplo 8: Viroembolización Arterial Transcatéter con virus WR-TK(-) y Gelfoam

El impacto de Gelfoam en la emboloterapia transcatéter con el virus vaccinia oncolítico WR-TK(-) se evaluó en un modelo de tumor hepático VX2 en conejo.

Métodos

Preparación Animal

En este estudio se usaron cuatro conejos blancos, sanos, de Nueva Zelanda (Biogenomics, Seúl, Corea; Samtako, Oh San, Corea del Sur), que pesaron 2,5-3 kg cada uno.

La cepa de carcinoma VX2 se mantiene mediante trasplantes sucesivos en la extremidad posterior de un conejo portador. Para la anestesia, se inyectaron 2,5-3 mL de una mezcla 2:3 de xilacina (Rompun; Bayer Corea, Seúl, Corea) y tiletamina/zolazepam (Zoletil; Virbac, Carros, Francia) por vía intramuscular en el muslo posterior. A través de una incisión abdominal en la línea media, se implanta 0,1 mL de carcinoma VX2 picado (2-3 mm³) en el parénquima subcapsular del lóbulo medial izquierdo del hígado. Catorce días después de la implantación del tumor, cuando los tumores tienen un diámetro de 15-30 mm, los animales se usaron para los experimentos.

Un día antes de la emboloterapia con WR-TK(-), se realizó una tomografía computarizada (CT) (Somatom definition AS; Siemens Medical Systems, Erlangen, Alemania) con los animales en posición prono o decúbito. La TC no mejorada se realiza para cubrir todo el hígado (colimación de 1,5 mm, 1,5 inclinación, e intervalo de reconstrucción de 1 mm). Para la TC mejorada con material de contraste, se inyectan 13 mL del material de contraste a una velocidad de 0,5 mL/s a través de la vena auricular. Con la técnica de seguimiento de bolo, se obtiene una exploración de la fase arterial y venosa portal hepática en intervalos de 5 segundos y 16 segundos (Yoon y otros, (2003) Radiology 229:126-31).

En el escáner TC se mide la ubicación y el tamaño del tumor. El volumen (V) del tumor se calculó de acuerdo con la ecuación $V = L \times S^2/2$, donde L es el diámetro más largo y S es el diámetro más corto del tumor (Okada y otros, (1995) Br J Cancer 71:518-524; Watanabe y otros, (1994) Oncology 52:76-81.31).

Viroembolización Arterial Transcatéter con WR-TK(-)

Dos semanas después de la implantación del carcinoma VX2 en el hígado, se realizó la emboloterapia con guía fluoroscópica. La angiografía se realiza habitualmente con un enfoque transauricular, y se siguen métodos detallados (Chang y otros, (2011) J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187). Las arterias auriculares centrales derecha e izquierda se canularon para determinar qué lado es ventajoso para realizar una angiografía de la arteria hepática.

Para la anestesia, se inyectaron por vía intramuscular 1,5 mL de una mezcla 2:3 de xilacina y tiletamina/zolazepam en el muslo posterior. Después de la anestesia, el conejo se coloca en posición supina sobre una mesa fluoroscópica. El afeitado del cabello es innecesario para el acceso arterial transauricular. El pelo corto en el sitio de punción se afeita con una podadora eléctrica. Las orejas de los conejos se frota con alcohol para su esterilización. La arteria auricular central se perfora percutáneamente en una de las orejas del conejo con una aguja de Angiocath calibre 18 insertada en la dirección retrógrada. Después de hacer avanzar la vaina de plástico de la aguja de Angiocath, se retira la aguja interna del estilete y se tapa el centro de la vaina de plástico con la tapa de una llave de tres vías. La funda de plástico se fija mediante esparadrappo.

Después de aplicar una tapa perforada modificada al centro de la funda de plástico, se introdujeron un microcatéter 2,0-F (Progreat, Terumo, Tokio, Japón) y un cable guía de 0,016 pulgadas (Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japón) en la arteria auricular central por los radiólogos intervencionistas. Se infundió aproximadamente 1 mL del agente de contraste

para obtener una hoja de ruta desde la arteria carótida extracraneal hasta la aorta torácica. El cable guía se avanzó cuidadosamente hacia la aorta torácica descendente, y después se seleccionó la arteria hepática apropiada manipulando el cable guía. Después de colocar la punta del microcatéter en la arteria hepática apropiada, la angiografía de la arteria hepática se realizó mediante inyección manual del agente de contraste.

5

Se preparó una mezcla de 1×10^8 UFP de WR-TK(-) y partículas de gelfoam de 150 μm -350 μm (Caligel, Alicon, China). La mitad de un vial de gelfoam se disolvió en 5 cc de medio de contraste y 5 cc de solución salina normal, y esta mezcla se combinó con 1 cc de virus. El punto final de la embolización es cuando se logra una oclusión del vaso alimentador tumoral. Después de la selección del tumor VX2 con microcatéter, la embolización se realiza mediante el uso de 1,5 cc de una mezcla preparada de virus y partículas de gelfoam. Los animales de control reciben embolización solo con tampón Tris, virus, o Gelfoam. Después de retirar el microcatéter y la vaina de plástico de la arteria auricular central, el sitio de punción se comprime manualmente. La composición y los regímenes de dosificación para los cuatro grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 17.

10

15

Tabla 17: Grupos de tratamiento de Viroembolización Arterial Transcatéter.

