



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 207**

51 Int. Cl.:
A01N 63/00 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **98949797 .9**
86 Fecha de presentación : **09.10.1998**
87 Número de publicación de la solicitud: **1032269**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.09.2000**

54

Título: **Tratamiento de neoplasmas con virus clonales, sensibles al interferón.**

30

Prioridad: **09.10.1997 US 948244**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

73

Titular/es: **Wellstat Biologics Corporation**
930 Clopper Road
Gaithersburg, Maryland 20878, US

72

Inventor/es: **Roberts, Michael, S.;**
Lorence, Robert, M.;
Groene, William, S.;
Rabin, Harvey y
Von Borstel, Reid, W.

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 292 207 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

Tratamiento de neoplasmas con virus clonales, sensibles al interferón.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a virus clonales que son capaces de replicarse en, y causar la muerte de, células neoplásicas que presentan una deficiencia en la respuesta antiviral mediada por interferón (IFN). La invención también se refiere al uso de estos virus para el tratamiento de enfermedades neoplásicas que incluyen cáncer y tumores grandes.

10 Antecedentes de la invención

La enfermedad neoplásica, que incluye el cáncer, es una de las causas principales de muerte en seres humanos. Hay más de 1,3 millones de casos nuevos de cáncer diagnosticados cada año en los Estados Unidos y de 550.000 muertes. La detección temprana del cáncer, antes de que el cáncer se propague a localizaciones secundarias del organismo, aumenta enormemente las posibilidades de supervivencia del hospedador. Sin embargo, la detección temprana del cáncer no siempre es posible, e incluso cuando lo es, los tratamientos no son satisfactorios, especialmente en casos de cánceres muy malignos. Los tratamientos contra el cáncer, que incluyen quimioterapia y radiación, son mucho menos efectivos en fases más tardías, especialmente cuando los crecimientos neoplásicos tiene un tamaño grande y/o constituyen una carga tumoral alta. (Véase, Hillard Stanley, *Cancer Treat. Reports*, Vol. 61, No. 1, enero/febrero de 1977, págs. 29-36, Tannock, *Cancer Research*, 42, 4921-4926, diciembre de 1982).

Se ha informado sobre la regresión de tumores asociada con la exposición a diferentes virus. La mayoría de los virus descritos son patógenos en seres humanos e incluyen los virus de la parotiditis y del sarampión. También se ha descrito el efecto de otros virus específicos sobre tipos particulares de células cancerosas. Smith y col., (1956) *Cancer*, 9, 1, 211 (efecto de adenovirus sobre el carcinoma de cuello de útero); Hoizaepfel y col., (1957) *Cancer*, 10, 557 (efecto de adenovirus sobre tumores epiteliales); Taylor y col., (1970) *J. Natl. Cancer Inst.* 44, 515 (efecto del enterovirus-1 bovino sobre el sarcoma-1); Shingu y col., (1991) *J. General Virology*, 72, 2031 (efecto del enterovirus MZ-468 bovino sobre células leucémicas F-647a); Suskind y col., (1957) *PSEBM*, 94, 309 (efecto del coxsackievirus B3 sobre células tumorales HeLa); Rukavishnikova y col., (1976) *Acta Virol.*, 20, 387 (efecto de la cepa A del virus de la gripe sobre tumores ascíticos).

Las primeras referencias bibliográficas describieron la regresión parcial de tumores en pacientes tratados con vacunas de virus vivos atenuados con la finalidad de vacunarles contra la viruela o la rabia. Véanse, DePace, N.G. (1912) *Ginecología*, 9, 82-88; Salmon, P. y Baix (1922) *Compt. Rend. Sec. Biol.*, 86, 819-820. También se ha observado la regresión parcial de tumores y la regresión de leucemias durante infecciones naturales de sarampión. Véanse, Pasquinnucci, G. (1971) *Lancet*, 1, 136; Gross, S. (1971) *Lancet*, 1, 397-398; Bluming, A.Z. y Ziegler, J.L. (1971) *Lancet*, 2, 105-106. En un estudio de 90 pacientes con cáncer, intencionalmente infectados con virus vivos de la parotiditis, se observó una regresión parcial de los tumores en 79 casos. Véase, Asada (1994) *Cancer*, 34, 1907-1928. Aunque los efectos secundarios de estos virus fueron temporales, las graves secuelas de la infección con estos patógenos de seres humanos constituye un problema importante.

Los virus se clasifican de la siguiente manera [véase, Murphy A. y Kingsbury D.W., 1990, En: *Virology*, 2ª Edición (Redactor: Fields, B.N.), *Raven Press*, Nueva York, págs. 9-35].

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 292 207 T3

Características divisorias		Nombres de las familias de virus
Virus con RNA		
ssRNA,	sentido positivo,	<i>Picornaviridae, Caliciviridae</i>
	no segmentado	
	sin envoltura	
ssRNA,	sentido positivo,	<i>Togaviridae, Flaviviridae, Coronaviridae</i>
	no segmentado,	
	con envoltura,	
ssRNA,	sentido negativo,	<i>Rhabdoviridae, Filiviridae, Paramyxoviridae</i>
	no segmentado,	
	con envoltura	
ssRNA,	sentido negativo,	<i>Orthomyxoviridae</i>
	segmentado,	
	con envoltura	
ssRNA,	de ambos sentidos	<i>Bunyaviridae, Arenaviridae</i>
	segmentado	
	con envoltura	
dsRNA	sentido positivo	<i>Reoviridae, Birnaviridae</i>
	segmentado	
	sin envoltura	
ssRNA	Etapa con DNA en la replicación	<i>Retroviridae</i>
	sentido positivo	
	no segmentado	
	con envoltura	
Virus con DNA		
ss/dsDNA,	sin envoltura	<i>Hepadnaviridae</i>
ssDNA,	sin envoltura	<i>Parvoviridae</i>
dsDNA,	sin envoltura	<i>Papovaviridae, Adenoviridae</i>
dsDNA,	con envoltura	<i>Herpesviridae, Poxiviridae, Iridoviridae</i>

Incluidas en la familia *Herpesviridae* (o de los Herpesvirus, están las subfamilias de los *Alphaherpesvirus* (que incluye el género *Varicellavirus* y el género *Simplexvirus*), *Betaherpesvirus* y *Gammaherpesvirus*).

El virus de la enfermedad de Newcastle ("NDV") (del inglés, "*Newcastle Disease Virus*") es miembro de la *Paramyxoviridae* (o de los *Paramyxovirus*). Los hospedadores naturales del NDV son los pollos y otras aves. El NDV típicamente se une a determinadas moléculas sobre la superficie de células hospedadoras animales, se fusiona con la superficie celular e inyecta su material genético en el hospedador. El NDV es un virus citocida. Una vez dentro de la

célula, los genes virales dirigen a la célula hospedadora para que haga copias de virus, lo que conduce a la muerte de la cepa hospedadora, que libera las copias del NDV que infectan a otras células. A diferencia de ciertos virus, no se tiene conocimiento de que el NDV produzca alguna enfermedad grave en seres humanos. A diferencia de otras clases de virus (p. ej., HTLV-1, virus de la Hepatitis B), los *Paramyxovirus* no se conoce que sean carcinogénicos.

Se ha informado sobre la regresión temporal de tumores en un número pequeño de pacientes expuestos al NDV. Véase, Csatory, L.K. (1971) *Lancet* 2, 825. Csatory observó la regresión de un cáncer gastrointestinal en un granjero criador de pollos, durante una epidemia de la enfermedad de Newcastle en sus pollos. En un informe anecdótico similar, Cassel, W.A. y Garrett, R.E. (1965) *Cancer*, 18, 863-868, observaron la regresión de un cáncer primario de cuello de útero, que se habían propagado a los ganglios linfáticos, en una paciente después de la inyección de NDV en el interior del tumor de cuello de útero. Ya que se pensaba que el mecanismo de la actividad tumoricida era inmunológico, no se llevó a cabo ningún trabajo que dirigiera la citotoxicidad del virus directamente contra el tumor. En lugar de ello, los trabajos se centraron en los efectos inmunomoduladores del NDV. Véanse, por ejemplo, Murray, D.R., Cassel, W.A., Torbin, A.H., Olkowski, Z.L. y Moore, M.E. (1977) *Cancer*, 40, 680; Cassel, W.A., Murray, D.R. y Phillips, H.S. (1983) *Cancer*, 52, 856; Bohle, W., Schlag, P.J., Liebrich, W., Hohenberger, P., Manasterski, M., Miller, P. y Schirmacher, V. (1990) *Cancer*, 66, 1517-1523.

La selección de un virus específico para la represión de tumores se basó en la serendipidad o sistema de ensayo y error en las anteriores citas bibliográficas. Sólo recientemente, se han desarrollado estrategias racionales basadas en mecanismos, para el uso de virus en el tratamiento contra el cáncer, usando virus con DNA. Ejemplos de este tipo de estrategia se encuentran en el desarrollo de vectores adenovirales recombinantes que se replican únicamente en tumores de un origen tisular específico (Rodríguez, R. y col., 1997 *Cancer Res.*, 57:2559-2563), o de vectores que carecen de determinadas proteínas reguladoras clave (Bischoff, J.R. y col., 1996 *Science*, 274:373-376). Otra estrategia reciente ha sido el uso de un vector adenoviral recombinante, incompetente en replicación, para restablecer una función crítica de una proteína, perdida en algunas células tumorales (Zhang, W.W. y col., 1994 *Cancer gene therapy*, 1:5-13). Finalmente, el virus del herpes simple ha sido también manipulado por ingeniería genética para que se replique preferentemente en las células en división rápida que caracterizan a los tumores (Mineta, T. y col., 1994 *Cancer Res*, 54:3963-3966).

El documento WO 94/25627 describe el uso del NDV o de otros *Paramyxovirus* en el tratamiento del cáncer.

Expresión de transgenes que portan IFN en virus

Una de las estrategias comunes para el tratamiento del cáncer con terapéutica viral ha sido el uso de vectores virales para el suministro de determinados genes a la masa tumoral.

Adenovirus recombinantes, virus adenoasociados, virus de la viruela vacuna y retrovirus han sido todos ellos modificados para que expresen un gen de interferón, solo o en combinación con otros genes de citoquinas.

En Zhang y col. ((1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4513-4518), un adenovirus recombinante que expresa un gen consenso (es decir, sintético) de interferón humano, se usó para tratar xenotrasplantes de cáncer de mama humano (y otros cánceres) en ratones carentes de sistema inmunológico. Los autores concluyeron que "...una combinación de una oncólisis viral con un virus de baja patogenicidad, que es de por sí resistente a los efectos IFN y de una terapia con genes de IFN, pudiera ser una estrategia fructífera para el tratamiento de una diversidad de tumores diferentes, en particular de cáncer de mama". En contraste con la presente invención que se refiere a virus sensibles a interferón, Zhang y col. (1966) enseñan el uso de un adenovirus resistente a interferón en el tratamiento de tumores.

En Zhang y col. ((1996) *Cancer Gene Ther.*, 3:31-38), un virus adenoasociado (AAV) que expresa un IFN consenso se usó para la transducción de células tumorales humanas *in vitro*, seguida de su inyección a ratones carentes de sistema inmunológico. Los tumores transducidos, o no formaron tumores, o crecieron más lentamente que los controles no transducidos. Asimismo, la inyección de una célula tumoral humana transducida en la masa tumoral de otro tumor no transducido, produjo una pequeña disminución del tamaño.

En Peplinski y col., ((1996) *Ann. Surg. Oncol.*, 3:15-23), el IFN gamma (y otras citoquinas, expresadas solas o en combinación) se ensayaron en un modelo de cáncer de mama de ratones. Los ratones se inmunizaron con células tumorales, viralmente modificadas con un virus recombinante de la viruela vacuna. Cuando fueron de nuevo estimulados inmunológicamente con las células tumorales, los ratones inmunizados con células viralmente modificadas presentaron una mejoría estadísticamente demostrada en el tiempo de supervivencia sin enfermedad.

Gastl y col., ((1992) *Cancer Res.*, 52:6229-6236), usaron vectores retrovirales que expresan IFN-gamma para transducir células de carcinoma renal *in vitro*. Se demostró que estas células producían cantidades más altas de varias proteínas importantes para la función del sistema inmunológico.

Restifo y col., ((1992) *J. Exp. Med.*, 175:1423-1431) usaron vectores retrovirales que expresan IFN-gamma para transducir una línea de células de sarcoma murino, lo que permite que la línea de células tumorales presente de manera más eficiente antígenos virales a las células T CD8+.

ES 2 292 207 T3

Howard y col., ((1994) *Ann. NY Acad. Sci.*, 716:167-187) usaron vectores retrovirales que expresan IFN-gamma para transducir células tumorales de melanoma humano y melanoma murino. Se observó que estas células aumentaban la expresión de proteínas importantes para la función inmunológica. Estas células fueron también menos tumorigénicas en ratones que la línea parental no transducida y produjeron la activación de una respuesta de los CTL específica de tumor, *in vivo*.

Uso de dosis terapéuticas de interferón como adyuvante de una terapia viral contra el cáncer

Debido a las conocidas propiedades estimuladoras del sistema inmunológico que tiene el IFN, varios estudios han investigado el uso de la proteína IFN en combinación con otras terapias de vacunas virales contra el cáncer.

En Kirchner y col. ((1995) *World J. Urol.*, 13:171-173), se inmunizaron 208 pacientes con células tumorales de carcinoma de células renales, autólogas, modificadas con NDV e irradiadas letalmente, y se trataron con una dosis baja de IL-2 o IFN-alfa. Los autores afirmaron que este régimen de tratamiento produce una mejoría en la evolución natural de los pacientes con carcinoma de células renales localmente avanzado. La dosis fue aproximadamente desde $3,3 \times 10^3$ PFU/kg hasta $2,2 \times 10^5$ PFU/kg. Esta terapia fue una terapia local, en contraposición a una estrategia sistémica, con el objetivo de inducir una inmunorrespuesta anti-tumoral.

Tanaka y col. ((1994) *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, 16:283-293), coadministraron IFN-alfa y un virus recombinante de la viruela vacuna como modelo de terapia vacunal contra el cáncer en ratones. Este estudio reveló una mejoría estadísticamente demostrada en la capacidad de supervivencia de los ratones que habían recibido IFN, en comparación con los que no lo habían recibido. Los autores atribuyeron la eficacia del IFN a la inducción de células T CD8 positivas en esos animales.

Arroyo y col. (1990) *Cancer Immunol. Immunother.*, 31:305-311 usaron un modelo en ratones de cáncer de colon para ensayar el efecto de una coterapia con IFN-alfa y/o IL-2 sobre la eficacia de un tratamiento contra el cáncer usando un oncolisado de colon que contiene el virus de la viruela vacuna (VCO). Encontraron que este triple tratamiento de VCO + IL-2 + IFN era sumamente eficaz en este modelo murino. Esta estrategia está basada en la inmunización como mecanismo de actividad antitumoral.

Se usó IFN en estos estudios para aumentar la capacidad de las células cancerosas para ser reconocidas por el sistema inmunológico.

Intervirology (1993) 36/4 (193-214) proporciona una revisión de terapias virales contra el cáncer.

Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual, Vol. 36, 1995, página 439, proporciona una comparación entre cepas oncolíticas del Virus de la Enfermedad de Newcastle.

El documento WO 96/26285 describe métodos y composiciones para administrar vectores de terapia génica.

DChemical Abstract Service, DN 116:104333 y CN 1054192 A, describe un procedimiento para preparar e inducir interferón de un organismo humano.

Nature, 23 de agosto de 1969, Vol. 223, págs. 844-845, describe interferón exógeno e inductores de interferón en el tratamiento de ratones Balb/c inoculados con células tumorales RC19.

Es un objetivo de esta invención proporcionar virus para el tratamiento de enfermedades que incluyen cáncer.

Es otro objetivo de esta invención proporcionar virus para el tratamiento de enfermedades neoplásicas que incluyen cáncer.

Es otro objetivo de esta invención proporcionar un medio mediante el que se seleccionan virus candidatos y/o se someten a escrutinio para usar en la terapia de enfermedades neoplásicas.

Es otro objetivo de esta invención proporcionar asesoramiento en la manipulación de virus por ingeniería genética con el fin de aumentar su utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

Es otro objetivo de esta invención proporcionar un medio con el que realizar el escrutinio de células diana potenciales para una terapia viral, con el objetivo de evaluar la sensibilidad de las células diana candidatas a ser destruidas por el virus.

Es otro objetivo más de esta invención proporcionar asesoramiento en el manejo de la terapia viral.

Es un objetivo de esta invención proporcionar tratamiento para tumores grandes.

Es otro objetivo de esta invención proporcionar un virus purificado y métodos para obtenerlo.

La presente invención proporciona el uso de un virus clonal con RNA, competente en replicación y sensible a interferón, para la fabricación de un medicamento para tratar un neoplasma en un mamífero.

5 Sumario de la invención

Esta invención se refiere por lo tanto a un método para infectar un neoplasma de un mamífero con un virus, que comprende el uso de un virus clonal competente en replicación y sensible a interferón, seleccionado entre el grupo que consiste en virus con RNA y las familias de virus con DNA de *Adenovirus*, *Parvovirus*, *Papovavirus* e *Iridovirus*, para la fabricación de un medicamento.

Esta invención también se refiere a la infección de un neoplasma de un mamífero con un virus, que comprende administrar a un mamífero por vía sistémica un virus clonal competente en replicación y sensible a interferón.

Esta invención también se refiere al tratamiento de un neoplasma, que incluye cáncer, en un mamífero, que comprende el uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un virus clonal competente en replicación y sensible a interferón, seleccionado entre el grupo que consiste en virus con RNA y las familias de virus con DNA de *Adenovirus*, *Parvovirus*, *Papovavirus* e *Iridovirus*, para la fabricación de un medicamento.

Esta invención también se refiere a un método para infectar un neoplasma en un mamífero con un virus, que comprende el uso de un virus clonal de la viruela vacuna, competente en replicación y sensible a interferón, que contiene una o más mutaciones en uno o más genes virales implicados en el bloqueo de la actividad antiviral del interferón, seleccionados entre el grupo que consiste en K3L, E3L y B18R, para la fabricación de un medicamento.

La invención también se refiere al uso, para la fabricación de un medicamento para tratar un neoplasma, que incluye cáncer, en un mamífero, de una cantidad terapéuticamente efectiva de un virus de la viruela vacuna, competente en replicación y sensible a interferón, que contiene una o más mutaciones en uno o más genes virales implicados en el bloqueo de la actividad antiviral del interferón, seleccionados entre el grupo que consiste en K3L, E3L y B18R.

La invención también se refiere a la infección de un neoplasma de al menos 1 cm de tamaño, con un virus, en un mamífero, que comprende el uso de un virus clonal sensible a interferón, seleccionado entre el grupo que consiste en (1) virus con RNA; (2) *Hepadnavirus*; (3) *Parvovirus*; (4) *Papovavirus*; (5) *Poxivirus*; y (6) *Iridovirus*, para la fabricación de un medicamento.

La invención también se refiere al uso, para la fabricación de un medicamento para tratar un neoplasma en un mamífero, de una cantidad terapéuticamente efectiva de un virus clonal sensible a interferón, seleccionado entre el grupo que consiste en (1) virus con RNA; (2) *Hepadnavirus*; (3) *Parvovirus*; (4) *Papovavirus*; (5) *Poxivirus*; y (6) *Iridovirus*, en el que el neoplasma tiene al menos 1 centímetro de tamaño.

La invención también se refiere al uso, para la fabricación de un medicamento para tratar un tumor en un mamífero, de una cantidad terapéuticamente efectiva de un virus clonal con RNA, sensible a interferón y citocida para el tumor, en el que el mamífero tiene una carga tumoral que comprende al menos el 1,5% del peso total del cuerpo.

La invención también describe un método de escrutinio de células tumorales o de un tejido recién extirpado del paciente, para determinar la sensibilidad de las células o del tejido a ser destruidos por un virus, que comprende someter a las células o al tejido a un ensayo diferencial de citotoxicidad usando un virus sensible a interferón.

La invención también describe un método para identificar un virus con actividad antineoplásica en un mamífero, que comprende a) usar el virus del ensayo para infectar i) células deficientes en actividad antiviral mediada por IFN, y ii) células competentes en actividad antiviral mediada por IFN, y b) determinar si el virus del ensayo destruye las células deficientes en actividad antiviral mediada por IFN, de manera preferente con respecto a las células competentes en actividad antiviral mediada por IFN.

La invención también describe un método para preparar virus para usar en terapias antineoplásicas, que comprende: a) modificar un virus ya existente disminuyendo o suprimiendo un mecanismo viral para la inactivación de los efectos antivirales del IFN, y opcionalmente b) crear una mutación atenuante que produce como resultado una virulencia menor que la de dicho virus ya existente.

La invención también describe un método para controlar la replicación viral en un mamífero tratado con un virus seleccionado entre el grupo que consiste en virus con RNA, *Adenovirus*, *Poxivirus*, *Iridovirus*, *Parvovirus*, *Hepadnavirus* y *Varicellavirus*, que comprende administrar un compuesto antiviral.

Esta invención también se refiere al tratamiento o a la infección de un neoplasma de un mamífero, que comprende someter una muestra (p. ej., suero, células tumorales, tejido tumoral, sección de un tumor) procedente del mamífero, a un inmunoensayo para detectar la cantidad de receptor de virus presente, para determinar si el neoplasma permitirá al virus unirse a él y producir citólisis y, si el receptor está presente, usar un virus clonal competente en replicación y sensible a interferón, que se une al receptor, para la fabricación de un medicamento.

ES 2 292 207 T3

La invención también se refiere a la infección de un neoplasma de un mamífero con un virus, que comprende administrar al mamífero por vía sistémica una dosis desensibilizante de un virus clonal competente en replicación y sensible a interferón.

5 La invención también se refiere a la infección de un neoplasma de un mamífero con un virus, que comprende administrar al mamífero un virus clonal competente en replicación y sensible a interferón, durante el transcurso de al menos 4 minutos.

10 La invención también se refiere a la infección de un neoplasma de un mamífero con un virus, que comprende administrar un virus clonal competente en replicación, seleccionado entre el grupo que consiste en la cepa MK107 del virus de la enfermedad de Newcastle, la cepa NJ Roakin del virus de la enfermedad de Newcastle, el virus Sindbis y el virus de la estomatitis vesicular.

