

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 463 678**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2003 E 03779569 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 1581257**

54 Título: **Composición que comprende echovirus EV1 y su uso**

30 Prioridad:

18.12.2002 AU 2002953436

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

28.05.2014

73 Titular/es:

**VIRALYTICS LIMITED (100.0%)
Suite 305, 66 Hunter Street
Sydney NSW 2000, AU**

72 Inventor/es:

SHAFREN, DARREN

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 463 678 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

Composición que comprende echovirus EV1 y su uso

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la eliminación de células anormales utilizando un virus. También se describe un método para seleccionar células para averiguar si son susceptibles a tratamiento con virus, así como composiciones farmacéuticas. La invención encuentra uso veterinario así como una amplia aplicación en el campo médico humano.

10

Antecedentes de la invención

El cáncer de ovario es una causa principal de morbilidad en la población femenina. En los ovarios se presentan varias neoplasias. El carcinoma epitelial del ovario es una de las malignidades ginecológicas más comunes y la quinta causa más frecuente de muerte por cáncer en mujeres, sucediendo la mitad de los casos en mujeres con edad superior a los 65.

15

De aproximadamente el 5% al 10% de los cánceres de ovario son familiares y se han identificado 3 patrones hereditarios distintos: cáncer de ovario solo, cánceres de ovario y mama, o cánceres de ovario y colon. El factor de riesgo más importante para cáncer de ovario es un historial familiar de un pariente de primer grado (madre, hija o hermana) con la enfermedad. El mayor riesgo aparecen en mujeres con 2 o más parientes de primer grado con cáncer de ovario. El riesgo es algo menor para mujeres con un pariente de primer grado y uno de segundo grado (abuela, tía) con cáncer de ovario. En la mayoría de las familias afectadas con síndrome de cáncer de mama y ovario o cáncer de ovario específico de sitio, la vinculación genética se ha hallado al locus BRCA1 en el cromosoma 17q21. BRCA2, también responsable en algunos casos de cáncer de ovario y mama hereditario, se ha mapeado por vinculación genética al cromosoma 13q12.

20

25

El riesgo durante toda su vida de desarrollar cáncer de ovario en pacientes que albergan mutaciones en la línea germinal en BRCA1 está sustancialmente aumentado sobre la población general. Dos estudios retrospectivos de pacientes con mutaciones en la línea germinal en BRCA1 sugieren que estas mujeres tienen supervivencia mejorada en comparación con mujeres BRCA1 negativas. Cuando se interpretan estos datos, debe considerarse que la mayoría de las mujeres con una mutación BRCA1 probablemente tienen miembros en la familia con un historial de cáncer de ovario y/o mama. Por lo tanto, estas mujeres pueden haber estado más alerta y haberse inclinado a participar en programas de exploración de cáncer que pueden haber conducido a su detección temprana. Para pacientes en riesgo aumentado, puede considerarse la ooforectomía profiláctica después de la edad de 35 si se ha completado la edad fértil. Sin embargo, el beneficio de la ooforectomía profiláctica aún no se ha establecido. Un pequeño porcentaje de mujeres puede desarrollar un carcinoma peritoneal primario, similar en aspecto al cáncer de ovario, después de la ooforectomía profiláctica (Xiao, C. *et al.*, 2001). Los carcinomas epiteliales son los tipos más comunes de cáncer de ovario. Los tumores en el estroma y de células germinales son relativamente raros y comprenden menos del 10% de los casos.

30

35

40

El cáncer de ovario habitualmente se propaga mediante desprendimiento local en la cavidad peritoneal seguida por implante en el peritoneo, y mediante invasión local del intestino y la vejiga. La naturaleza altamente letal de este tumor se debe a la ausencia de síntomas en mujeres con fases tempranas de esta enfermedad. Se ha informado de la incidencia de ganglios positivos en cirugía primaria tan elevada como del 24% en pacientes con enfermedad en fase I, del 50% en pacientes con enfermedad en fase II, del 74% en pacientes con enfermedad en fase III, y del 73% en pacientes con enfermedad en fase IV. Las células tumorales también pueden bloquear el sistema linfático diafragmático. La alteración resultante del drenaje linfático del peritoneo se cree que desempeña una tarea en el desarrollo de fluido ascítico en cáncer de ovario. Además, es habitual la propagación transdiafragmática a la pleura.

45

50

El pronóstico en cáncer de ovario está influenciado por varios factores, pero análisis multivariados sugieren que los factores favorables más importantes incluyen edad temprana, buen estado general, tipo celular diferente a células mucinosas y claras, fase inferior, tumor bien diferenciado, volumen de la enfermedad más pequeño antes de cualquier cirugía citoreductora, ausencia de fluido ascítico, y tumor residual más pequeño después de cirugía citoreductora primaria. Para pacientes con enfermedad en fase I, el factor pronóstico más importante es el grado, seguido por la adherencia densa y ascitis de gran volumen. El análisis citométrico de flujo de ADN de pacientes en fase I y en fase IIA puede identificar un grupo de pacientes de alto riesgo. Los pacientes con histología de células claras parecen tener un pronóstico peor. Pacientes con un componente significativo de carcinoma celular transitorio parecen tener un mejor pronóstico.

55

60

Aunque el antígeno asociado a cáncer de ovario, CA 125, no tiene significancia pronóstica cuando se mide en el momento del diagnóstico, tiene una elevada correlación con la supervivencia cuando se mide un mes después del tercer ciclo de quimioterapia para pacientes con enfermedad en fase III o fase IV (Rossmann, M.G. *et al.*, 2000). Para pacientes cuyo elevado CA 125 se normaliza con quimioterapia, más de un CA 125 elevado posterior es altamente predictivo de enfermedad activa, pero esto no obliga a terapia inmediata.

65

La mayoría de los pacientes tienen enfermedad extendida en el momento del diagnóstico porque el cáncer de ovario a menudo es asintomático en sus fases tempranas. Parcialmente como resultado de esto, la mortalidad anual en cáncer de ovario es de aproximadamente el 65% de la tasa de incidencia. Un seguimiento a largo plazo de pacientes en fase III y fase IV con cirugía citoreductora subóptima revela una tasa de supervivencia de 5 años de menos del 10% incluso con terapia de combinación basada en platino. No obstante, las fases tempranas de la enfermedad son curables en un elevado porcentaje de los pacientes.

Actualmente, el tratamiento para cánceres de ovario en fase tardía implica una histerectomía abdominal total, un examen cuidadoso de las superficies cerosas, e intentos por citarreducir toda la enfermedad residual habitualmente seguida por quimioterapia de combinación que incluye un análogo de platino. La tasa de supervivencia entonces está entre seis a cuarenta meses, siendo la supervivencia a largo plazo menor del diez por ciento.

Existe una investigación en curso con el objetivo de identificar moléculas que se expresen de forma diferencial en tumores de ovario benignos y malignos.

Se ha descubierto que los carcinomas de ovario expresan la integrina $\alpha_2\beta_1$ (Moser, T.L. *et al.*, 1996; Cannistra, S.A. *et al.*, 1995; Bartolazzi, A. *et al.*, 1993). $\alpha_2\beta_1$ promueve la diseminación metastásica de carcinoma epitelial de ovario humano mediante interacciones de unión específicas con colágeno de tipo I (Schiro, J.A. *et al.*, 1991; Cardarelli, P.M. *et al.*, 1992). La expresión superficial regulada positivamente de la integrina $\alpha_2\beta_1$ también se ha observado previamente en carcinoma gástrico humano.

La interacción de $\alpha_2\beta_1$ con colágeno de tipo I probablemente desempeña una tarea crítica en la siembra peritoneal así como en la metástasis, y la sobreexpresión de $\alpha_2\beta_1$ ha demostrado inducir propiedades metastásicas en células no metastásicas (Chan, B.M. *et al.*, 1991). El bloqueo de $\alpha_2\beta_1$ ha demostrado inhibir en gran medida la adhesión de carcinomas de ovario por colágeno de tipo I.

Los virus capaces de inducir lisis de células malignas a través de su proceso de replicación se conocen como virus oncolíticos. La mayoría de los virus oncolíticos requieren proliferación en la misma especie o linaje celular. La infección de una célula por un virus implica la adhesión y captación en la célula que conduce a o es coincidente con el desprendimiento de la cápsida viral, y posteriormente la replicación dentro de la célula.

Los virus oncolíticos evaluados para su capacidad de eliminar células cancerosas han incluido el virus adenoviral subtipo Egypt 101 que mostró actividad oncolítica en la línea celular de cáncer uterino/cuello del útero HeLa, el virus de las paperas para el tratamiento de carcinoma gástrico, carcinoma uterino y carcinoma cutáneo, el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), el virus de la influenza para el tratamiento de cáncer de ovario, y adenovirus para el tratamiento de carcinoma cervical (Nemunaitis J; 1999). Otros informes han indicado que los adenovirus y recombinantes de poliovirus atenuados pueden tener uso en el tratamiento de células malignas de glioma (por ejemplo, Andreansky S.S., 1996), y que el reovirus muestra capacidad lítica en células de glioblastoma humanas U87 y células NIH-3T3 con una vía de señalización Ras activada (por ejemplo, Strong J.E. *et al.*, 1998).

También se ha usado un oncolisado de vaccinia en ensayos clínicos para el tratamiento de pacientes con melanoma (fase II) (Nemunaitis J., 1999). Se ha demostrado que virus del herpes simple (HSV) no neurovirulentos modificados se muestran prometedores para el tratamiento de tumores cerebrales incluyendo melanoma intracraneal, y melanoma humano subcutáneo (Randazzo B.R., 1997), mientras que se ha informado de que infección con adenovirus potencia la eliminación de células de melanoma por la mitotoxina vegetal, saporina (Satyamoorthy K., 1997).