Grupo #	Tratamiento	Tiempo de mezcla de los materiales	Dosis	Volumen (ul)	Ruta de inyección	# de Animales
1	10 mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
2	WR-TK(-)	NA	5x10 ⁷ ufp	100 ul	HAI	1
3	Gelfoam + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
4	WR-TK(-) + Gelfoam	10 min	5x10 ⁷ ufp/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

20

25

30

Monitoreo de los Animales

Los animales se observaron para constatar la supervivencia, el tamaño del tumor, el peso corporal, y la apariencia de acuerdo con la Tabla 18. Se realizaron escáneres TC inmediatamente antes de la embolización (día 0) y en el día 7. Se recolectó sangre en los días -1, 3, y 9. Los animales se sacrificaron el día 9 (32 días después del implante tumoral) y los tejidos se cosechan para su análisis.

35

Tabla 18: Calendario de monitoreo de animales

Supervivencia	Diaria
Tamaño del tumor	Cada dos días y justo antes del sacrificio
Peso corporal	Cada dos días
Apariencia	Cada dos días: pelaje áspero, deshidratación, dificultad para respirar, letargo. Si encuentra algo inusual, tome fotos e informe
Sacrificio	32 días después del implante tumoral
Registros digitales	Escáner ST en el día del procedimiento y en el día 7 después del procedimiento

40

45

50

Imágenes de los Tejidos

El tejido hepático recolectado de los animales tratados y de control se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E) para visualizar los tumores. Se realizaron escáneres TC con una unidad de TC de 128 secciones (Somatom Definition AS Plus; Siemens Healthcare) con los siguientes parámetros: voltajes de tubo de 120 kVp, corriente de tubo efectiva de 90 mA, campo de visión de 146 mm, y espesor de reconstrucción de 2 mm a intervalos de 2 mm. Se realizaron escáneres TC al inicio y 23 días después del inicio del tratamiento con suero. El protocolo de CT incluye la adquisición de imágenes no mejoradas y la adquisición posterior de series de imágenes de fase arterial, venosa y retardada después de la inyección intravenosa en bolo de 8 a 9 mL del material de contraste yodado no iónico (300 mg de yodo por mililitro de iohexol (Omnipaque; GE Healthcare AS), 2 mL/kg, 2,4 a 2,7 g de yodo) a una velocidad de 2 mL/s a través de una vena de la oreja. La obtención de imágenes de la fase arterial se obtiene 10 s después de lograr la mejora de la aorta descendente a 100 unidades Hounsfield, medida con la técnica de seguimiento de bolo. La obtención de imágenes en fase venosa se obtiene 10 s después de completar la fase arterial, y la obtención de imágenes en fase retardada se obtiene 70 s después de completar la fase venosa. Para obtener muestras histológicas, los conejos portadores de VX2 se sacrifican por inhalación de CO₂. Posteriormente, se realizó una incisión quirúrgica en el abdomen para aislar los tejidos del hígado completo que se trataron

55

60

65

en una solución de formalina al 10 % durante 2 días. Después de realizar incisiones cuidadosas en todo el hígado cruzando las masas de VX2, los tejidos se sumergieron en parafina. Después de la tinción de rutina con H&E, la observación histológica se realizó bajo el microscopio óptico a 100-200 x.

5 Ejemplo 9: Viroembolización Arterial Transcatéter con virus vvDD y Gelfoam

El impacto de Gelfoam en la emboloterapia transcatéter con el virus vaccinia oncolítico vvDD se evaluó en un modelo de tumor hepático VX2 en conejo.

10 Métodos

Preparación Animal

15 En este estudio se usaron cuatro conejos blancos, sanos, de Nueva Zelanda (Biogenomics, Seúl, Corea; Samtako, Oh San, Corea del Sur), que pesaron 2,5-3 kg cada uno.

La cepa de carcinoma VX2 se mantiene mediante trasplantes sucesivos en la extremidad posterior de un conejo portador. Para la anestesia, se inyectaron 2,5-3 mL de una mezcla 2:3 de xilacina (Rompun; Bayer Corea, Seúl, Corea) y tiletamina/zolazepam (Zoletil; Virbac, Carros, Francia) por vía intramuscular en el muslo posterior. A través de una incisión abdominal en la línea media, se implanta 0,1 mL de carcinoma VX2 picado (2-3 mm³) en el parénquima subcapsular del lóbulo medial izquierdo del hígado. Catorce días después de la implantación del tumor, cuando los tumores tienen un diámetro de 15-30 mm, los animales se usaron para los experimentos.

25 Un día antes de la emboloterapia con vvDD, se realizó una tomografía computarizada (CT) (Somatom definition AS; Siemens Medical Systems, Erlangen, Alemania) con los animales en posición prono o decúbito. La TC no mejorada se realiza para cubrir todo el hígado (colimación de 1,5 mm, 1,5 inclinación, e intervalo de reconstrucción de 1 mm). Para la TC mejorada con material de contraste, se inyectan 13 mL del material de contraste a una velocidad de 0,5 mL/s a través de la vena auricular. Con la técnica de seguimiento de bolo, se obtiene una exploración de la fase arterial y venosa portal hepática en intervalos de 5 segundos y 16 segundos (Yoon y otros, (2003) Radiology 229:126-31).

30 En el escáner TC se mide la ubicación y el tamaño del tumor. El volumen (V) del tumor se calculó de acuerdo con la ecuación $V = L \times S^2/2$, donde L es el diámetro más largo y S es el diámetro más corto del tumor (Okada y otros, (1995) Br J Cancer 71:518-524; Watanabe y otros, (1994) Oncology 52:76-81.31).

35 Viroembolización Arterial Transcatéter con vvDD

40 Dos semanas después de la implantación del carcinoma VX2 en el hígado, se realizó la emboloterapia con guía fluoroscópica. La angiografía se realiza habitualmente con un enfoque transauricular, y se siguen métodos detallados (Chang y otros, (2011) J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187). Las arterias auriculares centrales derecha e izquierda se canularon para determinar qué lado es ventajoso para realizar una angiografía de la arteria hepática.