Están incluidos en la invención:

15

i) un *Paramyxovirus* purificado mediante ultracentrifugación sin formación de sedimento;

ii) un *Paramyxovirus* purificado hasta un nivel de al menos 2×10^9 PFU por mg de proteína;

20

iii) un *Paramyxovirus* purificado hasta un nivel de 1×10^{10} PFU por mg de proteína;

iv) un *Paramyxovirus* purificado hasta un nivel de al menos 6×10^{10} PFU por mg de proteína;

25

v) un virus con RNA purificado hasta un nivel de al menos 2×10^9 PFU por mg de proteína;

vi) un virus con RNA purificado hasta un nivel de al menos 1×10^{10} PFU por mg de proteína;

vii) un virus con RNA purificado hasta un nivel de al menos 6×10^{10} PFU por mg de proteína;

30

viii) un virus citocida con DNA que es sensible a interferón y que está purificado hasta un nivel de al menos 2×10^9 PFU por mg de proteína;

35

ix) un virus de la viruela vacuna, competente en replicación, que contiene a) una o más mutaciones en uno o más de los genes K3L, E3L y B18R, y b) una mutación atenuante en uno o más de los genes que codifican timidina-quinasa, rebonucleótido-reductasa, factor de crecimiento derivado del virus de la viruela vacuna, timidilato-quinasa, DNA-ligasa, dUTPasa;

40

x) un virus de la viruela vacuna, competente en replicación, que contiene una o más mutaciones en dos o más genes seleccionados entre el grupo que consiste en K3L, E3L y B18R;

xi) un *Herpesvirus* que contiene una modificación en la expresión del análogo (2'-5')A que hace que el *Herpesvirus* tenga aumentada la sensibilidad a interferón; y

45

(xii) un *Reovirus* que contiene una mutación atenuante en omega 3 que hace que dicho virus se vuelva sensible a interferón.

También se incluyen en la invención los siguientes métodos:

50

i) un método para purificar un virus con RNA, que comprende las etapas de a) generar un virus clonal; y b) purificar dicho virus clonal mediante ultracentrifugación sin formación de sedimento; o c) purificar dicho virus clonal mediante filtración en flujo tangencial con o sin una posterior cromatografía de permeabilidad en gel, y

55

ii) un método para purificar un *Paramyxovirus*, que comprende purificar el virus mediante ultracentrifugación sin formación del sedimento, o mediante filtración en flujo tangencial con o sin una posterior cromatografía de permeabilidad en gel.

60

La invención también se refiere al tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en el que las células afectadas presentan defectos en una respuesta antiviral mediada por interferón, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un virus clonal competente en replicación y sensible a interferón.

Breve descripción de los dibujos

65

La Figura 1 muestra el efecto de un anticuerpo anti-interferón-beta sobre la expresión de antígenos virales y sobre el título infeccioso en células NHEK (del inglés "*Normal Human Epithelial Keratinocytes*") (queratinocitos epiteliales humanos normales).

La Figura 2 muestra el efecto del interferón-beta sobre la expresión de antígenos virales en diferentes células (fibroblastos normales CCD922-sk de piel humana y dos tipos de células de carcinoma de cabeza y cuello (células KB y células Hep2).

5 La Figura 3A muestra el efecto de interferón sobre la expresión de antígenos virales en células CCD922-sk, y

La Figura 3B muestra el efecto de interferón sobre la expresión de antígenos virales en células KB.

10 La Figura 4 muestra las curvas de supervivencia de ratones atómicos que portan células humanas de carcinoma ovárico ES-2 y que fueron tratados con disolución salina o con la cepa PPMK107 de NDV.

La Figura 5 muestra la capacidad de respuesta del interferón de varias líneas celulares de tumores humanos y de células normales humanas.

15

Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se refiere al descubrimiento de un mecanismo nuevo mediante el cual la replicación viral destruye selectivamente células neoplásicas deficientes en una respuesta anti-viral mediada por interferón (IFN). Esta invención también proporciona métodos para la selección, diseño, purificación y uso de virus para el tratamiento de enfermedades neoplásicas que incluyen cáncer y tumores grandes. Los virus de la invención se replican selectivamente en células neoplásicas y las destruyen sobre la base de la deficiencia selectiva en estas células de una respuesta antiviral mediada por IFN. La administración de la dosificación apropiada de virus da como resultado la muerte de las células neoplásicas, mientras que las células normales, que poseen intacta la respuesta antiviral mediada por IFN, limitan la replicación del virus y no son destruidas.

25

30 Includo en el asunto de la invención está el uso de *Paramyxovirus* tales como el NDV, y de otros virus, para usar en el tratamiento de enfermedades que incluyen enfermedades neoplásicas tales como cáncer. La invención también ilustra sobre el escrutinio y la manipulación por ingeniería genética de otros virus adecuados para usar como terapéutica de enfermedades neoplásicas. Otra realización de la invención implica un método para identificar tejidos tumorales que son candidatos para una terapia viral. Finalmente, la invención también describe la preparación de virus altamente purificados.

35 *Fundamento para el uso de virus sensibles a interferón, que incluyen NDV, para tratar enfermedades neoplásicas*

NDV demuestra ejercer una destrucción selectiva de células tumorales.

40 El virus de la enfermedad de Newcastle produce efectos citotóxicos selectivos contra muchas células tumorales humanas, produciendo notablemente menos efectos sobre la mayoría de las células humanas normales. En un ensayo diferencial de citotoxicidad se descubrió que células cancerosas humanas derivadas de sarcomas, melanomas, carcinomas de mama, carcinomas de ovario, carcinomas de vejiga, carcinoma de colon, carcinoma de próstata, carcinomas de células pequeñas y de células no pequeñas de pulmón y glioblastomas, eran aproximadamente de 3 a 4 órdenes de magnitud más sensibles al NDV que muchas células humanas normales (células de epitelio renal, fibroblastos, queratinocitos, melanocitos y células endoteliales (véase el Ejemplo 1). El ensayo diferencial de citotoxicidad se puede también aplicar a materiales aislados recién obtenidos, procedentes de las células o de tejido tumoral de los pacientes.

45

50 Se usó un ensayo *in vitro* para definir la actividad tumorocida de NDV según se describe en el Ejemplo 1. El ensayo mide la cantidad de virus requerida para matar el 50% del cultivo celular sometido al ensayo, en un período de tiempo de cinco días. Los Ejemplos 2 y 3 muestran los resultados de experimentos *in vivo* en los que el virus se administró a ratones atómicos que portaban xenotrasplantes de tumores humanos, por vía intratumoral (Ejemplo 2) o por vía intravenosa (Ejemplo 3). Estos resultados demuestran que NDV es capaz de producir regresión de diversos tipos de tumores humanos en un modelo animal estándar para el ensayo de agentes quimioterapéuticos potenciales.

55

La evidencia de que NDV se replica de manera específica dentro del tumor se demostró mediante tinción inmunohistoquímica con respecto a un antígeno viral (Ejemplo 2). A los 30 minutos de una inyección intratumoral de virus, el tejido tumoral fue negativo con respecto a antígeno viral. Sin embargo, en el día 2 después del tratamiento, se observó una intensa inmunotinción con respecto al antígeno viral dentro del tumor, que indicaba la replicación del virus en el interior del tumor. Es importante destacar que la replicación del virus fue específica del tejido tumoral ya que el tejido conjuntivo y la piel circundantes dieron resultado negativo con respecto al antígeno viral.

60

Es importante destacar que una replicación eficiente de NDV es crucial para la habilidad del virus para destruir las células infectadas, como se demuestra en estudios que usan virus no clonales, inactivados con luz UV (Lorence, R. y col., 1994, *J. Natl. Cancer Inst.* 86:1288-1233).

65

El NDV puede también producir la regresión de tumores grandes después de su administración intratumoral o intravenosa (Ejemplos del 4 al 9). El tratamiento intratumoral con NDV de xenotrasplantes intradérmicos grandes del melanoma humano A375 (≥ 10 mm de dimensión máxima; volumen del tumor ≥ 300 mm³) en ratones atómicos, dio

lugar a altas tasas de regresión del tumor (Ejemplos del 4 al 8). El tratamiento intravenoso con NDV de xenotrasplantes subcutáneos grandes del fibrosarcoma humano HT1080 (≥ 10 mm de dimensión máxima) en ratones atímicos dio lugar a una regresión del tumor parcial o completa en cinco de los seis ratones (Ejemplo 9).

5 *La familia de citoquinas de los interferones de clase I son importantes moduladores negativos de la función viral.*

Los interferones de la clase I consisten en el IFN α , que se encuentra principalmente en células de origen hematopoyético, y en el IFN β que se encuentra principalmente en fibroblastos y células epiteliales [Joklik, W.K. 1990. *Interferons*, págs. 383-410. *Virology*, segunda edición, redactores: B.N. Fields, D.M. Knipe y col., *Raven Press Ltd.*, Nueva York; and Sreevalsan, T. 1995. *Biological Therapy with Interferon - α y - β . Preclinical Studies*. págs. 347-364. *Biologic Therapy of Cancer*, Segunda edición, redactores: V.T. DeVita, Jr., S. Hellman y S.A. Rosenberg, *J.B. Lippincott Company*, Philadelphia]. Ambos tipos de IFN actúan a través de un mecanismo de acción aparentemente común que incluye la degradación de los intermediarios de la replicación viral de tipo RNA bicatenario, y la inhibición de la traducción celular a través de la actividad de una proteína-quinasa activada por RNA bicatenario (Joklik, W.K. 1990. *Interferons*, págs. 383-410. *Virology*, Segunda edición, redactores: B.N. Fields, D.M. Knipe y col., *Raven Press Ltd.*, Nueva York; y las referencias bibliográficas contenidas en ellos). Varios virus (de la gripe, EBV, SV40, adenovirus, de la viruela vacuna) han desarrollado mecanismos mediante los cuales una o más rutas del sistema de los IFN están inactivadas, permitiendo con ello la eficiente replicación del virus (Katze, M.G. 1995. *Trends in Microbiol.* 3:75-78).

20 *Una amplia variedad de células tumorales son deficientes en la capacidad para limitar una infección viral a través de un mecanismo dependiente de IFN.*

Las células de carcinoma celular humano (HeLa) fueron más de trescientas veces menos sensibles en la inhibición de la replicación del virus de la estomatitis vesicular después de un pretratamiento con IFN, que una línea celular de control de fibroblastos no transformados (Maheshwari R.K., 1983. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 17:161-168). Los autores de la presente invención han descubierto que la infección de un cocultivo de células tumorigénicas de carcinoma humano de cabeza y cuello (KB) y de fibroblastos normales de piel humana (CCD922-sk) da como resultado la replicación viral, inicialmente en ambos tipos de células, seguida por una limitación de la infección en las células normales frente a una replicación continuada y destrucción de las células tumorales (Ejemplo 10). Además, aunque las células normales secretaban IFN en el medio de cultivo, las células tumorales no fueron capaces de responder a IFN a las concentraciones en las que se estaba produciendo para establecer un estado antiviral. Otra evidencia más del papel del IFN en la sensibilidad diferencial de las células tumorales frente a la de las células normales para ser destruidas por NDV, se obtuvo en dos experimentos independientes en los que se demostró que fibroblastos normales (CCD922-sk) o queratinocitos epiteliales normales (NHEK) se volvían más sensibles a la infección con NDV en presencia de un anticuerpo neutralizador de IFN (Ejemplos 11 y 12). Por último, una infección paralela de fibroblastos normales (CCD922-sk) y de células tumorales humanas (KB) en presencia de IFN, reveló que las células normales fueron al menos 100 veces más sensibles a los efectos antivirales de IFN añadido que las células tumorales (Ejemplos 13 y 14). Ensayos similares de diversas líneas de células tumorales (de un total de 9) revelaron una clara correlación entre la sensibilidad relativa de una línea celular para ser destruida por NDV y entre una falta de capacidad de la línea celular para manifestar una respuesta antiviral mediada por interferón (Ejemplo 26).

40 *Interferón y crecimiento celular*

Existen varias especies de interferón (IFN) que incluyen formas naturales y recombinantes de α -IFN, β -IFN, ω -IFN y γ -IFN así como formas consenso sintéticas (p. ej., como las descritas en Zhang y col., (1996) *Cancer Gene Therapy* 3:31-38). Además de las actividades antivirales que conducen a su descubrimiento, actualmente se sabe que el IFN desempeña un importante papel en la regulación normal del crecimiento y diferenciación celulares. El IFN se considera como un regulador negativo del crecimiento y se ha demostrado que varias proteínas clave implicadas en la función y regulación de la actividad de IFN actúan como proteínas supresoras de tumores en células normales (Tanaka y col., 1994 *Cell* 77:829-839). Además, otras varias proteínas conocidas por antagonizar la actividad antiviral de IFN, se ha demostrado que poseen un potencial oncogénico cuando se expresan de manera inapropiada (véase más adelante, Barber, G.N., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4278-4282). Se ha demostrado que células derivadas de varios cánceres humanos tienen deleciones de los genes que codifican IFN (James, CD y col., 1991, *Cancer Res.*, 51:1684-1688) y se ha observado una pérdida parcial o completa de la función de IFN en células de carcinoma de cuello de útero humano (Petricoin, E. y col., 1994, *Mol. Cell. Biol.*, 14:1477-1486), células de leucemia linfocítica crónica (Xu, B. y col., 1994, *Blood*, 84:1942-1949) y células de melanoma maligno (Linge, C. y col., 1995, *Cancer Res.*, 55:4099-4104).

La proteína-quinasa (p68) inducible por IFN se ha demostrado que es un importante regulador de la síntesis de proteínas virales. Ha aparecido una correlación que asocia la expresión o la actividad de la quinasa p68 con el estado de diferenciación de las células. Así, células escasamente diferenciadas, como las que están presentes en muchos cánceres, son deficientes en la función de p68 (Haines, G.K. y col., 1993, *Virchows Arch. B Cell Pathol.* 63:289-295). Las células que carecen de actividad de p68 son generalmente sensibles a ser destruidas por virus debido a que la quinasa p68 es un efector importante del estado antiviral inducible por IFN. La actividad antiviral de p68 puede ser antagonizada a través de una interacción directa con una proteína celular identificada como p58. Cuando se clona y sobreexpresa en células NIH3T3, p58 hace que las células exhiban un fenotipo transformado y un crecimiento independiente de anclaje (Barber GN y col. 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:4278-4382) y se ha demostrado que varias líneas celulares de leucemia humana sobreexpresan la proteína p58 (Korth M.J. y col., 1996 *Gene* 170:181-

188). La sensibilidad a ser destruidas por virus en células indiferenciadas se puede revertir a través de la inducción de un fenotipo más diferenciado (Kalvakolanu, D.V.R. y Sen, G.C., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3167-3171).

Definiciones

5 *Células competentes en una respuesta antiviral mediada por interferón.* Según aquí se usa, la expresión “células competentes en una respuesta antiviral mediada por interferón” se refiere a células que responden a niveles bajos (p. ej., 10 unidades por ml) de interferón exógeno disminuyendo significativamente (al menos 10 veces, más ventajosamente al menos 100 veces, más ventajosamente al menos 1.000 veces y lo más ventajosamente al menos 10.000 veces) la replicación de un virus sensible a interferón, en comparación con su respuesta en ausencia de interferón. El grado de replicación del virus se determina midiendo la cantidad de virus (p. ej., de un virus infeccioso, de un antígeno viral, de un ácido nucleico viral). Los fibroblastos normales CCD922 son células competentes en una respuesta antiviral mediada por interferón.

15 *Células deficientes en una respuesta antiviral mediada por interferón.* Según aquí se usa, la expresión “células deficientes en una respuesta antiviral mediada por interferón” se refiere a células que no satisfacen los criterios anteriormente listados para las células competentes en una respuesta antiviral mediada por interferón, es decir, no responden a niveles bajos (p. ej., 10 unidades por ml) de interferón exógeno disminuyendo significativamente la replicación de un virus sensible a interferón, en comparación con su respuesta en ausencia de interferón. Las células KB de carcinoma de la cavidad oral son células deficientes en una respuesta antiviral mediada por interferón.

25 *Clonal.* El uso del término “clonal” se define de aquí en adelante como un virus derivado de una única partícula infecciosa y del que los clones moleculares individuales poseen una homología significativa en la secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, la homología en la secuencia es tal que al menos ocho clones moleculares individuales procedentes de la población de viriones poseen una homología en las secuencias mayor que el 95%, más ventajosamente mayor que el 97%, más ventajosamente mayor que el 99%, y lo más ventajosamente una homología del 100%, a lo largo de 300 nucleótidos contiguos.

30 *Citocida.* Según aquí se usa, la expresión virus “citocida” se refiere a un virus que infecta células causándoles la muerte.

Dosis desensibilizante. Según aquí se usa, la frase “dosis desensibilizante” se refiere a la cantidad de virus requerida para disminuir los efectos secundarios de dosis posteriores del virus.

35 *Ensayo diferencial de citotoxicidad.* Según aquí se usa, la frase “ensayo diferencial de citotoxicidad” para el escrutinio de células o tejidos tumorales usando un virus, se refiere a: (a) la infección viral de las células tumorales y de una o más células o tejidos de control; (b) la determinación de la supervivencia o de la muerte celular de cada una de las muestras (por ejemplo, mediante el uso de un colorante indicador de viabilidad celular, según se detalla en el Ejemplo 1) pasados uno o más días después de la infección, y (c) sobre la base de los resultados, una estimación de la sensibilidad (por ejemplo, mediante determinación de la IC50 según se detalla en el Ejemplo 1) de la muestra hacia el virus en comparación con el control(es).

45 *Infección de un neoplasma.* Según aquí se usa, la expresión “infección de un neoplasma” se refiere a la entrada del ácido nucleico viral en las células o tejidos neoplásicos.

50 *Sensible a interferón.* Según aquí se usa, la frase virus “sensible a interferón” (p. ej., NDV) significa un virus que se replica significativamente menos (al menos 10 veces menos, ventajosamente al menos 100 veces menos, más ventajosamente al menos 1.000 veces menos y lo más ventajosamente al menos 10.000 veces menos), en presencia de interferón que en ausencia de interferón. Esto se determina midiendo la cantidad de virus (p. ej., de un virus infeccioso, de un antígeno viral, de un ácido nucleico viral) obtenido a partir de células competentes en una respuesta antiviral mediada por interferón, en presencia o ausencia de niveles bajos de interferón exógeno (p. ej., 10 unidades por ml).

55 *Neoplasma y enfermedad neoplásica.* Según aquí se usa, “neoplasma” significa crecimiento nuevo de un tejido, e incluye tumores, crecimientos benignos (p. ej., condilomas, papilomas) y crecimientos malignos (p. ej. cáncer). Según aquí se usa, “enfermedad neoplásica” se refiere a una enfermedad manifestada por la presencia de un neoplasma.

Competente en replicación. Según aquí se usa, la expresión virus “competente en replicación” se refiere a un virus que produce una progenie infecciosa en células neoplásicas.

60 *Sustancialmente libre de proteínas de huevo contaminantes.* La expresión “sustancialmente libre de proteínas de huevo contaminantes” se refiere a un nivel de pureza del virus en el que la ovoalbúmina no es detectable en una transferencia Western realizada por un experto en la técnica, (1) usando $1,7 \times 10^9$ PUF de virus por pocillo (de 3,3 cm de ancho), que se hacen correr sobre un gel de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico) (grosor de 1 mm); (2) transfiriendo las proteínas virales desde el gel hasta una membrana de nitrocelulosa; y (3) realizando una inmunotinción con respecto a ovoalbúmina usando un anticuerpo anti-ovoalbúmina procedente de conejo [fracción IgG procedente de conejo, en una dilución 1:200 de una concentración de anticuerpo de 4 mg/ml (procedente de *Cappel, Inc.*) o un anticuerpo policlonal equivalente].

Cantidad terapéuticamente efectiva. Según aquí se usa, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” cuando se refiere al tratamiento de una enfermedad neoplásica, se refiere a una cantidad de virus que produce el efecto deseado, p. ej., el cese del crecimiento neoplásico, la regresión del tumor, la mejoría del cuadro clínico o un aumento de la supervivencia.

5

Compuestos de la invención

Se usa un diverso grupo de virus para matar selectivamente a las células neoplásicas. Los virus naturales o los manipulados son capaces de actuar como agente antineoplásico. Estos virus i) infectan a células neoplásicas produciendo su muerte; ii) son competentes en replicación en las células neoplásicas; y iii) están restringidos en cuanto a destruir células normales debido a los efectos antivirales del interferón.

En una realización ventajosa de la invención, los virus que poseen las tres características anteriormente mencionadas [(i) infectan a células neoplásicas produciendo su muerte; (ii) son competentes en replicación en las células neoplásicas; y (iii) están restringidos en cuanto a destruir células normales debido a los efectos antivirales del interferón], también inducen a interferón.

En otra realización ventajosa de la invención, los virus que poseen las tres características anteriormente mencionadas también ocasionan la regresión de neoplasmas humanos; y/o no son neutralizados en la población humana diana debido a la presencia de una inmunidad pre-existente.

En otra realización ventajosa, los virus que poseen las tres características anteriormente mencionadas son citocidas para las células tumorales.

25

Un *Paramyxovirus* (según aquí se usa, “*Paramyxivirus*” se refiere a un miembro de *Paramyxoviridae*) se puede usar conforme a la presente invención para tratar un neoplasma, incluyendo un tumor grande, o para tratar a un hospedador que presenta una carga tumoral elevada. La familia *Paramyxoviridae* comprende tres géneros: (1) los paramyxovirus; (2) virus relacionados con el virus del sarampión (los morbilivirus); y (3) virus respiratorios sincitiales (los pneumovirus). Estos virus contienen un genoma con RNA. El uso de virus pertenecientes a *Paramyxoviridae* que son citocidas, especialmente los paramyxovirus, p. ej., el virus de la enfermedad de Newcastle (“NDV”) y otros paramyxovirus aviares tales como el paramyxovirus aviar de tipo 2, constituye un método ventajoso para la práctica de la invención. Las cepas atenuadas de estos virus son especialmente útiles para el tratamiento de neoplasmas de acuerdo con la presente invención.

35

El NDV es un virus especialmente ventajoso conforme a la presente invención. El NDV se clasifica en tres clases diferentes conforme a sus efectos en pollos y en embriones de pollo. Las cepas de “baja virulencia” se denominan cepas lentogénicas y tardan de 90 a 150 horas en matar a los embriones de pollo a la dosis letal mínima (MLD); las cepas de “virulencia moderada” se denominan cepas mesogénicas y tardan de 60 a 90 horas en matar a los embriones de pollo a la MDL. Las cepas de “alta virulencia” se denominan cepas velogénicas y tardan de 40 a 60 horas en matar a los embriones de pollo a la MDL. Véanse, p. ej., Hanson y Brandly, 1955 (*Science*, 122:156-157) y Dardiri y col., 1961 (*Am. J. Vet. Res.*, 918-920). Las tres clases son útiles y son ventajosamente útiles las cepas mesogénicas del NDV tales como la cepa MK107, la cepa NJ Roakin y la cepa Connecticut-70726 (véanse los Ejemplos 21-23). Véase, p. ej., Schloer y Hanson, 1968 (*J. Virol.*, 2:40-47) para obtener un listado de otras cepas mesogénicas.

