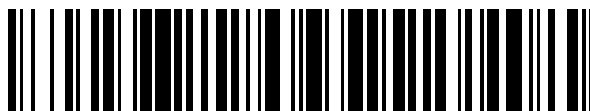


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 950**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)
A61K 35/765 (2015.01)
A61K 35/768 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/555 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2014 PCT/CA2014/000806**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.05.2015 WO15070323**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2014 E 14861625 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3068411**

54 Título: **Virus oncolíticos y regímenes reforzados para tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

15.11.2013 US 201361904783 P

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

30.11.2020

73 Titular/es:

**ONCOLYTICS BIOTECH INC. (100.0%)
Suite 210 1167 Kensington Crescent N. W.
Calgary, AB T2N 1X7, CA**

72 Inventor/es:

**COFFEY, MATTHEW C. y
THOMPSON, BRADLEY G.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 796 950 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

Virus oncolíticos y regímenes reforzados para tratamiento de cáncer

Campo técnico

Antecedentes de la invención

- 5 El cáncer es una de las principales causas de muerte. Aunque ha sido el foco de la investigación médica durante un largo período de tiempo, las principales terapias contra el cáncer hasta la fecha son la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Cada una de estas terapias está sujeta a limitaciones que incluyen, por ejemplo, los diferentes efectos de la misma terapia para sujetos con tipos similares de cáncer.

Breve resumen de la divulgación

- 10 La invención se define en y por las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación proporciona en el presente documento un método para tratar el cáncer en un sujeto. El método incluye administrar al sujeto un virus oncolítico y un régimen reforzado de tratamiento de un agente quimioterapéutico, en el que la administración trata el cáncer en el sujeto. También se proporciona un kit que incluye un virus oncolítico y un agente quimioterapéutico, en el que el agente quimioterapéutico comprende una cantidad para un régimen reforzado de tratamiento de un agente quimioterapéutico.
- 15 Un régimen reforzado de tratamiento se incrementa en cantidad (dosis, frecuencia o duración) en comparación con la terapia estándar.

Los detalles de una o más realizaciones se exponen en la divulgación adjunta a continuación. Otras características, objetivos y ventajas serán evidentes a partir de la divulgación y de las reivindicaciones.

Descripción detallada de la divulgación

- 20 La presente divulgación proporciona en el presente documento un método para tratar el cáncer en un sujeto. El método incluye administrar al sujeto un virus oncolítico y un régimen reforzado de tratamiento de un agente quimioterapéutico en comparación con la terapia estándar, en la que la administración trata el cáncer en el sujeto. Notablemente, el tratamiento es efectivo a pesar de la desviación de la terapia estándar. En los métodos proporcionados, la administración de un régimen reforzado de tratamiento de un agente quimioterapéutico es permisible al menos en parte debido a la reducción o prevención de la toxicidad (por ejemplo, neurotoxicidad) generalmente asociada con la quimioterapia como resultado de la administración de los virus oncolíticos.
- 25

- Opcionalmente, el régimen reforzado de tratamiento comprende un mayor número de dosis por ciclo de tratamiento del agente quimioterapéutico en comparación con la terapia estándar o comprende una cantidad incrementada por dosis del agente quimioterapéutico en comparación con la terapia estándar. Opcionalmente, el régimen reforzado de tratamiento comprende una cantidad incrementada por dosis y un mayor número de dosis del agente quimioterapéutico en comparación con la terapia estándar. Opcionalmente, el régimen reforzado de tratamiento comprende un mayor número de ciclos de tratamiento con el agente quimioterapéutico en comparación con la terapia estándar. Opcionalmente, el mayor número de ciclos de tratamiento comprende más de cuatro ciclos de tratamiento con el agente quimioterapéutico. Opcionalmente, el mayor número de ciclos de tratamiento comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más ciclos de tratamiento con el agente quimioterapéutico. Las reivindicaciones adjuntas especifican que el virus oncolítico se usa en un método que comprende administrar al sujeto un mayor número de ciclos de tratamiento con un agente quimioterapéutico en comparación con la terapia estándar, en el que el mayor número de ciclos de tratamiento comprende 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más ciclos de tratamiento con el agente quimioterapéutico.
- 30
- 35

- 40 Como se usa en el presente documento, el término "quimioterapia" se refiere al tratamiento del cáncer con uno o más agentes citotóxicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos) de acuerdo con un régimen de tratamiento. Como se usa en este documento, un régimen de tratamiento se refiere a un protocolo bajo el cual se administra quimioterapia a un sujeto para el tratamiento de la enfermedad. El término "régimen de tratamiento de inducción" se refiere a un régimen de quimioterapia utilizado para el tratamiento inicial de una enfermedad, mientras que un "régimen de tratamiento de mantenimiento" se refiere al uso continuo de quimioterapia para reducir las posibilidades de un nuevo cáncer o la prevención del crecimiento continuo del cáncer. Como se usa en el presente documento, los agentes quimioterapéuticos incluyen sustancias naturales, semisintéticas o sintéticas que funcionan a través de un mecanismo citotóxico para provocar apoptosis o muerte celular. Un régimen de tratamiento quimioterapéutico puede incluir la administración a un sujeto de un agente quimioterapéutico o una combinación de agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antraciclinas, taxanos, epotilonas, inhibidores de histona desacetilasa, inhibidores de Topoisomerasa I, inhibidores de Topoisomerasa II, inhibidores de quinasa, anticuerpos monoclonales, análogos de nucleótidos y análogos precursores, antibióticos peptídicos, compuestos a base de platino, retinoides y alcaloides y derivados de la vinca.
- 45
- 50

- 55 Como se usa en el presente documento, "terapia estándar" o "régimen de tratamiento estándar" se refiere al estándar de atención utilizado (por ejemplo, por un médico en ejercicio) para el tratamiento de una enfermedad, por ejemplo, cáncer. A modo de ejemplo, un régimen de tratamiento estándar o terapia estándar para un agente particular, por

ejemplo, un agente X, puede ser que el agente se administre para cada ciclo de tratamiento a una dosis de 10 mg/kg una vez por semana y hasta cuatro ciclos de tratamiento se administran con los ciclos de tratamiento en semanas consecutivas o no consecutivas. Alternativamente, un régimen de tratamiento estándar puede ser la administración del agente X a una dosis de 10 mg/kg una vez por semana durante cuatro semanas y se pueden administrar hasta seis ciclos de tratamiento. Por lo tanto, el agente X se puede administrar durante cuatro semanas a la dosis de 10 mg/kg una vez por semana hasta seis veces y los ciclos de tratamiento se pueden administrar de forma consecutiva o no consecutiva. El tiempo entre ciclos de tratamiento puede variar y puede ser de una o más horas, uno o más días, una o más semanas o uno o más meses. Los regímenes de tratamiento particulares o la terapia estándar para un medicamento en particular, por ejemplo, un agente quimioterapéutico variarán. Por ejemplo, el régimen de tratamiento estándar o la terapia estándar pueden variar según la etapa del cáncer que se está tratando, la clase de paciente que se está tratando, si el paciente ha sido tratado previamente con una terapia contra el cáncer y similares. La terapia estándar para un agente quimioterapéutico en particular se puede encontrar en las pautas de información de prescripción para ese agente quimioterapéutico según lo aprobado por la Administración Federal de Medicamentos (FDA) u otra autoridad reguladora, por ejemplo, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), Health Canada, y similares. Las terapias estándar para un cáncer dado también se pueden encontrar en http://www.clinicalpharmacology-ip.com/help/find_and_list/lists/combo_chemo_regimens_list.htm. Por lo tanto, por ejemplo, un régimen reforzado de tratamiento de un agente quimioterapéutico es un aumento sobre la cantidad o dosis administrada, la cantidad de veces que se administra el agente por ciclo de tratamiento y/o la cantidad de ciclos de tratamiento administrados como se establece en la información de prescripción para un agente quimioterapéutico particular o una combinación de agentes quimioterapéuticos.

Como se usa en el presente documento, la frase "régimen reforzado de tratamiento" se refiere a un régimen de tratamiento o curso prescrito de tratamiento médico que se incrementa en comparación con el régimen de tratamiento o curso prescrito de tratamiento médico administrado bajo terapia estándar o regímenes de tratamiento estándar. Por lo tanto, un régimen reforzado de tratamiento en comparación con la terapia estándar o un régimen de tratamiento estándar se refiere a un aumento de la dosis, un aumento en el número de veces que se prescribe o administra una dosis o un agente o un aumento en el número de ciclos de tratamiento que se prescribe o administra un agente. Opcionalmente, la terapia estándar incluye una reducción en la cantidad (por ejemplo, dosis) o frecuencia de un agente que se prescribe o administra, por ejemplo, debido a la presencia o al aumento de uno o más efectos secundarios adversos como la toxicidad (por ejemplo, neurotoxicidad). Por lo tanto, un régimen reforzado de tratamiento incluye un régimen que no implica reducción en la cantidad o frecuencia de un agente que se prescribe o administra, por ejemplo, debido a la ausencia o falta de aumento en uno o más efectos secundarios adversos típicamente observados durante la administración del agente. A modo de ejemplo, la terapia estándar para un sujeto con cáncer de pulmón de células no pequeñas que usa una combinación de carboplatino y paclitaxel es paclitaxel administrado como una infusión intravenosa de 3 horas a una dosis de 200 mg/m² y luego carboplatino administrado como una infusión intravenosa de 30 minutos a una dosis calculada por la fórmula de Calvert (AUC 6 mg/mL/minuto con GFR medido por EDTA con ⁵¹Cr) en el día 1 de un ciclo de 21 días. Este ciclo se repite cada 21 días para un total de hasta cuatro ciclos de tratamiento. Sin embargo, la terapia estándar para un sujeto con cáncer de pulmón de células no pequeñas que usa una combinación de carboplatino y paclitaxel que responde al tratamiento de cuatro ciclos es de hasta seis ciclos de tratamiento. Por lo tanto, en los métodos proporcionados, se administra una combinación de carboplatino y paclitaxel como un régimen reforzado de tratamiento si se administran más de cuatro o más de seis ciclos de tratamiento y/o si se administra uno o ambos de carboplatino o paclitaxel a una dosis superior a AUC 6 mg/mL o superior a 200 mg/m², respectivamente, y/o si se administra uno o ambos de carboplatino o paclitaxel más de una vez en un ciclo de tratamiento.