El receptor en las células diana reconocido por el adenovirus difiere para diferentes tipos de adenovirus. Es decir, los subgrupos A, C, D, E y F de adenovirus por ejemplo reconocen el receptor CAR mientras que el tipo 5 de adenovirus (subgrupo C), el tipo 2 de adenovirus (subgrupo C) y subtipo 9 de adenovirus (subgrupo D) reconocen la molécula de histocompatibilidad clase II, $\alpha_m\beta_2$ e integrinas α_v , respectivamente. Se sabe que el receptor CAR se expresa en líneas células de melanoma.

El sulfato de heparán se reconoce por los tipos 1 y 2 del virus del herpes simple y el virus 7 del herpes humano, el virus adeno-asociado tipo 2. El receptor para el virus del herpes humano 7 es CD4 mientras que el virus de Epstein-Barr reconoce el receptor del complemento Cr2 (CD21). El poliovirus tipo 1 y 2 reconocen el receptor de poliovirus (Pvr) para la adhesión celular mientras que el reovirus reconoce ácido siálico. El virus de la influenza A y B reconocen el ácido siálico ácido N-acetil neuramínico para la adhesión celular. En contraste, el virus de la influenza tipo C reconoce el ácido siálico ácido 9-O-acetil neuramínico. El virus vaccinia reconoce tanto el receptor del factor de crecimiento epidérmico como sulfato de heparán. Los Coxsackievirus A13, A15, A18 y A21 reconocen ICAM-1 y la proteína reguladora del complemento DAF (CD55) (véase, por ejemplo, Shafren D.R., *et al.* 1997). La solicitud de patente internacional n° PCT/AU00/01461 describe la administración de Coxsackievirus que reconoce ICAM-1 para la infectividad celular a un sujeto para la lisis de células de melanoma que expresan ICAM-1. DAF también se reconoce por el enterovirus 70 (véase, por ejemplo, Flint SJ, *et al.* (2000) Principles of Virology:molecular biology, pathogenesis and control. ASM Press, Washington).

Se ha presentado un estudio para evaluar la adaptabilidad de células de ovario a subcultivo y su uso potencial para la detección de virus (Harris, RE and Pindak, FF, 1975). En el estudio, se expusieron cultivos de células normales de ovario con una amplia gama de virus incluyendo picornavirus tales como Coxsackievirus A, Coxsackievirus B, poliovirus, echovirus y cardiovirus y serotipos de los mismos; paramixovirus tales como el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus del sarampión, el virus del moquillo; el subgrupo de adenovirus humano serotipos 3, 4, 7 y 21; el virus del herpes simple, Tipo 1; togavirus tales como Sindbis y Mararo; reovirus serotipos 1 a 3; y virus vaccinia. El estudio demostró que células de ovarios humanos pueden cultivarse a largo plazo en cultivo celular y pueden pasarse una cantidad indeterminada de veces para la propagación de diversos virus *in vitro* y se propuso que dichos cultivos pueden ser útiles con el fin de estudiar la patogénesis viral y patología de la infección viral. El informe sugirió adicionalmente que como algunos virus tales como poliovirus y vaccinia han demostrado cruzar la placenta humana e infectar el feto, el estudio de interacciones virales con células normales de ovario en cultivo puede ser un medio para ampliar investigaciones teratogénicas.

La propagación del tumor metastásico es un proceso patológico asociado con una serie de eventos de adhesión/des-adhesión acoplados con degradación tisular regulada. La adhesión a y migración a través de la matriz extracelular es esencial para la invasión del tumor. A pesar del progreso que se ha hecho en el tratamiento de las neoplasias, el tratamiento del cáncer incluyendo neoplasias de ovario presenta un reto principal para la investigación y sigue existiendo la necesidad de alternativas a los enfoques existentes de terapia.

La técnica previa incluye: Ferdat, A. K. et al (1989) Immunomodulation mechanisms in the anti-tumour effect of the ECHO-7 enterovirus. EKSP ONKOL. Vol. 11, nº 5, 43-48.

Documento WO 01/37866 (The University of Newcastle research associates limited)

Ward, T. et al (1994) Decay-accelerating factor CD55 is identified as the receptor for echovirus 7 using CELICS, a rapid immune-focal cloning method. EMBO Journal vol. 13, no. 21, 5070-5074.

Wang, J.-h. (2002) Protein recognition by cell surface receptors: physiological receptors versus virus interactions. TIBS Vol. 27, No. 3, 122-126.

Bergelson, J.M. et al (1992) Identification of the integrin VLA-2 as receptor for echovirus. Science Vol. 235, 1718 - 1720.

Buczek-Thomas, J.A. et al (1998) Integrin-mediated adhesion and signalling in ovarian cancer cells. Cell. Signal. Vol. 10, 55-63.

Huttunen, P. et al (1998) Echovirus 1 infection induces both stress- and growth-activated mitogen-activated protein kinase pathway and regulates the transcription of cellular immediate-early genes. Virology 250, 85-93.

Peitainen, V. et al (2000) Effects of EV1 infection on cellular gene expression. Virology 276, 243-250.

Smyth, M. et al (2002) Bovine enterovirus as an oncolytic virus: foetal calf serum facilitates its infection of human cells. J. Molecular medicine 10, 49-53.

45 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la observación de que la eliminación significativa de células anormales tales como células cancerosas que expresan la integrina $\alpha_2\beta_1$ puede conseguirse utilizando echovirus que reconoce la integrina $\alpha_2\beta_1$ para la infectividad celular.

Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención se proporciona echovirus EV1 para su uso en el tratamiento en células cancerosas de mamífero que expresan integrina $\alpha_2\beta_1$. EV1 reconoce la integrina $\alpha_2\beta_1$ para la infectividad de las células de modo que al menos algunas de las células se eliminan por el virus.

La expresión "células anormales" usada en este documento debe adoptarse en el sentido más amplio para incluir células malignas, las células de cualquier crecimiento anormal, y cualquier célula que tenga expresión regulada positivamente anormal de integrina $\alpha_2\beta_1$ con relación a células normales correspondientes del mismo tipo celular que expresan su fenotipo normal, sean las células o no células cancerosas y proliferen o no las células a una tasa anormal. Por consiguiente, la expresión abarca células pre-neoplásicas y neoplásicas, y células que pueden o no desarrollarse finalmente en células cancerosas. Un crecimiento anormal puede ser, por ejemplo, un tumor benigno o maligno. Las células anormales habitualmente serán células malignas. Generalmente, las células anormales tendrán expresión regulada positivamente de $\alpha_2\beta_1$ en comparación con el tejido adyacente en que se hallan las células anormales. Por tanto, el virus típicamente infectará de forma preferente las células anormales debido a la mayor probabilidad de contacto de $\alpha_2\beta_1$ en esas células. Por tanto, el virus puede usarse para abordar de forma eficaz las células anormales.

El uso del echovirus de la invención es particularmente adecuado para tratar cáncer de ovario en un paciente o cáncer que sea metastatizado desde un tumor primario de ovario. Sin embargo, la invención no se limita al tratamiento de dichos cánceres y los métodos descritos en este documento encuentran aplicación en el tratamiento de otros cánceres incluyendo melanoma y tumores de próstata así como cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, y cánceres secundarios que se han propagado a partir de los mismos a otros sitios en el organismo. Por ejemplo, el virus puede administrarse a células cancerosas de melanoma en áreas del organismo diferentes a la piel del mamífero. Por consiguiente, el echovirus de la invención puede usarse en el tratamiento de una neoplasia donde la neoplasia ha metastatizado hasta un sitio o tejido en el mamífero no asociado normalmente con infección por echovirus.

Típicamente, el virus se administrará al mamífero como un virus vivo, completo. Como alternativa, el ácido nucleico que codifica el genoma viral o una parte suficiente del mismo para la generación del virus puede, por ejemplo, administrarse para su captación por las células y generación de virus vivo completo dentro de las células. El ácido nucleico puede comprender una única molécula de ARN o ADN o una pluralidad de estas moléculas que codifican las diferentes proteínas virales, respectivamente.

El virus también puede usarse para seleccionar células anormales para averiguar por ejemplo si el virus puede ser adecuado para tratar al mamífero del cual se obtuvieron las células o si podría ser beneficioso un protocolo de tratamiento diferente que no implique el virus. A la inversa, pueden seleccionarse diferentes echovirus y/o formas modificadas o combinaciones de los mismos usando muestras de células recogidas del mamífero para seleccionar el virus más apropiado para tratar al mamífero.

Por consiguiente, un método para explorar una muestra de células anormales de un mamífero para su susceptibilidad a muerte celular inducida por virus para evaluar la administración del virus al mamífero para el tratamiento de las células anormales, puede comprender las etapas de:

- (a) proporcionar la muestra de las células anormales del mamífero;
- (b) tratar las células con el virus durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la infección de las células por el virus; y
- (c) determinar si el virus ha infectado y causado muerte de al menos algunas de las células anormales;

donde el virus se selecciona entre echovirus, y formas modificadas y combinaciones de los mismos, que reconoce $\alpha_2\beta_1$ para la infectividad de las células anormales.

Puede seleccionarse un virus para la invención ensayando si un virus dado es capaz de infectar y eliminar al menos algunas de las células anormales en la muestra. En particular, el ensayo puede implicar explorar varios virus diferentes incubando cada virus con una muestra de las células anormales respectivamente, y determinar si las células se eliminan como resultado de la infección por el virus.