45

Es conveniente obtener un virus clonal para asegurar o aumentar la homogeneidad genética de una cepa viral particular y para retirar las partículas defectuosas interferentes. La retirada de las partículas defectuosas interferentes por medio de clonación proporciona una mayor pureza del producto final, según se determina por el número de partículas virales totales por cada partícula infecciosa (p. ej., el número de partículas por PFU).

50

Un virus clonal se puede producir conforme a cualquiera de los métodos disponibles para el profesional experto. Por ejemplo, la purificación a partir de una placa de lisis se utiliza de manera rutinaria para obtener virus clonales. Véase, p. ej., Maassab y col., en: Plotkin y Mortimer, redactores. *Vaccines. Philadelphia: W.B. Saunders Co.*, 1994, páginas 78-801. La purificación por el método de la triple placa de lisis es especialmente conveniente, y en él en cada ronda de purificación se selecciona una placa de lisis que presenta las características deseadas, tales como el tamaño, forma y aspecto preferidos, o las características representativas de la cepa parental. Otros medios para generar un virus clonal es mediante técnicas de DNA recombinante, aplicables por un experto en la técnica. Otro medio para obtener un virus clonal emplea la técnica de la dilución límite (p. ej., añadiendo diluciones de la muestra del virus hasta obtener una media de una o menos partículas infecciosas del virus por cada pocillo que contiene una monocapa de un tipo de célula susceptible).

60

En una realización ventajosa de la invención, el virus purificado se usa para tratar enfermedades neoplásicas. Un método ventajoso para la purificación de virus derivados de huevo es el siguiente (el virus no es sedimentado en ninguna de las etapas de estos métodos):

65

ES 2 292 207 T3

Método de purificación A

a) generar un virus clonal (p. ej., mediante purificación en placa de lisis)

5 b) inocular huevos con el virus clonal

c) incubar los huevos

d) enfriar los huevos

10 e) recoger el fluido alantoico de los huevos

f) retirar los restos celulares del fluido alantoico

15 g) ultracentrifugación del fluido alantoico sin sedimentación (p. ej., usando un gradiente discontinuo de sacarosa).

20 En otra realización de la invención, pasos adicionales, añadidos después de la retirada de los restos celulares (del fluido alantoico) y antes de la ultracentrifugación, consisten en:

* congelar y después descongelar el fluido alantoico,

* retirar el material contaminante de la suspensión que contiene el virus (p. ej., por medio de centrifugación).

25 En otra realización de la invención, la ultracentrifugación se lleva a cabo por medio de una ultracentrífuga de flujo continuo.

30 Una de las realizaciones de la invención se refiere a un método para purificar un virus con RNA y competente en replicación, que comprende las etapas de:

a) generar un virus clonal y

35 b) purificar dicho virus clonal mediante ultracentrifugación sin sedimentación.

Otra realización de la invención implica un método para purificar un paramyxovirus (p. ej., NDV) que comprende purificar el virus mediante ultracentrifugación sin sedimentación.

40 Opcionalmente, la etapa de purificación comprende adicionalmente antes de la ultracentrifugación:

a) purificar a partir de una placa de lisis para generar un virus clonal,

45 b) inocular huevos con el virus clonal,

c) incubar los huevos,

d) enfriar los huevos,

50 e) recoger el fluido alantoico de los huevos y

f) retirar los restos celulares del fluido alantoico.

55 Otra realización de la invención implica un método para purificar un virus clonal competente en replicación, a partir de huevos o de un cultivo celular, que comprende la etapa de ultracentrifugación sin una etapa en la que el virus es sedimentado.

60 Otra realización de la invención implica un método para purificar un paramyxovirus (p. ej., NDV) que comprende purificar el virus mediante filtración secuencial en flujo tangencial (TFF).

Opcionalmente, el virus se puede purificar adicionalmente mediante cromatografía de permeabilidad en gel, en cuyo caso cada una de estas etapas tiene lugar en presencia de un tampón estabilizante (Ejemplo 15):

65 a) purificar a partir de una placa de lisis para generar un virus clonal,

b) inocular huevos con el virus clonal,

ES 2 292 207 T3

- c) incubar los huevos,
- d) enfriar los huevos,
- 5 e) recoger el fluido alantoico de los huevos y diluir el fluido alantoico con tampón,
- f) retirar los restos celulares del fluido alantoico mediante TFF,
- 10 g) purificar el virus mediante TFF y
- h) purificar el virus mediante cromatografía de permeabilidad en gel.

15 Opcionalmente, el virus obtenido en la etapa de permeabilidad en gel se puede concentrar usando TFF.

Otra realización de la invención implica un método para purificar un virus clonal competente en replicación, a partir de huevos o de un cultivo celular, que comprende la etapa de purificar el virus mediante filtración secuencial en flujo secuencial (TFF), seguida opcionalmente por cromatografía de permeabilidad en gel, seguida opcionalmente por TFF para concentrar el virus.

Virus clonal

25 El uso de estos métodos permite la purificación de un virus clonal [que incluye *Paramyxovirus* (p. ej., NDV)] hasta al menos 2×10^9 PFU/mg de proteína, ventajosamente hasta al menos 3×10^9 PFU/mg de proteína, más ventajosamente hasta al menos 5×10^9 PFU/mg de proteína, más ventajosamente hasta al menos $1,0 \times 10^{10}$ PFU/mg de proteína, más ventajosamente hasta al menos 2×10^{10} PFU/mg de proteína, más ventajosamente hasta al menos 3×10^{10} PFU/mg de proteína, más ventajosamente hasta al menos 4×10^{10} PFU/mg de proteína, más ventajosamente hasta al menos 5×10^{10} PFU/mg de proteína y lo más ventajosamente hasta al menos 6×10^{10} PFU/mg.

30 El uso de estos métodos permite la purificación de un virus clonal [que incluye *Paramyxovirus* (p. ej., NDV)] hasta un nivel en el que el número de partículas virales por PFU es menor que 10, más ventajosamente menor que 5, más ventajosamente menor que 3, más ventajosamente menor que 2 y lo más ventajosamente menor que 1,2. (Cantidades menores de partículas virales por PFU indican un grado mayor de pureza).

Virus con RNA

40 En otra realización, estos métodos permiten la purificación (hasta los niveles anteriormente citados para los virus clonales) de un virus con RNA [que incluye (a) un virus citocida con RNA; (b) un virus con RNA monocatenario, no segmentado y sin envoltura; (c) un virus con RNA monocatenario, segmentado y con envoltura; (d) un virus con RNA bicatenario, segmentado y sin envoltura; (e) y un virus con RNA monocatenario, no segmentado y con envoltura (p. ej., *Paramyxovirus* (p. ej., NDV) y p. ej., *Retrovirus*)].

Virus con DNA

50 En otra realización, estos métodos permiten la purificación (hasta los niveles anteriormente citados para los virus clonales) de un virus citocida y sensible a interferón, seleccionado entre el grupo que consiste en (a) virus con DNA bicatenario y con envoltura (que incluyen los poxivirus); (b) virus con DNA monocatenario y sin envoltura; y (c) virus con DNA bicatenario y sin envoltura.

Virus derivados de huevo

55 En otra realización, estos métodos permiten la purificación de virus derivados de huevo hasta un nivel sustancialmente libre de proteínas de huevo contaminantes. Se prefiere limitar la cantidad de proteínas de huevo en preparaciones de virus para uso terapéutico en seres humanos, debido a que las principales proteínas de huevo, como la ovoalbúmina, son alérgenos.

60 En la Tabla 1 se muestran virus útiles en el tratamiento de enfermedades neoplásicas, que incluyen cáncer. Estos virus opcionalmente se someten a escrutinio con respecto a variaciones presentes en la naturaleza (determinadas cepas o materiales aislados) que dan como resultado una producción de IFN alterada con respecto a la de la cepa parental.

65

ES 2 292 207 T3

TABLA 1

Virus presentes en la naturaleza para usar en una terapia contra el cáncer

Clase de virus	Familia de virus	Ejemplo de virus
RNA, cadena negativa	<i>Paramyxoviridae</i>	Virus de la enfermedad de Newcastle
		Paramyxovirus aviar, Tipo 2
		Virus de la parotiditis
		Virus paragripal humano
	<i>Rhabdoviridae</i>	Virus de la estomatitis vesicular
RNA, cadena positiva	<i>Togaviridae</i>	Virus Sindbis
	<i>Flaviviridae</i>	Virus de la fiebre amarilla (atenuado)
	<i>Picornaviridae</i>	Rinovirus
		Enterovirus bovino
		Ecovirus
	<i>Coronaviridae</i>	Virus de la bronquitis infecciosa aviar
		Coronavirus humano

En otra realización de esta invención, los virus candidatos, tanto presentes en la naturaleza como manipulados por ingeniería genética, se ensayan con respecto a su capacidad para proporcionar una utilidad terapéutica en el tratamiento de neoplasmas. En una de las realizaciones, la cantidad del virus candidato requerida para matar al 50% de las células deficientes en una respuesta antiviral mediada por interferón, p. ej., células KB de carcinoma de cabeza y cuello, se compara con la cantidad de virus requerida para matar al 50% de un número similar de células competentes en una respuesta antiviral mediada por interferón, por ejemplo, fibroblastos normales de la piel. La cantidad de muerte celular se cuantifica mediante cualquiera de diversos medios, que incluyen el ensayo de exclusión con azul tripán o el ensayo con MTT (véase el Ejemplo 1). Una disminución significativa (p. ej., de al menos 5 veces) en la cantidad de virus requerida para matar a las células deficientes en una respuesta antiviral mediada por interferón, con respecto a la cantidad necesaria para matar a las células competentes en una respuesta antiviral mediada por interferón, indica que el virus del ensayo exhibe la actividad requerida para la utilidad terapéutica en el tratamiento de neoplasmas. Otros virus NDV y el virus Sindbis son de esos virus presentes en la naturaleza que presentan la característica de producir muerte celular selectiva de tumor (véanse los Ejemplos 21-23 y 25).

Un conocimiento de los factores implicados en el establecimiento de un estado antiviral permite la creación de un ensayo de escrutinio de tumores que es probable que respondan a una terapia viral. En principio, un tejido tumoral procedente de un paciente, obtenido por biopsia, se somete a escrutinio con respecto a la expresión de la quinasa p68, la quinasa p58 u otros factores implicados en la regulación de un estado antiviral o de una diferenciación celular. Otros factores incluyen, pero no se limitan a, factor-1 de respuesta de interferón (IRF-1), factor génico 3 estimulador de interferón (ISGF-3) (del inglés, "*Interferon Stimulatory Gene Factor-3*"), c-Myc, c-Myb y receptores para IFN. En el caso de c-Myc, c-Myb o p58 un alto nivel de expresión indica que el tejido o las células tumorales son candidatos a tratamiento para una terapia viral. En el caso de p68, IRF-1, ISGF-3 y receptores para IFN, un nivel bajo de expresión indica que el tejido o las células tumorales son candidatos de tratamiento para una terapia viral.

En otra realización de esta invención, tejidos o células del tumor primario, obtenidos procedentes de biopsias del paciente, se expanden en cultivo y se ensayan con respecto a su sensibilidad a ser destruidas por medio de una terapia viral adecuada. En una de las realizaciones, la cantidad del virus candidato para matar al 50% del cultivo de tejido tumoral se compara con la cantidad de virus requerida para matar al 50% de un cultivo de células normales, como se ha descrito en lo que antecede para el escrutinio de los virus candidatos. Un aumento de diez veces o mayor en la sensibilidad de las células tumorales en comparación con la de las células normales para ser destruidas por el agente viral, indica que las células tumorales son específicamente sensibles al efecto citocida del tratamiento viral. En una realización más de la invención, la capacidad de las células tumorales a las que se dirige el tratamiento, para responder al IFN suministrado por vía endógena o por vía exógena, se determina llevando a cabo el escrutinio anteriormente mencionado en presencia de IFN (de la forma α o β , usando p. ej., 10 unidades por ml, véase el Ejemplo 27).

Un conocimiento de los receptores celulares requeridos para la unión o entrada del virus, permite un escrutinio adicional de tumores que tienen una elevada expresión de receptores y por ello una mayor sensibilidad frente al virus sensible a interferón. Este es un nivel de escrutinio adicional con respecto a pacientes que es probable que respondan a una terapia con virus. De manera ventajosa para una terapia con un virus sensible a interferón, el tumor del paciente es resistente a interferón y presenta también un alto nivel de expresión del receptor celular para el virus. En principio, el suero, células tumorales, tejidos o secciones de tejidos derivados del paciente, se someten a escrutinio mediante inmunoensayo o inmunotinción con respecto a la cantidad de receptor para el virus presente en el suero o en las células tumorales o en el tejido tumoral. Por ejemplo, el virus Sindbis utiliza el receptor de alta afinidad para laminina para infectar células de mamíferos (Wang y col., 1992, *J. Virol.*, 66, 4992-5001). Se sabe que este mismo receptor se expresa en mayores cantidades en muchos tipos diversos de cáncer metastásico. La línea celular PANC-1 de cáncer renal y la línea celular SW620 de adenocarcinoma de colon se sabe que expresan un nivel alto del mRNA del receptor de alta afinidad para laminina (Campo y col., 1992, *Am. J. Pathol.* 141:1073-1083; Yow y col., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 6394-6398) y son muy sensibles al virus Sindbis (Ejemplo 25). Por el contrario, la línea celular SW1423 de adenocarcinoma de recto se sabe que expresa niveles muy bajos del mRNA del receptor de alta afinidad para laminina (Yow y col., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 6394-6398) y es más de 4 órdenes de magnitud más resistente a ser destruida por el PPSINDBIS-Ar339 que las células SW620.

Las cepas existentes de NDV o de otros virus, que incluyen virus con RNA y virus con DNA, se someten a escrutinio o se manipulan por ingeniería genética con respecto a respuestas a IFN alteradas (p. ej., de manera ventajosa, respuestas aumentadas a IFN) en células normales. Además de la capacidad para provocar una potente respuesta a IFN, otras características virales son objeto de escrutinio o se introducen mediante ingeniería genética dentro del virus. Los virus con una especificidad para receptor alterada (p. ej., el virus Sindbis PPSINDBIS-Ar339, véase el Ejemplo 25) o con una neurovirulencia baja, están incluidos en la materia de la invención (p. ej., el virus PPNJROAKIN de NDV, véase el Ejemplo 24). De manera ventajosa, los virus de la invención poseen la capacidad de propagarse a través de un contacto directo célula a célula.

La invención que aquí se describe incluye un amplio grupo de virus (véase la Tabla 1) que son útiles para el tratamiento de neoplasmas de una manera análoga a la que se ha indicado para NDV). Además, virus que en su manera natural no serían candidatos para ser usados, debido a la presencia de un mecanismo(s) que inactiva la respuesta a IFN en células normales, son opcionalmente manipulados por ingeniería genética para soslayar las restricciones anteriormente mencionadas. Si se dejan sin modificar, los virus que poseen mecanismos para inactivar la respuesta a interferón serían más tóxicos para las células normales que los virus a los que se les ha quitado ese mecanismo. La presente invención proporciona (1) el desarrollo de un vector que puede ser fácilmente manipulado; y (2) la creación de un grupo de virus terapéuticos. Las manipulaciones incluyen la adición de un gen de IFN para permitir la expresión viral de un transgén que expresa IFN, o de otros activadores de la ruta de las respuestas a IFN. Permutaciones adicionales, incluyen la expresión obtenida mediante ingeniería genética de enzimas activadoras de profármacos, tales como la timidina-quinasa o la citosina-desaminasa de *Herpesvirus* (Blaese R.M. y col., 1994, *Eur. J. Cancer* 30A: 1190-1193) y la expresión de un antígeno marcador adecuado que permite el direccionamiento hacia las células tumorales por parte del sistema inmunológico. Una permutación adicional incluye la expresión obtenida mediante ingeniería genética de ligandos de receptores para células diana que poseen esos receptores [p. ej., la expresión de receptores para otros virus para dirigir el tratamiento a células infectadas con esos virus (véase Mebastsion y col., 1997, *Cell* 90:841-847; y Schnell MI y col., 1997, *Cell* 90:849-857)].

Varias cepas del virus de la enfermedad de Newcastle demuestran ejercer una destrucción selectiva de células tumorales. En un ensayo diferencial de citotoxicidad usando una segunda cepa de un virus mesogénico de la enfermedad de Newcastle, se encontró que las células tumorales eran 3 órdenes de magnitud más sensibles que las células normales en cuanto a ser destruidas por el virus (Ejemplo 21). De manera adicional, cuando una tercera cepa de un virus mesogénico de la enfermedad de Newcastle se usó en un ensayo diferencial de citotoxicidad, se encontró que las células tumorales eran de 80 a 5.000 veces más sensibles que las células normales en cuanto a ser destruidas por el virus (Ejemplo 22). Estas dos cepas de virus mesogénicos de la enfermedad de Newcastle produjeron también la regresión del crecimiento del tumor después de su administración intratumoral a ratones atímicos que portaban xenotrasplantes de tumores humanos (Ejemplo 23).

En experimentos independientes, la inocuidad de tres cepas diferentes del virus de la enfermedad de Newcastle se estudió después de su inoculación intracerebral en ratones atímicos y en ratones inmunocompetentes. Los resultados de este estudio mostraron que las tres cepas de virus fueron bien toleradas en los ratones que tenían un sistema

inmunológico intacto. La inoculación intracerebral en los cerebros de los ratones atímicos reveló que uno de los virus era tolerado significativamente mejor que los otros dos (Ejemplo 24). Estos resultados demuestran que dentro de una familia concreta de virus se pueden presentar diferencias importantes en las propiedades virales y éstas pueden ser explotadas terapéuticamente para obtener una mayor eficacia o una inocuidad incrementada.

Otro medio mediante el que se puede obtener una mayor eficacia y una menor toxicidad después del tratamiento con virus oncolíticos es a través del uso de virus sensibles a interferón que requieren receptores de superficie celular específicos que se expresan preferentemente sobre células tumorales. El virus Sindbis proporciona un ejemplo de este tipo de restricción. El virus Sindbis infecta las células de mamífero usando el receptor de alta afinidad para laminina ((Wang y col., (1992) *J. Virol.* 66, 4992-5001). Cuando células normales y células tumorales se infectan con el virus Sindbis en un ensayo diferencial de citotoxicidad, se encontró que las células que eran tumorigénicas y que expresaban el receptor de alta afinidad para laminina eran más sensibles a ser destruidas por este virus que otras células (Ejemplo 25). Los queratinocitos normales expresan el receptor de alta afinidad para laminina (Hand y col., (1985) *Cancer Res.*, 45, 2713-2719) pero fueron resistentes a la destrucción por el virus Sindbis en este ensayo.

El virus de la estomatitis vesicular (VSV) (del inglés, “*Vesicular Stomatitis Virus*”) proporciona una evidencia de la destrucción selectiva de tumor por acción de virus oncolíticos, es decir, una deficiencia inherente en la capacidad de respuesta a interferón en células tumorales hace a estas células sensibles a ser destruidas por virus sensibles a interferón y competentes en replicación, cuando el VSV se usa para infectar células WISH humanas, no tumorigénicas, y células HT1080 o células KB tumorigénicas en presencia de interferón exógeno.

Más adelante se encuentra una lista de virus que cuando se modifican para suprimir las actividades anti-interferón presentes en la naturaleza, son útiles en una terapia viral contra el cáncer (véase la Tabla 2). Virus modificados (de manera ventajosa, pero no necesariamente, virus atenuados, además de llevar la modificación anti-interferón, véase la Tabla 3), en los que se han destruido o disminuido las actividades anti-interferón endógenas, son útiles para una terapia contra el cáncer. Esta lista incluye, pero no se limita a, los virus que se describen más adelante. Debido a la similitud entre virus pertenecientes a una clase común, los mecanismos identificados para cada uno de los virus listados más adelante, están también presentes en otros miembros de esa clase de virus como mecanismos idénticos o funcionalmente análogos. El grupo más amplio de virus se añade en paréntesis. Los virus, tales como los que se listan más adelante, que presentan una pérdida funcional de actividad anti-interferón, producida a través de alguno de los medios para ello, que incluyen mutaciones aparecidas en la naturaleza así como deleciones o mutaciones puntuales producidas por ingeniería genética, son útiles en los métodos de la presente invención.

Los virus que usan más de un único mecanismo se modifican opcionalmente para que contengan mutaciones en una, algunas o todas las actividades. Las mutaciones de algunas de las actividades descritas se encuentran a disposición de la comunidad científica general.

Materiales aislados de virus presentes en la naturaleza o de virus manipulados por ingeniería genética que son de crecimiento más lento en comparación con la velocidad de crecimiento del virus de tipo salvaje, son particularmente ventajosas debido a que una velocidad más lenta del crecimiento del virus permitirá a una célula o a una población de células competentes en una respuesta a interferón, establecer un estado antiviral eficiente antes de que la replicación viral sea capaz de matar a la célula o a la población de células.

La desactivación de las actividades virales anti-interferón, como alteración específica del carácter viral que da como resultado el incremento de la respuesta de interferón en una célula infectada, pero que aún permite la replicación viral en células neoplásicas, está incluida en la presente invención.

La Tabla 2 muestra virus existentes, manipulados por ingeniería genética para suprimir la actividad anti-interferón.

La Tabla 3 es un listado de virus manipulados por ingeniería genética para atenuar su virulencia.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 292 207 T3

TABLA 2

Virus existentes manipulados por ingeniería genética para suprimir la actividad anti-IFN

Clase de virus	Familia de virus	Virus	Actividad anti-IFN	Referencias bibliográficas
RNA	<i>Reoviridae</i>	reovirus	$\sigma 3$	Imani F y Jacobs B (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7887-7891.
DNA	<i>Poxiviridae</i>	virus de la viruela vacuna	K3L	Bealtie E y col. (1991) Virology 183:419
			E3L	Bealtie E y col. (1996) Virus Genes 12:89-94
			B18R	Symons JA y col., (1995) Cell 81551-560
	<i>Adenoviridae</i>	Diferentes subtipos	transcritos VA ₁	Mathews MB y Shenx T. (1991) J. Virol. 64:5657-5662
	<i>Alphaherpesviridae</i>	HSV-1	producto del gen gamma 34.5	Chou J y col. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:10516-10520

ES 2 292 207 T3

TABLA 3

Mutaciones atenuantes conocidas de los virus seleccionados

Clase de Virus	Familia de virus	Virus	Atenuación	Referencia bibliográfica
RNA	<i>Reoviridae</i>	reovirus	$\sigma 1$	Spriggs DR y Fields BN (1982) Nature 297:8-70.
		rotavirus	cepas bovinas (WC3)	Clark HF (1988) J. Infect. Dis. 158:570-587.
DNA	<i>Poxiviridae</i>	virus de la viruela vacuna	factor de crecimiento de la viruela vacuna	Butler RML y col. (1988) Bealtie E y col. Virology 164:182.
			timidina-quinasa	Butler RML y col. (1985) Nature 317:813-815
			timidilato-quinasa	Hughes SJ y col. (1991) J. Biol.Chem. 266:20103-20109
			DNA-ligasa	Kerr SM y col. (1991) EMBO.J. 10: 4343-4350
			ribonucleótido-reductasa	Child SJ y col., (1990) Virology 174: 625-629
			dUTP-asa	
	<i>Adenoviridae</i>	distintos subtipos	Ad-4, Ad-7, Ad-21	Takafugi ET y col. (1979) J. Infect.Dis. 140: 48-53
	<i>Alphaherpesviridae</i>	HSV-1	timidina-quinasa	Field HJ y Wildy P (1978) J. Hyg. 81:267-277.
			ribonucleótido-reductasa	Goldstein DJ and Weller SK (1988) Virology 166:41-51.
			producto del gen gamma 34,5	Chou Jet al (1895) Proc Nata Arad Sal USA 92:10516-10520.
			repeticiones invertidas b'a'c'	Meignier 8 et al (1988) J Infect bis 162:313-322.