Como se usa en este documento, el término "cáncer" se refiere a todos los tipos de cáncer, trastornos proliferativos, neoplasia o tumores malignos que se encuentran en mamíferos, incluidos linfomas, leucemias, blastomas, tumores de células germinales, carcinomas y sarcomas. Los ejemplos de cánceres incluyen cáncer de cerebro, mama, cuello uterino, colon, cabeza y cuello, hígado, riñón, pulmón, pulmón de células no pequeñas, melanoma, mesotelioma, ovario, sarcoma, estómago, útero y meduloblastoma. Opcionalmente, el cáncer es una neoplasia. Opcionalmente, el cáncer es cáncer de cabeza y cuello. Opcionalmente, el cáncer es cáncer de pulmón, cáncer de hígado, linfoma, cáncer de páncreas, melanoma, cáncer de riñón o cáncer de ovario. Opcionalmente, como se analiza con más detalle a continuación, el cáncer se activa por ras.

Opcionalmente, el cáncer es metastásico. Como se usa en el presente documento, los términos "metástasis", "metastásico" y "cáncer metastásico" se pueden usar indistintamente y se refieren a la propagación de una enfermedad o trastorno proliferativo, por ejemplo, cáncer, de un órgano a otro órgano no adyacente o parte del cuerpo. El cáncer se produce en un sitio de origen, por ejemplo, mama, cuyo sitio se conoce como tumor primario, por ejemplo, cáncer de mama primario. Algunas células cancerosas en el tumor primario o en el sitio de origen adquieren la capacidad de penetrar e infiltrarse en el tejido normal circundante en el área local y/o la capacidad de penetrar las paredes del sistema linfático o sistema vascular que circula a través del sistema a otros sitios y tejidos en el cuerpo. Un segundo tumor clínicamente detectable formado a partir de células cancerosas de un tumor primario se denomina tumor metastásico o secundario. Cuando las células cancerosas hacen metástasis, se presume que el tumor metastásico y sus células son similares a los del tumor original. Por lo tanto, si el cáncer de pulmón hace metástasis en la mama, el tumor secundario en el sitio de la mama consiste en células pulmonares anormales y no en células mamarias anormales. El tumor secundario en la mama se refiere a un cáncer de pulmón metastásico. Por lo tanto, la frase cáncer

metastásico se refiere a una enfermedad en la cual un sujeto tiene o tuvo un tumor primario y tiene uno o más tumores secundarios. Las frases cáncer no metastásico o sujetos con cáncer que no es metastásico se refieren a enfermedades en las que los sujetos tienen un tumor primario pero no uno o más tumores secundarios. Por ejemplo, el cáncer de pulmón metastásico se refiere a una enfermedad en un sujeto con o con antecedentes de un tumor pulmonar primario y con uno o más tumores secundarios en una segunda ubicación o múltiples ubicaciones, por ejemplo, en la mama.

Los virus oncolíticos que se usan en los métodos y kits provistos incluyen, pero no se limitan a, virus oncolíticos que son miembros de la familia de myoviridae, siphoviridae, podpviridae, tecoviridae, corticoviridae, plasmaviridae, lipothrixviridae, fuselloviridae, poxyviridae, iridoviridae, phycodnaviridae, baculoviridae, herpesviridae, adnoviridae, papovaviridae, polydnviridae, inoviridae, microviridae, geminiviridae, circoviridae, parvoviridae, hepadnaviridae, retroviridae, cyctoviridae, reoviridae, birnaviridae, paramyxoviridae, rhabdoviridae, filoviridae, orthomyxoviridae, bunyaviridae, arenaviridae, leviviridae, picornaviridae, sequiviridae, comoviridae, potyviridae, calciviridae, astroviridae, nodaviridae, tetraviridae, tombusviridae, coronaviridae, glaviviridae, togaviridae, y barnaviridae. Los métodos proporcionados también abarcan los virus inmunoprotegidos y los virus reordenados o recombinantes de estos y otros virus oncolíticos. Por lo tanto, el virus oncolítico utilizado en los métodos proporcionados se selecciona, por ejemplo, del grupo que consiste en un reovirus, un virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), un virus de estomatitis vesicular (VSV), un adenovirus, un virus vaccinia, un virus orf parapoxvirus, un virus Sindbis y un virus del herpes simple. Además, también se puede emplear una combinación de al menos dos virus oncolíticos para practicar los métodos proporcionados. A continuación se analizan algunos virus oncolíticos, y una persona de habilidad ordinaria en la técnica puede practicar los presentes métodos usando virus oncolíticos adicionales también de acuerdo con la divulgación del presente documento y el conocimiento disponible en la técnica. Las reivindicaciones adjuntas especifican que el virus oncolítico es un reovirus con IDAC No. de acceso 190907-01.

En los cánceres para los que se usa el virus oncolítico como tratamiento, una o más de las células proliferantes asociadas con el cáncer pueden tener una mutación en la que se activa el gen ras (o un elemento de la vía de señalización de ras), ya sea directamente (por ejemplo, por una mutación activadora en ras) o indirectamente (por ejemplo, por activación de un elemento secuencia arriba o secuencia abajo en la vía de ras). La activación de un elemento secuencia arriba en la vía de ras incluye, por ejemplo, la transformación con receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o Sos. Véanse, por ejemplo, Wiessmuller y Wittinghofer, 1994, Cellular Signaling 6 (3): 247-267; y Barbacid, 1987, Ann. Rev. Biochem. 56, 779-827. La activación de un elemento secuencia abajo en la vía de ras incluye, por ejemplo, la mutación dentro de B-Raf. Véase, por ejemplo, Brose et al., 2002, Cancer Res. 62: 6997-7000. Un cáncer o trastorno proliferativo que resulta, al menos en parte, por la activación de ras, un elemento secuencia arriba de ras, o un elemento en la vía de señalización de ras se denomina en este documento un trastorno proliferativo o cáncer mediado por ras. Además, el virus oncolítico es útil para tratar trastornos proliferativos causados por mutaciones o desregulación de PKR. Véase, por ejemplo, Strong et al., 1998, EMBO J. 17: 3351-62. Normalmente, cuando un virus entra en una célula, se activa la ARN quinasa bicatenaria (PKR), bloqueando la síntesis de proteínas, y el virus no puede replicarse en esta célula. Algunos virus han desarrollado un sistema para inhibir la PKR y facilitar la síntesis de proteínas virales y la replicación viral. Por ejemplo, el adenovirus produce una gran cantidad de un ARN pequeño, ARN VA1. El ARN VA1 tiene estructuras secundarias extensas y se une a PKR en competencia con el ARN bicatenario (ARNbc) que normalmente activa PKR. Dado que se requiere una longitud mínima de ARNbc para activar PKR, ARN VA1 no activa PKR. En cambio, secuestra PKR en virtud de su gran cantidad. En consecuencia, la síntesis de proteínas no está bloqueada y el adenovirus puede replicarse en la célula.

Las células neoplásicas activadas por ras no están sujetas a la inhibición de la síntesis de proteínas por PKR porque ras inactiva PKR. Por lo tanto, estas células son susceptibles a la infección viral incluso si el virus no tiene un sistema inhibidor de PKR. En consecuencia, si los inhibidores de PKR en adenovirus, virus vaccinia, virus del herpes simple o virus orf parapoxvirus están mutados para no bloquear más la función de PKR, los virus resultantes no infectan las células normales debido a la inhibición de la síntesis de proteínas por PKR, pero se replican en células neoplásicas o cancerosas activadas por ras que carecen de actividad de PKR. A modo de ejemplo, los reovirus se replican selectivamente y lisan células neoplásicas o cancerosas activadas por ras.

Por consiguiente, un virus, que incluye virus modificados o mutados, que no inhiben la función de PKR, se replica selectivamente en células neoplásicas activadas por ras mientras que las células normales son resistentes. Opcionalmente, el virus oncolítico es un adenovirus mutado en la región VA1, un virus vaccinia mutado en la región K3L y/o E3L, un virus vaccinia mutado en el gen de timidina quinasa (TK), un virus vaccinia mutado en el gen del factor de crecimiento de vaccinia (VGF), un virus del herpes mutado en el gen γ 134.5, un virus orf parapoxvirus mutado en el gen OV20.0L, o un virus de influenza mutado en el gen NS-1.

Los virus vaccinia mutados en el gen de la timidina quinasa viral (TK) no pueden producir los nucleótidos necesarios para la replicación del ADN. En las células normales, los niveles de TK celular son generalmente muy bajos y el virus no puede replicarse. En los tumores, la pérdida del supresor tumoral Rb o un aumento en la actividad de la ciclina, conduce a la activación de la vía de E2F y altos niveles de expresión de TK. Por lo tanto, las células cancerosas tienen altos niveles de TK y el virus vaccinia mutado puede replicarse y propagarse.

El gen del factor de crecimiento de vaccinia (VGF) es un homólogo del factor de crecimiento epidérmico (EGF) de mamífero y puede unirse y activar el receptor de EGF (EGFR). Los virus vaccinia mutados en el gen de VGF tienen un crecimiento restringido a las células con vías de EGF activadas, que comúnmente están mutadas en los cánceres.

Los virus se pueden modificar o mutar de acuerdo con la relación conocida estructura-función de los inhibidores de PKR viral. Por ejemplo, dado que la región del terminal amino de la proteína E3 interactúa con el dominio de la región del terminal carboxilo de PKR, la eliminación o mutación puntual de este dominio impide la función anti-PKR (Chang et al., PNAS 89: 4825-4829 (1992); Chang, HW et al., Virology 194: 537-547 (1993); Chang et al., J. Virol. 69: 6605-6608 (1995); Sharp et al., Virol. 250: 301-315 (1998) y Romano et al., Mol. and Cell. Bio. 18: 7304-7316 (1998)). El gen K3L del virus vaccinia codifica pK3, un pseudo sustrato de PKR. Los truncamientos o mutaciones puntuales dentro de la porción del terminal C de la proteína K3L que es homóloga a los residuos 79 a 83 en eIF-2 eliminan la actividad inhibidora de PKR (Kawagishi-Kobayashi, M., et al., Mol. Cell. Biology 17: 4146- 4158 (1997)).