Un método para seleccionar un virus por su capacidad de infectar y causar muerte de células anormales de un mamífero para evaluar la administración del virus al mamífero para el tratamiento de las células anormales comprende las etapas de:

- (a) seleccionar el virus;
- (b) tratar una muestra de las células anormales del mamífero con el virus durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la infección de las células por el virus; y
- (c) determinar si el virus ha infectado y causado muerte de al menos algunas de las células anormales;

donde el virus se selecciona entre echovirus, y formas modificadas y combinaciones de los mismos, que reconocen $\alpha_2\beta_1$ para la infectividad de las células anormales.

El método también puede comprender la etapa de comparar la capacidad del virus seleccionado de infectar y causar la muerte de las células con la de otro echovirus o forma modificada del mismo sometido a las etapas (d) y (c) utilizando otra muestra de las células y que reconoce $\alpha_2\beta_1$ para la infectividad celular.

La muerte de las células típicamente resultará de la infección de las células por el virus, y puede causarse por lisis de las células debido a la replicación intracelular del virus o por la infección que desencadena apoptosis muy probablemente como resultado de la activación de caspasas celulares. Una vez lisadas, los contenidos citosólicos de las células infectadas pueden derramarse desde las membranas plasmáticas rotas, y pueden liberarse antígenos incluyendo antígenos de superficie celular capaces de provocar una respuesta inmune contra las células anormales. Por tanto, el tratamiento de células anormales en un mamífero de acuerdo con un método de la invención puede proporcionar un refuerzo a la inmunidad del mamífero contra las células anormales.

Un método para inducir una respuesta inmune en un mamífero contra células anormales que expresan $\alpha_2\beta_1$ comprende infectar células anormales en el mamífero con virus seleccionado entre echovirus, formas modificadas y combinaciones de los mismos, que reconocen $\alpha_2\beta_1$ para la infectividad de las células anormales y donde se causa la lisis de al menos algunas de las células.

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

Generalmente, el virus se proporcionará en forma de una composición farmacéutica. Dicha composición farmacéutica para tratar células anormales en un mamífero puede comprender un inoculante para generar virus para tratar las células de modo que al menos algunas de las células se eliminen por el virus junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el virus se selecciona entre echovirus, y formas modificadas y combinaciones de los mismos, que reconocen $\alpha_2\beta_1$ para la infectividad de las células.

Como alternativa, el inoculante para generar virus puede inducir una respuesta inmune contra células anormales en un mamífero.

El echovirus utilizado en la invención definido en las reivindicaciones será un echovirus EV1.

Aunque el virus habitualmente será un echovirus animal común, la invención no se limita al mismo y puede utilizarse un virus recombinante modificado por ingeniería para que sea capaz de infectar y eliminar las células anormales, o un virus que por ejemplos se ha modificado de otro modo para potenciar su capacidad de infectar y eliminar las células.

El mismo virus puede administrarse al mamífero durante diferentes ciclos de tratamiento. Preferiblemente, sin embargo, se usan diferentes virus para diferentes ciclos de tratamiento para evitar o menguar el efecto potencial de cualquier respuesta inmune contra el virus previo administrado. Puede usarse echovirus EV8 o EV22 con el EV1. Un virus, por ejemplo, puede administrarse por vía tópica, intratumoral o sistémica al mamífero.

El mamífero puede ser cualquier mamífero que necesite tratamiento de acuerdo con la invención. Típicamente, el mamífero será un ser humano.

La invención puede usarse como auxiliar para otro tratamiento de las células anormales tal como un tratamiento convencional contra el cáncer, o como un tratamiento en ausencia de otros tratamientos terapéuticos. En particular, la invención puede utilizarse cuando el tratamiento convencional no es adecuado o práctico, o en el caso en que la escisión de las células anormales puede conducir a cicatrización o desfiguración que es inaceptable para el paciente, particularmente de la cara del paciente tal como de su nariz o labio. El virus puede administrarse al paciente antes de y/o después de la escisión de las células anormales. La administración después de la escisión puede eliminar las células anormales residuales que quedan en el tejido adyacente.

Puede usarse un tratamiento terapéutico después del diagnóstico de la neoplasia en fase temprana y fase tardía, y que halle aplicación adicional en la eliminación de células anormales antes de y lo que queda después de cirugía. Usando protocolos descritos en este documento los especialistas serán capaces de seleccionar fácilmente un virus adecuado y determinar cuáles de las células anormales son susceptibles a infección que conduzca a la muerte de las células.

Puede usarse un aplicador para aplicar un inoculante a un mamífero para generar virus para tratar células anormales en el mamífero, donde el aplicador comprende una región impregnada con el inoculante, de modo que el inoculante esté en contacto con el mamífero, y el virus se selecciona entre echovirus, y formas modificadas y combinaciones de los mismos, que reconocen $\alpha_2\beta_1$ para la infectividad de las células.

Durante toda esta memoria descriptiva la palabra "comprende", o variaciones tales como "comprenden" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un elemento indicado, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, entero o etapa, o grupo de elementos, enteros o etapas.

Cualquier análisis de documentos, rutinas, materiales, dispositivos, artículos o similares que se han incluido en la presente memoria descriptiva son únicamente con fines de proporcionar un contexto para la presente invención. No debe tomarse como admisión que todas o alguna de estas materias formen parte de la técnica previa básica o sean conocimiento general común en el campo relevante de la presente invención que existía en cualquier otra parte antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

Se exponen aspectos adicionales de la invención en las reivindicaciones adjuntas.

Las características y ventajas de la invención llegaran a ser evidentes adicionalmente a partir de la siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la invención.

Breve descripción de las figuras

- 5 La **Figura 1** muestra el análisis citométrico de flujo de los niveles de ICAM-1, CAR, DAF y $\alpha_2\beta_1$ expresados en superficie sobre la superficie de células cancerosas de mama. Las células cancerosas de mama se incubaron con fragmento F(ab')₂ conjugado con R-ficoeritrina de inmunoglobulina de cabra anti-ratón en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales correspondientes específicos para estos receptores. La media geométrica de la muestra de conjugado se sustrajo de la media geométrica de la muestra de receptor de enterovirus revelando el nivel relativo de expresión del receptor.
- 10 La **Figura 2** muestra la infección lítica de células cancerosas de mama por los enterovirus CAV21, CVB3, EV1, EV7 y PV1. Se calcularon los títulos con punto final del cincuenta por ciento y la oncolisis se consideró significativa si el límite TCID₅₀/ml era 10⁴ o mayor.
- 15 La **Figura 3** muestra el análisis citométrico de flujo de los niveles de ICAM-1, CAR, DAF y $\alpha_2\beta_1$ expresados en superficie sobre la superficie de células cancerosas colorrectales. Las células cancerosas colorrectales se incubaron con fragmento F(ab')₂ conjugado con R-ficoeritrina de inmunoglobulina de cabra anti-ratón en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales correspondientes específicos para estos receptores. La media geométrica de la muestra de conjugado se sustrajo de la media geométrica de la muestra de receptor de enterovirus revelando el nivel relativo de expresión del receptor.
- 20 La **Figura 4** muestra la infección lítica de células cancerosas colorrectales por los enterovirus CAV21, CVB3, EV1, EV7 y PV1. Se calcularon los títulos con punto final del cincuenta por ciento y la oncolisis se consideró significativa si el límite TCID₅₀/ml era 10⁴ o mayor.
- 25 La **Figura 5** muestra el análisis citométrico de flujo de los niveles de ICAM-1, CAR, DAF y $\alpha_2\beta_1$ expresados en superficie sobre la superficie de células cancerosas de próstata o pancreáticas. Las células cancerosas de próstata o pancreáticas se incubaron con fragmento F(ab')₂ conjugado con R-ficoeritrina de inmunoglobulina de cabra anti-ratón en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales correspondientes específicos para estos receptores. La media geométrica de la muestra de conjugado se sustrajo de la media geométrica de la muestra de receptor de enterovirus revelando el nivel relativo de expresión del receptor.
- 30 La **Figura 6** muestra la infección lítica de células cancerosas de próstata o pancreáticas por los enterovirus CAV21, CVB3, EV1, EV7 y PV1. Se calcularon los títulos con punto final del cincuenta por ciento y la oncolisis se consideró significativa si el límite TCID₅₀/ml era 10⁴ o mayor.
- 35 La **Figura 7** muestra el análisis citométrico de flujo de los niveles de ICAM-1, CAR, DAF y $\alpha_2\beta_1$ expresados en superficie sobre la superficie de células cancerosas de ovario. Las células cancerosas de ovario se incubaron con fragmento F(ab')₂ conjugado con R-ficoeritrina de inmunoglobulina de cabra anti-ratón en presencia o ausencia de anticuerpos monoclonales correspondientes específicos para estos receptores. La media geométrica de la muestra de conjugado se sustrajo de la media geométrica de la muestra de receptor de enterovirus revelando el nivel relativo de expresión del receptor.
- 40 La **Figura 8** muestra la infección lítica de células cancerosas de ovario por los enterovirus CAV21, CVB3, EV1, EV7 y PV1. Se calcularon los títulos con punto final del cincuenta por ciento y la oncolisis se consideró significativa si el límite TCID₅₀/ml era 10⁴ o mayor.
- 45 La **Figura 9A** muestra fotomicrografías de monocapas de células cancerosas de ovario infectadas durante 72 horas con una dilución 10⁻¹ de EV1. En esta multiplicidad de introducción viral, todas las líneas celulares presentaron niveles significativos de oncolisis por EV1 (derecha) excluyendo la línea celular A2780.
- 50 La **Figura 9B** muestra fotomicrografías de monocapas de células cancerosas de ovario infectadas durante 72 horas con una dilución 10⁻¹ de EV1. Todas las líneas celulares presentaron niveles significativos de oncolisis por EV1 (derecha) excluyendo la línea células SKOV-3.
- 55 La **Figura 10** muestra infección lítica de células cancerosas de ovario con EV1. Siete de las diez líneas celulares se consideran susceptibles a oncolisis por EV1. La oncolisis se consideró significativa si un título viral (TCID₅₀/ml) calculado era 10⁴ o mayor.
- 60 La **Figura 11** muestra la unión de EV1 inhibida en presencia de anti- $\alpha_2\beta_1$. Unión de EV1 marcado con [³⁵S]-metionina a líneas celulares de cáncer de ovario en presencia y ausencia de MAb anti- $\alpha_2\beta_1$ o anti-DAF. Se determinaron los niveles de virus marcado con [³⁵S]-metionina unido por recuento de centelleo líquido en una Microbeta TRILUX 1450 (Wallac, Finlandia).
- 65 La **Figura 12** muestra la infección lítica de las líneas celulares de cáncer de ovario OWA-42 e IGROV-1 por EV1 en presencia o ausencia de MAb anti- $\alpha_2\beta_1$, 72 horas después de la infección, las células pre-incubadas con el

MAB anti- $\alpha_2\beta_1$ permanecieron completamente protegidas. La supervivencia celular se determinó tiñendo con solución metanólica de cristal violeta.