Tratamiento de Neoplasmas

La presente invención se refiere a una terapia viral de neoplasmas, especialmente en animales con cáncer. En una realización ventajosa, la invención se refiere al tratamiento de tumores que tienen 1 centímetro (cm) o más del tamaño, medido en su dimensión mayor. Según aquí se usa, “tumor de 1 cm” indica que al menos una de las dimensiones del tumor es de 1 cm de longitud. Esos tumores son más sensibles de lo esperado a una terapia viral, a menudo al menos tan sensibles al virus, si no más sensibles, que tumores que tienen un tamaño menor. En un aspecto más ventajoso de la invención, se tratan tumores mayores que 1 cm, p. ej., tumores que tienen 2 cm o más, tumores desde aproximadamente 2 cm hasta aproximadamente 5 cm, y tumores mayores que 5 cm.

La presente invención también que se puede utilizar para tratar hospedadores con una carga tumoral alta. Según aquí se usa, la frase “carga tumoral” se refiere a la cantidad total de tumor en el organismo, expresada en forma de porcentaje con respecto al peso corporal. La terapia viral del hospedadores que tienen una carga tumoral, por ejemplo, desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 2% del peso corporal total, es sorprendentemente efectiva, p. ej., produciendo la regresión del tumor y una reducción de la carga tumoral global. Esto es especialmente inesperado ya que una carga tumoral de aproximadamente el 2% del peso corporal total (p. ej., 1 kg de tumor en un individuo humano de 60 kg) es aproximadamente la masa máxima de cáncer máxima compatible con la vida. Véase, p. ej., Cotran y col., *En Robbins Pathological Basis of Disease*, 4ª Edición, WB Saunders, 1989, página 252. En los Ejemplos, volúmenes de hasta 397 mm³ de un cáncer de melanoma (p. ej., A375) en un hospedador ratón, mostró una regresión completa en respuesta al tratamiento con un virus de la enfermedad de Newcastle (p. ej., un virus purificado por el sistema de triple placa de lisis). Suponiendo que un tejido de 1.000 m³ equivale a 1 gramo, un tumor con un volumen de 397 mm³; comprende aproximadamente el 2% del peso corporal total en el caso de un ratón de 20 g.

Según se muestra más adelante en los Ejemplos del 4 al 9, la regresión del tumor se consiguió con tumores de al menos 1 cm de tamaño, mientras que los animales de control no tratados comenzaron a morir a consecuencia de la carga tumoral en el plazo de algunas semanas. Por lo tanto, esos animales enfermos fueron tratados con éxito a pesar de encontrarse a dos semanas de la muerte. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, un animal que está casi en estado terminal a consecuencia de su carga tumoral, puede ser tratado de manera efectiva con una terapia viral. Por consiguiente, la presente invención se puede usar para tratar pacientes que no han respondido a una terapia convencional, p. ej., una quimioterapia tal como con metotrexato, 5-fluorouracilo, y radioterapia.

La eficacia del NDV en el tratamiento del cáncer después de su administración por vía intraperitoneal ha sido también investigada. Usando un modelo de prevención de ascitis de cáncer de ovario, la inyección intraperitoneal de NDV en ratones que albergan tumores ováricos ES-2 de seres humanos, produjo un aumento de la supervivencia comparada con la de ratones tratados con disolución salina (Ejemplo 16). Cuando se usaron células ES-2 en un modelo de tumor de cáncer de ovario, iniciándose el tratamiento una vez formada la ascitis, la producción de fluido ascítico disminuyó notablemente en los animales tratados con virus, comparados con los controles tratados con disolución salina (Ejemplo 17).

En otra realización de la invención, administración de virus produce 1) el alivio de los síntomas relacionados con el tumor, tales como, pero sin limitarse a, una tasa disminuida de la producción de fluido ascítico, alivio del dolor y alivio de la enfermedad obstructiva, y 2) la prolongación de la vida.

Veintitrés pacientes han recibido el material aislado de NDV purificado en placa de lisis, por vía intravenosa (Ejemplo 20). Las respuestas al tratamiento incluyen la regresión de un tumor palpable, la estabilización de la enfermedad en el 47% de los pacientes y una disminución de la medicación analgésica.

Administración y formulación

En una de las realizaciones de la invención, las células o tejidos tumorales se someten escrutinio *in vitro* para determinar los pacientes con tumores sensibles al virus. Las células tumorales extraídas de los pacientes (mediante métodos tales como aspiración con aguja fina en el caso de tumores sólidos o mediante paracentesis en el caso de tumores ascíticos ovario) se hacen crecer *in vitro* y se incuban con el virus. En esta realización de la invención, los pacientes se seleccionan para terapia si el virus tiene una actividad alta frente a las células tumorales de los mismos.

En una realización ventajosa de la invención, la cantidad de virus administrada produce la regresión del tumor o de los tumores. Según aquí se usa, el término “regresión” significa que tumores se encoge, por ejemplo, de tamaño, masa o volumen. El encogimiento en el tamaño del tumor se demuestra mediante distintos métodos, que incluyen el examen físico, placa de tórax u otras radiografías, ecografía, barrido CT, MRI o un procedimiento de barrido con radioisótopos.

Distintos tipos de neoplasmas que incluyen cánceres son tratables de acuerdo con la invención. Los virus de la presente invención son útiles para tratar diversos cánceres, que incluyen pero que no se limitan a, carcinomas de pulmón, carcinoma de mama, carcinoma de próstata, adenocarcinoma de colon, carcinoma de cuello de útero, carcinoma endometrial, carcinoma ovárico, carcinoma de vejiga, tumor Wilm, fibrosarcoma, osteosarcoma, melanoma, sarcoma sinovial, neuroblastoma, linfoma, leucemia, cáncer de cerebro que incluye glioblastoma, carcinoma neuroendocrino, carcinoma renal, carcinoma de cabeza y cuello, carcinoma de estómago, carcinoma esofágico, carcinoma

vulvar, sarcoma, cáncer de piel, cáncer de tiroides y páncreas y mesotelioma. Los virus de la presente invención son también útiles para tratar diversos tumores benignos, que incluyen, pero que no se limitan a, condilomas, papilomas, meningiomas y adenomas.

5 Una cantidad terapéuticamente efectiva de virus se administra a un hospedador que tiene un neoplasma. Los expertos en la técnica saben que la dosis de virus administrada variará dependiendo del virus seleccionado, del tipo de neoplasma, de la extensión del crecimiento de las células neoplásicas o de metástasis, de la localización biológica o del compartimento corporal del neoplasma(s), de la cepa de virus, de la vía de administración, de la pauta de administración, del modo de administración y de la identidad de todos los demás fármacos o tratamientos que están siendo
10 administrados al mamífero, tales como tratamiento con radiación, quimioterapia o tratamiento quirúrgico. Estos parámetros se definen a través de la determinación de la dosis máxima tolerada en modelos animales y se ajustan a la dosificación humana en función de la superficie corporal o de la masa corporal relativas. Se entiende también que en determinadas circunstancias, se administra más de una única dosis del virus. El intervalo óptimo entre esas múltiples dosis del virus se puede determinar empíricamente y está dentro de la experiencia en la técnica. El NDV generalmente
15 se administra en una dosis desde aproximadamente 3×10^6 hasta aproximadamente 5×10^{12} PFU de virus. En caso de administración local (por ejemplo, directamente en el tumor), típicamente se usan cantidades totales desde aproximadamente 3×10^6 hasta aproximadamente 5×10^{10} PFU de virus. En caso de administración sistémica, se usan cantidades desde aproximadamente 1×10^8 hasta aproximadamente 4×10^{11} PFU de virus por metro cuadrado de superficie corporal. En caso de administración intravenosa, se usan las pautas de dosificación de una vez por semana, dos veces por semana y tres veces por semana. Un virus de acuerdo con la presente invención, opcionalmente junto
20 con un agente quimioterapéutico, se puede administrar por diferentes vías, p. ej., entérica, parenteral, oral, nasal, rectal, intratecal, intravenosa (p. ej., usando un catéter), subcutánea, intratumoral (directamente dentro del tejido tumoral o de los vasos que lo perfunden), peritumoral, local, sublingual, bucal, tópica, intramuscular, mediante inhalación, percutánea, vaginal, intra-arterial, intracraneal, intradérmica, epidural, sistémica, tópica, intraperitoneal, intrapleural, etc. En el caso de los tumores de pulmón, se puede usar un vía bronquial (p. ej., administración bronquial). También se pueden usar inyecciones endoscópicas de tumores gastrointestinales, así como el tratamiento con supositorios de tumores rectales cuando convenga.

Estudios de toxicidad en muridos con NDV han indicado que la toxicidad aguda después de la administración intravenosa del virus es probable que esté causada por reacciones mediadas por citoquinas. Se sabe que las respuestas de las citoquinas a estímulos repetidos son desensibilizadas o reguladas por disminución después de un evento de inducción inicial (Takahashi y col., (1991) *Cancer Res.* 51, 2366-2372). Ratones a los que se les inyectó por vía intravenosa una dosis desensibilizante de virus, fueron capaces de tolerar aproximadamente 10 veces más virus en una segunda dosis que los ratones que habían recibido sólo vehículo en la primera inyección (Ejemplo 18). La velocidad de administración de virus por vía intravenosa puede afectar significativamente la toxicidad. Dos grupos de ratones atímicos se trataron por vía intravenosa con dosis idénticas de NDV, el cual se administró o bien lentamente (0,2 ml a lo largo de 4 minutos) o bien rápidamente (0,2 ml a lo largo del 30 segundos). La comparación de la pérdida de peso máxima en cada uno de los grupos reveló una pérdida de peso del 50% en el grupo había recibido la inyección lenta frente al que había recibido una inyección rápida (Ejemplo 19).

En una cohorte de un estudio clínico, los pacientes recibieron tres inyecciones del material aislado de NDV purificado en placa de lisis, a lo largo de una semana (Ejemplo 20). En estas condiciones, un efecto desensibilizante de la dosis inicial redujo la toxicidad asociada con la segunda y la tercera dosis. Estos datos se asemejan a los obtenidos con los estudios realizados en animales, mostrados en el Ejemplo 18. Un problema relacionado con el uso de virus oncolíticos en el tratamiento del cáncer es el efecto inhibitor potencial que la inmunorrespuesta humoral puede ejercer sobre la terapia. En el estudio clínico, los pacientes que presentan una enfermedad estable transcurrido 1 mes son elegibles para una segunda tanda de tratamiento que se administra a continuación en presencia de anticuerpos neutralizantes dirigidos a NDV. No obstante, el virus infeccioso se pudo encontrar en la orina de los pacientes siete días después de haber recibido la dosis de la segunda ronda de tratamiento, evidenciando que la administración de dosis altas de virus es capaz de superar el efecto de los anticuerpos neutralizantes y de establecer una infección en el paciente.

En una realización ventajosa en la invención, una dosis desensibilizante se administra antes de administrar dosis posteriores más altas. Para la desensibilización, se usan dosis de virus desde 1×10^8 hasta $2,4 \times 10^{10}$ PFU/m². Después de la desensibilización, se usan dosis adicionales de virus desde 3×10^8 hasta 4×10^{12} PFU/m². El margen de tiempo entre las dosis, que incluye el margen de tiempo entre la dosis desensibilizante y la siguiente dosis, es de 1 a 14 días, ventajosamente de 1 a 7 días. La dosis desensibilizante se puede administrar por diversas vías, p. ej., intravenosa, entérica, parenteral, oral, nasal, rectal, intratecal, intravenosa, subcutánea, intratumoral, peritumoral, local, sublingual, bucal, tópica, intramuscular, mediante inhalación, percutánea, vaginal, intra-arterial, intracraneal, intradérmica, epidural, sistémica, tópica, intraperitoneal, intrapleural, endoscópica, intrabronquial, etc. Las dosis posteriores se pueden administrar mediante la misma vía que la dosis desensibilizante o mediante otra vía, p. ej., intravenosa, entérica, parenteral, oral, nasal, rectal, intratecal, intravenosa, subcutánea, intratumoral, peritumoral, local, sublingual, bucal, tópica, intramuscular, mediante inhalación, percutánea, vaginal, intra-arterial, intracraneal, intradérmica, epidural, sistémica, tópica, intraperitoneal, intrapleural, endoscópica, intrabronquial, etc.

Opcionalmente, se puede usar más de una única vía de administración ya sea de una manera secuencial o de una manera concurrente. Las vías para una administración o concurrente o secuencial incluyen, pero no se limitan a, la vía intravenosa, entérica, parenteral, oral, nasal, rectal, intratecal, intravenosa, subcutánea, intratumoral, peritumoral, local, sublingual, bucal, tópica, intramuscular, mediante inhalación, percutánea, vaginal, intra-arterial, intracraneal,

intradérmica, epidural, sistémica, tópica, intraperitoneal, intrapleural, endoscópica, intrabronquial, etc. Un ejemplo sería la administración de una dosis desensibilizante intravenosa seguida de una dosis intraperitoneal.

5 En otra realización ventajosa de la invención, el virus se administra mediante infusión lenta, que incluye usar una bomba intravenosa o una inyección lenta durante el transcurso de 4 minutos a 24 horas.

Un virus, y opcionalmente uno o más agentes quimioterapéuticos, se administra a través de una única inyección, a través de inyecciones múltiples, o de una manera continuada. El virus se administra antes, al mismo tiempo, o después de la administración de agentes quimioterapéuticos (tales como, pero sin limitarse a: busulfano, ciclofosfamida, metotrexato, citarabina, bleomicina, cisplatino, doxorubicina, melfalán, mercaptopurina, vinblastina, 5-fluorouracilo, taxol y ácido retinoico). La terapia viral de acuerdo con la presente invención, se combina opcionalmente con otros tratamientos, que incluyen, cirugía, radiación, quimioterapia (véase, por ejemplo, *Current Medical Diagnosis and Treatment*, Tierney y col. redactores, Appleton y Lange, 1997, especialmente en las páginas 78-94) y terapia biológica. El virus se administra antes, al mismo tiempo, o después de la administración de agentes biológicos tales como (1) otros agentes oncolíticos [tales como, pero sin limitarse a: adenovirus con uno de sus genes bajo el control transcripcional de un elemento de respuesta específico de células prostáticas (véase Rodriques, R. y col., 1997, *Cancer Res.*, 57:2559-2563); adenovirus que no codifican un polipéptido E1b capaz de unirse a p53 (véase Bischoff, J.R. y col., 1996, *Science* 274:373-376)]; un virus del herpes simple que es incapaz de expresar un producto funcional del gene gamma 34.5 (véase Mineta, T. y col., 1995, *Nature Medicine*, 1:938-943)]; (2) citoquinas (tales como, pero sin limitarse a: factores estimuladores de colonias, tales como GM-CSF; factor de necrosis tumoral e interleuquinas tales como IL-1, IL-2, IL-6 de IL-10); (3) vectores virales [tales como, pero sin limitarse a, adenovirus que codifican p53 (véase Zhang, W.W. y col., 1994, *Cancer Gene Therapy*, 1:5-13)]; y (4) vacunas contra el cáncer. En una de las realizaciones de la invención, la terapia consiste en el tratamiento seriado con virus antigénicamente diferentes que son citotóxicos y selectivos de tumor a través del mecanismo del IFN. Esta realización posibilita la terapia viral a lo largo de un período de tiempo prolongado sin interferencia inmunológica.

Otra realización implica el tratamiento de pacientes con interferón IFN (p. ej., α IFN, β IFN o γ IFN) antes de, de manera concurrente con, o después de la administración de NDV (o de otros virus). El IFN se selecciona entre la clase I (alfa, beta y omega) y la clase 2 (gamma) del grupo, y sus versiones recombinantes y sus análogos según se trata detalladamente en, por ejemplo, Sreevalsoun, T., 1995 (En: *Biologic Therapy of Cancer*, segunda edición, redactores: V.T. DeVita, Jr., S. Hellman y S.A. Rosenberg, *J.B. Lippincott Company*, Philadelphia, págs. 347-364). Las células normales responden al pretratamiento con IFN con una respuesta de IFN aumentada a la infección viral, proporcionando una inocuidad aún mayor a estas células. Las células tumorales deficientes en la ruta de señalización de IFN permanecen sensibles a la destrucción por el virus. Esto permite que se usen dosis aún mayores de terapia viral. El IFN se administra de acuerdo con las directrices clínicas estándar para dosis y regímenes conocidos y se sabe que son efectivos para tratar infecciones virales. En otra realización de la invención, otros fármacos, que se sabe que afectan a la ruta de respuesta de IFN, se usan también opcionalmente para aumentar la sensibilidad de las células tumorales, o para aumentar la resistencia de las células normales a los efectos citocidas de la infección viral. Esta clase de fármacos incluye, pero no se limita a, inhibidores de tirosina-quinasa, cimetidina e inhibidores mitocondriales. Se sabe también que la hipoxia y la hipertermia modulan la capacidad de respuesta de interferón.

En otra realización de la invención, con el virus se administran inmunosupresores tales como ciclosporina A, azatiaprina y leflunomida, diferentes preparaciones de corticoesteroides y anticuerpos anti-ligando CD-40 (Foy, T.M. y col., 1993, *J. Exp. Med.* 178:1567-1575). Como alternativa, Como alternativa, un compuesto inmunoestimulador, p. ej., lipopéptidos, se puede administrar con el virus.

Un mecanismo independiente mediante el cual la cantidad interferón producida en respuesta a una infección viral se incrementa través del uso de nucleósidos (Machida, H., 1979. *Microbiol. Immunol.* 23:643-650), precursores de nucleósidos, o fármacos que aumentan la concentración celular de uno o más nucleósidos, se usará opcionalmente como ayudante para la terapia viral.

Determinados análogos de nucleósidos de purina, p. ej., 2-clorodesoxiadenosina y 2'-desoxicoformicina, disminuyen la producción de interferón *in vivo*. Esos compuestos se usarán para la EFFECT marcar aún más las diferencias entre las sensibilidades a interferón de las células tumorales frente a las células normales y se usan opcionalmente como adyuvante de la terapia viral.

En uno de los aspectos, una cantidad efectiva de virus se pueden subdividir en unidades de dosis más pequeñas y se puede inyectar al mismo tiempo en diferentes lugares de mismo tumor. En el caso de una administración continua, el agente(s) conveniente se administra a través de una minibomba implantada o se impregna en un polímero conveniente y después se trasplanta en un lugar conveniente (p. ej., directamente en el tumor) para obtener una liberación lenta o retardada.

Un virus de la presente invención se formula en forma de una preparación farmacéutica llevándola a una forma de dosificación adecuada, junto con al menos un excipiente o agente auxiliar, y si se desea, junto con uno o más de otros compuestos activos. Los excipientes adecuados incluyen, p. ej., sustancias orgánicas e inorgánicas que son apropiadas para la administración entérica o parenteral, p. ej., agua, disolución salina, medios para cultivo de tejidos, tampones, lisina, citrato, triacetato de glicerol y otros glicéridos de ácidos grasos, gelatina, lecitina de soja, carbohidratos tales como manitol, sacarosa, lactosa o almidón, estearato de magnesio, talco, celulosa o proteínas transportadoras, o una

ES 2 292 207 T3

combinación de los anteriores compuestos, tal como manitol/lisina, o manitol/lisina/sacarosa. Las preparaciones se esterilizan y/o contienen aditivos, tales como conservantes y estabilizantes. Para la administración parenteral, p. ej., una inyección sistémica o una inyección local, se formula una preparación del virus, p. ej., en forma de suspensión acuosa o de emulsión.

5 La invención también se refiere a un método para tratar una enfermedad en un mamífero, en el que las células afectadas presentan defectos en la respuesta antiviral mediada por interferón, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un virus clonal, sensible a interferón y competente en replicación. Por ejemplo, células infectadas con muchos virus similares al de la hepatitis B que inactivan la respuesta de interferón, son susceptibles a los virus de esta invención. Existe evidencia de que el virus de inmunodeficiencia humana (HIV) inactiva la respuesta de interferón. Los virus sensibles a interferón de esta invención son útiles en el tratamiento de infecciones virales crónicas, tales como las causadas por el virus de la hepatitis B, el virus de la hepatitis C, HIV, virus de Epstein-Barr, virus del papiloma humano y herpesvirus.

15 Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitativos, de los métodos y composiciones de la presente invención. Otras modificaciones y adaptaciones convenientes de varias de las condiciones y parámetros normalmente encontrados en terapia clínica, que son obvios para los expertos en la técnica, están dentro del alcance de esta invención.

20 Ejemplo 1

PPMK107 (un material aislado, purificado por el método de la triple placa de lisis, de la cepa MK107 de NDV), muestra una actividad citotóxica selectiva frente a muchas células cancerosas humanas en comparación con células humanas normales

Células tumorales y células normales humanas se hicieron crecer hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 80% en placas de 24 pocillos para cultivo de tejidos. El medio de crecimiento se retiró y se añadió PPMK107 en diluciones de razón 10 veces que variaban desde 10^6 unidades formadoras de placa (PFU)/pocillo hasta 10^{-1} PFU/pocillo. En cada placa se incluyeron pocillos de control sin virus añadido. El virus se dejó adsorber durante 90 minutos sobre una plataforma oscilatoria a 37°C. Al final del período de incubación, las diluciones virales se retiraron y se sustituyeron por 1 ml de medio de cultivo. Las placas se incubaron a continuación durante 5 días a 37°C, en CO₂ al 5%, después se evaluaron cualitativamente con respecto a la cantidad de efecto citopático (CPE). La citotoxicidad se cuantificó usando un ensayo colorimétrico con MTT (bromuro de 2-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio) (*Cell Titer 96*, n.º catálogo G4000, *Promega Corporation*, Madison WI 53711) con detección a 570 nm, que detecta actividad de enzimas mitocondriales (Mosman, T., 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55). La viabilidad de los pocillos tratados con virus se expresó en forma de un porcentaje de la actividad encontrada en los pocillos de control no tratados. Los datos se representaron gráficamente en forma de PFU/pocillo frente a la viabilidad expresada como un porcentaje del control. La IC₅₀ se calculó como la cantidad de virus expresada en PFU/pocillo que produce una reducción del 50% en la cantidad de células viables.