Otro ejemplo es el virus Delta24, que es un adenovirus mutante que porta una eliminación de 24 pares de bases en la región E1A (Fueyo, J., et al., Oncogene 19 (1): 2-12 (2000)). Esta región es responsable por la unión al supresor tumoral celular Rb e inhibir la función de Rb, permitiendo de este modo que la maquinaria celular proliferativa, y por lo tanto la replicación del virus, proceda de manera incontrolada. Delta24 tiene una eliminación en la región de unión a Rb y no se une a Rb. Por lo tanto, la replicación del virus mutante es inhibida por Rb en una célula normal. Sin embargo, si Rb se inactiva y la célula se vuelve neoplásica, Delta24 ya no se inhibe. En cambio, el virus mutante se replica eficientemente y lisa la célula deficiente en Rb.

Además, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) mata selectivamente las células neoplásicas (y se puede agregar interferón). Un mutante del virus 1 del herpes simple (HSV-1) defectuoso en la expresión de ribonucleótido reductasa, hrR3, se replica en células de carcinoma de colon pero no en células hepáticas normales (Yoon, S. S. et al., FASEB J. 14: 301-311 (2000)). El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) se replica preferiblemente en células malignas, y la cepa más utilizada es la 73-T (Reichard, KW et al., J. of Surgical Research 52: 448-453 (1992); Zorn, U. et al., Cancer Biotherapy 9 (3): 22-235 (1994); Bar-Eli, N. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 409-415 (1996)). El virus vaccinia se propaga en varias líneas celulares tumorales malignas. El virus de la encefalitis tiene un efecto oncolítico en un tumor de sarcoma de ratón, pero puede ser necesaria la atenuación para reducir su infectividad en las células normales. La regresión tumoral se ha descrito en pacientes con tumores infectados con herpes zoster, virus de la hepatitis, influenza, varicela y virus del sarampión (para una revisión, véase Nemunaitis, J. Invest. New Drugs 17: 375-386 (1999)).

Opcionalmente, el virus oncolítico es un virus no reovirus modificado que comprende una proteína sigma 1 de reovirus, en el que la proteína sigma 1 de reovirus reemplaza la proteína de unión nativa del virus no reovirus, y en el que el virus modificado no comprende ninguna porción de la proteína de unión nativa del virus no reovirus. En el virus no reovirus modificado, la proteína sigma 1 de reovirus se une a las células transportadoras que protegen al virus de la neutralización de anticuerpos durante el suministro *in vivo* a un tumor, por ejemplo, durante el suministro sistémico. El virus no reovirus puede ser, entre otros, un adenovirus, un virus vaccinia, un virus del herpes simple, un virus Sindbis o un parapoxvirus. El virus no reovirus modificado puede ser un virus oncolítico. Dichos virus no reovirus se pueden elaborar reemplazando la proteína de unión nativa del virus no reovirus con una proteína sigma 1 de reovirus, en el que la secuencia de longitud completa de la proteína de unión nativa del virus no reovirus se reemplaza con una proteína sigma 1 de reovirus. En los métodos para elaborar un virus no reovirus, el reemplazo de la proteína de unión nativa del virus con una proteína sigma 1 de reovirus permite que el virus se una a las células transportadoras que protegen al virus de la neutralización de anticuerpos durante el suministro *in vivo*. La proteína sigma 1 de reovirus se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/11004.

Opcionalmente, el virus oncolítico es un reovirus. Reovirus se refiere a cualquier virus clasificado en el género reovirus, ya sea natural, modificado o recombinante. Los reovirus son virus con un genoma de ARN segmentado bicatenario. Los viriones miden 60-80 nm de diámetro y poseen dos capas de cápside concéntricas, cada una de las cuales es icosaédrica. El genoma consiste en ARN bicatenario en 10-12 segmentos discretos con un tamaño total del genoma de 16-27 kpb. Los segmentos de ARN individuales varían en tamaño. Se han recuperado tres tipos distintos pero relacionados de reovirus de muchas especies. Por lo tanto, el reovirus puede ser un reovirus de mamífero o un reovirus humano. Los tres tipos comparten un antígeno común de fijación al complemento.

El reovirus humano incluye tres serotipos: tipo 1 (cepa Lang o T1L), tipo 2 (cepa Jones, T2J) y tipo 3 (cepa Dearing o cepa Abney, T3D). Los tres serotipos son fácilmente identificables sobre la base de la neutralización y los ensayos de inhibición de la hemaglutinina. Un reovirus de acuerdo con esta divulgación puede ser un ortoreovirus de mamífero tipo 3. Los ortoreovirus de mamíferos tipo 3 incluyen, sin limitación, cepas Dearing y Abney (T3D o T3A, respectivamente). Véanse, por ejemplo, los números de acceso ATCC VR-232 y VR-824. Como se describió anteriormente, los reovirus usan la maquinaria de la vía de ras de una célula huésped para subregular la proteína quinasa (PKR) activada por ARN bicatenario y, por lo tanto, la replicación en la célula. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.110.461; 6.136.307; 6.261.555; 6.344.195; 6.576.234; y 6.811.775.

El reovirus puede ser natural o modificado. El reovirus es natural cuando puede aislarse de una fuente en la naturaleza y no ha sido modificado intencionalmente por humanos en el laboratorio. Por ejemplo, el reovirus puede ser de una fuente de campo, es decir, de un humano que ha sido infectado con el reovirus. El reovirus también puede seleccionarse o ser mutagenizado para mejorar la actividad oncolítica.

El reovirus puede modificarse pero aún ser capaz de infectar líticamente una célula de mamífero que tiene una vía de ras activa. El reovirus puede tratarse previamente química o bioquímicamente (por ejemplo, mediante tratamiento con

una proteasa, tal como quimotripsina o tripsina) antes de la administración a las células en proliferación. El tratamiento previo con una proteasa elimina la capa externa o la cápside del virus y puede aumentar la infectividad del virus. El reovirus puede recubrirse en un liposoma o micela (Chandran y Nibert, J. of Virology 72 (1): 467-75 1998). Por ejemplo, el virión puede tratarse con quimotripsina en presencia de concentraciones formadoras de micelas de detergentes de sulfato de alquilo para generar una nueva partícula subviral infecciosa (ISVP).

El reovirus puede ser un reovirus recombinante. Por ejemplo, el reovirus recombinante puede ser un reovirus reordenado, que incluye segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente distintos. La recombinación/reordenamiento de segmentos genómicos de reovirus puede ocurrir después de la infección de un organismo huésped con al menos dos reovirus genéticamente distintos. Los virus recombinantes/reordenados también pueden generarse en cultivos celulares, por ejemplo, por coinfección de células huésped permisivas con reovirus genéticamente distintos. Por consiguiente, los métodos proporcionados incluyen el uso de un reovirus recombinante resultante del reordenamiento de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente distintos, que incluyen, entre otros, reovirus humano, tal como el tipo 1 (por ejemplo, Cepa Lang), tipo 2 (por ejemplo, cepa Jones) y tipo 3 (por ejemplo, cepa Dearing o cepa Abney); reovirus de mamíferos no humanos; o reovirus aviar. Opcionalmente, los métodos proporcionados incluyen el uso de reovirus recombinantes resultantes del reordenamiento de segmentos del genoma de dos o más reovirus genéticamente distintos en los que al menos un virus parental está genéticamente modificado, comprende uno o más segmentos genómicos sintetizados químicamente, ha sido tratado con mutágenos químicos o físicos, o en sí mismos son el resultado de un evento de recombinación. Opcionalmente, los métodos proporcionados incluyen el uso del reovirus recombinante que ha sufrido recombinación en presencia de mutágenos químicos, incluidos, entre otros, sulfato de dimetilo y bromuro de etidio, o mutágenos físicos, incluidos, entre otros, la luz ultravioleta y otras formas de radiación

Opcionalmente, los métodos proporcionados incluyen el uso de reovirus con mutaciones (incluidas inserciones, sustituciones, eliminaciones o duplicaciones) en uno o más segmentos del genoma. Dichas mutaciones pueden comprender información genética adicional como resultado de la recombinación con un genoma de la célula huésped o pueden comprender genes sintéticos. Por ejemplo, los reovirus mutantes como se describe en el presente documento pueden contener una mutación que reduce o esencialmente elimina la expresión de un polipéptido sigma3 o que da como resultado la ausencia de un polipéptido sigma3 funcional como se describe en la publicación de patente de los Estados Unidos No. 2008/0292594. Una mutación que elimina la expresión de un polipéptido sigma3 o que da como resultado la ausencia de un polipéptido sigma3 funcional puede estar en el ácido nucleico que codifica el polipéptido sigma3 (es decir, el gen S4) o en un ácido nucleico que codifica un polipéptido que regula la expresión o función del polipéptido sigma3.

Como se usa en el presente documento, una mutación que reduce la expresión de un polipéptido sigma3 se refiere a una mutación que da como resultado una disminución en la cantidad de polipéptidos sigma3, en comparación con un reovirus que expresa niveles de tipo silvestre del polipéptido sigma3, de al menos 30% (por ejemplo, al menos 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%). Como se usa en el presente documento, una mutación que esencialmente elimina la expresión de un polipéptido sigma3 se refiere a una mutación que da como resultado una disminución en la cantidad de polipéptidos sigma3, en relación con la cantidad de polipéptidos sigma3 producidos por un reovirus de tipo silvestre, de al menos el 95% (por ejemplo, 96%, 97%, 98%, 99% o 100%). Como se usa en el presente documento, una mutación que da como resultado una disminución o ausencia de un polipéptido sigma3 funcional se refiere a una mutación que permite la expresión del polipéptido sigma3 pero que da como resultado un polipéptido sigma3 que no puede ensamblarse o incorporarse a la cápside viral. Se entenderá que puede ser deseable o necesario que los polipéptidos sigma3 retengan otras funciones (por ejemplo, la capacidad de unirse al ARN) para que el reovirus mutante retenga la capacidad de propagarse.