45 Para la anestesia, se inyectaron por vía intramuscular 1,5 mL de una mezcla 2:3 de xilazina y tiletamina/zolazepam en el muslo posterior. Después de la anestesia, el conejo se coloca en posición supina sobre una mesa fluoroscópica. El afeitado del cabello es innecesario para el acceso arterial transauricular. El pelo corto en el sitio de punción se afeita con una podadora eléctrica. Las orejas de los conejos se frota con alcohol para su esterilización. La arteria auricular central se perfora percutáneamente en una de las orejas del conejo con una aguja de Angiocath calibre 18 insertada en la dirección retrógrada. Después de hacer avanzar la vaina de plástico de la aguja de Angiocath, se retira la aguja interna del estilete y se tapa el centro de la vaina de plástico con la tapa de una llave de tres vías. La funda de plástico se fija mediante esparadrapo.

50 Después de aplicar una tapa perforada modificada al centro de la funda de plástico, se introdujeron un microcatéter 2,0-F (Progreat, Terumo, Tokio, Japón) y un cable guía de 0,016 pulgadas (Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japón) en la arteria auricular central por los radiólogos intervencionistas. Se infundió aproximadamente 1 mL del agente de contraste para obtener una hoja de ruta desde la arteria carótida extracraneal hasta la aorta torácica. El cable guía se avanzó cuidadosamente hacia la aorta torácica descendente, y después se seleccionó la arteria hepática apropiada manipulando el cable guía. Después de colocar la punta del microcatéter en la arteria hepática apropiada, la angiografía de la arteria hepática se realizó mediante inyección manual del agente de contraste.

60 Se preparó una mezcla de 1×10^8 UFP de vvDD (OHRI) y partículas de gelfoam de 150 µm - 350 µm (Caligel, Aicon, China). La mitad de un vial de gelfoam se disolvió en 5 cc de medio de contraste y 5 cc de solución salina normal, y esta mezcla se combinó con 1 cc de virus. El punto final de la embolización es cuando se logra una oclusión del vaso alimentador tumoral. Después de la selección del tumor VX2 con microcatéter, la embolización se realiza mediante el uso de 1,5 cc de una mezcla preparada de virus y partículas de gelfoam. Los animales de control reciben embolización solo con tampón Tris, virus, o Gelfoam. Después de retirar el microcatéter y la vaina de plástico de la arteria auricular central, el sitio de punción se comprime manualmente. La composición y los regímenes de dosificación para los cuatro grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 19.

Tabla 19: Grupos de tratamiento de Viroembolización Arterial Transcatéter.

Grupo #	Tratamiento	Tiempo de mezcla de los materiales	Dosis	Volumen (ul)	Ruta de inyección	# de Animales
1	10 mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
2	wDD	NA	5x10 ⁷ ufp	100 ul	HAI	1
3	Gelfoam + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
4	wDD + Gelfoam	10 min	5x10 ⁷ ufp/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

Monitoreo de los Animales

Los animales se observaron para constatar la supervivencia, el tamaño del tumor, el peso corporal, y la apariencia de acuerdo con la Tabla 20. Se realizaron escáneres TC inmediatamente antes de la embolización (día 0) y en el día 7. Se recolectó sangre en los días -1, 3, y 9. Los animales se sacrificaron el día 9 (32 días después del implante tumoral) y los tejidos se cosechan para su análisis.

Tabla 20: Calendario del monitoreo de animales

Supervivencia	Diaria
Tamaño del tumor	Cada dos días y justo antes del sacrificio
Peso corporal	Cada dos días
Apariencia	Cada dos días: pelaje áspero, deshidratación, dificultad para respirar, letargo. Si encuentra algo inusual, tome fotos e informe
Sacrificio	32 días después del implante tumoral
Registros digitales	Escáner ST en el día del procedimiento y en el día 7 después del procedimiento

Imágenes de los Tejidos

El tejido hepático recolectado de los animales tratados y de control se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E) para visualizar los tumores. Se realizaron escáneres TC con una unidad de TC de 128 secciones (Somatom Definition AS Plus; Siemens Healthcare) con los siguientes parámetros: voltajes de tubo de 120 kVp, corriente de tubo efectiva de 90 mA, campo de visión de 146 mm, y espesor de reconstrucción de 2 mm a intervalos de 2 mm. Se realizaron escáneres TC al inicio y 23 días después del inicio del tratamiento con suero. El protocolo de CT incluye la adquisición de imágenes no mejoradas y la adquisición posterior de series de imágenes de fase arterial, venosa y retardada después de la inyección intravenosa en bolo de 8 a 9 mL del material de contraste yodado no iónico (300 mg de yodo por mililitro de iohexol (Omnipaque; GE Healthcare AS), 2 mL/kg, 2,4 a 2,7 g de yodo) a una velocidad de 2 mL/s a través de una vena de la oreja. La obtención de imágenes de la fase arterial se obtiene 10 s después de lograr la mejora de la aorta descendente a 100 unidades Hounsfield, medida con la técnica de seguimiento de bolo. La obtención de imágenes en fase venosa se obtiene 10 s después de completar la fase arterial, y la obtención de imágenes en fase retardada se obtiene 70 s después de completar la fase venosa. Para obtener muestras histológicas, los conejos portadores de VX2 se sacrifican por inhalación de CO₂. Posteriormente, se realizó una incisión quirúrgica en el abdomen para aislar los tejidos del hígado completo que se trataron en una solución de formalina al 10 % durante 2 días. Después de realizar incisiones cuidadosas en todo el hígado cruzando las masas de VX2, los tejidos se sumergieron en parafina. Después de la tinción de rutina con H&E, la observación histológica se realizó bajo el microscopio óptico a 100-200 x.