Los resultados se proporcionan en las Tablas 4, 5 y 6. PPMK107 mostró un alto grado de actividad citotóxica frente a un grupo diverso de células cancerosas humanas, presentando 30 de un total de 39 líneas malignas un valor de IC₅₀ menor que 1.000 en comparación con la insensibilidad relativa de los tipos de células humanas normales. La mayoría de las células cancerosas humanas presentó valores de IC₅₀ que fueron de 2 a 3 órdenes de magnitud más bajos que los de los tipos de células humanas normales.

50 (Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 292 207 T3

TABLA 4

Sumario de los resultados de los ensayos de citotoxicidad

5

TIPO DE TUMOR	LÍNEA CELULAR	IC ₅₀ (PFU/pocillo)
FIBROSARCOMA	HT1080	2
MELANOMA	SKMEL2	8
	SKMEL3	2
	SKMEL5	4
	A375	37
	MALME-3M	778
	HT144	28
CÁNCER DE MAMA	SKBR3	10
	MDA-MB-468	44
	ZR75-1	78
CARCINOMA OVÁRICO	SW626	4
	PA-1	4
	ES-2	13
	SKOV-3	24
	OVCAR3	34
CARCINOMA DE PULMÓN (células grandes, vías bajas)	H-1299	26
GLIOBLASTOMA	U87MG	25
	U373MG	765
	U138	38
	A172	207
CARCINOMA DE VEJIGA	HT1197	3
	UM-UC-3	54
	HT1376	422
NEUROBLASTOMA	IMR32	41
CARCINOMA DE CUELLO UTERINO	HeLa	4
CARCINOMA DE PRÓSTATA	DU-145	31
	PC3	3,1 X 10 ³
CARCINOMA DE COLON	SW620	55
	HT29	> 1,0 X 10 ⁶
CARCINOMA DE CABEZA Y CUELLO	KB	4
	A253	2,7 x 10 ⁹
	FaDu	2,9 x 10 ³
	Hep-2	1,5 x 10 ⁴
NEUROEPITELIOMA	SK-N-MC	20
CÁNCER DE PULMÓN DE CÉLULAS PEQUEÑAS	DMS-114	48
	DMS-153	1,1 X 10 ⁵
	NCI-H345	1,2 X 10 ⁶
CÁNCER DE PRÓSTATA DE CÉLULAS PEQUEÑAS	NCI-H660	1,0 X 10 ⁵
LEUCEMIA (AML)	K562	5,4 X 10 ⁴

65

ES 2 292 207 T3

TABLA 5

Sumario de los resultados de los ensayos de citotoxicidad usando células humanas normales

TIPO DE CÉLULAS	CÉLULAS	IC ₅₀ (PFU/pocillo)
Queratinocitos	NHEK	9,0 x 10 ⁶
Fibroblastos	CCD-922	1,4 x 10 ⁵
	NHDF	8,1 x 10 ³
Células endoteliales	HPAEC	5,2 x 10 ⁴
Células renales	RPTEC	2,7 x 10 ⁴
Melanocitos	NHEM	5,1 x 10 ⁴
Astrocitos	NHA	3,8 x 10 ³

TABLA 6

Sumario de los resultados de los ensayos de citotoxicidad usando células humanas normales de proliferación rápida

TIPO DE CÉLULAS	TASA DE PROLIFERACIÓN		IC ₅₀ (PFU/pocillo)
	IN VIVO	IN VITRO	
Células de médula ósea CD34+ enriquecidas hasta el 50%	De moderada a alta	Alta	6,2 x 10 ³
Células epiteliales de mama	Muy baja ¹	Alta ¹	30
¹ Las células epiteliales de mama humana (HMEC) (del inglés, " <u>H</u> uman <u>B</u> reast <u>E</u> pithelial <u>C</u> ells") del ensayo presentaron una tasa de proliferación alta después de una estimulación con extracto de hipófisis bovina y con factor de crecimiento epidérmico humano. En marcado contraste, las células epiteliales normales de mama casi siempre presentan un grado de proliferación muy bajo en mujeres adultas con cáncer.			

Ejemplo 2

Uso de PPMK107 para el tratamiento intratumoral de xenotrasplantes de tumores humanos (< 10 mm y > 5 mm) en ratones atímicos

Ratones atímicos recibieron inyecciones por vía intradérmica de 10 millones de células tumorales humanas. Una vez que los tumores alcanzaron un intervalo de tamaños entre 5 mm y 10 mm, se les administró una inyección única de PPMK107 (a una dosis de 3 x 10⁸ PFU) o de disolución salina. Casi todos los tipos de tumor exhibieron una tasa de regresión completa o parcial del 50% al 100% (véase la Tabla 7) en los ratones tratados con PPMK107. La única excepción es el caso del experimento U87MG (experimento I): Aunque solamente uno de los 9 tumores tratados con PPMK107 experimentó regresión completa, dos tumores más tratados con el virus mostraron una regresión del 32% y del 20% y dos tumores más tratados con virus presentaron un crecimiento más lento que los 8 tumores tratados con el control de disolución salina. La regresión de tumores estuvo virtualmente ausente en los tumores tratados con el

ES 2 292 207 T3

control de disolución salina: En todos estos experimentos (desde el A hasta el I, listados en la Tabla 7) solamente uno de los 73 tumores de control mostró regresión. Estos resultados indican que los diversos tipos de tumor mostraron respuestas al tratamiento intratumoral con PPMK107.

5 Para estudiar la replicación de los virus en el interior del tumor, se realizó una tinción inmunohistoquímica del antígeno viral (usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína P de NDV) usando el modelo del fibrosarcoma HT1080 subcutáneo. Dentro de los 30 minutos después de la inyección intratumoral de 3×10^8 PFU de PPMK107, el tejido tumoral fue negativo con respecto al antígeno viral. Sin embargo, en el día 2 después del tratamiento, una intensa inmunotinción con respecto al antígeno viral se observó dentro del tumor, indicando la replicación del virus en el interior del tumor. Es importante destacar que la replicación del virus fue específica para el tejido tumoral ya que el tejido conjuntivo y la piel adyacentes fueron negativos con respecto al antígeno viral.

Ejemplo 3

15 *Uso de PPMK107 para el tratamiento intravenoso de xenotrasplantes de tumores humanos (< 8,5 mm y > 5,5 mm) en ratones atímicos*

20 Ratones atímicos recibieron inyecciones intradérmicas de 10 millones de células del fibrosarcoma HT1080 humano. Una vez que los tumores alcanzaron un intervalo de tamaños entre 5 mm y 8 mm, se les administró una inyección (inyecciones) intravenosa de PPMK107 o de disolución salina. Como se muestra en la Tabla 8, al nivel más alto de dosis de virus (1×10^9 PFU) se observó una regresión completa del tumor en los siete ratones. Las inyecciones únicas de 3×10^8 PFU y 6×10^7 PFU produjeron unas tasas de regresión de más del 90%. Mientras que una inyección única por vía IV de 3×10^8 proporcionó solamente una tasa de regresión del tumor del 55%, tres inyecciones por vía IV de este nivel de dosis proporcionaron una tasa de respuesta del 100%. Los ratones tratados con disolución salina por vía IV, no exhibieron evidencia de regresión del tumor. Estos resultados indican que los tumores HT1080 subcutáneos dan una buena respuesta al tratamiento por vía IV con PPMK107.

30 Tabla 7. Tratamiento intratumoral con PPMK107 de xenotrasplantes subcutáneos de tumores humanos (< 10 mm y > 5mm) en ratones atímicos

Tumor	Tipo de tumor	n.º de experimento	Dosis	N	Regresión completa	Regresión parcial + completa
HT1080	Fibrosarcoma	A	$3,00E+08$	12	11	11
		B	$3,00E+08$	9	8	8
		C	$3,00E+08$	8	8	8
PA-1	Carcinoma ovárico	D	$3,00E+08$	9	9	9
KB	Carcinoma oral	E	$3,00E+08$	12	7	10
SKMEL5	Melanoma	F	$3,00E+08$	8	5	7
A375	Melanoma	G	$3,00E+08$	8	5	7
		H	$3,00E+08$	8	1	4
U87MG	Glioblastoma	I	$3,00E+08$	9	1	1

ES 2 292 207 T3

Tabla 8. Tratamiento intravenoso con PPMK107 de xenotrasplantes de fibrosarcoma HT1080 humano subcutáneo (< 8,5 mm y > 5 mm) en ratones atímicos

	Dosis	Programa	N	Regresión completa	Regresión parcial+completa	% de regresión
5	1,00+09	Una sola inyección	7	7	7	100%
	3,00+08	Una sola inyección	10	9	10	100%
10	6,00+07	Una sola inyección	11	10	10	91%
	2,00+07	Una sola inyección	11	5	6	55%
15	2,00+07	Tres inyecciones, un día sí y otro no	7	5	7	100%
20	Disolución salina	Una sola inyección	10	0	0	0%
	Disolución salina	Tres inyecciones, un día sí y otro no	6	0	0	0%
25						

Ejemplo 4

30 *Primer experimento usando PPMK107 para el tratamiento intratumoral de xenotrasplantes grandes de melanoma A375 en ratones atímicos*

35 Ratones atímicos recibieron inyecciones intradérmicas de 10 millones de células del melanoma A375 humano. Diez días más tarde, tumores de diferentes tamaños se trataron con una sola inyección de PPMK107 (dosis de 3×10^8 , 9×10^8 y $1,5 \times 10^9$ PFU) o de disolución salina. De los tumores con su dimensión más grande de 10 mm a 11 mm, los nueve experimentaron regresión completa en respuesta al tratamiento intratumoral con estas dosis de PPMK107, mientras que de los tumores con su dimensión más grande de 8 mm a 9,5 mm, doce de los 24 tumores experimentaron regresión completa en respuesta a la terapia viral ($P < 0,008$; Tabla 9, sección A). No se observó regresión de los tumores en ninguno de los ratones tratados con disolución salina.

40 Estos mismos tumores, cuando se clasificaron por el volumen del tumor, también evidenciaron un alto porcentaje de regresión completa en aquellos tumores con mayor volumen tumoral. En respuesta a estas dosis de PPMK107, la regresión completa tuvo lugar en 14 de un total de 17 tumores con volúmenes $> 300 \text{ mm}^3$ (intervalo de 304 mm^3 a 397 mm^3) y en 7 de un total de 16 tumores con volúmenes $< 300 \text{ mm}^3$ (intervalo de 144 mm^3 a 295 mm^3 ; $P < 0,023$; Tabla 9, sección B).

Estos resultados indican que los tumores de al menos 1 cm de longitud o 300 mm^3 de volumen son por lo menos igual de sensibles, si no más sensibles, al tratamiento intratumoral con PPMK107 que los tumores más pequeños.

50 Ejemplo 5

Segundo experimento usando PPMK107 para el tratamiento intratumoral de xenotrasplantes grandes de melanoma A375 en ratones atímicos

55 Los tumores se establecieron de la misma manera que en el Ejemplo 4 diez días después de la inoculación de las células tumorales. El tratamiento consistió en distintas dosis de PPMK107 (3×10^6 PFU, 3×10^7 PFU, 3×10^8 PFU y $1,5 \times 10^9$ PFU) o de disolución salina. En el caso de los tumores con de 10 mm a 11,5 mm en su dimensión más grande, tuvo lugar una regresión completa o parcial (al menos del 50%) en los 28 tumores tratados con PPMK107 usando estas dosis, en contraste con la ausencia de regresión en todos los ratones tratados con disolución salina (Tabla 10, sección A).

60 Cuando estos mismos tumores se clasificaron por volumen tumoral, los 26 tumores mayores que 300 mm^3 (intervalo: de 309 mm^3 a 525 mm^3) experimentaron una regresión completa o parcial de al menos el 50% en respuesta a PPMK107 en contraste con ninguno de los ratones tratados con disolución salina.

65 Estos resultados confirman que los tumores de al menos 1 cm de longitud o 300 mm^3 de volumen son sensibles al tratamiento intratumoral con PPMK107.

Tabla 9: Tratamiento de xenotrasplantes intradérmicos de melanoma A375 con PPMK107 intratumoral

A. Tumores clasificados con respecto a su dimensión más grande		Dimensión de los tumores: de 8 a 9,5 mm		Dimensión de los tumores: de 10 a 11 mm	
Tratamiento	Dosis	N	Regresión completa %	N	Regresión completa %
PPMK107	1,5x10 ⁹	8	25%	3	100%
PPMK107	9,0x10 ⁸	8	88%	3	100%
PPMK107	3,0x10 ⁸	8	38%	3	100%
Total		24	50%	9	100% a
Disolución salina		6	0%	3	0%
B. Tumores clasificados con respecto al volumen del tumor		Volumen del tumor < 30 mm ³		Volumen del tumor > 30 mm ³	
Tratamiento	Dosis	N	Regresión completa %	N	Regresión completa %
PPMK107	1,5x10 ⁹	6	33%	5	60%
PPMK107	9,0x10 ⁸	5	75%	7	100%
PPMK107	3,0x10 ⁸	6	33%	5	80%
Total		16	44%	12	82% b
Disolución salina		8	0%	1	0%

a - P < 0,008 para la regresión completa en el grupo de 10 a 11 mm tratado con PPMK107 frente al grupo de 8 a 9,5 mm tratado con PPMK107.

b - P < 0,023 para la regresión completa en el grupo de > 30 mm³ tratado con PPMK107 frente al grupo de < 30 mm³ tratado con PPMK107.

ES 2 292 207 T3

Tabla 10: Tratamiento de xenotrasplantes intradérmicos de melanoma A375 con PPMK107 intratumoral						
A. Tumores de 10 a 15 mm (Clasificados con respecto a su dimensión más grande)						
Regresiones						
Tratamiento	Dosis	N	Completa	%	Completa + parcial	%
	$1,5 \times 10^9$	7	7	100%	7	100%
	$3,0 \times 10^8$	7	6	86	7	100%
	$3,0 \times 10^7$	7	5	71	7	100%
	$3,0 \times 10^6$	7	5	71	7	100%
	Todos los grupos PPMK107	28	23	82	28	100%
	Disolución salina	6	0	0%	0	0%
B. Tumores > 300 mm ³ (Clasificados con respecto al volumen del tumor)						
Regresiones						
Tratamiento	Dosis	N	Completa	%	Completa + parcial	%
	$1,5 \times 10^9$	7	7	100	7	100%
	$3,0 \times 10^8$	7	6	86	7	100%
	$3,0 \times 10^7$	6	4	67	6	100%
	$3,0 \times 10^6$	6	4	67	6	100%
	Todos los grupos PPMK107	26	21	81	26	100%
	Disolución salina	5	0	0%	0	0%

45 Ejemplo 6

Tercer experimento usando PPMK107 para el tratamiento intratumoral de xenotrasplantes grandes de melanoma A375 en ratones atímicos

50 Los tumores se establecieron de la misma manera que en el Ejemplo 4 diecinueve días después de la inoculación de las células tumorales. El tratamiento consistió en distintas dosis de PPMK107 (3×10^8 PFU, 3×10^6 PFU, 3×10^5 PFU, 3×10^4 PFU, 3×10^3 PFU, 3×10^2 PFU) o de disolución salina. En el caso de los tumores con de 12,5 a 14 mm en su dimensión más grande (intervalo de volúmenes: de 632 mm³ a 787 mm³; volumen medio 698 mm³), tuvieron lugar regresiones tumorales de al menos el 50% en dos de los tres ratones tratados con 3×10^8 PFU, en contraste con la ausencia de regresión en los dos ratones tratados con disolución salina (Tabla 11). Usando la misma dosis de PPMK107 (3×10^8 PFU) para tratar tumores con su dimensión más grande de 10 mm a 12 mm (intervalo de volúmenes: de 320 mm³ a 600 mm³; volumen medio: 411 mm³), siete de ocho ratones exhibieron una regresión de la menos el 25% ($P < 0,001$ para una regresión de al menos el 25% en comparación con los ratones tratados con disolución salina que no exhibieron regresiones, Tabla 11). También se observaron regresiones de al menos el 25% en tumores de 10 mm a 12 mm de longitud, en ratones tratados con 3×10^6 PFU, 3×10^5 PFU, 3×10^4 PFU y 3×10^3 PFU, pero no en ratones tratados con 3×10^2 PFU o con disolución salina (Tabla 11).

60 Estos resultados confirman que los tumores de al menos 1 cm de longitud o 300 mm³ de volumen son sensibles al tratamiento intratumoral con PPMK107.

65

ES 2 292 207 T3

Ejemplo 7

Cuarto experimento usando PPMK107 para el tratamiento intratumoral de xenotrasplantes grandes de melanoma A375 en ratones atímicos

5

Se establecieron tumores de 10 mm a 12 mm de dimensión más grande, de la misma manera que en el Ejemplo 4, trece días después de la inoculación de las células tumorales. El tratamiento intratumoral consistió en una única inyección de 3×10^8 PFU de PPMK107 o de disolución salina. Los volúmenes de los tumores tratados con PPMK107 variaron desde 295 mm^3 hasta 600 mm^3 (volumen medio de los tumores de 437 mm^3). Los grupos de ratones de cada uno de los grupos de tratamiento se sacrificaron con eutanasia en los días 0, 2, 3, 4, 7 y 14 para el estudio histológico del tumor. En el caso de los ratones observados durante un mínimo de 4 días, 11 de un total de 12 ratones tratados con PPMK107 exhibieron una regresión de al menos el 25% en comparación con ninguno de los 8 ratones del grupo tratado con disolución salina ($P < 0,0001$, Tabla 12). A los 2 días después del tratamiento con PPMK107, dos tumores exhibieron ya signos de regresión pero el grado de regresión fue de menos del 25%.

15

(Tabla pasa a página siguiente)

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 11: Tercer experimento usando PPMK107 para el tratamiento intratumoral de xenotrasplantes de melanoma A375 (de al menos 10 mm de tamaño)									
Tamaño: de 12,5 a 14 mm		Regresiones		Regresiones		Regresiones		Regresiones	
Tratamiento	N	Intervalo de volúmenes	Volumen medio	Completa	Parcial ^a	>25% ^b	Núm. total de regresiones ^c	% de regresiones ^c	
3,0E+08	3	de 632 a 787	698	1	1	0	2	87%	
Disolución salina	2	de 717 a 860	788	0	0	0	0	0%	
Tamaño: de 10 a 12 mm									
Tratamiento	N	Intervalo de volúmenes	Volumen medio	Completa	Parcial ^a	>25% & 50% ^b	Núm. total de regresiones ^c	% de regresiones ^c	
3,0 E +08	8	320 a 600	411	0	3	4	7	88%	d
3,0 E +06	8	425 a 662	502	0	0	2	2	25%	
3,0 E +05	8	245 a 600	421	0	0	1	1	13%	
3,0 E +04	8	336 a 600	477	0	0	1	1	13%	
3,0 E +03	8	281 a 542	349	2	0	0	2	25%	
3,0 E+ 02	8	281 a 662	372	0	0	0	2	0%	
Disolución salina	8	379 a 666	518	0	0	0	0	0%	

Tabla 12. Cuarto experimento usando PPMK107 para el tratamiento intratumoral de xenotrasplantes de melanoma A375 (de al menos 10 mm de tamaño)									
Tratamiento	Día del sacrificio después del tratamiento	N	Regresiones			Núm. total de regresiones C	% de regresiones C		
			Completa	Parcial a	>25% & 50% b				
Tamaño: de 12,5 a 14 mm									
3,0 E +08	14 días	3	0	2	1	3	100%		
3,0 E +08	7 días	3	0	2	1	3	100%		
3,0 E +08	4 días	3	0	2	1	3	100%		
3,0 E +08	3 días	3	0	0	2	3	67%		
3,0 E +08	Todos los grupos PPMK107	12	0	6	5	11	92% d, e		
Disolución salina	14 días	2	0	0	0	0	0%		
Disolución salina	7 días	2	0	0	0	0	0%		
Disolución salina	4 días	2	0	0	0	0	0%		
Disolución salina	3 días	2	0	0	0	0	0%		
Disolución salina	Todos los grupos tratados con disolución salina	8	0	0	0	0	0%		

ES 2 292 207 T3

Ejemplo 8

Quinto experimento usando PPMK107 para el tratamiento intratumoral de xenotrasplantes grandes de melanoma A375 en ratones atímicos

5 Los tumores de mayor dimensión, de 10 mm a 12 mm, se establecieron de la misma manera que en el Ejemplo 4 veinte días después de la inoculación de las células tumorales. El tratamiento intratumoral consistió en una única inyección de 3×10^8 PFU de PPMK107 o de disolución salina. Los volúmenes de los tumores tratados con PPMK107 variaron desde 361 mm^3 hasta 756 mm^3 (volumen medio de los tumores de 551 mm^3). Nueve de un total de 10 ratones
10 tratados con PPMK107 exhibieron una regresión de al menos el 25% en comparación con ninguno de los 10 ratones del grupo tratado con disolución salina ($P < 0,0001$, Tabla 13).