Una mutación en un polipéptido sigma3 como se describe en el presente documento puede dar como resultado un polipéptido sigma3 que se incorpora en la cápside a niveles que se reducen en relación con un polipéptido sigma3 que no contiene la mutación (por ejemplo, un polipéptido sigma3 de tipo silvestre). Una mutación en un polipéptido sigma3 como se describe en el presente documento también puede dar como resultado un polipéptido sigma3 que no puede incorporarse a una cápside viral. Sin estar limitado por ningún mecanismo en particular, un polipéptido sigma3 puede tener una función reducida o carecer de función debido, por ejemplo, a la incapacidad del polipéptido sigma3 y el polipéptido mu1 para unirse de manera apropiada, o debido a un cambio conformacional que reduce o prohíbe la incorporación del polipéptido sigma3 en la cápside.

Además de una mutación que elimina o reduce la expresión del polipéptido sigma3 o que da como resultado un polipéptido sigma3 no funcional o de función reducida, un reovirus mutante como se describe en el presente documento también puede contener una o más mutaciones adicionales (por ejemplo, una segunda, tercera o cuarta mutación) en uno de los otros polipéptidos de la cápside de reovirus (por ejemplo, mu1, lambda2 y/o sigma 1). Los reovirus que contienen una mutación que afecta al polipéptido sigma3 y, opcionalmente, una mutación adicional en todas y cada una de las otras proteínas de la cápside externa se pueden examinar para determinar la capacidad de dichos reovirus mutantes para infectar y causar la lisis de las células. Por ejemplo, las células neoplásicas que son resistentes a la lisis por reovirus de tipo silvestre se pueden usar para detectar reovirus mutantes efectivos descritos en este documento.

Por ejemplo, una mutación adicional puede reducir o esencialmente eliminar la expresión de un polipéptido mu1 o dar

como resultado la ausencia de un polipéptido mu1 funcional. El polipéptido mu1, que está codificado por el gen M2, probablemente está involucrado en la penetración celular y puede desempeñar un papel en la activación de la transcriptasa. Cada virión contiene aproximadamente 600 copias de polipéptidos mu1, que están presentes en forma de complejos 1:1 con polipéptidos sigma3. El polipéptido mu1 está miristoilado en su extremo terminal N, y luego los 42 residuos miristoilados del terminal N se escinden, dando como resultado un fragmento del terminal C (mu1C). Además o alternativamente, una mutación adicional puede reducir o eliminar esencialmente la expresión de un polipéptido lambda2 o provocar la ausencia de un polipéptido lambda2 funcional, y/o una mutación adicional puede reducir o eliminar esencialmente la expresión de un polipéptido sigma1 o provocar la ausencia de un polipéptido sigma1 funcional. El polipéptido lambda2 está codificado por el gen L2, participa en el ensamblaje de partículas y exhibe actividad de guanililtransferasa y metiltransferasa. El polipéptido sigma1 está codificado por el gen S1, participa en la unión celular y sirve como hemaglutinina viral.

Opcionalmente, el reovirus comprende un polipéptido lambda-3 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos, un polipéptido sigma-3 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos, un polipéptido mu-1 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos, un polipéptido mu-2 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos, o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, el reovirus tiene un polipéptido lambda-3 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos; un polipéptido sigma-3 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos; un polipéptido mu-1 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos; y/o un polipéptido mu-2 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos, como se describe en la solicitud estadounidense No. 12/046.095. A modo de ejemplo, una o más modificaciones de aminoácidos en el polipéptido lambda-3 son una Val en el residuo 214, una Ala en el residuo 267, una Thr en el residuo 557, una Lys en el residuo 755, una Met en el residuo 756, una Pro en el residuo 926, una Pro en el residuo 963, una Leu en el residuo 979, una Arg en el residuo 1045, una Val en el residuo 1071, o cualquier combinación de los mismos, numerados con relación al número de acceso del GenBank M24734.1 (SEQ ID NO: 23). Se observa que, cuando la secuencia de aminoácidos es una Val en el residuo 214 o una Val en el residuo 1071, la secuencia de aminoácidos incluye además al menos un cambio adicional en la secuencia de aminoácidos. Opcionalmente, el polipéptido lambda-3 incluye la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 19. Además, a modo de ejemplo, una o más modificaciones de aminoácidos en el polipéptido sigma-3 son una Leu en el residuo 14, una Lys en el residuo 198, o cualquier combinación de los mismos, numerados con relación al número de acceso del GenBank K02739 (SEQ ID NO: 25). Se observa que, cuando la secuencia de aminoácidos es una Leu en el residuo 14, la secuencia de aminoácidos incluye además al menos un cambio adicional en la secuencia de aminoácidos. Opcionalmente, el polipéptido sigma-3 incluye la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 15. Además, a modo de ejemplo, una o más modificaciones de aminoácidos en el polipéptido mu-1 es una Asp en el residuo 73 numerado con relación al número de acceso del GenBank M20161.1 (SEQ ID NO: 27). Opcionalmente, el polipéptido mu-1 incluye la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 17. También a modo de ejemplo, la modificación de aminoácidos del polipéptido mu-2 es una Ser en el residuo 528 numerado con relación al número de registro del GenBank AF461684.1 (SEQ ID NO: 29). Opcionalmente, el polipéptido mu-1 incluye la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 17. Un reovirus como se describe en el presente documento que tiene una o más modificaciones puede incluir además un polipéptido sigma-2 de reovirus. Tal polipéptido sigma-2 tiene una Cys en una o más de las posiciones 70, 127, 195, 241, 255, 294, 296 o 340, numeradas con relación al número de acceso del GenBank NP_694684.1 (SEQ ID NO: 30). Opcionalmente, el polipéptido sigma-2 incluye la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 12.

Opcionalmente, el reovirus comprende un segmento del genoma L1 que comprende una o más modificaciones de ácido nucleico, un segmento del genoma S4 que comprende una o más modificaciones de ácido nucleico, un segmento del genoma M1 que comprende una o más modificaciones de ácido nucleico, un segmento del genoma M2 que comprende una o más modificaciones de ácido nucleico, o cualquier combinación de las mismas. Opcionalmente, el reovirus tiene un segmento del genoma L1 que tiene una o más modificaciones de ácido nucleico; un segmento del genoma S4 que tiene una o más modificaciones de ácido nucleico; un segmento del genoma M1 que tiene una o más modificaciones de ácido nucleico; y/o un segmento del genoma M2 que tiene una o más modificaciones de ácido nucleico, como se describe en el documento WO 2008/110004. A modo de ejemplo, una o más modificaciones de ácido nucleico en el segmento del genoma L1 son una T en la posición 660, una G en la posición 817, una A en la posición 1687, una G en la posición 2283, un ATG en las posiciones 2284-2286, una C en la posición 2794, una C en la posición 2905, una C en la posición 2953, una A en la posición 3153 o una G en la posición 3231, numerada con relación al número de acceso del GenBank M24734.1 (SEQ ID NO: 22). Opcionalmente, el segmento del genoma L1 incluye la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 8. Además, a modo de ejemplo, una o más modificaciones de ácido nucleico en el segmento del genoma S4 es una A en la posición 74 y una A en la posición 624, numeradas con relación al número de acceso del GenBank K02739 (SEQ ID NO: 24). Opcionalmente, el segmento del genoma S4 incluye la secuencia que se muestra en la SEQ ID NO: 4. Además, a modo de ejemplo, la modificación de ácido nucleico en el segmento del genoma M2 puede ser una C en la posición 248, numerada con relación al número de acceso del GenBank M20161.1 (SEQ ID NO: 26). El segmento del genoma M2, por ejemplo, incluye la secuencia que se muestra en SEQ ID NO: 6. También a modo de ejemplo, la modificación de ácido nucleico en el segmento del genoma M1 es una T en la posición 1595, numerada en relación con el número de acceso del GenBank AF461684.1 (SEQ ID NO: 28). Opcionalmente, el segmento del genoma M1 incluye la secuencia que mostrada en la SEQ ID NO: 5. Un reovirus como se describe en el presente documento puede incluir cualquier modificación o combinación de modificaciones divulgadas en el presente documento. Opcionalmente, un reovirus como se describe en el presente documento incluye segmentos genómicos que tienen las secuencias mostradas en las SEQ ID NOs: 1-10 o los polipéptidos mostrados en las SEQ ID NOs: 11, 12 y 16-21, y una o ambas SEQ ID NO: 13 o 14. Opcionalmente, un

reovirus como se divulga en este documento se identifica con el número de acceso IDAC 190907-01, que se depositó en el Depositario Internacional de Canadá (IDAC, Laboratorio Nacional de Microbiología, Agencia de Salud Pública de Canadá, 1015 Arlington St., Winnipeg, Manitoba Canadá R3E 3R2 el 19 de septiembre de 2007. Las reivindicaciones adjuntas especifican que el virus oncolítico es un reovirus que tiene el No. de acceso IDAC 190907-01.

5 El virus Sindbis (SIN) puede usarse en los métodos descritos en este documento. El virus Sindbis es un miembro del género alfavirus de la familia Togaviridae. El genoma del virus Sindbis es un ARN monocatenario de 11703 nucleótidos, protegido en el extremo 5' y poliadenilado en el extremo 3'. El genoma consiste en una región no traducida (UT) 49S, proteínas no estructurales nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4 seguidas de un promotor. El promotor es seguido por una UT 26S, proteínas estructurales C, E3, E2, 6K y E1 y finalmente una UT 3' y un terminal poliadenilado. El ARN
10 genómico 49S tiene sentido positivo, es infeccioso y sirve como ARNm en la célula infectada.