Ejemplo 10: Viroembolización Arterial Transcatéter con HSV-1 y Gelfoam

El impacto de Gelfoam en la emboloterapia transcatéter con HSV-1 se evaluó en un modelo de tumor de hígado VX2 en conejo.

Métodos

Preparación Animal

5 En este estudio se usaron cuatro conejos blancos, sanos, de Nueva Zelanda (Biogenomics, Seúl, Corea; Samtako, Oh San, Corea del Sur), que pesaron 2,5-3 kg cada uno.

10 La cepa de carcinoma VX2 se mantiene mediante trasplantes sucesivos en la extremidad posterior de un conejo portador. Para la anestesia, se inyectaron 2,5-3 mL de una mezcla 2:3 de xilacina (Rompun; Bayer Corea, Seúl, Corea) y tiletamina/zolazepam (Zoletil; Virbac, Carros, Francia) por vía intramuscular en el muslo posterior. A través de una incisión abdominal en la línea media, se implanta 0,1 mL de carcinoma VX2 picado (2-3 mm³) en el parénquima subcapsular del lóbulo medial izquierdo del hígado. Catorce días después de la implantación del tumor, cuando los tumores tienen un diámetro de 15-30 mm, los animales se usaron para los experimentos.

15 Un día antes de la emboloterapia con HSV-1, se realizó una tomografía computarizada (TC) (Somatom definition AS; Siemens Medical Systems, Erlangen, Alemania) con los animales en posición prono o decúbito. La TC no mejorada se realiza para cubrir todo el hígado (colimación de 1,5 mm, 1,5 inclinación, e intervalo de reconstrucción de 1 mm). Para la TC mejorada con material de contraste, se inyectan 13 mL del material de contraste a una velocidad de 0,5 mL/s a través de la vena auricular. Con la técnica de seguimiento de bolo, se obtiene una exploración de la fase arterial y venosa portal hepática en intervalos de 5 segundos y 16 segundos (Yoon y otros, (2003) Radiology 229:126-31).

20 En el escáner TC se mide la ubicación y el tamaño del tumor. El volumen (V) del tumor se calculó de acuerdo con la ecuación $V = L \times S^2/2$, donde L es el diámetro más largo y S es el diámetro más corto del tumor (Okada y otros, (1995) Br J Cancer 71:518-524; Watanabe y otros, (1994) Oncology 52:76-81.31).

25 Viroembolización Arterial Transcatéter con HSV-1

30 Dos semanas después de la implantación del carcinoma VX2 en el hígado, se realizó la emboloterapia con guía fluoroscópica. La angiografía se realiza habitualmente con un enfoque transauricular, y se siguen métodos detallados (Chang y otros, (2011) J Vasc Interv Radiol 22:1181-1187). Las arterias auriculares centrales derecha e izquierda se canularon para determinar qué lado es ventajoso para realizar una angiografía de la arteria hepática.

35 Para la anestesia, se inyectaron por vía intramuscular 1,5 mL de una mezcla 2:3 de xilacina y tiletamina/zolazepam en el muslo posterior. Después de la anestesia, el conejo se coloca en posición supina sobre una mesa fluoroscópica. El afeitado del cabello es innecesario para el acceso arterial transauricular. El pelo corto en el sitio de punción se afeita con una podadora eléctrica. Las orejas de los conejos se frota con alcohol para su esterilización. La arteria auricular central se perfora percutáneamente en una de las orejas del conejo con una aguja de Angiocath calibre 18 insertada en la dirección retrógrada. Después de hacer avanzar la vaina de plástico de la aguja de Angiocath, se retira la aguja interna del estilete y se tapa el centro de la vaina de plástico con la tapa de una llave de tres vías. La funda de plástico se fija mediante esparadrapo.

40 Después de aplicar una tapa perforada modificada al centro de la funda de plástico, se introdujeron un microcatéter 2,0-F (Progreat, Terumo, Tokio, Japón) y un cable guía de 0,016 pulgadas (Meister, Asahi intec, Aichi, Co, Ltd, Japón) en la arteria auricular central por los radiólogos intervencionistas. Se infundió aproximadamente 1 mL del agente de contraste para obtener una hoja de ruta desde la arteria carótida extracraneal hasta la aorta torácica. El cable guía se avanzó cuidadosamente hacia la aorta torácica descendente, y después se seleccionó la arteria hepática apropiada manipulando el cable guía. Después de colocar la punta del microcatéter en la arteria hepática apropiada, la angiografía de la arteria hepática se realizó mediante inyección manual del agente de contraste.

45 Se preparó una mezcla de 1×10^8 UFP de HSV-1 y partículas de gelfoam de 150 µm - 350 µm (Caligel, Alicon, China). La mitad de un vial de gelfoam se disolvió en 5 cc de medio de contraste y 5 cc de solución salina normal, y esta mezcla se combinó con 1 cc de virus. El punto final de la embolización es cuando se logra una oclusión del vaso alimentador tumoral. Después de la selección del tumor VX2 con microcatéter, la embolización se realiza mediante el uso de 1,5 cc de una mezcla preparada de virus y partículas de gelfoam. Los animales de control reciben embolización solo con tampón Tris, virus, o Gelfoam. Después de retirar el microcatéter y la vaina de plástico de la arteria auricular central, el sitio de punción se comprime manualmente. La composición y los regímenes de dosificación para los cuatro grupos de tratamiento se resumen en la Tabla 21.