La **Figura 13** muestra la infección lítica de monocapas de células cancerosas de ovario OWA-42 por EV1 en presencia o ausencia de MAB anti- $\alpha_2\beta_1$. Se tomaron fotomicrografías a las 24, 48 y 72 horas después de la infección, lo que demuestra la protección completa de las células de infección por EV1 debido al bloqueo por anticuerpo monoclonal del receptor $\alpha_2\beta_1$.

La **Figura 14** muestra células cancerosas de ovario DOV13 que se cultivaron dentro del inserto anular y se cultivaron células HeLa (células fibroblásticas humanas) en el anillo exterior. Después de la infección con EV1 se tiñeron las células viables con solución metanólica de cristal violeta. EV1 infectó específicamente las células cancerosas de ovario mientras que las células HeLa permanecieron sanas.

La **Figura 15** muestra análisis citométrico de flujo del nivel de $\alpha_2\beta_1$ expresado en superficie sobre la línea celular de melanoma SkMel28. Las células SkMel28 se incubaron con fragmento F(ab')₂ conjugado con R-ficoeritrina de inmunoglobulina de cabra anti-ratón en presencia o ausencia de $\alpha_2\beta_1$. La media geométrica de la muestra de conjugado se sustrajo de la media geométrica de la muestra determinando el desplazamiento y por tanto la expresión del receptor. Se demuestra una expresión significativa de $\alpha_2\beta_1$ debido al desplazamiento en la media geométrica.

La **Figura 16** muestra la unión de EV1 marcado con [³⁵S]-metionina a células de melanoma SkMel28 en presencia y ausencia de MAB anti- $\alpha_2\beta_1$ o anti-DAF. Se determinaron los niveles de virus marcado con [³⁵S]-metionina unido por recuento de centelleo líquido en una Microbeta TRILUX 1450 (Wallac, Finlandia). El bloqueo de $\alpha_2\beta_1$ provocó la inhibición significativa de la unión de EV1. Los resultados se expresan como la media de muestras triplicadas \pm error típico.

La **Figura 17** muestra la infección lítica de células de melanoma SkMel28 con EV1. La supervivencia celular se determinó mediante solución metanólica de cristal violeta. Puede observarse lisis significativa.

La **Figura 18** es una fotomicrografía que muestra el tratamiento de esferoides multicelulares de cáncer de ovario con EV1.

La **Figura 19A** es un histograma que muestra el cambio en el peso corporal de ratones SCID a los que se ha administrado $1,0 \times 10^6$ células OVHS-1 mediante vía intraperitoneal (i.p) 3 semanas antes de la inyección con solución salina tamponada con fosfato (PBS), echovirus EV1 inactivado por UV o EV1 infeccioso (10^5 TCID₅₀) mediante vía i.p.

La **Figura 19B** muestra las fotografías tomadas 5 semanas después de la inyección de un ratón SCID de control normal en comparación con ratones inyectados con las células OVHS-1 y tratados con PBS, EV1 inactivado por UV o EV1. Obsérvese el desarrollo de ascitis peritoneal en ratones que albergan tumor administrado con PBS o EV1 inactivado por UV.

Descripción detallada de realizaciones preferidas de la invención

Para determinar si un virus es capaz de infectar y causar la muerte de células de un tumor, puede tomarse una biopsia del tumor y prepararse una preparación de células usando técnicas convencionales antes de: (i) confirmar la expresión en superficie celular del receptor del virus y (ii) exponer las células con el virus y controlar las células para infección y muerte celular durante un periodo predeterminado de incubación, típicamente aproximadamente 2 días aunque esto puede variar dependiendo del virus usado. La expresión de $\alpha_2\beta_1$ puede confirmarse fácilmente por análisis citométrico de flujo. Pueden explorarse varios virus de este modo simultáneamente utilizando diferentes alícuotas de las células malignas preparadas, el virus que muestra el mayor grado de infectividad y muerte celular después puede seleccionarse para su administración al sujeto del que se tomó la biopsia. Asimismo, pueden emplearse diferentes preparaciones de células malignas de biopsias tomadas de diferentes fuentes en un ensayo usando un virus específico. Las biopsias pueden recogerse de diferentes sitios de un único individuo o de varios individuos.

Un virus usado en un método descrito en este documento causará de forma deseable pocos síntomas clínicos o solamente minoritarios en el destinatario. Dichos virus se pueden obtener fácilmente de fuentes comerciales bien conocidas para los especialistas y pueden seleccionarse por su eficacia en los presentes métodos del modo descrito anteriormente. De forma deseable, el virus normalmente será un echovirus seleccionado entre el grupo que consiste en Echovirus EV1 y Echovirus EV8. Cada uno de estos virus reconoce $\alpha_2\beta_1$ para la infectividad celular. EV1 se ha asociado, por ejemplo, con enfermedades respiratorias de la región media superior y también pleurodinia (Fields B. N. et al., 2000; McCracken A. W. et al., 1969).

Se cree que la expresión de $\alpha_2\beta_1$ está regulada positivamente en carcinomas de ovario debido a la matriz prevalente de colágeno I que se encuentra en el mesotelio. También se ha demostrado que numerosos melanomas malignos expresan niveles regulados positivamente de $\alpha_2\beta_1$ (Kramer R. H. y Marks N, 1989; Ramos D. M. et al., 1990). EV1 y el colágeno se adhieren a $\alpha_2\beta_1$ usando diferentes restos en el dominio I de la subunidad $\alpha_2\beta_1$ (Bergelson J.H. 1993).
 5 La integrina $\alpha_2\beta_1$ no puede acomodar simultáneamente EV1 y colágeno. Sin embargo, el virus se une a $\alpha_2\beta_1$ con un aumento de 10 veces en la afinidad en comparación con colágeno I (Xing L, 2002).

Con el fin de seleccionar un virus dado para averiguar si es capaz de infectar y causar la muerte de células malignas, pueden usarse líneas celulares malignas en lugar de células malignas primarias aisladas de una biopsia.

10 El virus seleccionado se inyectará preferiblemente de forma directa en varios sitios en un tumor maligno para maximizar el área para una infección potencial del tumor por el virus. En lugar del virus intacto, pueden inyectarse plásmidos virales u otros plásmidos o vectores de expresión que incorporan ácido nucleico para la generación del virus en el tumor para su captación por las células tumorales y la generación de virus intacto dentro de las células para realizar el tratamiento. Los vectores de expresión adecuados incluyen plásmidos con capacidad de expresión de un inserto de ADN (por ejemplo, ADN genómico o ADNc) que codifica proteínas virales necesarias para la generación del virus. Un vector de expresión típicamente incluirá secuencias de control regulador de la transcripción a las cuales está unido de forma funcional el ácido nucleico insertado. Por "unido de forma funcional" se entiende el que el inserto de ácido nucleico está unido a las secuencias de control regulador de la transcripción para permitir la transcripción de la secuencia o secuencias insertadas sin un desplazamiento en la fase de lectura del inserto. Dichas secuencias de control regulador de la transcripción incluyen promotores para facilitar la unión de la ARN polimerasa para iniciar la transcripción, y elementos de control de la expresión para posibilitar la unión de los ribosomas al ARNm transcrito.

25 Más particularmente, debe aceptarse que la expresión "secuencia de control regulador" como se usa en este documento abarca cualquier ADN que esté implicado en dirigir la transcripción y controlar (es decir, regular) el niveles de transcripción de una secuencia dada de ADN. Por ejemplo, una secuencia de control 5' reguladora es una secuencia de ADN localizada cadena arriba de una secuencia codificante y que puede comprender el promotor y la secuencia líder no traducida 5'. Una secuencia de control 3' reguladora es una secuencia de ADN localizada cadena abajo de la secuencia o secuencias codificantes, que pueden comprender señales adecuadas de terminación de la transcripción (y/o) regulación, incluyendo una o más señales de poliadenilación. Como se usa en este documento, el término "promotor" abarca cualquier secuencia de ADN que se reconoce y une (directa o indirectamente) por una ARN polimerasa dependiente de ADN durante el inicio de la transcripción. Un promotor incluye el sitio de inicio de la transcripción, y sitios de unión para factores de inicio de la transcripción y la ARN polimerasa, y puede comprender otros diversos sitios o secuencias (por ejemplo, potenciadores), a los cuales pueden unirse las proteínas reguladoras de la expresión génica.