Los vectores Sindbis infectan/detectan y matan sistémica y específicamente tumores que hicieron metástasis *in vivo*, lo que conduce a una supresión significativa del crecimiento tumoral y una supervivencia mejorada (Hurtado et al., Rejuvenation Res. 9 (1): 36-44 (2006)). El virus Sindbis infecta las células de mamíferos utilizando el receptor de laminina Mr 67.000, que está elevado en las células tumorales frente a las normales. La sobreexpresión tumoral del
15 receptor de laminina puede explicar la especificidad y eficacia que los vectores Sindbis demuestran para las células tumorales *in vivo*. Sindbis no tiene que someterse a manipulación genética para atacar las células cancerosas o para inyectarse directamente en los tumores. Sindbis inyectado en cualquier parte de un sujeto viaja a través del torrente sanguíneo hacia el área objetivo (Tseng et al., Cancer Res. 64 (18): 6684-92 (2004)). Sindbis también puede modificarse genéticamente para transportar uno o más genes que suprimen el respuesta inmune al virus y/o genes
20 que estimulan una respuesta inmune contra el tumor tales como, por ejemplo, genes de citocinas antitumorales como los genes de interleucina-12 e interleucina-15.

El virus oncolítico puede ser natural o modificado. El virus puede previamente tratarse química o bioquímicamente (por ejemplo, mediante tratamiento con una proteasa, tal como quimotripsina o tripsina) antes de la administración a las células neoplásicas. El pretratamiento con una proteasa elimina la capa externa o la cápside del virus y puede
25 aumentar la infectividad del virus. El virus puede recubrirse en un liposoma o micela (Chandran y Nibert, J. of Virology 72 (1): 467-75 (1998)) para reducir o prevenir una respuesta inmune de un mamífero que ha desarrollado inmunidad al virus. Por ejemplo, el virión puede tratarse con quimotripsina en presencia de micelas que forman concentraciones de detergentes de sulfato de alquilo para generar una nueva partícula infecciosa de subvirión. El virus oncolítico también puede ser un virus reordenado o un ISVP.

30 Los presentes métodos incluyen el uso de cualquier virus oncolítico de acuerdo con la divulgación en este documento y el conocimiento disponible en la técnica. El virus oncolítico puede ser natural o modificado. El virus oncolítico es natural cuando puede aislarse de una fuente en la naturaleza y no ha sido modificado intencionalmente por humanos en el laboratorio. Por ejemplo, el virus oncolítico puede provenir de una fuente de campo, es decir, de un humano que ha sido infectado con el virus oncolítico.

35 El virus oncolítico puede ser un virus oncolítico recombinante. Por ejemplo, el virus oncolítico recombinante resulta del reordenamiento de segmentos genómicos de dos o más virus oncolíticos genéticamente distintos, a los que también se hace referencia en el presente documento como un reordenamiento. El reordenamiento de los segmentos genómicos del virus oncolítico puede ocurrir después de la infección de un organismo huésped con al menos dos virus oncolíticos genéticamente distintos. Los virus recombinantes también pueden generarse en cultivo celular, por
40 ejemplo, por coinfección de células huésped permisivas con virus oncolíticos genéticamente distintos. Opcionalmente, los métodos incluyen el uso del virus oncolítico recombinante que resulta del reordenamiento de segmentos genómicos de dos o más virus oncolíticos genéticamente distintos en los que al menos un virus parental está genéticamente modificado, comprende uno o más segmentos genómicos sintetizados químicamente, ha sido tratado con mutágenos químicos o físicos, o es en sí mismo el resultado de un evento de recombinación. Opcionalmente, los métodos incluyen
45 el uso del virus oncolítico recombinante que ha sufrido recombinación en presencia de mutágenos químicos, incluidos, entre otros, sulfato de dimetilo y bromuro de etidio, o mutágenos físicos, incluidos, entre otros, la luz ultravioleta y otras formas de radiación.

Opcionalmente, los métodos incluyen el uso de virus oncolíticos con mutaciones que incluyen (inserciones, sustituciones, eliminaciones o duplicaciones) en uno o más segmentos del genoma. Dichas mutaciones pueden
50 comprender información genética adicional como resultado de la recombinación con un genoma de la célula huésped, o que comprenden genes sintéticos tales como, por ejemplo, genes que codifican agentes que suprimen las respuestas inmunitarias antivirales.

Opcionalmente, el virus oncolítico es un virus oncolítico mutante. Por ejemplo, el virus oncolítico puede modificarse mediante la incorporación de proteínas de recubrimiento mutadas, tales como por ejemplo, en la cápside externa del virión. El virus oncolítico mutante es, opcionalmente, un reovirus mutante. Los reovirus mutantes como se describen
55 en el presente documento pueden contener una mutación que reduce o esencialmente elimina la expresión de un polipéptido sigma3 o que da como resultado la ausencia de un polipéptido sigma3 funcional como se describe en la solicitud estadounidense No. 12/124.522. Opcionalmente, los reovirus mutantes utilizados en los métodos proporcionados están mutados como se describe en la solicitud estadounidense No. 12/046.095.

Una mutación a la que se hace referencia en el presente documento puede ser una sustitución, inserción o eliminación de uno o más nucleótidos. Las mutaciones puntuales incluyen, por ejemplo, transiciones de un solo nucleótido (purina por purina o pirimidina por pirimidina) o transversiones (purina por pirimidina o viceversa) y eliminaciones o inserciones de nucleótidos individuales o múltiples. Una mutación en un ácido nucleico puede dar como resultado una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras en el polipéptido codificado, lo que puede resultar en cambios conformacionales o pérdida o pérdida parcial de la función, un cambio en el marco de lectura de la traducción (cambio de marco) que resulta en un polipéptido completamente diferente codificado desde ese punto en adelante, un codón de parada prematuro que resulta en un polipéptido truncado (truncamiento), o una mutación en un ácido nucleico del virus puede no cambiar el polipéptido codificado en absoluto (silencioso o sin sentido). Véase, por ejemplo, Johnson y Overington, 1993, *J. Mol. Biol.* 233: 716-38; Henikoff y Henikoff, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-19; y la patente de Estados Unidos No. 4.554.101, para la divulgación de sustituciones de aminoácidos conservadoras y no conservadoras.

Se pueden generar mutaciones en el ácido nucleico de un virus oncolítico usando cualquier número de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio puede usarse para modificar una secuencia de ácido nucleico de reovirus. Uno de los métodos más comunes de mutagénesis dirigida al sitio es la mutagénesis dirigida a oligonucleótidos. En la mutagénesis dirigida a oligonucleótidos, un oligonucleótido que codifica el cambio o cambios deseados en la secuencia se hibrida con una cadena del ADN de interés y sirve como cebador para el inicio de la síntesis de ADN. De esta manera, el oligonucleótido que contiene el cambio de secuencia se incorpora a la cadena recién sintetizada. Véase, por ejemplo, Kunkel, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos* 82: 488; Kunkel et al., 1987, *Meth. Enzymol* 154: 367; Lewis y Thompson, 1990, *Nucl. Acids Res.* 18: 3439; Bohnsack, 1996, *Meth. Mol. Biol.* 57: 1; Deng y Nickoloff, 1992, *Anal. Biochem.* 200: 81; y Shimada, 1996, *Meth. Mol. Biol.* 57: 157. Otros métodos se usan rutinariamente en la técnica para modificar la secuencia de una proteína o polipéptido. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que contienen una mutación pueden generarse usando PCR o síntesis química, o los polipéptidos que tienen el cambio deseado en la secuencia de aminoácidos pueden sintetizarse químicamente. Véase, por ejemplo, Bang y Kent, 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 5014-9 y las referencias citadas allí.

Los virus se pueden purificar usando metodología estándar. Véase, por ejemplo, Schiff et al., "Orthoreoviruses and Their Replication", Capítulo 52, en *Fields Virology*, Knipe and Howley, editores., 2006, Lippincott Williams y Wilkins; Smith et al., 1969, *Virology* 39 (4): 791-810; y en las patentes de los Estados Unidos Nos. 7.186.542; 7.049.127; 6.808.916; y 6.528.305. Como se usa en este documento, los virus purificados se refieren a virus que se han separado de los componentes celulares que los acompañan naturalmente. Típicamente, los virus se consideran purificados cuando tienen al menos 70% (por ejemplo, al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 99%) en peso seco, libres de proteínas y otros componentes celulares con que están naturalmente asociados.

Como se discutió anteriormente, los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antraciclinas, taxanos, epotilonas, inhibidores de histona desacetilasa, inhibidores de Topoisomerasa I, inhibidores de Topoisomerasa II, inhibidores de quinasa, anticuerpos monoclonales, análogos de nucleótidos y análogos de precursores, antibióticos peptídicos, compuestos a base de platino, retinoides y alcaloides y derivados de la vinca.

Los ejemplos de agentes alquilantes incluyen, pero no se limitan a, mostazas nitrogenadas, nitrosoureas, tetrazinas, aziridinas, cisplatino y derivados, y agentes alquilantes no clásicos. Los ejemplos específicos de agentes alquilantes incluyen, entre otros, mecloretamina, ciclofosfamida, melfalan, clorambucilo, ifosfamida, busulfano, N-nitroso-N-metilurea (MNU), carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), semustina (MeCCNU), fotemustina, estreptozotocina, dacarbazina, mitozolomida, temozolomida, tiotepa, mitomicina, diaziquona, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, procarbazona y hexametilmelamina.

Otros ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, mitomicina C, metotrexato, hidroxurea, mitoxantrona, antraciclinas (por ejemplo, epirrubina y doxorrubina), anticuerpos para los receptores (por ejemplo, herceptina, etopósido, pregnasoma), terapias hormonales (por ejemplo, tamoxifeno y antiestrógenos), interferones, inhibidores de aromatasas, agentes progestacionales y análogos de LHRH. Opcionalmente, el agente quimioterapéutico es un compuesto de platino. Opcionalmente, el compuesto de platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, nedaplatino y triplatino. Opcionalmente, el agente quimioterapéutico es un taxano. Opcionalmente, el taxano se selecciona del grupo que consiste en cabazitaxel, abraxano, paclitaxel y docetaxel.

Como se discutió en su totalidad, la quimioterapia y la administración de un agente quimioterapéutico pueden incluir la administración de más de un agente quimioterapéutico al sujeto, es decir, la administración de una combinación de agentes quimioterapéuticos. De este modo, por ejemplo, el agente quimioterapéutico es una combinación seleccionada del grupo que consiste en (i) un agente alquilante y un antibiótico, (ii) un antibiótico y un compuesto de platino, (iii) un agente alquilante y un análogo de nucleótido, (iv) un compuesto de platino y un taxano, (v) un compuesto de platino, un taxano y un anticuerpo. Opcionalmente, el agente quimioterapéutico es un compuesto de platino y un taxano. Opcionalmente, el agente quimioterapéutico es carboplatino y paclitaxel.