Ejemplo 9

15 *Primer experimento usando PPMK107 para el tratamiento intravenoso de xenotrasplantes grandes de fibrosarcoma HT1080*

20 A ratones atímicos se les inyectaron por vía subcutánea 10 millones de células del fibrosarcoma humano HT1080. Seis días después, los tumores se trataron con una inyección única de PPMK107 (a una dosis de $1,5 \times 10^9$ PFU) o de disolución salina. En el caso de los tumores de 10 a 11 mm en su dimensión más grande, cinco de un total de seis tumores mostraron una regresión completa o parcial en respuesta a una inyección intravenosa única de PPMK107 en comparación con ninguno de los tumores tratados con disolución salina (Tabla 14, $P < 0,025$). Estos resultados indican que los tumores de al menos 1 cm de longitud son sensibles al tratamiento intravenoso con PPMK107.
25

(Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 13: Quinto experimento usando PV701 para el tratamiento intratumoral de xenotrasplantes de melanoma A375 (de al menos 10 mm de tamaño)						
Tamaño: de 10 a 12 mm						
Tratamiento	N	Completa	Parcial a	>25% & < 50% b	Núm. total de regresiones c	% de regresiones c
3,0 E +08	10	0	4	5	9	90%
Disolución salina	10	0	0	0	0	0%
<p>a - La regresión parcial se define como la regresión menor que el 100% e igual o mayor que el 50%.</p> <p>b - "Regresión >25% & < 50%" se define como una regresión del tumor mayor que el 25% y menor que el 50%.</p> <p>c - Incluye toda regresión del tumor que es menor que el 25%.</p> <p>d - $P < 0,05$ para una regresión completa o parcial en el grupo tratado con PV701 frente al grupo tratado con disolución salina.</p> <p>e - $P < 0,0001$ para toda regresión de tumor de al menos el 25% en el grupo tratado con PV701 frente al grupo tratado con disolución salina.</p>						

ES 2 292 207 T3

Tabla 14: Tratamiento intravenoso de xenotrasplantes subcutáneos del fibrosarcoma humano HT1080 en ratones atímicos

Tabla 14: Tratamiento intravenoso de xenotrasplantes subcutáneos del fibrosarcoma humano HT1080 en ratones atímicos							
Tamaño: de 10 a 11 mm							
Regresiones							
Tratamiento	Dosis	N	Completa	%	Completa+Parcial	%	
PPMK107	1,5E+09	6	4	67%			
					5	83%	a
Disolución salina		4	0	0	0	0	

a - $P < 0,025$ (mediante la prueba exacta de Fisher) para la regresión completa o parcial (regresión de al menos el 50%) en el grupo tratado con PPMK107 en comparación con el grupo tratado con disolución salina

Ejemplo 10

Eliminación específica de la infección de PPMK107 por parte de las células normales pero no de las células tumorales

Con el fin de estudiar el mecanismo de destrucción específica de tumor por acción de la cepa PPMK107 de NDV, se escogieron células tumorales representativas sobre la base de los siguientes criterios: a) capacidad para generar tumores en forma de xenotrasplantes en ratones atímicos; b) los trasplantes tumorales son destruidos de manera específica *in vivo* después de la administración de PPMK107; c) las células tumorales manifiestan ser destruidas por PPMK107 *in vitro* a concentraciones de virus que están a varios log por debajo de la concentración necesaria para matar a las células normales resistentes; y d) las células tumorales se deben distinguir con facilidad de las células normales cuando se encuentran en forma de cocultivo. Los tumores de los xenotrasplantes que comprenden células KB de carcinoma de cabeza y cuello exhiben en el 83% una regresión parcial o completa en respuesta a una única inyección intratumoral de PPMK107, son más de cuatro veces más sensibles a ser destruidos por PPMK107 *in vitro* que fibroblastos primarios normales de la piel (CCD922-sk) y se distinguen fácilmente de las células CCD922-sk cuando se encuentran en forma de cocultivo.

Por consiguiente, cocultivos de células KB y células CCD922-sk se infectaron a una multiplicidad de infección (m.o.i. (del inglés, "*multiplicity of infection*"), proporción de virus añadido por célula) de 0,0005, y el transcurso de la infección se siguió durante 5 días mediante tinción inmunohistoquímica con respecto a un antígeno viral (la proteína P de NDV). La infección de las células normales tuvo su máximo en el día 2, con una muerte celular escasa o no evidenciada, según se determinó mediante inspección visual de la monocapa de células. En el tercer día después de la infección, la cantidad de expresión viral de las células normales disminuyó significativamente, mientras que la infección de las células tumorales se evidenció claramente. La cantidad de antígeno viral prácticamente desapareció en las células normales en los días 4 y 5, mientras que la infección de las células tumorales progresó rápidamente por toda la población de células tumorales, dando como resultado la destrucción de la mayoría de las células tumorales presentes en el cocultivo.

Así, las células normales fueron infectadas y eliminaron la infección fácilmente en conformidad con los efectos anti-virales de IFN. Las células tumorales no fueron capaces de establecer un estado anti-viral como respuesta y fueron destruidas por el crecimiento viral constante, a pesar de la presencia de concentraciones fisiológicamente efectivas del IFN secretado en el medio por las células normales.

Ejemplo 11

Demostración de que el interferón es un componente importante de la eliminación de los virus en células normales CCD922-sk

Se hizo un ensayo para comprobar la hipótesis de que el interferón mediaba la capacidad de las células CCD922-sk para eliminar la infección de las células PPMK107. Anticuerpos policlonales neutralizantes, dirigidos contra el interferón- α humano o contra el interferón- β humano, usados solos o en combinación, se añadieron diariamente a cultivos de células CCD922-sk infectadas con PPMK107 a una m.o.i. de 0,0005 y el avance de la infección se siguió durante tres días. La cantidad de antígeno viral presente en las células aumentó en proporción a la concentración del anticuerpo neutralizante, siendo más marcado el efecto del anticuerpo anti-interferón- β que el del anticuerpo anti-interferón- α ; en conformidad con los informes de que los fibroblastos producen de manera predominante la forma beta de interferón.

ES 2 292 207 T3

La capacidad para hacer a las células normalmente insensibles, más susceptibles a la infección con PPMK107 a través de la adición de un anticuerpo neutralizante dirigido contra interferón, apoya la hipótesis de que una diferencia clave entre la sensibilidad de las células normales y de las células tumorales a ser destruidas por PPMK107 reside en la capacidad de las células normales, pero no de las tumorales, para establecer una respuesta anti-viral mediada por interferón.

Ejemplo 12

Demostración de que el Interferón- β es un componente importante en la eliminación de los virus en otras células normales

En este experimento, se determinó que otro tipo de células normales (NHEK, células epiteliales humanas normales), que se sabe que son bastante resistentes a ser destruidas por PPMK107, se hicieron más sensibles a través de la adición de un anticuerpo policlonal anti-interferón- β a un cultivo de células infectadas. Las células NHEK (queratinocitos epiteliales humanos normales) se infectaron a una m.o.i. de 0,0005 o de 0,05 y se les añadió anticuerpo diariamente durante cinco días.

En los cultivos infectados a la m.o.i baja (0,0005), el aumento de la expresión de antígeno viral, dependiente de anticuerpo, fue claro a los cinco días después de la infección, pero fue menos claro en las primeras fases del experimento. La adición de anticuerpo a los cultivos infectados con PPMK107 a una m.o.i. de 0,05 dio como resultado un aumento marcado de antígeno viral en los días 4 y 5 después de la infección. En los días 2 y 3 después de la infección, la adición de anticuerpo neutralizante dio como resultado una menor acumulación de antígeno viral (Fig. 1).

Los sobrenadantes de los cultivos de las muestras de m.o.i. alta, se titularon con respecto a la cantidad de virus infeccioso presente, mediante ensayo en placa de lisis sobre células tumorales de fibrosarcoma HT1080 humano; sistema de ensayo estándar del laboratorio de los autores de la invención. Los resultados obtenidos de este análisis demostraron que a los cinco días después de la infección había un aumento de 19 veces de la cantidad de virus infeccioso en los cultivos tratados con anticuerpo en relación con los controles que recibieron un tratamiento simulado (Fig. 1).

Estos resultados sugieren un mecanismo general mediante el cual las células normales están protegidas de ser destruidas por PPMK107 a través de un mecanismo relacionado con interferón.

Ejemplo 13

Comparaciones del efecto del interferón- β sobre la infección por PPMK107 en células tumorales y en células normales

Se realizó una comparación del efecto del interferón- β añadido de manera exógena sobre la infección de células normales (CCD922-sk) y de células tumorales de sensibilidad alta (células KB) o de sensibilidad intermedia (células HEp2) a PPMK107. Cultivos independientes de los tres tipos de células se trataron con interferón- β , a 20.000 unidades/ml o a 2.000 unidades/ml, 1 día antes de la infección y 2 días después de la infección a una m.o.i. de 0,0005.

En el día 3 después de la infección, el bajo nivel de expresión de antígeno viral presente en las células normales fue eliminado a todas las dosis de interferón usadas. Por el contrario, la adición de interferón a las células tumorales KB altamente sensibles, a concentraciones de 2 unidades/ml o 200 unidades/ml, disminuyó los niveles relativos de expresión de antígeno viral 2 veces, con una supresión completa a una concentración de interferón de 1.000 unidades/ml. Las células HEp-2 de sensibilidad intermedia, respondieron al interferón exógeno eliminando la expresión de antígeno viral a todas las dosis de interferón usadas (Fig. 2).

El patrón de sensibilidad de las células KB y de las células CCD922-sk a los efectos antivirales del interferón- β añadido de manera exógena, fue inversamente proporcional a la sensibilidad de estas células a ser destruidas por PPMK107. La capacidad de las células HEp-2 para responder a los efectos de interferón indica que estas células son capaces de utilizar eficientemente las concentraciones de interferón usadas en este experimento. De manera similar, la respuesta de las células KB a las altas dosis de interferón sugiere que la incapacidad para establecer una respuesta antiviral mediada por interferón, no es el resultado de un defecto absoluto en la ruta del interferón sino de una insensibilidad relativa en comparación con las células normales.

Ejemplo 14

Efecto de concentraciones bajas de interferón- β sobre la infección de células normales y células tumorales con PPMK107

En este experimento, células normales (CCD922-sk) y células tumorales (KB) se trataron con concentraciones bajas de interferón- β (0,2 unidades/ml, 2 unidades/ml y 20 unidades/ml) 1 día antes y 2 días después de la infección con PPMK107 a una m.o.i. de 0,05.

ES 2 292 207 T3

En estas condiciones, las células normales experimentaron una disminución de la cantidad de antígeno viral, dependiente de la dosis, mientras que los niveles relativos de antígeno viral de las células tumorales no se vio afectada por la adición de interferón exógeno (Fig. 3).

5 Ejemplo 15

Purificación de PPMK107

Método A

10 El PPMK107 derivó de la cepa mesogénica Mass-MK107 del virus de la enfermedad de Newcastle mediante el método de purificación en triple placa. Aproximadamente 1.000 PFU (unidades formadoras de placa) de PPMK107 vivos se inocularon en la cavidad de fluido alantoico de cada uno de 10 huevos de pollo embrionados que contenían embriones de 10 días. Después de una incubación a 36°C durante 46 horas, los huevos se enfriaron y a continuación se recogió el fluido alantoico. Las células y los restos celulares se separaron del fluido alantoico mediante centrifugación a 1.750 x g durante 30 minutos. El fluido alantoico clarificado (el sobrenadante que contiene el virus) se extendió a continuación a lo largo de un gradiente discontinuo de sacarosa al 20%/55% y se centrifugó a aproximadamente 100.000 x g durante 30 minutos. El virus purificado se recogió en la interfase de las concentraciones al 20%/55% y se dializó frente a disolución salina para retirar la sacarosa.

Método B

20 En otra realización ventajosa, el fluido alantoico clarificado se congeló a -70°C. Después de descongelado, el fluido se mantuvo a de 1°C a 4°C durante la noche y luego el material se separó de la suspensión del virus por medio de centrifugación (1.750 x g durante 30 minutos). Este material fue posteriormente procesado usando el gradiente discontinuo de sacarosa en la ultracentrífuga según lo expuesto en lo que antecede.

Método C

30 En otra realización ventajosa, la ultracentrifugación en el gradiente discontinuo de sacarosa se llevó a cabo con una ultracentrífuga de flujo continuo.

Método D

35 En otra realización ventajosa, el fluido alantoico recogido se diluye con un tampón que contiene manitol al 5% y l-lisina al 1,0%, pH 8,0 (tampón ML) y se somete a clarificación e intercambio con tampón ML mediante filtración en flujo tangencial (TFF) a través de filtros con un tamaño de poro nominal de 0,45 μm . La fracción permeabilizada que contiene el virus clarificado en tampón ML se recoge y el virus se purifica mediante TFF a través de filtros con un valor de exclusión nominal de 300.000 dalton en tampón ML. El virus concentrado y purificado en tampón ML se recoge como la fracción retenida en esta etapa y se diluye de nuevo con tampón ML antes de ser aplicado a una columna de permeabilidad en gel *Sephacryl S500* (*Pharmacia*) equilibrada con tampón ML. Las fracciones que contienen el virus purificado se recogen, se reúnen y se pueden concentrar de nuevo mediante TFF a través de filtros con un valor de exclusión nominal de 300.000 dalton con tampón ML.

45 *Resultados*

** Virus clonal*

50 Después de generar PPMK107 mediante purificación en placas de lisis, se encontró que ocho clones moleculares individuales procedentes de la población de viriones tenían una secuencia idéntica (p. ej., una homología del 100%) de más de 300 nucleótidos contiguos contenidos en el gen de la proteína de fusión de NDV. PPMK107 es un virus clonal con un alto grado de homogeneidad genética.

** PFU/mg de proteína*

55 Uno de los medios cuantitativos para medir la pureza es mediante determinación de las PFU/mg de proteína. Los valores más altos indican un nivel de pureza más alto. Usando el Método A, se obtuvieron valores de PFU/mg de proteína de al menos $4,8 \times 10^{10}$ (véase la Tabla 15). Usando el método C, se obtuvieron valores de PFU/mg de proteína de al menos $2,0 \times 10^{10}$. En el caso de una cepa mesogénica de NDV, no se ha encontrado en la literatura un valor para esta medida de pureza. La mejor estimación para una cepa mesogénica de NDV es la preparación del virus (NDV MassMK107, lote RU2, preparado como se describe en Faaberg KS y Peebles, ME, 1988, *J. Virol.* 62:586; y Bratt, MA y Rubin, H. 1967, *Virology* 33:598-608). Se encontró que este lote RU2 tenía un valor de PFU/mg de $1,3 \times 10^9$ PFU/mg de proteína. Los valores de pureza conseguidos con el Método A son aproximadamente 40 veces mejores que lo conseguido con el método de Peebles (véase la Tabla 15).

65

ES 2 292 207 T3

* *Proporción de partículas por PFU*

Otro de los medios cuantitativos para medir la pureza es mediante la determinación de la proporción de partículas por PFU. Los valores más bajos indican un nivel mayor de pureza. El recuento de partículas se realizó mediante microscopía electrónica usando métodos estándar. Usando el Método A o el Método B, se obtuvieron valores de partículas por PFU cercanos a uno (Tabla 15).

TABLA 15
Pureza del virus

<u>Método de preparación del virus</u>	<u>Virus</u>	<u>Núm. de Lote</u>	<u>PFU por mg de proteína</u>	<u>Partículas por PFU</u>
Método A preferido	PPMK107	L2	$4,8 \times 10^{10}$	0,80
		L4	$6,9 \times 10^{10}$	NT ^a
		L5	$6,6 \times 10^{10}$	NT
		L6	$7,7 \times 10^{10}$	0,55
		L7	$6,1 \times 10^{10}$	NT
Método C preferido	PPMK107	D004	$2,0 \times 10^{10}$	0,32
		D005	$4,5 \times 10^{10}$	0,52
		D010	$4,4 \times 10^{10}$	NT
Método D preferido	PPMK107	RD2	$5,6 \times 10^{10}$	NT
		RD3	$5,0 \times 10^{10}$	NT
^a NT, No determinado				

Las preparaciones de virus usando los Métodos A y C también permiten la purificación de NDV hasta un nivel sustancialmente libre de proteínas de huevo contaminantes. En el caso del lote 7 de PPMK107 usando el Método A, la ovoalbúmina no fue detectable en una transferencia Western usando (1) $1,7 \times 10^9$ PFU del virus purificado por pocillo (3,3 cm de ancho), procesadas en un gel de SDS-PAGE (electroforesis en gel (de 1 mm de grosor) de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico); (2) una membrana de nitrocelulosa para la transferencia; y (3) anticuerpo anti-ovoalbúmina procedente de conejo (fracción de IgG de conejo Cappel, a una dilución 1:200 de una concentración de anticuerpo de 4 mg/ml). En el caso de preparaciones de PPMK107 usando el Método D y analizadas mediante SDS-PAGE seguida de tinción con plata, no se observó ninguna banda correspondiente a ovoalbúmina.

Ejemplo 16

Uso de PPMK107 para prevenir muertes a consecuencia de las ascitis del carcinoma ovárico ES-2 en ratones atómicos

En este experimento, a todos los ratones atómicos (hembras, NCR nu/nu, de 8 semanas de edad) se les administró una inyección intraperitoneal de 10^6 células ES-2. Siete días más tarde, antes de que las ascitis se desarrollasen, los ratones recibieron un tratamiento intraperitoneal con disolución salina o con PPMK107 (a 1×10^9 PFU). Como se muestra en la Figura 4, se produjo una supervivencia notablemente mejorada en los animales tratados con PPMK107 en comparación con los tratados con disolución salina. La mayoría de los ratones del grupo tratado con disolución salina habían desarrollado ascitis a los siete días después del tratamiento y en el día 38 todos estos animales habían muerto. En marcado contraste, el 92% de los ratones tratados con PPMK107 seguían vivos en el día 38 y el 25% de estos animales fueron supervivientes de largo plazo (> 120 días de supervivencia).

ES 2 292 207 T3

Ejemplo 17

Tratamiento con PPMK107 del carcinoma ovárico ES-2 en ratones atímicos cuando hay ascitis

5 En este experimento, a todos los ratones atímicos (hembras, NCR nu/nu, de 8 semanas de edad) se les administró una inyección intraperitoneal de 10^6 células ES-2. Catorce días más tarde, cuando la mayoría de los ratones habían desarrollado ascitis, los ratones sin ascitis se excluyeron y los ratones con ascitis se repartieron aleatoriamente en 7 grupos de tratamiento intraperitoneal (PPMK107 - un único tratamiento en el día 0; PPMK107 - dos tratamientos durante la primera semana; PPMK107 - un tratamiento cada semana; PPMK107 - dos tratamientos cada semana; disolución salina - un único tratamiento en el día 0; disolución salina - dos tratamientos durante la primera semana; disolución salina - dos tratamientos cada semana); Una dosis de 1×10^9 PFU/ratón se usó para cada uno de los tratamientos con virus. A todos los ratones antes del primer tratamiento y de cualquiera de los tratamientos adicionales, se les vació de fluido ascítico. El día 0 se refiere al día del primer tratamiento.

15 El grado de ascitis de cada uno de los ratones se cuantificó y se anotó de la siguiente manera:

Puntuación de la ascitis	Grado de ascitis
1,0	El animal parece normal; poca o nada de ascitis presente.
2,0	Abdomen ligeramente distendido; el animal es capaz de realizar las funciones normales.
3,0	Abdomen distendido; el animal es lento de movimientos, encorvado con marcha vacilante.
4,0	Abdomen completamente distendido; animal moribundo.
5,0	Muerte después del desarrollo de ascitis.

Como se muestra en la Tabla 16, todos los animales tratados con disolución salina tuvieron ascitis más avanzadas que los animales tratados con PPMK107 tanto en el día 7 como en el día 10. En el día 7 después del tratamiento inicial, cada uno de los grupos tratados con disolución salina tuvo puntuaciones medias de las acitis por encima de 3,5, mientras que todos los grupos tratados con PPMK107 tuvieron puntuaciones medias de ascitis de 3,0 o por debajo. De manera similar, en el día 10 después del tratamiento inicial, cada uno de los grupos tratados con disolución salina presentó puntuaciones medias de ascitis por encima de 4,5 mientras que todos los grupos tratados con PPMK107 tuvieron puntuaciones medias de ascitis de 4,1 o inferiores. Estos resultados indican que la producción de fluido ascítico estaba marcadamente disminuida en animales tratados con virus en comparación con los controles tratados con disolución salina.

TABLA 16

Tratamiento del carcinoma ovárico ES-2 con PPMK107 en ratones atímicos cuando hay ascitis

Tratamiento	Núm. ratones	Puntuación media de las ascitis, Día 7	Puntuación media de las ascitis, Día 10
Disolución salina x 1	12	4,3	4,7
Disolución salina x 2	12	3,7	4,6
Disolución salina x 2 cada semana	12	4,3	4,8
PPMK107 x 1	17	3,0	4,1
PPMK107 x 2	17	2,3	3,6
PPMK107 x 1 cada semana	17	2,6	2,6
PPMK107 x 1 cada semana	17	2,2	3,6

ES 2 292 207 T3

Ejemplo 18

Uso de una dosis desensibilizante de PPMK107 para disminuir la letalidad de una dosis posterior de PPMK107

5 A ratones C57BL/6 (de siete semanas de edad) se les inyectó por vía intravenosa en el día 0 o disolución salina o una dosis desensibilizante de PPMK107 (3×10^8 PFU/ratón). Dos días más tarde, cada uno de los grupos de ratones se subdividió más en grupos correspondientes a una dosificación intravenosa con disolución salina o con PPMK107 (a dosis de 1×10^8 , $2,5 \times 10^9$ y 1×10^{10} PFU/ratón). Como se muestra en la Tabla 17, cuando se usó disolución salina para el pretratamiento de los ratones, se registraron muertes en los ratones a los que posteriormente se les
10 habían administrado dosis de $2,5 \times 10^9$, 5×10^9 y 1×10^{10} PFU). Las dosis de 5×10^9 y 1×10^{10} PFU fueron letales al 100% para los ratones pretratados con disolución salina. Por lo contrario, no se observaron muertes en ningún grupo de ratones a los que se les había administrado una dosis desensibilizante de PPMK107 en el día 0, seguida de una inyección de PPMK107 dos días más tarde a unos niveles de dosis de 1×10^{10} PFU. Estos datos indican que PPMK107 se puede usar para prevenir la letalidad de posteriores dosis usando el mismo agente. Además, la dosis
15 máxima tolerada de PPMK107 se puede elevar en un orden de magnitud cuando se usa este virus como agente de desensibilización.

TABLA 17

Uso de una dosis desensibilizante de PPMK107 para disminuir la letalidad de una dosis posterior de PPMK107

Grupo	Inyección en el día 0	Dosis en el día 2	Núm. de ratones	Núm. de muertes	% de letalidad
1	Disolución salina	Disolución salina	8	0	0
2	Disolución salina	PPMK107 $1,0E+09$	8	0	0
3	Disolución salina	PPMK107- $2,5E+09$	8	3	38
4	Disolución salina	PPMK107- $1,0E+09$	8	8	100
5	Disolución salina	PPMK107, $1,0E+10$	8	8	100
6	PPMK107, $3E+08$	Disolución salina	8	0	0
7	PPMK107, $3E+08$	PPMK107, $1,0E+09$	8	0	0
8	PPMK107, $3E+08$	PPMK107, $2,5E+09$	8	0	0
9	PPMK107, $3,0E+08$	PPMK107, $5,0E+09$	8	0	0
10	PPMK107, $3,0E+08$	PPMK107, $1,0E+10$	8	0	0

Ejemplo 19

Una velocidad más lenta de la inyección intravenosa disminuye la toxicidad de PPMK107

55 Veintidós ratones atímicos (de 8 semanas de edad) fueron anestesiados con una combinación de ketamina/xilacina y se colocaron dentro de un aparato de sujeción para que ayudara a inhibir sus movimientos durante el procedimiento de las inyecciones con el fin de permitir una inyección lenta o una inyección rápida de PPMK107. En el grupo de la inyección lenta, se inyectaron 0,2 ml de 4×10^9 PFU de PPMK107 en disolución salina, por vía intravenosa, a lo
60 largo de un período de 4 minutos, administrándose 0,01 ml cada de 10 a 15 segundos. El grupo de la inyección rápida recibió la misma dosis y el mismo volumen pero durante un período de 30 segundos. Como se muestra en la Tabla 18, los animales que recibieron sus dosis de PPMK107 a lo largo de 4 minutos presentaron una pérdida de peso de como mucho la mitad de la pérdida de peso máxima (registrada en el día 2 después de recibir la dosis) de los animales que habían recibido la misma dosis por vía I.V. a lo largo de 30 segundos. Estos resultados indican que PPMK107 tiene
65 menos toxicidad y es más inocuo para administración intravenosa cuando se inyecta a esas velocidades más lentas.