Se conocen en la técnica numerosos vectores de expresión adecuados para la transfección de células de mamífero. Los vectores de expresión adecuados para la transfección de células de mamífero incluyen pSV2neo, pEF-PGK puro, pTk2 y vectores lanzadera adenovirales no replicantes que incorporan el sitio de poliadenilación y el promotor del factor de elongación factor 1-x y vectores de expresión basados en pAdEasy que muy preferiblemente incorporan un promotor de citomegalovirus (CMV) (por ejemplo, véase He et al., 1998). El plásmido pEFBOS que emplea el factor- alfa 2 de elongación de polipéptido como promotor también puede utilizarse.

45 El ADNc que codifica las proteínas virales necesarias para la generación del virus puede prepararse por transcripción inversa del genoma de ARN viral o fragmentos del mismo y incorporarse en un vector adecuado utilizando técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica como describe en, por ejemplo Sambrook et al (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Nueva York, y Ausubel et al., (1994), Current Protocols in Molecular Biology, USA, Vol. 1 y 2.

50 El lugar de ADNc, las células pueden transfectarse con ARN viral extraído de viriones purificados o, por ejemplo, pueden generarse transcritos de ARN in vitro a partir de moldes de ADNx utilizando la ARN polimerasa del bacteriófago T7 como se describe en Ansardi D C., et al., 2001. Asimismo, puede administrarse un único plásmido o molécula de ARN para la expresión de proteínas virales y la generación de virus, o puede administrarse una pluralidad de plásmidos o moléculas de ARN que codifican proteínas virales diferentes para transfectar las células y la generación del virus.

60 Los plásmidos o el ARN pueden administrarse directamente a tumores de forma tópica o por inyección para su captación por las células tumorales en ausencia de un vehículo portador para facilitar la transfección de las células o en combinación con dicho vehículo. Los vehículos portadores adecuados incluyen liposomas típicamente proporcionados en forma de una emulsión de aceite-en-agua convencionalmente conocida en la técnica. Los liposomas típicamente comprenderán una combinación de lípidos, particularmente fosfolípidos tales como fosfolípidos con elevada temperatura de transición de fase habitualmente con uno o más esteroides o precursores de esteroides tales como colesterol para proporcionar estabilidad de membrana a los liposomas. Ejemplos de lípidos útiles para proporcionar liposomas incluyen compuestos de fosfatidilo tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, esfingolípidos, fosfatidiletanolamina, cerebrósidos y gangliósidos. Los diacil fosfatidilgliceroles son particularmente adecuados, donde el resto lípido contiene de 14 a 18 átomos de carbono y más preferiblemente de

16 a 18 átomos de carbono, y está saturado.

La interacción de los liposomas con las células diana puede ser pasiva o activa. El abordamiento activo implica la modificación del liposoma mediante la incorporación en la membrana liposómica de un ligando específico que se une o interacciona de otro modo con el ligando correspondiente expresado por las células diana. Dichos ligandos incluyen, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión del mismo (por ejemplo, un fragmento Fab o $F(ab')_2$), un resto de azúcar o glucolípido, o una proteína viral, las proteínas virales o anticuerpos monoclonales específicos para $\alpha_2\beta_1$, son particularmente preferidos.

Normalmente, también se inyectará el tejido que rodea el tumor o se tratará de otro modo con el virus dada la posibilidad de que haya células malignas presentes en el tejido. Si el tumor no se detecta hasta que esté relativamente avanzado, puede inyectarse el tejido adyacente con el virus después de escisión quirúrgica del propio tumor.

En lugar de inyectarse directamente en un tumor maligno, el inoculante puede administrarse sistémicamente por inyección intravenosa en el torrente sanguíneo del destinatario en una localización adyacente al sitio del tumor para su suministro al tumor. Asimismo, el inoculante puede administrarse por vía subcutánea, intraperitoneal o por ejemplo, intramuscular si se considera apropiado. Generalmente, sin embargo, cuando se administra virus intacto, se prefiere inyección directa en el tumor dada la posibilidad de la existencia de anticuerpos específicos para el virus y de este modo la potencial eficacia disminuida de modos alternativos de suministro del virus.

El inoculante también puede aplicarse de forma tópica a los tumores solo o en combinación con inyección directa del inoculante en el tumor. El tratamiento tópico del tumor puede conseguirse por aplicación gota a gota de una composición farmacéutica que comprende el inoculante y un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para mantener la integridad del inoculante para infección de las células malignas o restregando el tumor con un aplicador impregnado con dicha composición. El aplicador puede comprender una torunda o almohadilla de material adecuado que se ha sumergido en la composición. En el caso de tratamiento de melanoma sobre la piel, el inoculante puede aplicarse mediante un aplicador impregnado con el inoculante y que está adaptado para mantenerse contra el sitio maligno a tratar de modo que el inoculante esté en contacto con la piel. En este caso, el aplicador puede comprender un parche, torunda o similar impregnado con el inoculante y que se proporciona adicionalmente con una superficie o superficies adhesivas tal como en el caso de una tirita, para adherirse a la piel que rodea al melanoma y de este modo mantener el inoculante en contacto con el melanoma. Típicamente, el virus intacto se administrará al mamífero para realizar el tratamiento.

Generalmente, se harán una o más pequeñas incisiones en la neoplasia y/o el tejido adyacente para proporcionar un sitio de entrada para el virus en el mismo.

En el caso de cáncer de ovario, o cáncer en las cercanías del ovario, el echovirus puede suministrarse directamente al ovario o sitio afectado usando un catéter u otro instrumento adecuado de aplicación mediante inserción del catéter o instrumento seleccionado a lo largo de la trompa de Falopio correspondiente.

El vehículo farmacéuticamente aceptable usado para inocular al destinatario con virus y/o ácido nucleico o plásmidos que comprenden ácido nucleico viral para la generación del virus dentro de las células diana puede ser un fluido tal como solución salina fisiológica, o cualquier otro medio fisiológicamente aceptable convencionalmente conocido considerado apropiado tal como geles disponibles en el mercado adecuados para uso farmacéutico y para administrar el inoculante al sitio de tratamiento. El vehículo típicamente se tamponará a pH fisiológico y puede contener conservantes adecuados y/o antibióticos.

El inoculante generalmente contendrá de aproximadamente 1×10^2 a aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de placas por ml del inoculante. Preferiblemente, el inoculante contendrá más de aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de placas por ml de inoculante. La cantidad de inoculante administrada al paciente puede determinarla fácilmente el médico o cirujano asistente de acuerdo con la práctica médica aceptada teniendo en cuenta el estado general del paciente, la fase y localización de la neoplasia junto con el tamaño global y distribución del área a tratar con el virus. Típicamente, se tratará al paciente con una dosis inicial del virus y posteriormente se controlará durante un periodo adecuado de tiempo antes de tomar una decisión de administrar virus adicional al paciente dependiendo de factores tales como la respuesta del paciente a la administración inicial del virus y el grado de infección vírica y muerte de células malignas resultante del tratamiento inicial.

De forma deseable, se tratará al individuo con el virus durante un periodo de tiempo a intervalos predeterminados. Los intervalos pueden ser diariamente o variar de 24 horas hasta 72 horas o más según se determine apropiado en cada circunstancia. Puede administrarse un virus diferente cada vez para evitar o minimizar el efecto de cualquier respuesta inmune contra el virus administrado previamente, y puede prolongarse un ciclo de tratamiento durante una a dos semanas o más según pueda determinarlo el médico asistente. Más preferiblemente, se administrará el virus al cual el mamífero no se ha expuesto previamente o contra el cual el mamífero genera una respuesta inmune relativamente minoritaria que puede determinarse por técnicas convencionales.

Aunque pueden emplearse adecuadamente echovirus conocidos fácilmente disponibles en un método de la invención, también puede utilizarse un virus modificado o diseñado por ingeniería usando técnicas convencionales. Por ejemplo, puede modificarse un virus para que emplee moléculas adicionales de adhesión celular como receptores celulares. Como ejemplo, puede modificarse un virus usando mutagénesis dirigida al sitio de modo que se exprese el motivo peptídico "RGD" sobre la superficie de la cápsida viral. El motivo RGD se reconoce por heterodímeros de integrina α_v y esta modificación de la cápsida puede permitir, por ejemplo, que el virus se una a la integrina $\alpha_2\beta_1$, una molécula de adhesión celular que ha demostrado estar regulada positivamente en lesiones de melanoma (Natalia P.G; 1997) que tiene $\alpha_2\beta_1$, conduciendo potencialmente a una captación potenciada del virus por la célula diana.

Para que la naturaleza de la presente invención pueda entenderse más claramente, ahora se describirán formas preferidas de la misma con referencia a los siguientes ejemplos.

EJEMPLO 1: Materiales y métodos

1.1. Líneas celulares

Las líneas celulares cancerosas IGROV-1, A2780, DU145, PC3, AsPC-1, PANC-1, T47-D, MDA-MB361, MDA-MB453, MDA-MB231, y MCF-7 se obtuvieron del Garvan Institute, Sydney, New South Wales, Australia. Las líneas celulares cancerosas BT-20, MDA-MB157, SK-BR-3, ZR-75-1, HCT116, LIM2537, SW480, SW620, 2008, JAM, OVCA-429, OV-CAR-3, OVHS-1, OWA-42, SKOV-3, y DOV13 se obtuvieron del Peter MacCullum Cancer Institute, Melbourne, Victoria, Australia. Las células SkMel28 se obtuvieron de Dr Ralph, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Monash University, Victoria, Australia. Las células HeLa se obtuvieron de Margery Kennett, Entero-respiratory Laboratory, Fairfield Hospital, Melbourne, Victoria, Australia. Todas las células se cultivaron en condiciones convencionales (37°C en atmósfera de CO₂ al 5%) en RPMI que contenía suero de ternera fetal (FCS) al 2-5% y antibióticos excluyendo las células BT-20 que se cultivaron en medio α -MEM, y las células SkMel28 y HeLa que se cultivaron en medio DMEM. Todas las células usadas se comprobaron rutinariamente para la presencia de micoplasma por ELISA (Roche Molecular Systems, CA, EEUU).