En este documento se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más virus oncolíticos. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más agentes quimioterapéuticos. Opcionalmente, las composiciones farmacéuticas incluyen uno o más virus oncolíticos y uno o más agentes

quimioterapéuticos. Por lo tanto, las composiciones proporcionadas pueden incluir un solo agente o más de un agente.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento se administran *in vitro* o *in vivo* en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un material sólido, semisólido o líquido que puede actuar como vehículo, portador o medio para el reovirus. Por lo tanto, las composiciones que contienen un virus oncolítico y/o uno o más de los agentes proporcionados pueden estar en forma de tabletas, píldoras, polvos, pastillas, sobres, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles.

Opcionalmente, las composiciones que contienen un virus oncolítico son adecuadas para infusión. Para las infusiones intravenosas, hay dos tipos de fluidos que se usan comúnmente, cristaloides y coloides. Los cristaloides son soluciones acuosas de sales minerales u otras moléculas solubles en agua. Los coloides contienen moléculas insolubles más grandes, tales como gelatina; la sangre misma es un coloide. El líquido cristaloides más utilizado es la solución salina normal, una solución de cloruro de sodio al 0,9% de concentración, que está cerca de la concentración en la sangre (isotónica). El lactato de Ringer o el acetato de Ringer es otra solución isotónica que a menudo se usa para el reemplazo de grandes volúmenes de fluidos. A menudo se usa una solución de dextrosa al 5% en agua, a veces llamada D5W, si el paciente está en riesgo de tener un bajo nivel de azúcar en la sangre o alto contenido de sodio.

Algunos ejemplos de vehículos adecuados incluyen solución salina tamponada con fosfato u otro tampón fisiológicamente aceptable, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe y metilcelulosa. Una composición farmacéutica adicionalmente puede incluir, sin limitación, agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes tales como metil y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes; y agentes saborizantes. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada de un reovirus mutante después de la administración empleando procedimientos conocidos en la técnica. Además de las formulaciones representativas descritas a continuación, se pueden encontrar otras formulaciones adecuadas para su uso en una composición farmacéutica en Remington: The Science and Practice of Pharmacy edición 22 Loyd V. Allen et al., editores, Pharmaceutical Press (2012). Para preparar composiciones sólidas tales como tabletas, se puede mezclar un reovirus mutante con un vehículo farmacéutico para formar una composición sólida. Opcionalmente, las tabletas o píldoras pueden recubrirse o combinarse para proporcionar una forma de dosificación que ofrezca la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, una tableta o píldora puede comprender una dosificación interna y un componente de dosificación externa, esta última en forma de una envoltura sobre la primera. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase su liberación. Se pueden usar una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales que incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formulaciones líquidas que incluyen un reovirus y/o agente para administración oral o para inyección generalmente incluyen soluciones acuosas, jarabes con sabor adecuado, suspensiones acuosas o aceitosas y emulsiones saborizadas con aceites comestibles tales como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de maní, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Estas composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describe en el presente documento. Dichas composiciones pueden administrarse por vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables pueden nebulizarse mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas se pueden inhalar directamente del dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador se puede conectar a un dilatador de máscara facial o máquina de respiración de presión positiva intermitente. Las composiciones de solución, suspensión o polvo se pueden administrar, por vía oral o nasal, desde dispositivos que administran la formulación de manera apropiada.

Otra formulación que se emplea opcionalmente en los métodos de la presente divulgación incluye dispositivos de administración transdérmica (por ejemplo, parches). Tales parches transdérmicos pueden usarse para proporcionar una infusión continua o discontinua de los virus y agentes como se describe en el presente documento. La construcción y uso de parches transdérmicos para el suministro de agentes farmacéuticos es bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5.023.252. Dichos parches se pueden construir para la administración continua, pulsátil o bajo demanda de reovirus mutantes.

Como se describió anteriormente, los virus y/u otros agentes pueden, si es necesario, recubrirse en un liposoma o micela para reducir o prevenir una respuesta inmune en un mamífero que ha desarrollado inmunidad hacia un virus o agente. Dichas composiciones se denominan virus o agentes inmunoprotegidos. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos 6.565.831 y 7.014.847.

En los métodos proporcionados, el virus oncolítico se administra, por ejemplo, sistémicamente, de manera que finalmente puede contactar con el tumor objetivo o las células tumorales. La ruta por la que se administra el virus, así como la formulación, el portador o el vehículo, dependen de la ubicación y del tipo de células objetivo. Se puede emplear una amplia variedad de rutas de administración. Por ejemplo, para un tumor sólido que es accesible, el virus puede administrarse mediante inyección directamente al tumor. Para un tumor hematopoyético, por ejemplo, el virus puede administrarse por vía intravenosa o intravascular. Para los tumores que no son fácilmente accesibles dentro del cuerpo, tales como metástasis, el virus se administra de manera tal que pueda transportarse sistémicamente a través del cuerpo del mamífero y así alcanzar el tumor (por ejemplo, por vía intravenosa o intramuscular). Alternativamente, el virus puede administrarse directamente a un solo tumor sólido, del que luego se transporta sistémicamente a través del cuerpo a la metástasis. El virus también puede administrarse por vía subcutánea, intraperitoneal, intratecal o intraventricular (por ejemplo, para un tumor cerebral), tópicamente (por ejemplo, para melanoma), por vía oral (por ejemplo, para cáncer oral o esofágico), por vía rectal (por ejemplo, para cáncer colorrectal), vaginalmente (por ejemplo, para el cáncer de cuello uterino o vaginal), por vía nasal, por un atomizador para inhalación o por formulación en aerosol (por ejemplo, para el cáncer de pulmón).

Opcionalmente, el virus se administra continuamente a un sujeto al menos una vez al día o hasta de manera intermitente o continua durante todo el día en días consecutivos, durante un período de tiempo. Por lo tanto, el virus se administra, por ejemplo, a sujetos mediante administración intravenosa en cualquier solución farmacológicamente aceptable, o como una infusión durante un período de tiempo. Por ejemplo, la sustancia puede administrarse por vía sistémica mediante inyección (por ejemplo, IM o por vía subcutánea) o administrarse por vía oral diariamente al menos una vez al día, o administrarse por infusión de una manera que resulte en el suministro diario al tejido o al torrente sanguíneo del sujeto. Cuando el virus se administra por infusión durante un período de tiempo, el período de tiempo es, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 24 horas, o cualquier tiempo entre 1 y 24 horas, inclusive, o más. Opcionalmente, el período de tiempo es 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150 o 180 minutos, o cualquier tiempo entre 5 y 180 minutos, inclusive, o más. De este modo, por ejemplo, el virus se administra por infusión durante 60 minutos. Las administraciones pueden repetirse diariamente durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 21, 28 días o cualquier número de días entre 2 y 28 días, inclusive o más.

Los virus divulgados en este documento se administran en una cantidad que es suficiente (es decir, una cantidad efectiva) para efectuar el tratamiento del cáncer o trastorno proliferativo. Un trastorno proliferativo se trata cuando la administración de un régimen de tratamiento que incluye un virus a las células en proliferación afecta la lisis (por ejemplo, oncólisis) de las células afectadas, lo que resulta en una reducción en el número de células anormalmente proliferantes, una reducción en el tamaño de una neoplasia, y/o una reducción o eliminación de los síntomas (por ejemplo, dolor) asociados con el trastorno proliferativo. Como se usa en el presente documento, el término oncólisis significa que al menos el 10% de las células proliferantes se lisan (por ejemplo, al menos aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50% o 75% de las células se lisan). El porcentaje de lisis puede determinarse, por ejemplo, midiendo la reducción en el tamaño de una neoplasia o en el número de células proliferantes en un mamífero, o midiendo la cantidad de lisis de células *in vitro* (por ejemplo, a partir de una biopsia de las células proliferantes). Una cantidad efectiva de un virus utilizado en un régimen de tratamiento se determinará de forma individual y puede basarse, al menos en parte, en el virus particular utilizado; el tamaño del individuo, edad, género; y el tamaño y otras características de las células anormalmente proliferantes. Por ejemplo, para el tratamiento de un ser humano, se utilizan aproximadamente 10^3 a 10^{12} unidades formadoras de placa (UFP) de un virus, dependiendo del tipo, tamaño y número de células proliferantes o neoplasias presentes. La cantidad eficaz puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 1,0 UFP/kg de peso corporal a aproximadamente 10^{15} UFP/kg de peso corporal (por ejemplo, de aproximadamente 10^2 UFP/kg de peso corporal a aproximadamente 10^{13} UFP/kg de peso corporal). Opcionalmente, la cantidad efectiva es de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{12} UFP o TCID₅₀. Opcionalmente, la cantidad efectiva es de aproximadamente 3×10^{10} a aproximadamente 1×10^{10} TCID₅₀.

Las dosis óptimas de virus y agentes terapéuticos, y las composiciones y kits que comprenden virus y agentes dependen de una variedad de factores. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad, el peso y el estado general del sujeto, la gravedad de la enfermedad a tratar, el virus o vector particular utilizado y su modo de administración. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición o kit. Sin embargo, un experto en la materia puede determinar una cantidad apropiada utilizando solo experimentación de rutina dada la guía proporcionada en este documento.

Las dosis efectivas y los programas para administrar los regímenes de tratamiento pueden determinarse empíricamente. Por ejemplo, se pueden obtener modelos animales para una variedad de trastornos proliferativos del Jackson Laboratory, 600 Main Street, Bar Harbor, Maine 04609 EE. UU. Las mediciones directas (por ejemplo, Histología de tumores) y funcionales (por ejemplo, la supervivencia de un sujeto o el tamaño de un tumor) se pueden usar para controlar la respuesta a las terapias. Estos métodos implican el sacrificio de animales representativos para evaluar la población, aumentando el número de animales necesarios para los experimentos. La medición de la actividad de la luciferasa en el tumor proporciona un método alternativo para evaluar el volumen del tumor sin sacrificio de animales y permite un análisis de la terapia longitudinal basado en la población.