60

65

Tabla 21: Grupos de tratamiento de Viroembolización Arterial Transcatéter.

Grupo #	Tratamiento	Tiempo de mezcla de los materiales	Dosis	Volumen (ul)	Ruta de inyección	# de Animales
1	10 mM Tris pH 9	NA	NA	100 ul	HAI	1
2	HSV-1	NA	5x10 ⁷ ufp	100 ul	HAI	1
3	Gelfoam + 10mM Tris pH 9	1 h	2-3 mm ³	100 ul	HAI	1
4	HSV-1 + Gelfoam	10 min	5x10 ⁷ ufp/ 2-3 mm ³	100 ul	HAI	1

Monitoreo de los Animales

Los animales se observaron para constatar la supervivencia, el tamaño del tumor, el peso corporal, y la apariencia de acuerdo con la Tabla 26. Se realizaron escáneres TC inmediatamente antes de la embolización (día 0) y en el día 7. Se recolectó sangre en los días -1, 3, y 9. Los animales se sacrificaron el día 9 (32 días después del implante tumoral) y los tejidos se cosechan para su análisis.

Tabla 22: Calendario de monitoreo de animales

Supervivencia	Diaria
Tamaño del tumor	Cada dos días y justo antes del sacrificio
Peso corporal	Cada dos días
Apariencia	Cada dos días: pelaje áspero, deshidratación, dificultad para respirar, letargo. Si encuentra algo inusual, tome fotos e informe
Sacrificio	32 días después del implante tumoral
Registros digitales	Escáner ST en el día del procedimiento y en el día 7 después del procedimiento

Imágenes de los Tejidos

El tejido hepático recolectado de los animales tratados y de control se tiñó con hematoxilina y eosina (H&E) para visualizar los tumores. Se realizaron escáneres TC con una unidad de TC de 128 secciones (Somatom Definition AS Plus; Siemens Healthcare) con los siguientes parámetros: voltajes de tubo de 120 kVp, corriente de tubo efectiva de 90 mA, campo de visión de 146 mm, y espesor de reconstrucción de 2 mm a intervalos de 2 mm. Se realizaron escáneres TC al inicio y 23 días después del inicio del tratamiento con suero. El protocolo de CT incluye la adquisición de imágenes no mejoradas y la adquisición posterior de series de imágenes de fase arterial, venosa y retardada después de la inyección intravenosa en bolo de 8 a 9 mL del material de contraste yodado no iónico (300 mg de yodo por mililitro de iohexol (Omnipaque; GE Healthcare AS), 2 mL/kg, 2,4 a 2,7 g de yodo) a una velocidad de 2 mL/s a través de una vena de la oreja. La obtención de imágenes de la fase arterial se obtiene 10 s después de lograr la mejora de la aorta descendente a 100 unidades Hounsfield, medida con la técnica de seguimiento de bolo. La obtención de imágenes en fase venosa se obtiene 10 s después de completar la fase arterial, y la obtención de imágenes en fase retardada se obtiene 70 s después de completar la fase venosa. Para obtener muestras histológicas, los conejos portadores de VX2 se sacrifican por inhalación de CO₂. Posteriormente, se realizó una incisión quirúrgica en el abdomen para aislar los tejidos del hígado completo que se trataron en una solución de formalina al 10 % durante 2 días. Después de realizar incisiones cuidadosas en todo el hígado cruzando las masas de VX2, los tejidos se sumergieron en parafina. Después de la tinción de rutina con H&E, la observación histológica se realizó bajo el microscopio óptico a 100-200 x. Este ejemplo demuestra que el virus oncolítico HSV-1 (que incluye, entre otros, una cepa JS-1 de VIH-1 modificado por inactivación de los genes ICP34.5 e ICP47 y la adición del gen GM-CSF humano) puede usarse para tratar cánceres de hígado mediante los métodos de embolización para la presente solicitud (que incluye, por ejemplo, cánceres de melanoma que han metastatizado al hígado).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende un virus oncolítico Poxviridae o Herpesviridae y una micropartícula biocompatible o un agente de gel de polímero hidrófilo adecuado para la embolización activa, en donde la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo se seleccionan de la lista que consiste en: almidón degradable, alcohol polivinílico, espuma de gelatina, e hidrogel de alcohol polivinílico sulfonado.
- 10 2. La composición de conformidad con la reivindicación 1, en donde el virus oncolítico es un virus Poxviridae seleccionado del grupo que consiste en: virus vaccinia, virus del mixoma, y parapoxvirus y el virus vaccinia opcionalmente no comprende un gen de timidina quinasa activo; no comprende un gen de factor de crecimiento de vaccinia activo (VGF); comprende transgenes que codifican luciferasa de Renilla, proteína fluorescente verde, β -galactosidasa, y β -glucuronidasa; es una cepa Copenhagen, una cepa Western Reserve, una cepa Wyeth o una cepa Lister; comprende, además, una de más de una proteína de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, una proteína de citosina desaminasa y una proteína de receptor de somatostatina tipo 2; o cualquier combinación de lo anterior.
- 15 3. La composición de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el virus oncolítico tiene al menos 0,1 μm de diámetro a lo largo de su eje más corto u opcionalmente al menos 0,2 μm de diámetro a lo largo de su eje más corto.
- 20 4. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde las micropartículas del agente de micropartículas biocompatibles están entre 100 μm y 2000 μm , entre 150 μm y 350 μm , entre 150 μm y 200 μm , entre 200 μm y 250 μm en tamaño, entre 250 μm y 300 μm , o entre 300 μm y 350 μm en tamaño.
- 25 5. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles varían en tamaño de aproximadamente 0 μm a aproximadamente 100 μm , de aproximadamente 0 μm a aproximadamente 50 μm , o de aproximadamente 0 μm a aproximadamente 25 μm .
- 30 6. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde las partículas individuales del agente de micropartículas biocompatibles tienen una diferencia promedio de diámetro de 100 μm o menos, aproximadamente 50 μm o menos, aproximadamente 25 μm o menos, aproximadamente 10 μm o menos o aproximadamente 5 μm o menos.
- 35 7. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde las partículas individuales del agente de micropartícula biocompatible son agregados de partículas que están entre 10 y 200 μm o entre 10 y 100 μm .
- 40 8. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el agente de gel de polímero hidrófilo comprende partículas que están entre 10 y 200 μm o entre 10 y 100 μm .
- 45 9. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo es un agente embólico temporal o un agente embólico permanente.
- 50 10. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para el uso en la embolización activa de un sitio vascular en un mamífero, que comprende introducir la composición dentro de la vasculatura de un mamífero.
- 55 11. La composición para su uso de conformidad con la reivindicación 10, en donde el sitio vascular está en un tumor, suministra sangre al tumor, o está próximo al tumor y, opcionalmente, el tumor está en el hígado, es un tumor primario o secundario; y, opcionalmente, el tumor secundario es un melanoma maligno metastatizado.
- 60 12. La composición para el uso de conformidad con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde el mamífero es un ser humano.
- 65 13. La composición para el uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, que comprende, además, introducir dentro de la vasculatura un agente de contraste y opcionalmente el agente de contraste se selecciona de: metrizamida, iopamidol, iodixanol, iohexol, iopromida, iobtiridol, iomeprol, iopentol, iopamiron, ioxilan, iotrolan, gadodiamida, gadoteridol, iotrol, ioversol, o combinaciones de estos.
14. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para el uso en el tratamiento del cáncer mediante la reducción de una masa tumoral, que comprende aplicar la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en donde se induce necrosis en al menos el 75 % de la masa tumoral embolizada y opcionalmente se induce necrosis en al menos el 80 % de la masa tumoral embolizada.