1.2. Virus

Se obtuvieron la cepa prototipo de Coxsackievirus A21 (CAV21), Kuykendall; la cepa prototipo de Coxsackievirus B3 (CVB3), Nancy; la cepa prototipo de Echovirus (EV1), Farouk; la cepa prototipo de Echovirus (EV7), Wallace; y la cepa prototipo de Poliovirus 1 (PV1), Mahoney; de Dr Margery Kennett, Enterorespiratory Laboratory, Fairfield Hospital, Melbourne, Victoria, Australia. Todos los virus se propagaron y titularon en células HeLa.

1.3 Anticuerpos monoclonales (MAb)

El MAb anti-DAF VIII A7, que reconoce el tercer SCR de DAF, se obtuvo de Dr T. Kinoshita, Osaka University, Osaka, Japón y el mAb anti-DAF IH4 fue un presente de Dr Bruce Loveland, Austin Research Institute, Heidelberg, Victoria, Australia. El MAb anti-CAR RmcB se obtuvo de Dr. J. M. Bergelson, Dana Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts. El MAb anti- β_2 -microglobulina 918 se obtuvo de Dr. P. Minor, NIBSC, Hertfordshire, Inglaterra. El MAb anti- $\alpha_2\beta_1$ AK7, que reconoce la subunidad α_2 , y el anticuerpo de control MAb anti-GPIV (glucoproteína de membrana de plaquetas) PTA-1 se obtuvieron del Profesor Gordon Burns, Department of Medical Biochemistry and Cancer Research, University of Newcastle, NSW, Australia. El MAb anti-ICAM-1 IH4 se obtuvo de Dr Andrew Boyd del Queensland Institute for Medical Research, Queensland, Australia.

1.4. Análisis citométrico de flujo

La expresión superficial del receptor enteroviral sobre células cancerosas se analizó por citometría de flujo. Se incubaron células dispersadas (1×10^6) durante 20 minutos en hielo con el MAb apropiado (5 μ g/ml diluido en PBS) durante 20 minutos. Las células se lavaron con PBS y se sedimentaron por centrifugación antes de su resuspensión en 100 μ l de dilución 1:50 de fragmento F(ab')₂ conjugado con R-ficoeritrina de inmunoglobulina de cabra anti-ratón (Dako, A/S, Dinamarca). Las células se incubaron de nuevo en hielo durante 20 minutos, se lavaron, se sedimentaron y se resuspendieron en PBS antes del análisis citométrico de flujo. La expresión del receptor en superficie celular se analizó usando un FACStar Analyser (Becton Dickenson, Sydney, Australia).

1.5 Ensayo de infectividad del virus

Se inocularon monocapas confluentes de líneas celulares cancerosas con diluciones en serie de factor 10 (100 μ l/pocillo por triplicado o cuadruplicado) de CAV21, CVB3, EV1, EV7 o PV1 en DMEM que contenía suero de ternera fetal (FCS) al 1% y se incubaron a 37°C en un entorno de CO₂ al 5% durante 72 horas. Para determinar la supervivencia celular, las placas se incubaron con 100 μ l/pocillo de solución metanólica de cristal violeta (cristal violeta al 0,1%, metanol al 20%, formaldehído al 20%, solución salina tamponada con fosfato (PBS)) durante 24 horas y se lavaron en agua destilada.

El punto final de un ensayo de dilución limitante es la dilución del virus que afecta al 50% de las unidades de ensayo. Se emplearon procedimientos estadísticos para calcular el punto final usando el método de Reed y Muench (**Referencia**). Los puntos finales se expresaron como la dosis infecciosa de cultivo tisular al 50% por mililitro (TCID₅₀/ml).

5 Cuando se requería pre-tratamiento de la monocapa celular con anticuerpos monoclonales anti-receptor, las células se incubaban con 100 µl de MAb anti- $\alpha_2\beta_1$ AK7 (20 µg/ml diluido en PBS) durante 1 hora a 37°C. Las monocapas celulares entonces se inoculaban en muestras duplicadas de dilución viral apropiada y se incubaban a 37°C en entorno de CO₂ al 5% durante 72 horas antes de la tinción como se ha descrito anteriormente.

10 Se tomaron fotomicrografías a las 24, 48 o 72 horas a un aumento 100X (Olympus IX-FLA) usando un microscopio invertido.

15 1.6. Purificación del virus

Se inocularon placas de cultivo tisular de seis pocillos que contenían monocapas confluyentes de células DOV13 con 500 µl de EV1 (multiplicidad de infección [moi] = 10⁵ TCID₅₀/ml) durante 1 hora a 37°C. El virus no unido se retiró lavando tres veces con DMEM sin metionina/cisteína (ICN Biomedical, Ohio, EEUU) y las monocapas celulares se incubaron en 1,3 ml de este medio durante 2 horas adicionales a 37°C antes de la adición de 300 µCi de trans-label [³⁵S]-metionina (ICN Biomedical, Ohio, EEUU). Las monocapas infectadas se incubaron durante una noche a 37°C en un entorno de CO₂ al 5%. Después de tres ciclos de congelación/descongelación los lisados virales se purificaron en un gradiente de sacarosa al 5-30% por centrifugación de velocidad durante 95 minutos a 36.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman XL-90 (Rotor SW41ti). Las fracciones se recogieron del fondo de cada tubo y se controlaron por recuento de centelleo líquido (Wallac 1450' Microbeta TRILUX, Finlandia) para localizar la fracción del pico viral 160S usada en los ensayos de unión viral.

Se purificaron viriones EV1 no radiomarcados en gradientes paralelos con fracciones infecciosas máximas combinadas y dializadas frente a solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se produjo EV1 inactivado por luz ultravioleta (UV) exponiendo 1,0 ml de EV1 purificado en PBS/pocillo (5 x 10⁵ TCID₅₀) en una placa de 6 pocillos una luz UV de 15 vatios durante 30 segundos. La inactivación viral se evaluó por ensayos celulares de infectividad lítica en placa de microtitulación.

30 1.7. Ensayo de unión de virus radiomarcado

35 Se incubaron aproximadamente 1 x 10⁶ células resuspendidas en 800 µl de RPMI que contenía albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en presencia de 20 µg/ml de MAb (anti- $\alpha_2\beta_1$ o anti-DAF diluido en PBS) durante 1 hora a 4°C seguido de la adición de 300 µl (1 x 10⁶) de 160S EV1 marcado con [³⁵S]-metionina. Después de incubación a 4°C durante 2 horas, las células se lavaron cuatro veces con medio sin suero y los sedimentos celulares se disolvieron en 200 µl de NaOH 0,2 M-SDS al 1% antes de determinar el nivel de virus marcado con [³⁵S]-metionina unido por recuento de centelleo líquido de muestras triplicadas (Wallac 1450 Microbeta TRILUX, Finlandia). Los resultados se expresaron como la media ± DT.

45 1.10. Electroforesis en gel de dodecil sulfato sódico - poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las fracciones virales marcadas con [³⁵S]-metionina se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y se visualizaron por autorradiografía. Las fracciones 160S EV1 marcadas con [³⁵S]-metionina se incubaron con tampón reductor de muestra (TRIS 250 mM, 0,2 g p/v de SDS, 20% v/v de glicerol, 10% v/v de 2-mercaptoetanol y 0,01% p/v de azul bromofenol, pH 6,8) durante 10 minutos a 95°C que desnaturaliza el virión. Las fracciones de pico viral 160S desnaturalizadas después se separaron en un gel premoldeado de Tris-HCl al 15% (BIORAD Ready-Gel, CA, EEUU) junto con un marcador de proteína de intervalo medio Benchmark preteñido (GIBCO, EEUU) a 180 V durante 45 minutos. La visualización de las proteínas estructurales principales y el análisis de la pureza viral fueron por autorradiografía en Hyperfilm MP (Amersham International, Inglaterra) después de 96 horas de exposición.

55 1.11 Ensayo de citotoxicidad celular

Se expusieron suspensiones celulares de linfocitos de sangre periférica humana, células OVHS-1 y DOV-13 con EV1 (moi = 1,0 TCID₅₀/célula) y se incubaron durante 24 h a 37°C. Los niveles de citólisis celular se calcularon como una función de la liberación de LDH (una enzima citosólica estable que se libera tras la lisis celular), evaluada mediante el uso de un kit Cyto-Tox 96 (Promega Corp. Maddison, WI, EEUU) según las instrucciones del fabricante.

60 1.12 Cultivo de esferoides y ensayo de infectividad de esferoides

Se sembraron células DOV-13 en una placa de 24 pocillos a 500 o 5000 células por pocillo en 1 ml de RPMI 1640 que contenía FCS al 5% en una capa de agarosa semi-sólida al 0,5%. Las células se incubaron durante 48 h a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% para permitir la formación de los esferoides, antes de la adición de EV1 (10⁵ TCID₅₀).