ES 2 292 207 T3

TABLA 18

La inyección por vía I.V. de PPMK107 da como resultado una toxicidad disminuida

Grupo	Longitud de tiempo en el que se administró la dosis	Núm. de ratones	Porcentaje de la pérdida de peso máxima
Inyección rápida de 4E +09	30 segundos	11	12%
Inyección lenta de 4E +09	4 minutos	11	6%

Ejemplo 20

Uso de PPMK107 en el tratamiento de pacientes con cáncer avanzado

PPMK107 se ha ensayado por vía I.V. en un estudio clínico en fase I en EE.UU. Veintitrés pacientes con tumores sólidos avanzados, que ya no respondían a las terapias establecidas, han sido tratados con PPMK107. Diecisiete de estos pacientes han recibido una única dosis de la tanda inicial del tratamiento. Otros seis pacientes reciben tres dosis por semana durante una semana de la tanda inicial del tratamiento. El seguimiento de los tamaños de cada uno de los tumores de los pacientes se realizó una vez al mes. Los pacientes con la enfermedad cuanto menos estable (aumento menor que el 25% y descenso menor que el 50% en la suma de los productos de todos los tumores medibles en ausencia de lesiones nuevas) se eligieron cada mes para las tandas adicionales de tratamiento.

Regresión de un tumor palpable

Una anciana de 68 años con carcinoma de colon, presentaba un tumor abdominal palpable entre sus metástasis generalizadas. Después de un tratamiento único por vía I.V. con PPMK107, esta paciente experimentó una regresión del 91% de este tumor individual de pared abdominal en el transcurso de dos semanas (Tabla 19). Las medidas del tumor un día después de recibir la dosis (3,75 x 3 cm) fueron similares a las medidas de referencia de 4 x 3 cm. Sin embargo, en el día 7 después de recibir la dosis, el tumor había disminuido de tamaño a 2 x 2 cm y continuó disminuyendo de tamaño hasta alcanzar 1,5 x 1,5 cm en el día 14 después de recibir la dosis de PPMK107. Antes del tratamiento con PPMK107, esta masa de tumor había estado creciendo rápidamente, con un aumento del 1.065% en el volumen del tumor, en las dos semanas anteriores a recibir la dosis de PPMK107. Esta paciente dejó el estudio porque el crecimiento del tumor aumentaba en otro lugar.

TABLA 19

Tamaño de un tumor palpable de pared abdominal en la paciente Núm. 123 (anciana de 68 años de edad con carcinoma de colon metastásico) después de una dosis única por vía I.V. de PPMK107 de 12 Billones de PFU/m²

Fecha	Tiempo después de recibir la dosis	Dimensiones del tumor (longitud x anchura, cm ²)	Volumen del tumor (longitud x anchura x grosor, cm ³)	% de reducción en volumen del tumor
23/7/98	Día 0	4 x 3	18,0	-
24/7/98	Día 1	3,75 x 3	16,9	6%
30/7/98	Día 7	2 x 2	4,0	78%
6/8/98	Día 14	1,5 x 1,5	1,7	91%

Estabilización del cáncer

Otros ocho pacientes, todos los cuales habían presentado previamente progresión de los tumores con las terapias convencionales contra el cáncer, experimentaron un beneficio en forma de la estabilización de su cáncer avanzado después de recibir la dosis de PPMK107. Estos pacientes con la enfermedad en situación estable, representan pacientes con diversos tipos de cáncer que incluyen cáncer renal, cáncer pancreático, cáncer de mama y cáncer de pulmón. Después de tres meses de tratamiento con PPMK107, un anciano de 67 años, con cáncer renal avanzado y metástasis generalizadas, en el momento del estudio presentaba la enfermedad en situación estable, con ausencia de indicaciones de crecimiento nuevo y sin indicación de aumento del tamaño del tumor. Ha habido una proporción mayor de beneficio en los casos de enfermedad en situación estable usando dosis más altas de PPMK107: Dos de 6 pacientes con la enfermedad en situación estable (el 33% de los pacientes), a los dos primeros niveles de las dosificaciones únicas (5,9 y 12 billones de PFU por m²) y 4 de 5 pacientes (el 80% de los pacientes) con la enfermedad en situación estable, al nivel más alto de la dosis única (24 billones de PFU por m²) (Tabla 20).

15

TABLA 20

Tratamiento de pacientes que presentan un cáncer avanzado con PPMK107

20

25

30

35

40

45

50

Nivel de dosis (Billones de PFU por m ²)	Núm. de pacientes tratados con este nivel de dosis	Núm. de pacientes con estabilización de la enfermedad	% de pacientes con estabilización de la enfermedad	Tipos de cáncer con la enfermedad en situación estable durante al menos un mes y duración de la enfermedad en situación estable
5,9	6	2	33%	Cáncer renal - 3 meses seguidos. Cáncer de pulmón-1 mes seguido.
12	6	2	33%	Cáncer de páncreas - 2 meses seguidos.
24	3	4	80%	Cáncer de mama - 1 mes seguido. Cáncer de mama, 1 mes seguido. Cáncer de pulmón - 1 mes seguido. Cáncer de páncreas - 1 mes seguido.
TOTAL	17	8	47%	Los anteriormente indicados.

55

Disminución de la medicación analgésica

60

Uno de los pacientes tratado con el nivel de dosis de una dosis única de 5,9 billones de PFU/m², se benefició del tratamiento con PPMK107 en forma de un alivio sintomático del dolor asociado al cáncer, según se manifiesta por la disminución de la medicación narcótica contra el dolor.

Desensibilización

65

Un claro efecto desensibilizante desde la primera dosis (de 5,9 billones de PFU/m²) se observa en las dosis posteriores (también de 5,9 billones de PFU/m²) dentro de la misma semana. En general, los efectos secundarios descritos, resultantes de la segunda y tercera dosis, han sido muchos menos. Por ejemplo, los primeros 4 pacientes de este régimen de tratamiento multidosis (tres dosis por semana durante una semana) presentaron fiebre después de la primera

ES 2 292 207 T3

dosis a pesar de haber recibido tratamiento antipirético profiláctico con acetaminofeno e ibuprofeno. La mayoría de estos pacientes no presentaron fiebre después de haber recibido la segunda y la tercera dosis, incluso en los casos en los que no recibieron antipiréticos. Esto indica que la administración de la primera dosis en el programa de tres veces por semana, disminuye la toxicidad de las dosis segunda y tercera.

5

Administración de la dosis por medio de anticuerpos neutralizantes del suero

Usando el intervalo de dosis de este estudio de fase I ($\geq 5,9$ billones de PFU/m²), hay también una clara señal de que se pueden suministrar virus de manera efectiva a pacientes, aun cuando los pacientes hayan generado anticuerpos neutralizantes. Una anciana de 72 años con cáncer pancreático, al nivel de una dosis única de 12 billones de PFU/m², ha presentado la enfermedad en situación estable durante 2 meses desde el comienzo del tratamiento con PPMK107. Una segunda tanda de tratamiento (consistente en una única dosis de PPMK107 por vía I.V.) se administró un mes después de la primera dosis, cuando la paciente había producido anticuerpos neutralizantes en su suero. Siete días después de esta segunda tanda de tratamiento, su orina dio positivo con respecto a PPMK107 a un título de al menos 40 PFU por ml. Este resultado indica que los anticuerpos neutralizantes, dirigidos contra PPMK107, presentes en el suero de esta paciente, no fueron capaces de inhibir completamente al virus con esta segunda tanda de tratamiento.

10

15

Ejemplo 21

Sumario de los resultados de los ensayos de citotoxicidad con el virus PPNJROAKIN de la enfermedad de Newcastle

Células tumorales y células normales humanas se hicieron crecer hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 80% en placas de 24 pocillos para cultivo de tejidos. El medio de crecimiento se extrajo y se añadió PPNJROAKIN, un clon purificado en placa de lisis, de la cepa mesogénica New Jersey Roakin-1946 del virus de la enfermedad de Newcastle, en diluciones de razón 10 veces que variaban desde 10⁷ unidades formadoras de placa (PFU)/pocillo hasta 1 PFU/pocillo. En cada placa se incluyeron pocillos de control sin virus añadido. El virus se dejó adsorber durante 90 minutos sobre una plataforma oscilatoria a 37°C. Al final del período de incubación, las diluciones virales se extrajeron y se sustituyeron por 1 ml de medio de cultivo. Las placas se incubaron a continuación durante 5 días a 37°C, en CO₂ al 5%. Se cuantificó la citotoxicidad usando un ensayo colorimétrico con MTT (bromuro de 2-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio) (*Cell Titer 96*, n.º catálogo G4000, *Promega Corporation*, Madison WI 53711) con detección a 570 nm, que detecta actividad de enzimas mitocondriales (Mosman, T., 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55). La viabilidad de los pocillos tratados con virus se expresó en forma de porcentaje de la actividad encontrada en los pocillos de control no tratados. Los datos se representaron gráficamente en forma de PFU/pocillo frente a la viabilidad expresada como porcentaje del control. La IC₅₀ se calculó como la cantidad de virus expresada en PFU/pocillo que produce una reducción del 50% en la cantidad de células viables.

25

30

35

TABLA 21

Sumario de los resultados de los ensayos de citotoxicidad con PPNJROAKIN

40

<u>Tipo de células</u>	<u>Línea celular</u>	<u>IC₅₀ (PFU/pocillo)</u>
Fibrosarcoma	HT1080	13,8
Carcinoma de cabeza y cuello	KB	2,4
Fibroblastos normales	CCD922sk	1,2 x 10 ⁴

45

50

Estos resultados (Tabla 21) muestran que PPNJROAKIN manifiesta efectuar una destrucción selectiva de tumor, de al menos dos tipos diferentes de células tumorales humanas (HT1080 y KB) en relación con la que manifiesta frente a fibroblastos de la piel normales. Los valores de IC₅₀ con respecto a las dos líneas de células tumorales son entre 800 y 5.000 veces más bajos que los correspondientes para las células normales.

55

Ejemplo 22

Sumario de los resultados de los ensayos de citotoxicidad con el virus PPCONN70726 de la enfermedad de Newcastle

60

Células tumorales y células normales humanas se hicieron crecer hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 80% en placas de 24 pocillos para cultivo de tejidos. El medio de crecimiento se extrajo y se añadió PPCONN70726, un clon purificado en placa de lisis, de la cepa mesogénica Connecticut 70726-1946 del virus de la enfermedad de Newcastle, en diluciones de razón 10 veces que variaban desde 10⁷ unidades formadoras de placa (PFU)/pocillo hasta 1 PFU/pocillo. En cada placa se incluyeron pocillos de control sin virus añadido. El virus se dejó adsorber durante 90 minutos sobre una plataforma oscilatoria a 37°C. Al final del período de incubación, las diluciones virales se extrajeron y se sustituyeron por 1 ml de medio de cultivo. Las placas se incubaron a continuación durante

65

ES 2 292 207 T3

5 días a 37°C, en CO₂ al 5%. Se cuantificó la citotoxicidad usando un ensayo colorimétrico con MTT (bromuro de 2-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio) (*Cell Titer* 96, n.º catálogo G4000, *Promega Corporation*, Madison WI 53711) con detección a 570 nm, que detecta actividad de enzimas mitocondriales (Mosman, T., 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55). La viabilidad de los pocillos tratados con virus se expresó en forma de un porcentaje de la actividad encontrada en los pocillos de control no tratados. Los datos se representaron gráficamente en forma de PFU/pocillo frente a la viabilidad expresada como un porcentaje del control. La IC₅₀ se calculó como la cantidad de virus expresada en PFU/pocillo que produce una reducción del 50% en la cantidad de células viables.

TABLA 22

Sumario de los resultados de los ensayos de citotoxicidad con PPCONN70726

<u>Tipo de células</u>	<u>Línea celular</u>	<u>IC₅₀ (PFU/pocillo)</u>
Carcinoma de cabeza y cuello	KB	18,1
Glioblastoma	U87MG	12,7
Glioblastoma	U373MG	879
Fibroblastos normales	CCD922sk	7,3 x 10 ⁴

Estos resultados (Tabla 22) muestran que PPCONN70726 manifiesta efectuar una destrucción selectiva de tumor, de al menos tres tipos diferentes de células tumorales humanas (KB, U87MG y U373MG) en relación con la que demuestra frente a fibroblastos de la piel normales. Los valores de IC₅₀ con respecto a las dos líneas de células tumorales son entre 80 y 5.000 veces más bajos que los correspondientes para las células normales.

Ejemplo 23

Tratamiento intratumoral de xenotrasplantes del fibrosarcoma HT1080 en ratones atímicos usando PPMK107, PPNJROAKIN o PPCONN70726

En este experimento, los ratones atímicos (hembras, NCR nu/nu, de 5 a 6 semanas de edad) recibieron una inyección subcutánea de 10⁷ células tumorales HT1080. Cuatro días más tarde, cuando los tumores alcanzaron un intervalo de tamaños de 6 mm a 8,5 mm, los ratones recibieron un tratamiento intraperitoneal con disolución salina, con PPMK107 (a 1 x 10⁸ PFU), PPNJROAKIN (a 1 x 10⁸ PFU) o PPCONN70726 (a 1 x 10⁸ PFU). Como se muestra en la Tabla 23, se percibió una regresión de los tumores en los ratones tratados con estos tres virus (PPMK107, PPNJROAKIN y PPCONN70726). Después de tratar a 12 ratones con PPMK107, cuatro ratones experimentaron la regresión completa del tumor y seis ratones experimentaron una regresión parcial. Después de tratar a 12 ratones con PPNJROAKIN, un ratón experimentó la regresión completa del tumor y dos ratones experimentaron una regresión parcial. Después de tratar a 12 ratones con PPCONN70726, tres ratones experimentaron la regresión completa del tumor y dos ratones experimentaron una regresión parcial. No se percibió ninguna regresión de los tumores en ninguno de los animales tratados con disolución salina. Estos resultados muestran que las tres cepas mesogénicas de NDV son capaces de producir la regresión de los tumores.

TABLA 23

Regresión de tumores de fibrosarcoma HT1080 en ratones atímicos después de un tratamiento con uno de los tres virus (PPMK107, PPNJROAKIN y PPCONN70726), cada uno de ellos a una dosis de 1 x 10⁸ PFU

Tratamiento	Núm. ratones	Regresión		
		Parcial (PR)	Completa (CR)	PR + CR (%)
PPMK107	12	6	4	10 (83%)
PPNJROAKIN	12	2	1	3 (25%)
PPCONN70726	12	2	3	5 (42%)
Disolución salina	11	0	0	0 (0%)

ES 2 292 207 T3

Ejemplo 24

Efectos de PPMK107, PPNJROAKIN, PPCONN70726 después de su inyección intracerebral en ratones atímicos (nu/nu) inmunodeficientes y en ratones heterocigotos (nu/+) inmunocompetentes

5 A 56 ratones atímicos (nu/nu) y a 56 ratones heterocigotos (nu/+) inmunocompetentes se les administraron inyecciones intracerebrales estereotácticas de disolución salina, PPMK107, PPNJROAKIN o PPCONN70726. Ocho ratones adicionales de cada uno de los tipos se usaron como controles no tratados. Los virus se usaron a uno de estos dos niveles de dosis (2×10^4 PFU/ratón o $3,5 \times 10^6$ PFU/ratón). Como se muestra en la Tabla 24, todos los ratones heterocigotos nu/+ tratados con cada uno de los tres virus, a esos dos niveles de dosis, sobrevivieron hasta el día 39 a excepción de uno de los ratones tratado con el nivel más bajo de dosis de PPCONN70726, que fue sacrificado con eutanasia por presentar síntomas no neurológicos. Los animales atímicos nu/nu tratados con PPMK107 o con PPCONN70726 presentaron una supervivencia significativamente menor que los heterocigotos. Esto se cumplió especialmente en el caso de la dosis más alta de $3,5 \times 10^6$ PFU/ratón, de los virus PPMK107 o PPCONN70726, en el que solamente el 13% (1 de cada 8) de los animales atímicos de cada uno de los grupos de virus sobrevivió hasta el día 39. Por contraste, se produjo una supervivencia del 75% de los ratones atímicos tratados con PPNJROAKIN a este mismo nivel de dosis ($3,5 \times 10^6$ (PFU/ratón)). Estos datos indican que PPNJROAKIN se tolera mejor en los cerebros de los ratones atímicos que las otras dos cepas de virus.

TABLA 24

Supervivencia de los ratones después de la inyección intracerebral de PPMK107, PPCONN70726 y PPNJROAKIN

	Inyección intracraneal	Núm. de ratones	% de supervivencia en el día 39
nu/+	No tratados	8	100
nu/+	Disolución salina	8	100
nu/+	PPMK107, $2E+04$	8	100
nu/+	PPMK107, $3,5E+06$	8	100
nu/+	PPCONN70726, $2E+04$	8	88*
nu/+	PPCONN70726, $3,5E+06$	8	100
nu/+	PPNJROAKIN, $2E+04$	8	100
nu/+	PPNJROAKIN, $3,5E+06$	8	100
nu/nu	No tratados	8	100
nu/nu	Disolución salina	8	100
nu/nu	PPMK107, $2E+04$	8	75
nu/nu	PPMK107, $3,5E+06$	8	13
nu/nu	PPCONN70726, $2E+04$	8	75
nu/nu	PPCONN70726, $3,5E+06$	8	13
nu/nu	PPNJROAKIN, $2E+04$	8	100
nu/nu	PPNJROAKIN, $3,5E+06$	8	75

* El único ratón no superviviente en este grupo de tratamiento se sacrificó con eutanasia por presentar síntomas no neurológicos.

Ejemplo 25

Sumario de los resultados de los ensayos de citotoxicidad con el virus Sindbis PPSINDBIS-Ar339

5 Células tumorales y células normales humanas se hicieron crecer hasta alcanzar una confluencia de aproximadamente el 80% en placas de 24 pocillos para cultivo de tejidos. El medio de crecimiento se extrajo y se añadió el PPSINDBIS Ar-339, en diluciones de razón 10 veces que variaban desde 10^7 unidades formadoras de placa (PFU)/pocillo hasta 1 PFU/pocillo. En cada placa se incluyeron pocillos de control sin virus añadido. El virus se dejó adsorber durante 90 minutos sobre una plataforma oscilatoria a 37°C. Al final del período de incubación, las diluciones virales se extrajeron y se sustituyeron por 1 ml de medio de cultivo. Las placas se incubaron a continuación durante 5 días a 37°C, en CO₂ al 5%. Se cuantificó la citotoxicidad usando un ensayo colorimétrico con MTT (bromuro de 2-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio) (*Cell Titer* 96, n.º catálogo G4000, *Promega Corporation*, Madison WI 53711) con detección a 570 nm, que detecta actividad de enzimas mitocondriales (Mosman, T., 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55). La viabilidad de los pocillos tratados con virus se expresó en forma de un porcentaje de la actividad encontrada en los pocillos de control no tratados. Los datos se representaron gráficamente en forma de PFU/pocillo frente a la viabilidad expresada como un porcentaje del control. La IC₅₀ se calculó como la cantidad de virus expresada en PFU/pocillo que produce una reducción del 50% en la cantidad de células viables.

20

TABLA 25

Sumario de los resultados de los ensayos de citotoxicidad con PPSINDBIS-Ar339

25

<u>Tipo de células</u>	<u>Línea celular</u>	<u>IC₅₀ (PFU/pocillo)</u>
Carcinoma pancreático	Panc-1*	69
Carcinoma colorrectal	SW620*	13
Carcinoma colorrectal	SW1463	$1,8 \times 10^5$
Carcinoma pulmonar de células no pequeñas	A427	$> 1 \times 10^6$
Carcinoma pulmonar de células no pequeñas	A549	$5,2 \times 10^4$
Carcinoma renal	A498	$2,4 \times 10^4$
Carcinoma renal	Caki-1	$3,4 \times 10^4$
Fibrosarcoma	HT1080	$7,4 \times 10^5$
Queratinocitos normales	NHEK	$2,0 \times 10^5$
Fibroblastos normales	CCD922sk	$1,6 \times 10^5$

35

50

* Células que se sabe que sobreexpresan el mRNA del receptor de alta afinidad para laminina

55

60

El receptor celular para el virus Sindbis en células de mamífero es el receptor de alta afinidad para laminina, que se expresa principalmente en células del linaje epitelial, pero que frecuentemente es sobreexpresado en muchas células de cánceres metastásicos, como la línea Panc-1 de carcinoma pancreático y la línea celular SW620 de adenocarcinoma de colon (Campo y col., 1992, *Am. J. Pathol.* 141:1073-1083; Yow y col., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 6394-6398). Por el contrario, la línea celular SW1423 de adenocarcinoma de recto se sabe que expresa niveles muy bajos del mRNA del receptor de alta afinidad para laminina (Yow y col., (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 6394-6398) y es en más de 4 órdenes de magnitud más resistente a ser destruida por el PPSINDBIS-Ar339 que las células SW620. Estos resultados (Tabla 25) demuestran que las células que son tumorigénicas y que expresan niveles altos del receptor de alta afinidad para laminina son más sensibles a ser destruidas por el Clon PPSINDBIS-Ar339 del virus Sindbis que otras células tumorales o normales.

65

Ejemplo 26

Destrucción de células tumorigénicas y no tumorigénicas por acción del VSV en presencia de Interferón

5 En placas de 96 pocillos se sembraron células KB y células HT1080 tumorigénicas (3×10^3 células por pocillo) y células WISH no tumorigénicas ($2,5 \times 10^4$ células/pocillo) en presencia de interferón- α diluido de manera seriada en el intervalo desde 2.800 Unidades/ml hasta 22 Unidades/ml y se dejaron incubar 24 horas a 37°C. Las células se infectaron luego con el virus de la estomatitis vesicular (VSV, del inglés, “*Vesicular Stomatitis Virus*”, cepa Indiana) a una m.o.i. de 10. Se incluyeron controles de células sin interferón y de células sin interferón ni virus. Las células se
10 incubaron a 37°C durante 24 horas. La citotoxicidad se cuantificó usando un ensayo colorimétrico con MTT (bromuro de 2-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio) (*Cell Titer 96*, n.º catálogo G4000, *Promega Corporation*, Madison WI 53711) con detección a 570 nm, que detecta actividad de enzimas mitocondriales (Mosman, T., 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55). La viabilidad de los pocillos tratados con el virus se expresó en forma de un porcentaje de la actividad encontrada en los pocillos de control que no habían recibido virus.