15. La composición de conformidad con la reivindicación 1 o la composición para usar de conformidad con la reivindicación 14, en donde la micropartícula biocompatible o el agente de gel de polímero hidrófilo es espuma de gelatina.

Figura 1A

HuH-7 (tiempo de cosecha a las 24 horas) 10 minutos en RT

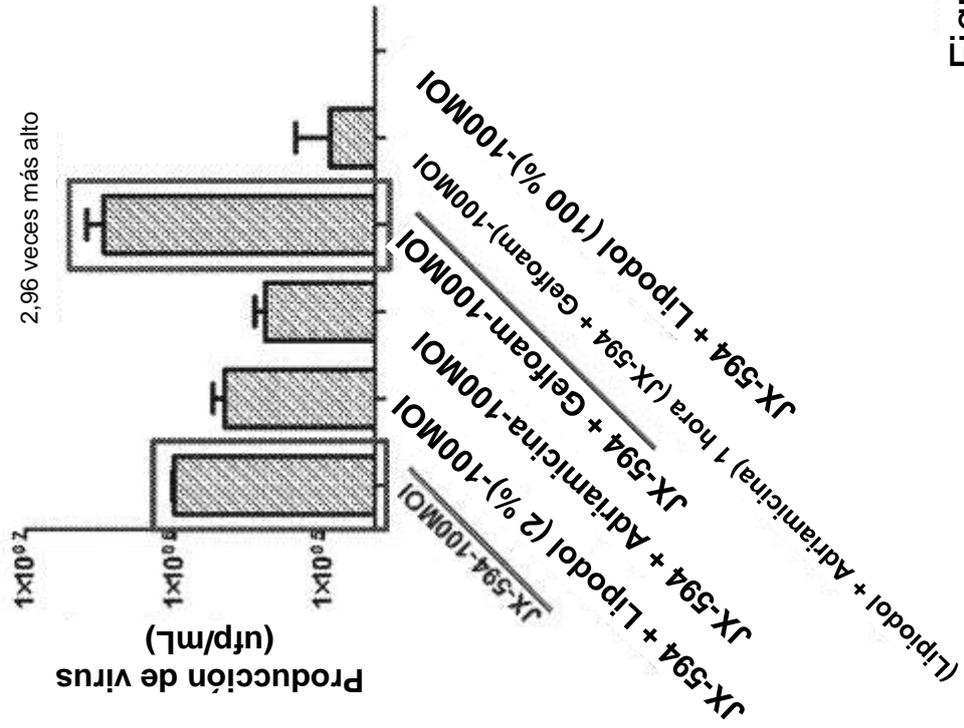
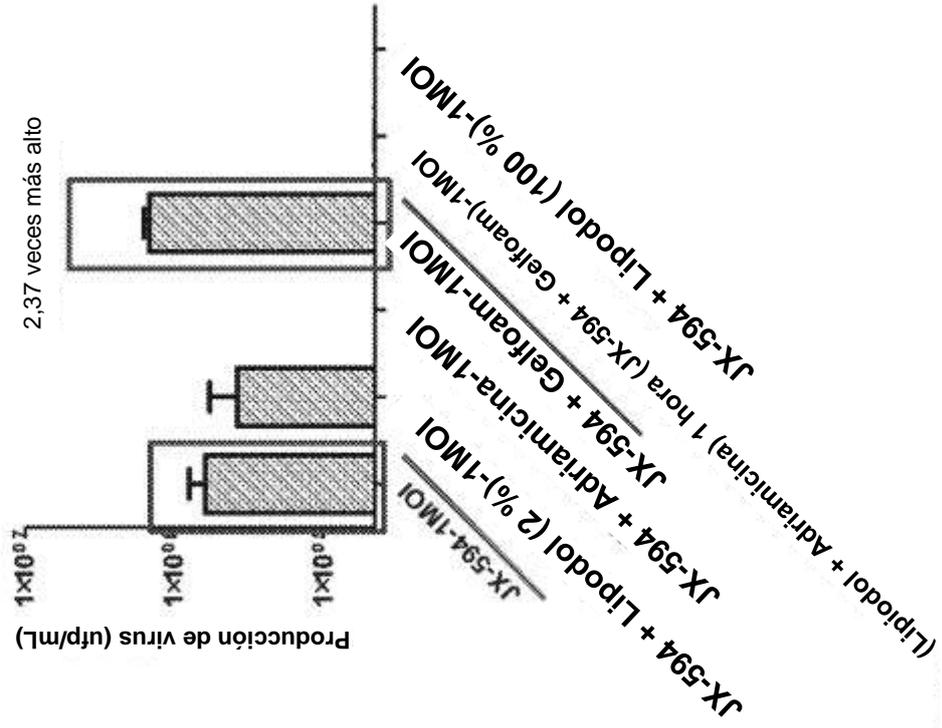