1.13 Modelo de xenoinjerto de tumor intraperitoneal en ratones SCID

Se alojaron ratones BALB/cSCID macho de seis a ocho semanas de edad en condiciones libres de patógenos de acuerdo con un protocolo aprobado por el University of Newcastle Animal Care and Ethics Committee. Las células OVHS-1 se recogieron con tripsina al 0,05%, se resuspendieron en RPMI que contenía FCS al 10% y se sedimentaron por centrifugación. Las células se lavaron y resuspendieron en PBS antes de inyectar a los ratones por vía intraperitoneal (i.p.) 1×10^6 células en 200 μ l. Catorce días después, los ratones se dividieron en tres grupos (n=5) y se trataron i.p. con solución salina tamponada con fosfato (PBS), o 10^5 TCID₅₀ de EV1 inactivado por UV o EV1 infeccioso. Los animales se pesaron en una base semanal y se sacrificaron cuando los tumores excedieron del 20% de su peso corporal. Los pesos de los ratones tratados se compararon con ratones BALB/cSCID sanos que no albergaban tumores.

1.14 Determinación de viremia por PCR a tiempo real

Los sueros de ratones infectados se analizaron para viremia usando RT-PCR cuantitativa a tiempo real. En resumen, se extrajo el ARN viral de 10 μ l de suero usando un mini kit QIAamp Viral RNA (Qiagen, Clifton Hill, Victoria, Australia) y se eluyó en un volumen final de 40 μ l de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cebadores y la sonda para la determinación de los niveles de ARN viral de EV1 se diseñaron usando el software Primer Express™ 1.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) y se basaron en la secuencia previamente publicada de EV1 (número de acceso a Genbank AF029859); cebador directo (5'-CAAGACAGGGACCAAAGAGGAT-3'), cebador inverso (5'-CCACTCGCCTGGTTGTAATCA-3') y sonda MGB marcada con 6-FAM (5'-CCAATAGCTTCAACAATT-3'). Se realizó RT-PCR de una etapa usando el sistema de una etapa Platinum® Quantitative RT-PCR ThermoScript™ en un detector de secuencia ABI 7000. Para la generación de la curva patrón, se amplificaron diluciones de factor 10 de la solución madre viral de EV1 (1×10^6 TCID₅₀/ml) con concentración optimizada de cebadores y sonda. En un volumen de 25 μ l, la mezcla de reacción comprendía: mezcla de reacción ThermoScript™ 1x, cebador directo 500 nM, cebador inverso 900 nM, sonda 250 nM, ROX 500 nM, 0,5 μ l de mezcla ThermoScript™ Plus/Platinum Taq y 5 μ l de ARN extraído. Las condiciones de ciclado térmico se sometieron a 30 min. a 60°C, seguido de 5 min. a 95°C y después 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min. a 60°C.

30 EJEMPLO 2: Oncolisis mediada por virus de líneas celulares cancerosas

2.1 Expresión de receptores de enterovirus sobre la superficie de células cancerosas de mama

Para determinar los niveles de expresión relativa de receptores de superficie celular enterovirales usados por los enterovirus se realizó análisis citométrico de flujo. El grupo seleccionado de receptores constaba de ICAM-1 empleado por CAV21; DAF empleado por EV7, CAV21, CVB3; CAR usado por CVB3; e integrina $\alpha_2\beta_1$ usado por EV1. Debido a la incapacidad del Mab frente al receptor PVR, no se determinaron niveles de expresión de PVR.

Se analizaron nueve líneas celulares cancerosas de mama incluyendo BT-29, MCF-7, MDA-MB157, MDA-MB231, MDA-MB361, MDA-MB453, SK-BR-3, T47-D y ZR-75-1. Las líneas celulares se incubaron con anti-ICAM-1 (IH4), anti-CAR (RmcB), anti-DAF (VIII7) o anti- $\alpha_2\beta_1$ (AK7).

La expresión de ICAM-1 fue significativa en seis de las nueve líneas mientras que pareció que DAF se expresaba a niveles relativamente bajos en todas las líneas celulares. Fueron evidentes niveles moderados de expresión CAR en siete de las nueve líneas, mientras que estuvieron presentes niveles mínimos de expresión de $\alpha_2\beta_1$ en la superficie de ocho de las líneas de cáncer de mama (Figura 1).

2.2. Oncolisis de células cancerosas de mama por enterovirus seleccionados

Se realizaron ensayos de infectividad lítica sobre las nueve líneas celulares cancerosas de mama para determinar su susceptibilidad a un grupo selecto de enterovirus, CAV21, CVB3, EV1, EV7 y PV1 (Figura 2). Una línea celular se consideró altamente susceptible a oncolisis si la dosis infecciosa de cultivo tisular a un punto final del cincuenta por ciento por mililitro (TCID₅₀/ml) calculada era 10^4 o mayor. CAV21 y CVB3 indujeron lisis significativa en seis de las nueve líneas celulares cancerosas de mama. En general, las células cancerosas de mama no fueron susceptibles a infección lítica por los echovirus EV1 y EV7 excluyendo la línea celular T47-D que demostró susceptibilidad considerable a EV1. PV1 causó oncolisis sustancial en ocho de las nueve líneas celulares cancerosas de mama (Figura 2).

2.3. Expresión de receptor de enterovirus sobre la superficie de células cancerosas colorrectales

Se analizaron cuatro líneas celulares cancerosas colorrectales (HCT116, LIM2537, SW480 y SW620) para la expresión de ICAM-1, CAR, $\alpha_2\beta_1$ y DAF por citometría de flujo. Se observaron niveles significativos de expresión de ICAM-1 y DAF en dos de las líneas celulares. Parecieron expresarse niveles moderados de CAR en las cuatro líneas, mientras que no se observaron niveles significativos de expresión de $\alpha_2\beta_1$ (Figura 3).

2.4. Oncolisis de células cancerosas colorrectales por enterovirus seleccionados

Se titularon CAV21, CVB3, EV1, EV7 y PV1 en las cuatro líneas celulares cancerosas colorrectales. Se observaron niveles significativos de oncolisis por CVB3 y PV1 en todas las líneas celulares (Figura 4). Sin embargo, sucedió lisis celular significativa inducida por CAV21 en solamente una de las cuatro líneas celulares (LIM2573). Esta línea celular mostró el mayor nivel de expresión de ICAM-1. A pesar de los niveles muy bajo de expresión de $\alpha_2\beta_1$, EV1 infectó de forma lítica tres de las líneas celulares mientras que todas las células fueron refractarias a infección por EV7.

2.5. Expresión de receptores de enterovirus sobre la superficie de células de cáncer de próstata y pancreático

Se analizaron líneas celulares cancerosas de próstata incluyendo DU145 y PC3, y líneas celulares cancerosas pancreáticas incluyendo AsPC-1 y PANC-1, para la expresión de ICAM-1, DAF, CAR y $\alpha_2\beta_1$. Se expresaron niveles significativos de ICAM-1 en ambas líneas celulares prostáticas y en una de las líneas pancreáticas. Se halló expresión moderada de CAR y DAF en las cuatro líneas celulares mientras que la expresión de $\alpha_2\beta_1$ pareció ser mínima (Figura 5).

2.6 Oncolisis de células cancerosas de próstata y pancreáticas

Se examinó la susceptibilidad de dos líneas celulares cancerosas de próstata y dos líneas celulares cancerosas pancreáticas a los enterovirus CAV21, CVB3, EV1, EV7 y PV1 en infecciones líticas en placa de microtitulación. Las líneas celulares cancerosas de próstata fueron susceptibles a todos los virus excluyendo EV7 en el caso de DU145. PANC-1 solamente se infectó por CAV21 y PV1, mientras que la otra línea celular cancerosas pancreática AsPC-1 mostró oncolisis por todos los virus excluyendo EV7 (Figura 6).

2.7 Expresión de receptores de enterovirus sobre la superficie de células cancerosas de ovario

Se examinaron líneas celulares cancerosas de ovario para la expresión de los receptores enterovirales ICAM-1, CAR, DAF y $\alpha_2\beta_1$. Se incluyeron nueve líneas celulares en este estudio: A2780, DOV13, IGROV-1, JAM, OVCA-429, OVHS-1, OWA-42, SKOV-3 y 2008. Se expresaron niveles significativos de ICAM-1 en dos de las nueve líneas celulares mientras que estuvieron presentes niveles moderados de expresión de CAR en seis de las nueve. Se expresó DAF a niveles de altos a moderados en todas salvo una de las líneas celulares cancerosas de ovario. Ocho de las nueve líneas celulares cancerosas de ovario mostraron nivel de moderado a alto de expresión de $\alpha_2\beta_1$ (Figura 7), expresando una línea celular cancerosas de ovario adicional (OVCAR-3) niveles significativos de $\alpha_2\beta_1$ (datos no mostrados).

2.8 Oncolisis de líneas celulares cancerosas de ovario

Se evaluó la capacidad oncolítica de CAV21, CVB3, EV1, EV7 y PV1 en cada una de las nueve líneas celulares cancerosas de ovario (Figura 8). Se descubrió susceptibilidad a CAV21 en dos de las nueve líneas celulares mientras que CVB3 causó lisis significativa en siete de las nueve líneas. Los cánceres de ovario parecieron particularmente susceptibles a los echovirus causando EV7 muerte en cuatro de las nueve líneas celulares cancerosas y causando EV1 que siete de las diez líneas celulares lisaran significativamente tras la infección (Figura 9A, 9B y 10). Se vulnerabilidad a PV1 se reveló en las nueve líneas celulares cancerosas de ovario. Se tomaron fotomicrografías de las diez líneas infectadas con EV1 (Figuras 9A y 9B) y también se observó infección lítica en placa de microtitulación de las diez líneas celulares cancerosas de ovario con EV1 (Figura 10).