TABLA 26

20 *Comparación de la actividad de destrucción celular de VSV en células tratadas con Interferón exógeno*

	Porcentaje de células viables		
	WISH	HT1080	KB
IFN, 100 U/ml	50	6	0
IFN, 1.000 U/ml	95	20	12

30 Estos resultados (Tabla 26) demuestran que VSV es capaz de destruir de manera selectiva a células tumorales deficientes en su capacidad de respuesta al interferón (véase el Ejemplo 27). Las células (células humanas de amnios) son una línea celular establecida, de uso en los bioensayos de interferón por su capacidad para responder eficientemente a interferones.

Ejemplo 27

Capacidad de respuesta a Interferón de células sensibles o de células resistentes a la destrucción por PPMK107

40 Líneas celulares individuales se hicieron crecer hasta casi alcanzar la confluencia en placas de microtitulación de 96 pocillos y se trataron con IFN α A entre 5 U/ml y 5.000 U/ml durante 24 horas. Los cultivos se infectaron luego con PPMK107 a una m.o.i. de 1,0 y se cultivaron durante 24 horas adicionales. Después de una fijación química, la cantidad de expresión del virus se cuantificó mediante inmunohistoquímica usando un colorante indicador soluble.
45 La cantidad de crecimiento del virus se representa en forma de porcentaje de antígeno P expresado en relación con las células de control no tratadas con interferón (Figura 5). En este ensayo, las células que responden a interferón manifiestan al menos una disminución del 50% en el antígeno viral en respuesta a interferón. En la Figura 5 las células que son sensibles a PPMK107 están indicadas por las líneas continuas; las células menos sensibles están indicadas por las líneas discontinuas.

50 Los resultados de este experimento muestran una fuerte correlación entre la resistencia de la línea celular a los efectos antivirales del interferón exógeno y la sensibilidad relativa de la célula a ser destruida por PPMK107 (indicada por el valor de IC50 mostrado entre paréntesis al lado del nombre de la línea celular en la leyenda de la gráfica, véase la Figura 5). Por ejemplo, después de un pretratamiento con una cantidad de interferón de 5 U/ml, 6 de 7 (el 86%) de las
55 líneas celulares que no responden a interferón, son sensibles a la destrucción por acción de PPMK107; cuando fueron pretratadas con una dosis de 500 U/ml de interferón, todas las líneas celulares (4 de 4) que no responden a interferón, son sensibles a la destrucción por acción de PPMK107. Los anteriores datos también representan un ejemplo de un ensayo de escrutinio para identificar células candidatas que es probable que sean sensibles a la destrucción por acción de PPMK107 o de otros virus sensibles a interferón. Por ejemplo, las células infectadas que expresan antígeno viral en cantidad importante (p. ej., más que el 50% de los controles) después del pretratamiento con interferón exógeno, se
60 considerarían deficientes en relación con interferón y por lo tanto sensibles a una oncólisis viral.

65 Lo expuesto en lo que antecede tiene la intencionalidad de ser ilustrativo de la presente invención, pero no limitativo. Se pueden efectuar numerosas variaciones y modificaciones sin que se aparten del auténtico alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un virus clonal con RNA, competente en replicación y sensible a interferón, para la fabricación de un medicamento para tratar un neoplasma en un mamífero.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho virus con RNA se replica al menos 100 veces menos en presencia de interferón que en ausencia de interferón.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho medicamento es una formulación sistémica.
4. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho neoplasma es un cáncer.
5. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho mamífero es un ser humano.
- 15 6. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho virus clonal se purifica en placa de lisis.
7. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho virus clonal es de origen clonal recombinante.
- 20 8. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho virus con RNA es un *Paramyxovirus*.
9. Uso según la reivindicación 8, en el que dicho *Paramyxovirus* se purifica hasta un nivel de al menos 2×10^9 PFU por mg de proteína; preferiblemente hasta un nivel de al menos 1×10^{10} PFU por mg de proteína; más preferiblemente hasta un nivel de al menos 6×10^{10} PFU por mg de proteína.
- 25 10. Uso según la reivindicación 8, en el que dicho *Paramyxovirus* se purifica hasta un nivel en el que la proporción de partículas por PFU es no mayor que 5; preferiblemente hasta un nivel en el que la proporción de partículas por PFU es no mayor que 3; más preferiblemente hasta un nivel en el que la proporción de partículas por PFU es no mayor que 1,2.
- 30 11. Uso según la reivindicación 8, en el que dicho *Paramyxovirus* se selecciona entre el grupo que consiste en un *Paramyxovirus* aviar de tipo 2, NDV, virus de la parotiditis y virus paragripal humano.
12. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho neoplasma es un cáncer seleccionado entre el grupo que consiste en cáncer de pulmón, colón, próstata, mama y cerebro.
- 35 13. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho neoplasma es un tumor sólido.
14. Uso según la reivindicación 12, en el que dicho cáncer de cerebro es un glioblastoma.
- 40 15. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho virus contiene un gen que codifica interferón para permitir la expresión viral de interferón, o un gen que codifica una enzima que activa un profármaco.
16. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es adecuado para administrar en combinación con IFN, el cual se administra antes, durante o después de la administración de dicho medicamento.
- 45 17. Uso según la reivindicación 16, en el que dicho interferón se selecciona entre el grupo que consiste en α -IFN, β -IFN, ω -IFN, γ -IFN y formas consenso sintéticas de IFN.
- 50 18. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es adecuado para administrar en combinación con un inhibidor de tirosina-quinasa, el cual se administra antes, durante o después de la administración de dicho medicamento.
19. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es adecuado para administrar en combinación con un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en un análogo nucleosídico de purina, un inhibidor de tirosina-quinasa, cimetidina y un inhibidor mitocondrial.
- 55 20. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es adecuado para administrar en combinación con un agente quimioterapéutico que se administra antes, durante o después de la administración de dicho medicamento.
- 60 21. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es adecuado para administrar en combinación con una citoquina o un inmunosupresor que se administra antes, durante o después de la administración de dicho virus.
22. Uso según la reivindicación 1, en el que el medicamento es adecuado para administrar en combinación con una cantidad que controla la replicación viral, de un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en IFN, ribavirina, aciclovir y ganciclovir.
- 65 23. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho medicamento es una formulación intravenosa o intratumoral.

ES 2 292 207 T3

24. Uso de un virus clonal, sensible a interferón, seleccionado entre el grupo que consiste en (1) virus con RNA; (2) *Hepadnavirus*; (3) *Parvovirus*; (4) *Papovavirus*; (5) *Poxivirus*; y (6) *Iridovirus*, en la fabricación de un medicamento para tratar un neoplasma de al menos 1 cm de tamaño, en un mamífero.
- 5 25. Uso según la reivindicación 24, en el que dicho neoplasma tiene al menos 300 mm³ de volumen.
26. Uso según la reivindicación 24, en el que dicho virus con RNA en un *Paramyxovirus*, preferiblemente NDV.
27. Uso según la reivindicación 24, en el que dicho mamífero es un ser humano.
- 10 28. Uso según la reivindicación 24, en el que dicho medicamento es una formulación intravenosa o intratumoral.
29. Uso según la reivindicación 24, en el que dicho *Paramyxovirus* se purifica hasta un nivel de al menos 2 x 10⁹ PFU por mg de proteína.
- 15 30. Uso según la reivindicación 26, en el que dicho NDV es mesogénico.
31. Uso según la reivindicación 24, en el que dicho neoplasma es canceroso.
- 20 32. Uso de una cantidad terapéuticamente efectiva de un virus clonal con RNA, sensible a interferón, en la fabricación de un medicamento para tratar un tumor en un mamífero, en el que dicho virus es citocida para dicho tumor y en el que dicho mamífero posee una carga tumoral que comprende al menos el 1,5% del peso corporal total de dicho mamífero.
- 25 33. Uso según la reivindicación 32, en el que dicho tumor no responde a quimioterapia.
34. Uso según la reivindicación 1, en el que dicho virus se selecciona entre el grupo que consiste en la cepa MK107 del virus de la enfermedad de Newcastle, la cepa NJ Roakin del virus de la enfermedad de Newcastle, el virus Sindbis y el virus de la estomatitis vesicular.
- 30 35. Uso de un virus clonal, sensible a interferón, seleccionado entre el grupo que consiste en la cepa MK107 del virus de la enfermedad de Newcastle, la cepa NJ Roakin del virus de la enfermedad de Newcastle, el virus Sindbis y el virus de la estomatitis vesicular, para la fabricación de un medicamento para tratar un neoplasma en un mamífero.
- 35 36. Uso según la reivindicación 1, en el que el tratamiento comprende administrar dicho medicamento en más de una única dosis.
37. Uso según la reivindicación 36, en el que la primera dosis es una dosis desensibilizante.
- 40 38. Uso según la reivindicación 37, en el que dicha primera dosis se administra por vía intravenosa y una dosis posterior se administra por vía intravenosa.
39. Uso según la reivindicación 37, en el que dicha primera dosis se administra por vía intravenosa y una dosis posterior se administra por vía intraperitoneal.
- 45 40. Uso según la reivindicación 37, en el que dicha primera dosis se administra por vía intravenosa y una dosis posterior se administra por vía intra-arterial.
41. Uso de un virus clonal competente en replicación y sensible a interferón, que se une a un receptor presente en un mamífero, para la fabricación de un medicamento para tratar un neoplasma en un mamífero, en el que el tratamiento comprende además someter una muestra procedente de dicho mamífero a un inmunoensayo para detectar la presencia del receptor del virus.
- 50 42. Uso según la reivindicación 1, en el que el tratamiento comprende la administración del medicamento durante el transcurso de al menos 4 minutos.
- 55
- 60
- 65

Fig. 1

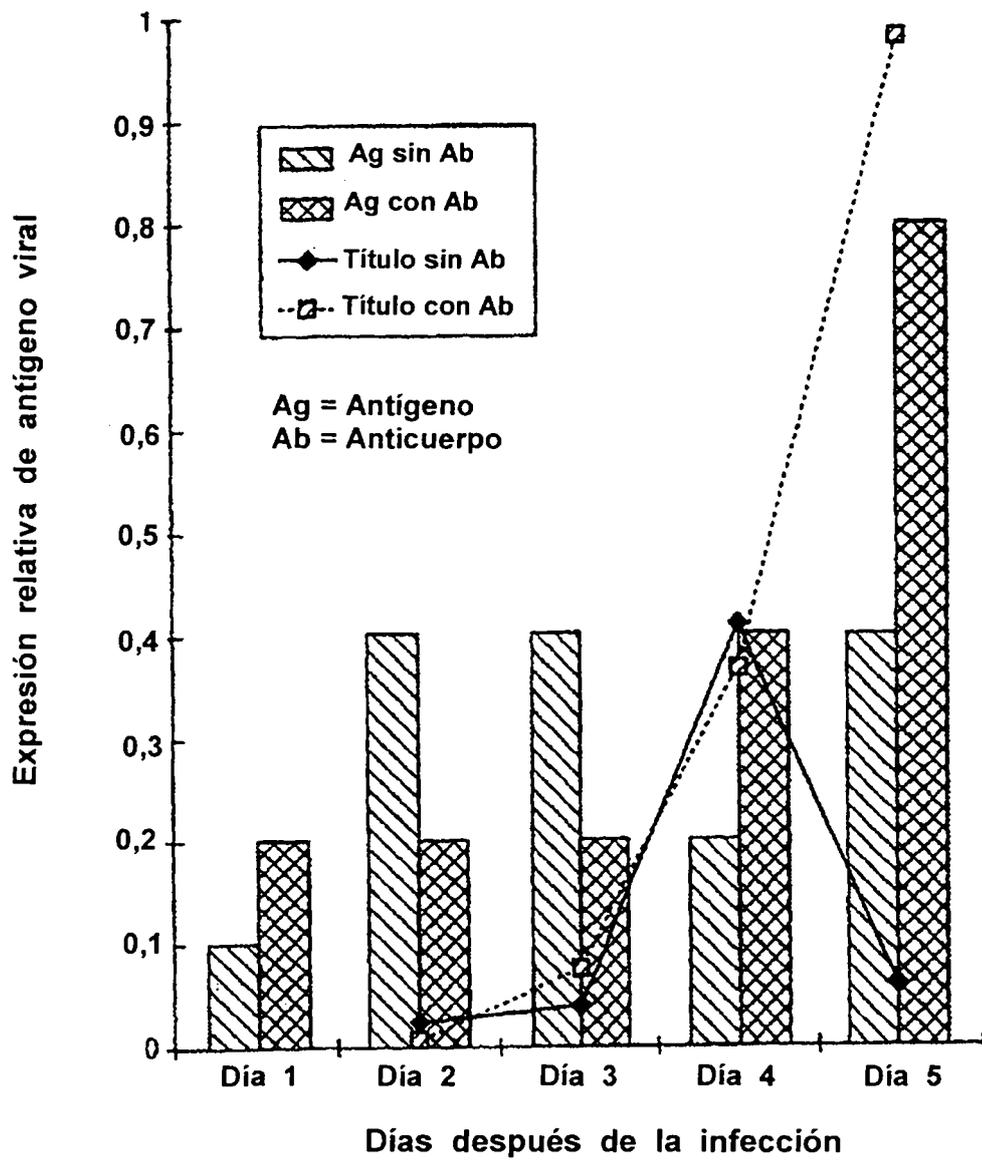


Fig. 2

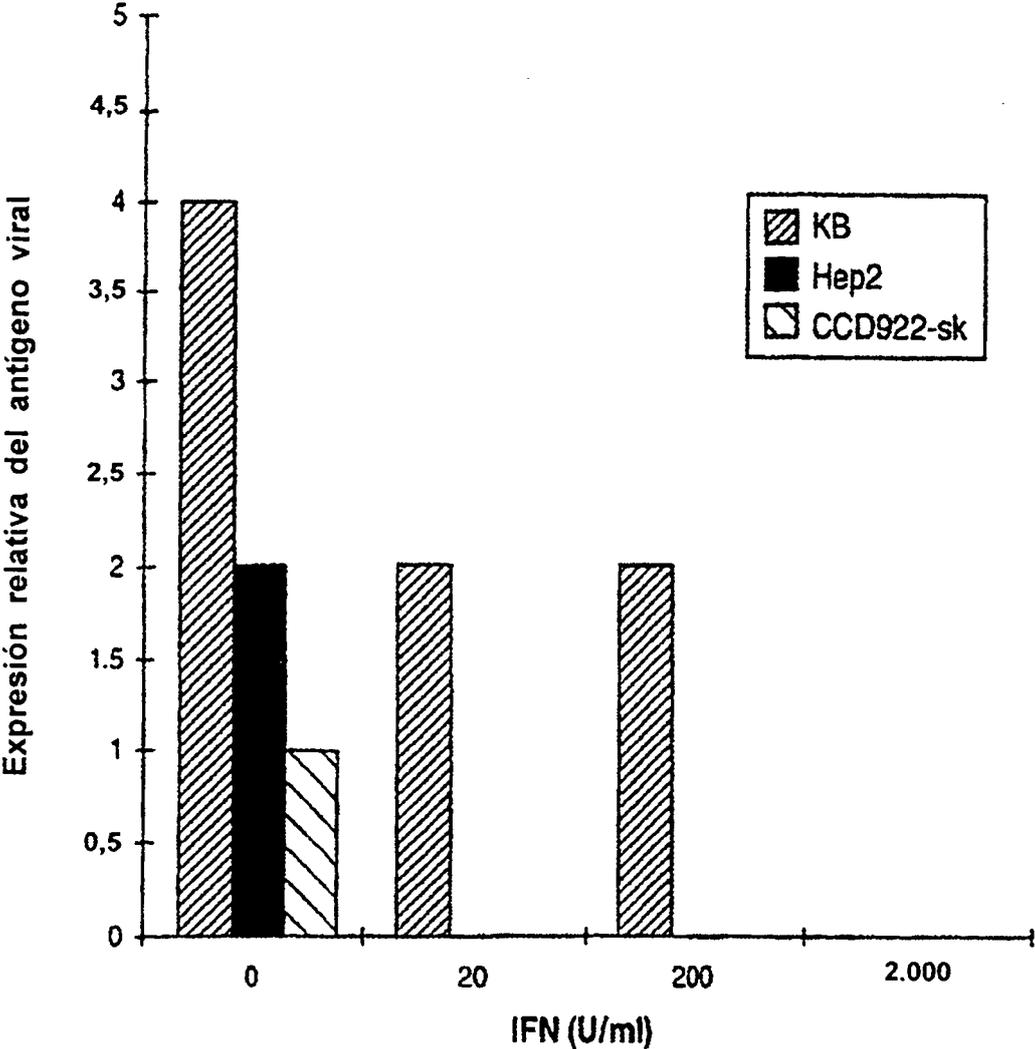


Fig. 3

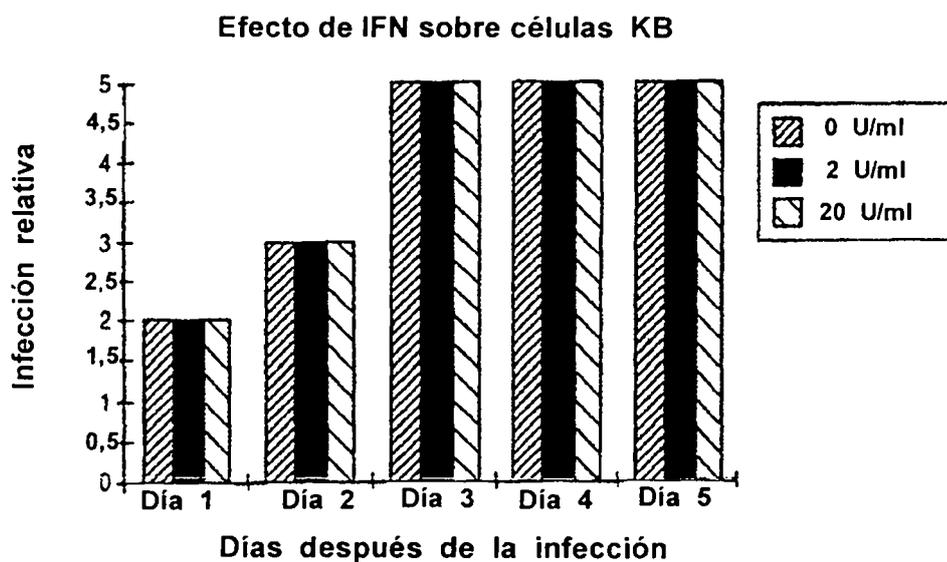
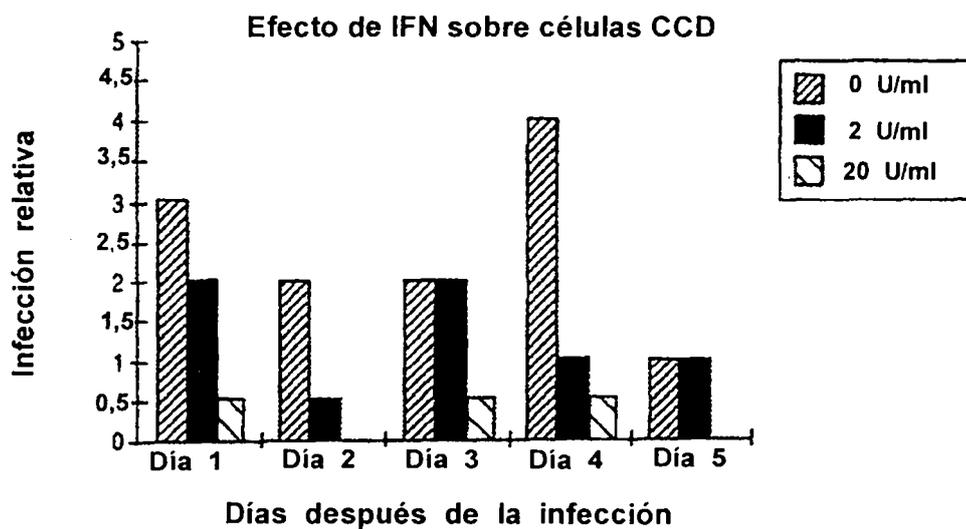


Fig. 4

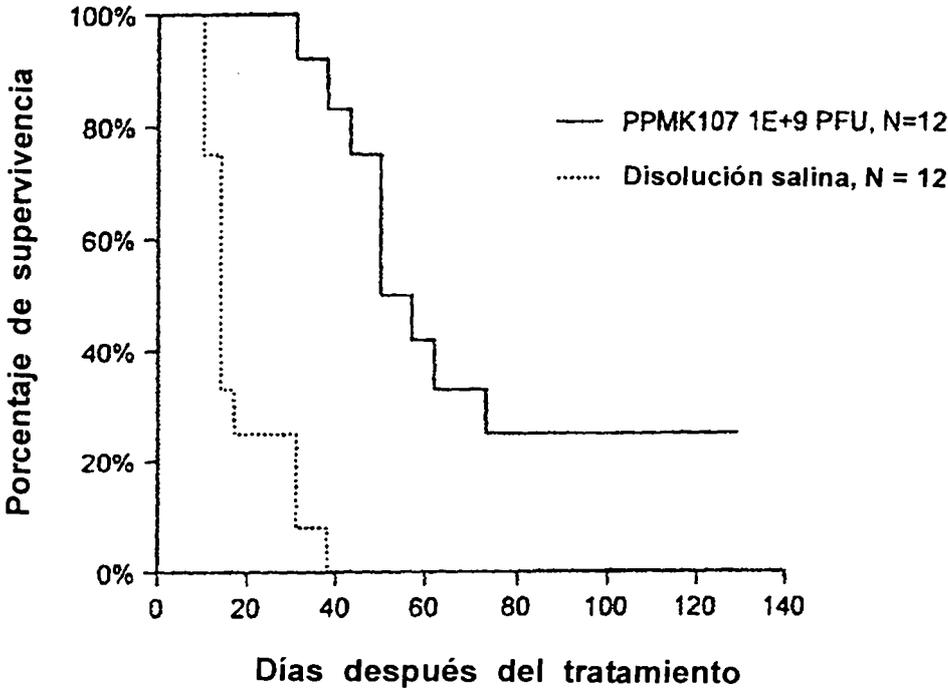


Fig. 5

Efecto antiviral de IFN en diferentes líneas celulares