Figura 1B

HuH-7 (tiempo de cosecha a las 24 horas) 10 minutos en RT



Figuras 1A y B

Figura 1C

HuH-7 (tiempo de cosecha a las 48 horas) 10 min en RT-100moi

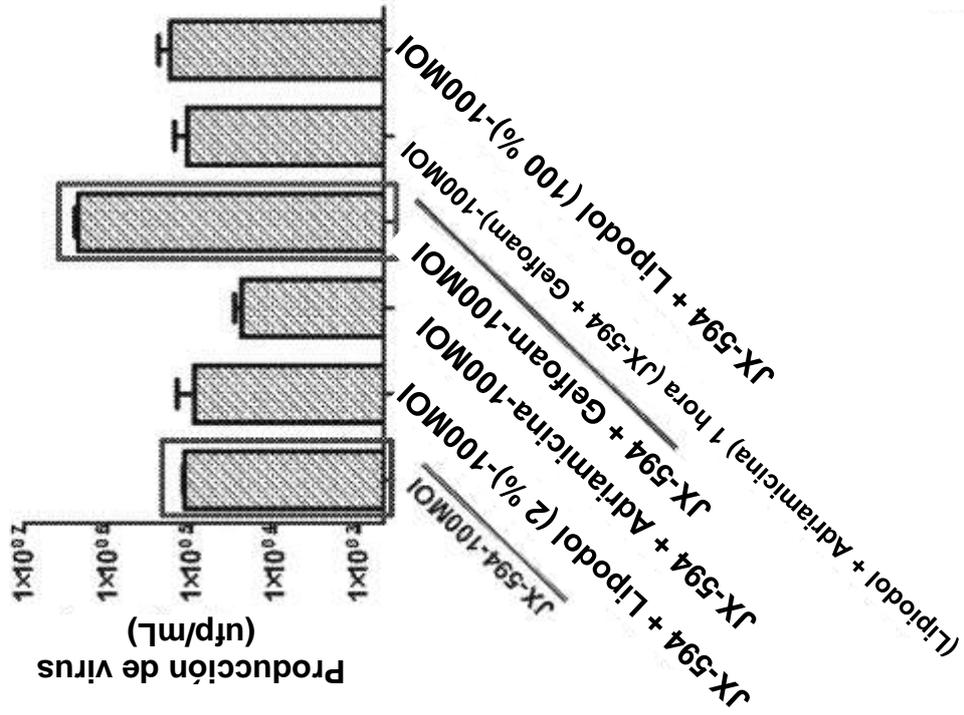


Figura 1D

HuH-7 (tiempo de cosecha a las 48 horas) 10 min en RT-1moi

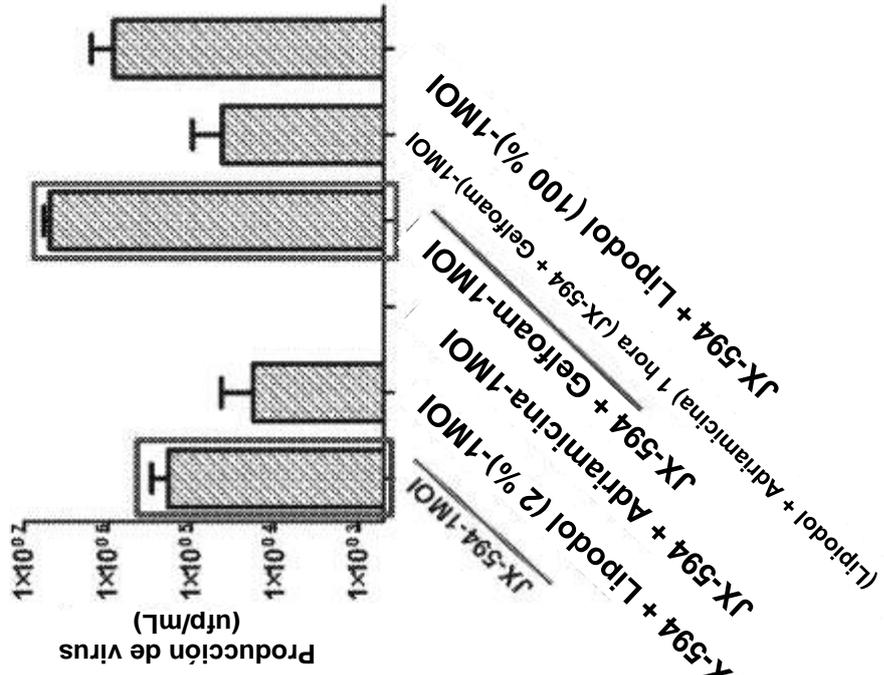


Figura 1C y D

Figura 2A



Figura 2B

	Análisis de sangre		qPCR	anticuerpo	IHC	Análisis de sangre		Escáner TC
	suero	Sangre completa				Sangre suero	Tumor VX2	
Conejo	1ml	500ul	500ul	1ml				
Antes del tratamiento								
Día 3 después del tratamiento								
Día 9 después del tratamiento								
Volumen total de sangre	1ml	3ml	0,5ml	1ml	6,5 ml			