Los intervalos de dosificación para la administración de composiciones son los suficientemente grandes como para producir el efecto deseado en el que se ven afectados los síntomas de la enfermedad. La dosis no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas y reacciones

anafilácticas. La dosis puede ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier contraindicación.

Las dosis varían y se administran en una o más administraciones de dosis, por ejemplo, diariamente, durante uno o varios días. Los virus y agentes terapéuticos proporcionados se administran en una dosis única o en dosis múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, seis o más dosis). Por ejemplo, cuando la administración es por infusión, la infusión puede ser una sola dosis sostenida o puede administrarse mediante múltiples infusiones. El tratamiento puede durar desde varios días hasta varios meses o hasta que se logre la disminución de la enfermedad.

Los métodos proporcionados pueden combinarse adicionalmente con otras terapias tumorales tales como radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o inmunoterapia. Por lo tanto, los métodos proporcionados pueden incluir además administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales al sujeto. Los agentes terapéuticos adicionales adecuados incluyen, entre otros, analgésicos, anestésicos, analépticos, corticosteroides, agentes anticolinérgicos, anticolinesterasas, anticonvulsivos, agentes antineoplásicos, inhibidores alostéricos, esteroides anabólicos, agentes antiirreumáticos, agentes psicoterapéuticos, agentes de bloqueo neural, agentes antiinflamatorios, antihelmínticos, antibióticos, anticoagulantes, antifúngicos, antihistamínicos, agentes antimuscarínicos, agentes antimicobacterianos, agentes antiprotozoarios, agentes antivirales, dopaminérgicos, agentes hematológicos, agentes inmunológicos, muscarínicos, inhibidores de proteasas, vitaminas, factores de crecimiento y hormonas. El experto en la materia puede determinar fácilmente la elección del agente y la dosificación en función de la enfermedad que se está tratando.

Las combinaciones de los virus y agentes terapéuticos proporcionados se administran de forma concomitante (por ejemplo, como una mezcla), por separado pero simultáneamente (por ejemplo, a través de líneas intravenosas separadas en el mismo sujeto), o secuencialmente (por ejemplo, uno de los compuestos o agentes se administra primero seguido por el segundo). Por lo tanto, el término combinación se usa para referirse a la administración concomitante, simultánea o secuencial de dos o más agentes.

Cuando un compuesto se administra antes de otro compuesto, el primer compuesto se administra minutos, horas, días o semanas antes de la administración del segundo compuesto. Por ejemplo, el primer compuesto se puede administrar a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 24, 36, 48, 60 o 72 horas, o en cualquier momento entre 1 y 72 horas, inclusive, antes de la administración de un segundo compuesto. Opcionalmente, el primer compuesto se administra más de 72 horas antes del segundo compuesto. A modo de otro ejemplo, el primer compuesto se puede administrar a 1, 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150 o 180 minutos, o en cualquier momento entre 1 y 180 minutos, inclusive, antes de la administración de un segundo compuesto. Opcionalmente, el primer compuesto se administra a los 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 o 28 días, o cualquier cantidad entre 1 y 28, inclusive, días antes de la administración del segundo compuesto. Opcionalmente, el primer compuesto se administra más de 28 días antes del segundo compuesto.

Los virus oncolíticos o una composición farmacéutica que comprende tales virus se pueden empaquetar en un kit. El kit también incluye uno o más agentes quimioterapéuticos o composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes quimioterapéuticos. Por lo tanto, en el presente documento se proporcionan kits que comprenden un virus oncolítico y un agente quimioterapéutico, en el que el agente quimioterapéutico comprende una cantidad para un régimen reforzado de tratamiento de un agente quimioterapéutico en comparación con la terapia estándar. El régimen reforzado de tratamiento puede incluir una cantidad incrementada por dosis de agente quimioterapéutico en comparación con la terapia estándar o un mayor número de dosis del agente quimioterapéutico en comparación con la terapia estándar. Opcionalmente, el régimen reforzado de tratamiento comprende una cantidad incrementada por dosis y un mayor número de dosis de agente quimioterapéutico en comparación con la terapia estándar. El régimen reforzado de tratamiento puede incluir un mayor número de ciclos de tratamiento con el agente quimioterapéutico en comparación con la terapia estándar. Opcionalmente, el mayor número de ciclos de tratamiento comprende más de cuatro ciclos de tratamiento con el agente quimioterapéutico. Opcionalmente, el mayor número de ciclos de tratamiento comprende 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más ciclos de tratamiento con el agente quimioterapéutico.

Los virus y/o agentes quimioterapéuticos oncolíticos y las composiciones farmacéuticas que los contienen pueden envasarse en uno o más recipientes. Cuando los kits contienen composiciones farmacéuticas, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una forma de dosificación unitaria. El término "formas de dosificación unitarias" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un virus oncolítico u otro agente, por ejemplo, agente quimioterapéutico calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable adecuado.

Opcionalmente, el kit incluye uno o más agentes quimioterapéuticos o una combinación de agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes alquilantes, antraciclinas, taxanos, epotilonas, inhibidores de histona desacetilasa, inhibidores de Topoisomerasa I, inhibidores de Topoisomerasa II, inhibidores de quinasa, anticuerpos monoclonales, análogos de nucleótidos y análogos de precursores, antibióticos peptídicos, compuestos a base de platino, retinoides y alcaloides y derivados de la vinca. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen, entre otros, 5-fluorouracilo, mitomicina C, metotrexato, hidroxiurea, mitoxantrona, antraciclinas (por ejemplo, epirrubicina y doxorubicina), anticuerpos contra los receptores (por ejemplo, herceptina, etopósido, pregnasoma), terapias hormonales (por ejemplo, tamoxifeno y antiestrógenos), interferones, inhibidores de aromatasa, agentes progestacionales y análogos de LHRH. Opcionalmente, el agente

quimioterapéutico es un compuesto de platino. Opcionalmente, el compuesto de platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, nedaplatino y triplatinato. Opcionalmente, el agente quimioterapéutico es un taxano. Opcionalmente, el taxano se selecciona del grupo que consiste en cabazitaxel, abraxano, paclitaxel y docetaxel. Opcionalmente, el kit incluye una combinación de agentes quimioterapéuticos seleccionados del grupo que consiste en (i) un agente alquilante y un antibiótico, (ii) un antibiótico y un compuesto de platino, (iii) un agente alquilante y un análogo de nucleótido, (iv) un compuesto de platino y un taxano, (v) un compuesto de platino, un taxano y un anticuerpo. Opcionalmente, el agente quimioterapéutico es un compuesto de platino y un taxano. Opcionalmente, el agente quimioterapéutico es carboplatino y paclitaxel.

El virus oncolítico en los kits proporcionados puede ser cualquiera de los virus oncolíticos descritos en el presente documento. Opcionalmente, el virus oncolítico se selecciona del grupo que consiste en un reovirus, un virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), un virus de estomatitis vesicular (VSV), un adenovirus, un virus vaccinia, un virus orf parapoxvirus, un virus Sindbis y un virus del herpes simple. Opcionalmente, el reovirus es un reovirus de mamífero, un reovirus humano, un reovirus de serotipo 1, un reovirus de serotipo 2, un reovirus de serotipo 3 o un reovirus de cepa Dearing. Opcionalmente, como se discutió anteriormente, el reovirus humano tiene el No. de acceso IDAC 190907-01. El reovirus puede incluir un polipéptido lambda-3 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos, un polipéptido sigma-3 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos, un polipéptido mu-1 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos, un polipéptido mu-2 que tiene uno o más modificaciones de aminoácidos, o cualquier combinación de las mismas. Opcionalmente, el reovirus comprende uno o más de un polipéptido sigma-3 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos, en las que una o más modificaciones de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en una Leu en el residuo 14, una Lys en el residuo 198, o cualquier combinación de los mismos, numerado con relación al número de acceso del GenBank K02739, en la que cuando la secuencia de aminoácidos comprende una Leu en el residuo 14, la secuencia de aminoácidos comprende además al menos una modificación adicional en la secuencia de aminoácidos, un polipéptido mu-1 que tiene al menos una modificación de aminoácido, en la que al menos una modificación de aminoácidos comprende una Asp en el residuo 73 numerado con relación al número de acceso del GenBank M20161.1, un polipéptido lambda-3 que tiene una o más modificaciones de aminoácidos, en las que una o más modificaciones de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en una Val en el residuo 214, una Ala en el residuo 267, una Thr en el residuo 557, una Lys en el residuo 755, una Met en el residuo 756, una Pro en el residuo 926, una Pro en el residuo 963, una Leu en el residuo 979, una Arg en el residuo 1045, una Val en el residuo 1071, o cualquier combinación de los mismos, numerados con relación al número de acceso del GenBank M24734.1, en el que cuando la secuencia de aminoácidos comprende una Val en el residuo 214 o una Val en el residuo 1071, la secuencia de aminoácidos comprende además al menos una modificación adicional en la secuencia de aminoácidos, o un polipéptido mu-2 que tiene al menos una modificación de aminoácidos, en la que al menos una modificación de aminoácidos comprende una Ser en el residuo 528 numerado con relación al número de acceso del GenBank AF461684.1. Alternativa o adicionalmente, el reovirus puede incluir un segmento del genoma L1 que comprende una o más modificaciones de ácido nucleico, un segmento del genoma S4 que comprende una o más modificaciones de ácido nucleico, un segmento del genoma M1 que comprende una o más modificaciones de ácido nucleico, o cualquier combinación de los mismos. Opcionalmente, el reovirus comprende uno o más de un segmento del genoma S4 que tiene una o más modificaciones de ácido nucleico, en el que una o más modificaciones de ácido nucleico en el segmento del genoma S4 se seleccionan del grupo que consiste en una A en la posición 74 y una A en la posición 624, numerada con relación al número de acceso del GenBank K02739, un segmento del genoma M2 que tiene al menos una modificación de ácido nucleico, en la que al menos una modificación de ácido nucleico comprende una C en la posición 248, numerada con respecto al número de acceso del GenBank M20161.1, un segmento del genoma L1 que comprende una o más modificaciones de ácido nucleico, en las que una o más modificaciones de ácido nucleico se seleccionan del grupo que consiste en una T en la posición 660, una G en la posición 817, una A en la posición 1687, una G en la posición 2283, un ATG en las posiciones 2284-2286, una C en la posición 2794, una C en la posición 2905, una C en la posición 2953, una A en la posición 3153, una G en la posición 3231, numeradas en relación con el número de acceso del GenBank M24734.1, o un segmento del genoma M1 que tiene al menos una modificación de ácido nucleico, en la que al menos una modificación de ácido nucleico comprende una T en la posición 1595, numerada con relación al número de acceso del GenBank AF461684.1.

Opcionalmente, el virus oncolítico es un virus oncolítico recombinante y/o un virus oncolítico modificado. Opcionalmente, el virus oncolítico modificado no inhibe la proteína quinasa activada por ARN bicatenaria (PKR).

Los kits proporcionados pueden incluir más de una dosis del virus oncolítico. Opcionalmente, cada dosis de virus oncolítico comprende aproximadamente 10^3 a 10^{12} unidades formadoras de placa (UFP) del virus oncolítico. Opcionalmente, cada dosis comprende aproximadamente 10^8 a 10^{12} UFP del virus oncolítico. Opcionalmente, cada dosis comprende aproximadamente 10^8 a 10^{12} TCID₅₀ del virus oncolítico. Opcionalmente, cada dosis comprende aproximadamente 1×10^{10} a 3×10^{10} TCID₅₀ del virus oncolítico.

Los kits proporcionados pueden incluir además uno o más agentes terapéuticos adicionales. Los agentes terapéuticos adicionales adecuados incluyen, entre otros, analgésicos, anestésicos, analépticos, corticosteroides, agentes anticolinérgicos, anticolinesterasas, anticonvulsivos, agentes antineoplásicos, inhibidores alostéricos, esteroides anabólicos, agentes antirreumáticos, agentes psicoterapéuticos, agentes de bloqueo neural, agentes antiinflamatorios, antihelmínticos, antibióticos, anticoagulantes, antifúngicos, antihistamínicos, agentes antimuscarínicos, agentes antimicobacterianos, agentes antiprotozoarios, agentes antivirales, dopaminérgicos, agentes hematológicos, agentes

inmunológicos, muscarínicos, inhibidores de proteasas, vitaminas, factores de crecimiento y hormonas.

Como se usa en el presente documento, los términos tratamiento, tratar, que trata o que mejora se refieren a un método para reducir los efectos de una enfermedad o afección o síntoma de la enfermedad o afección. Por lo tanto, en el método divulgado, el tratamiento puede referirse a una reducción o mejora del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en la gravedad de una enfermedad establecida o condición o síntoma de la enfermedad o condición. Por ejemplo, el método para tratar el cáncer se considera un tratamiento si hay una reducción del 10% en uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto en comparación con el control. Por lo tanto, la reducción puede ser una reducción de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% o cualquier porcentaje entre 10 y 100 en comparación con los niveles nativos o de control. Se entiende que el tratamiento no necesariamente se refiere a una cura o ablación completa de la enfermedad, afección o síntomas de la enfermedad o afección.

Como se usa en el presente documento, el término sujeto puede ser un vertebrado, más específicamente un mamífero (por ejemplo, un ser humano, caballo, cerdo, conejo, perro, oveja, cabra, primate no humano, vaca, gato, conejillo de indias o roedor), un pez, un ave o un reptil o un anfibio. El término no denota una edad o sexo en particular. Por lo tanto, los sujetos adultos y recién nacidos, ya sean machos o hembras, están destinados a ser cubiertos. Como se usa en el presente documento, el paciente o el sujeto pueden usarse indistintamente y pueden referirse a un sujeto con una enfermedad o trastorno. El término paciente o sujeto incluye sujetos humanos y veterinarios.

Se divulgan materiales, composiciones y componentes que pueden usarse para, pueden usarse junto con, pueden usarse en preparación para o son productos de los métodos y composiciones divulgados. Estos y otros materiales se divulgan en el presente documento, y se entiende que cuando se divulgan combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales, mientras que la referencia específica de cada una de las diversas combinaciones individuales y colectivas y la permutación de estos compuestos no se pueden divulgar explícitamente, cada uno se contempla y describe específicamente en este documento. Por ejemplo, si se divulga y discute un inhibidor y se discuten varias modificaciones que se pueden hacer a una serie de moléculas que incluyen el inhibidor, cada combinación y permutación del inhibidor, y las modificaciones que son posibles se contemplan específicamente a menos que específicamente se indique lo contrario. Asimismo, cualquier subconjunto o combinación de estos también se contempla y divulga específicamente. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta divulgación, incluidos, entre otros, las etapas en los métodos de uso de las composiciones divulgadas. Por lo tanto, si hay una variedad de etapas adicionales que se pueden realizar, se entiende que cada una de estas etapas adicionales se puede realizar con cualquier etapa del método específico o combinación de etapas del método de los métodos divulgados, y que cada combinación o subconjunto de combinaciones se contempla específicamente y se debe considerar divulgada.

Se han descrito varios aspectos. Sin embargo, se entenderá que se pueden hacer varias modificaciones. Además, cuando se describe una característica o etapa, se puede combinar con cualquier otra característica o etapa en el presente documento, incluso si la combinación no se indica explícitamente. En consecuencia, otros aspectos están dentro del alcance de las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1. La terapia con virus oncolítico permite un régimen reforzado de tratamiento de un agente quimioterapéutico en el cáncer de páncreas

En este documento se describen los resultados de un estudio de administración de carboplatino, paclitaxel y una cepa Dearing serotipo-3 de reovirus (Reolysin®) en comparación con carboplatino y paclitaxel en pacientes con cáncer de páncreas recurrente o metastásico. Los pacientes en el Grupo I recibieron paclitaxel como infusión intravenosa durante 3 horas y carboplatino como infusión intravenosa durante 30 minutos el día 1 de un ciclo de 21 días y Reolysin® como infusión intravenosa durante 60 minutos los días 1, 2, 3, 4 y 5 de un ciclo de 21 días. Este ciclo se repitió cada 21 días en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. Los pacientes en el Grupo II recibieron paclitaxel como una infusión intravenosa durante 3 horas y carboplatino como una infusión intravenosa durante 30 minutos el día 1 de un ciclo de 21 días. Este ciclo se repitió cada 21 días en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. Los pacientes en el Grupo I recibieron más ciclos de tratamiento que los pacientes en el Grupo II. Por lo tanto, en presencia de reovirus, los pacientes podían ser tratados con un mayor número de ciclos de tratamiento y, por lo tanto, un régimen reforzado de tratamiento en comparación con los pacientes que no recibieron reovirus, es decir, en ausencia de reovirus.

Ejemplo 2. La terapia con virus oncolítico permite un régimen reforzado de tratamiento de un agente quimioterapéutico en el cáncer de cabeza y cuello

En este documento se describen los resultados de un estudio de administración de carboplatino, paclitaxel y de la cepa Dearing serotipo-3 de reovirus (Reolysin®) en comparación con carboplatino y paclitaxel en pacientes con cáncer de cabeza y cuello refractario al platino. Los pacientes en el Grupo I recibieron 175 mg/m² de paclitaxel como una infusión intravenosa durante 3 horas y 5 AUC mg/mL de carboplatino como una infusión intravenosa durante 30 minutos el día 1 de un ciclo de 21 días y 3x10¹⁰ TCID₅₀ de Reolysin® como una infusión intravenosa durante 60 minutos los días 1, 2, 3, 4 y 5 de un ciclo de 21 días. Este ciclo se repitió cada 21 días en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. Los pacientes en el Grupo II recibieron 175 mg/m² de paclitaxel como una

5 infusión intravenosa durante 3 horas y 5 AUC mg/mL de carboplatino como una infusión intravenosa durante 30 minutos el día 1 de un ciclo de 21 días. Este ciclo se repitió cada 21 días en ausencia de progresión de la enfermedad o toxicidad inaceptable. Cinco (5) pacientes (6,02%) en el Grupo II tuvieron reducciones de dosis debido a neuropatía, mientras que ningún paciente (0%) en el Grupo I tuvo reducciones de dosis debido a neuropatía ($p = 0,0245$). Por lo tanto, los pacientes en el Grupo I recibieron un régimen reforzado de tratamiento en comparación con los pacientes en el Grupo II. Por lo tanto, en presencia de Reolysin®, los pacientes podían ser tratados con regímenes reforzados de tratamiento en comparación con los pacientes que no recibieron Reolysin®.

REIVINDICACIONES

1. Un virus oncolítico para uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto el virus oncolítico y un mayor número de ciclos de tratamiento con un agente quimioterapéutico en comparación con la terapia estándar, en la que el mayor número de ciclos de tratamiento comprende 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más ciclos de tratamiento con el agente quimioterapéutico, y en el que el virus oncolítico es un reovirus con No. de acceso IDAC 190907-01.
2. El virus oncolítico para uso de la reivindicación 1, en el que el agente quimioterapéutico es un compuesto de platino.
3. El virus oncolítico para uso de la reivindicación 2, en el que el compuesto de platino se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, satraplatino, picoplatino, nedaplatino y triplatino.
4. El virus oncolítico para uso de la reivindicación 1, en el que el agente quimioterapéutico es un taxano.
5. El virus oncolítico para uso de la reivindicación 4, en el que el taxano se selecciona del grupo que consiste en cabazitaxel, abraxano, paclitaxel y docetaxel.
6. El virus oncolítico para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el agente quimioterapéutico es un compuesto de platino y un taxano.
7. El virus oncolítico para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que se administran aproximadamente 10^3 a 10^{12} unidades formadoras de placa (UFP) del virus oncolítico al sujeto; o en el que aproximadamente 10^8 a 10^{12} UFP del virus oncolítico se administran al sujeto; o en el que aproximadamente 10^8 a 10^{12} TCID₅₀ del virus oncolítico se administran al sujeto.
8. El virus oncolítico para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el cáncer es activado por ras.