Figuras 2A y B

Figura 3A

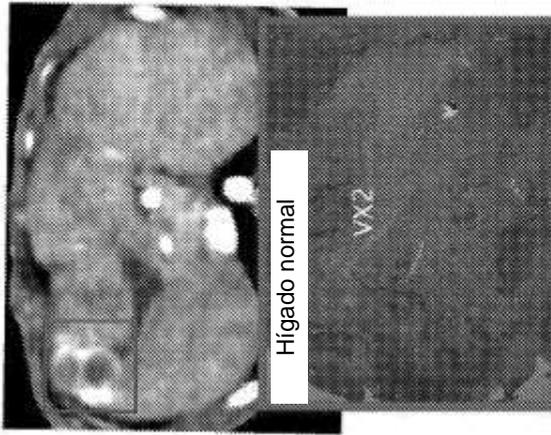


Figura 3B

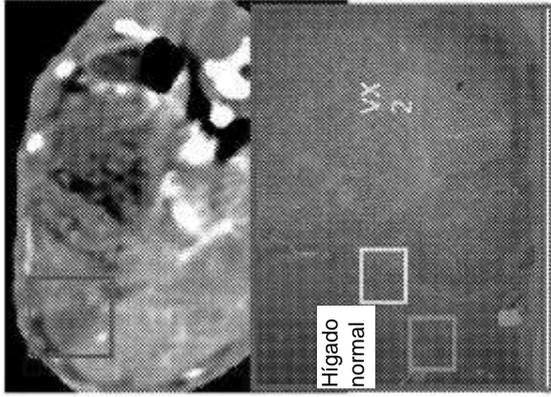


Figura 3C

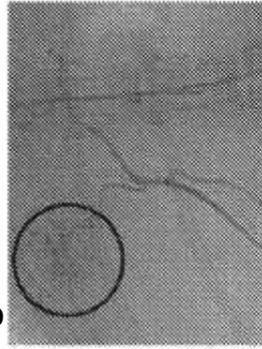


Figura 3D

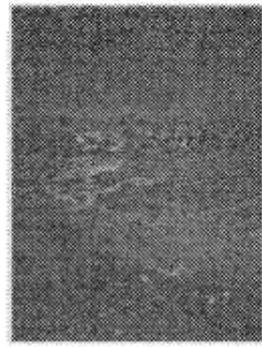


Figura 3E



Figura 3A-E

Muestreo de sangre para CBC
D-2~3, D+1, D+7, D+14, D+28 y D+56
De todos los conejos

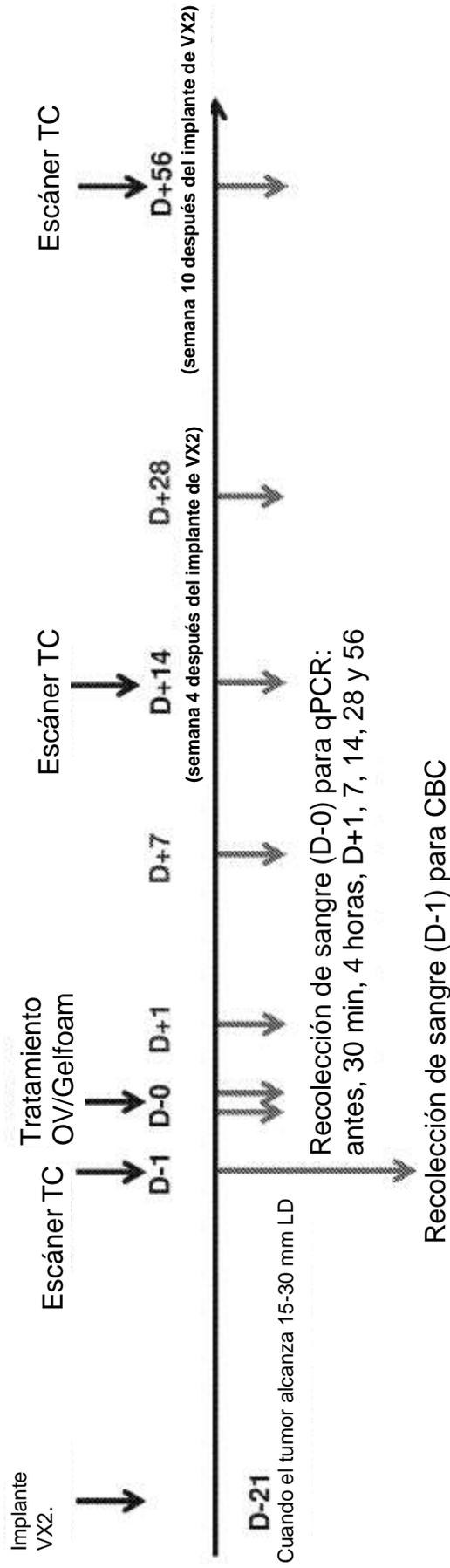


Figura 4