2.9 Unión de EV1 a líneas celulares cancerosas de ovario

Como las líneas celulares cancerosas de ovario eran altamente susceptibles a oncolisis por EV1, se emprendieron investigaciones adicionales para evaluar la naturaleza de la adhesión celular de EV1. Las células se preincubaron con anticuerpos monoclonales anti- $\alpha_2\beta_1$ (AK7) o anti-DAF (VIII A7) antes de añadir EV1 radiomarcado para determinar la implicación de estos receptores en la unión de EV1 a la célula hospedadora. La unión de EV1 fue evidente en las diez líneas celulares ensayadas. Bloqueando la integrina $\alpha_2\beta_1$ con anticuerpo anti-receptor se inhibía significativamente la adhesión celular de EV1. El bloqueo del receptor de superficie celular DAF con el anticuerpo monoclonal VIII A7 no causaba inhibición significativa de la unión de EV1 (Figura 11).

2.10 El bloqueo por anticuerpo de la integrina $\alpha_2\beta_1$ inhibe la infección por EV1 de líneas celulares cancerosas de ovario

Para evaluar la función de $\alpha_2\beta_1$ en la infección por EV1, se realizó un ensayo lítico donde la monocapa celular se preincubó con anticuerpo monoclonal anti- $\alpha_2\beta_1$ (AK7). Se analizaron las líneas celulares cancerosas de ovario OWA-42 y IGROV-1. Después de 72 horas tras la infección con el virus, las monocapas celulares en ausencia de bloqueo por MAb eran altamente susceptibles a infección lítica por EV1. Después del bloqueo por MAb de la integrina $\alpha_2\beta_1$ no hubo indicios de oncolisis en las líneas celulares incluso a la dilución más baja de EV1 (Figura 12). Se tomaron

fotomicrografías a las 24, 48 y 72 horas después de la infección de la línea celular OWA-42 (Figura 13).

2.11 Células humanas no cancerosas susceptibles a infección por EV1

5 Se realizó un experimento para examinar el efecto que EV1 tiene sobre células humanas no cancerosas, determinado por infección de fibroblastos humanos con EV1. En resumen, se prepararon placas de cultivo tisular de 6 pocillos con un inserto anular de cultivo tisular, células DOV13 dentro del anillo y células HeLa, fibroblastos humanos (obtenidos de CSL, Australia), en el anillo exterior incubados a 37°C hasta que se formaron monocapas confluente. El anillo se retiró y las células se infectaron con EV1 durante una noche a 37°C. Las células viables se tiñeron con solución metanólica de cristal violeta. Tras la infección con EV1, las células cancerosas de ovario DOV13 se lisaron mientras que las células HeLa permanecieron sanas (Figura 14) demostrando la susceptibilidad específica de las células cancerosas de ovario a EV1.

15 2.12 Expresión de $\alpha_2\beta_1$ en la línea celular de melanoma SkMel28

Se sabe que los melanomas, cánceres de la piel, regulan positivamente la expresión de $\alpha_2\beta_1$. Se examinó la línea celular de melanoma SkMel28 para su expresión usando citometría de flujo. Se observaron altos niveles de expresión de $\alpha_2\beta_1$. Sin embargo, se mostró un bajo nivel de fondo de unión por el MAb de control (Figura 15).

20 2.13 Unión de EV1 a SkMel28

Para investigar adicionalmente la naturaleza de la adhesión de EV1 al $\alpha_2\beta_1$ expresado en superficie en células SkMel28, se emprendieron ensayos de unión a virus radiomarcado. El EV1 radiomarcado se unió significativamente a la línea celular de melanoma maligno con bloqueo por MAb de $\alpha_2\beta_1$ reduciendo enormemente la cantidad de EV1 unido (Figura 16).

25 2.14 Ensayo de infectividad de SkMel28 con EV1

Se realizó un ensayo de infectividad lítica para determinar la susceptibilidad de SkMel28 a infección por EV1. La línea celular de melanoma maligno presentó oncolisis moderada tras infección con EV1. El colorante cristal violeta se absorbió por las células que no experimentaban infección lítica mientras que los pocillos no teñidos representan lisis completa de las monocapas celulares (Figura 17).

35 2.15 Discusión

Se descubrió que las líneas celulares cancerosas de ovario eran altamente susceptibles a infecciones líticas por EV1 mostrando siete de las diez líneas celulares ensayadas oncolisis significativa. Estudios adicionales sobre la unión de EV1 a las líneas celulares cancerosas de ovario confirmaron que $\alpha_2\beta_1$ es el receptor principal usado por EV1. Los estudios de unión con radiomarcaje indicaron adicionalmente que $\alpha_2\beta_1$ era necesario para la unión del virus y el ensayo de bloqueo con MAb reveló que pretratando las células cancerosas de ovario susceptibles con un anticuerpo monoclonal (Mab) contra $\alpha_2\beta_1$, se inhibía completamente la infección por EV1. El MAb contra DAF VIII A7 también se usó en el ensayo de unión como tratamiento de control negativo para determinar si DAF desempeñaba una tarea en la unión de EV1 como sucede con los enterovirus CAV21 y CVB3. No sucedía bloqueo significativo de la unión de EV1 con pretratamiento con MAb anti-DAF.

El co-cultivo de células cancerosas de ovario con fibroblastos humanos seguido de infección con EV1 reveló que las células fibroblásticas humanas no eran susceptibles a infección por EV1 incluso en un entorno donde el virus lisaba específicamente las células cancerosas de ovario.

También se investigó el efecto de la oncolisis mediada por EV1 sobre una línea celular de melanoma. Los datos revelaron que $\alpha_2\beta_1$ estaba regulado positivamente sobre la superficie de la línea celular de melanoma SkMel28 y que estas células eran susceptibles a infección lítica por EV1. La unión de EV1 a las células cancerosas de ovario demostró ser mediante interacciones con $\alpha_2\beta_1$ como se muestra por en ensayo de unión con radiomarcaje. El resto de las líneas celulares cancerosas que fueron permisivas para infección por EV1 fueron líneas celulares cancerosas de colon con tres de las cuatro líneas celulares altamente susceptibles así como ambas líneas celulares cancerosas de próstata. Estos dos tipos de cáncer pueden encontrar la misma matriz extracelular que las células cancerosas de ovario y por tanto, regulan positivamente su expresión de $\alpha_2\beta_1$ durante la metástasis a través de la matriz extracelular rica en colágeno I encontrado en superficies peritoneales.

Los especialistas en la técnica apreciarán que pueden hacerse numerosas variaciones y/o modificaciones a la invención mostrada en las realizaciones específicas sin alejarse del espíritu o alcance de la invención descrita ampliamente. Las presentes realizaciones deben considerarse, por lo tanto, en todos los aspectos ilustrativas y no restrictivas.

EJEMPLO 3: Especificidad de infección lítica por echovirus (EV2)

3.1 Patogenicidad relativa de EV1

5 Se investigó la patogenicidad relativa de EV1 sobre cultivos *in vitro* de células de ovario no malignas en comparación con células neoplásicas. Se expusieron células epiteliales de la superficie de ovario humano normal (HOSE) inmortalizadas usando las fases de lectura abierta de E6-E7 de papilomavirus humano 16 (Tsao, S.W. et al., 1995), junto con una línea de carcinoma de ovario de células claras (OVHS-1) y células de carcinoma de ovario no diferenciadas (DOV13) con multiplicidades de entrada de EV1 que variaban de moi 5,0 a 0,05 TCID₅₀/célula. A las 10 48 h después de la infección el examen microscópico reveló una gran destrucción celular y citolisis en monocapas de ambas líneas de carcinoma de ovario, incluso a una exposición viral tan baja como de 0,05 TCID₅₀ de EV1 por célula. En contraste, no se observaron cambios detectables en la morfología celular de las células HOSE incluso a la dosis de exposición viral más elevada.

15 En un esfuerzo adicional por determinar la especificidad de la infección por EV1, se expusieron linfocitos normales de sangre periférica (PBL) así como células OVHS-1 y DOV13 con EV1 (moi = 1,0). El análisis citométrico de flujo reveló que la preparación celular PBL expresaba de poco a nada de $\alpha 2\beta 1$ superficial, mientras que ambas líneas celulares cancerosas de ovario expresaban elevados niveles de $\alpha 2\beta 1$. Se evaluó la citolisis mediada por EV1 de suspensiones de PBL y células cancerosas de ovario usando un ensayo convencional de citotoxicidad celular que mide la liberación de LDH. La exposición a EV1 provocó la citolisis celular casi completa de los cultivos de ovario por 20 infección con EV1, mientras que se observaron niveles solamente de fondo de citolisis en los PBL después de exposición a la misma dosis de entrada de EV1.

25 Para determinar si EV1 iniciaba una infección productiva en PBL en ausencia de lisis celular detectable y para confirmar que el nivel de fondo de citolisis era no específico y no estaba mediado por infección con EV1, se inoculó la suspensión de PBL y dos líneas de carcinoma de ovario con EV1 (moi = 1,0) y se controlaron para la producción de descendencia viral.

30 En ambas líneas celulares cancerosas de ovario (OVHS-1 y DOV-13) los títulos de EV1 aumentaron en aproximadamente 10^4 veces sobre el inóculo inicial de células unidas. En contraste, no se produjo descendencia viral por los PBL durante el periodo de incubación de 48 h consistiendo la infectividad observada de inóculo de entrada residual unido no específicamente.

EJEMPLO 4: Lisis por echovirus (EV1) de células cancerosas de ovario

35

4.1 Lisis por EV1 de esferoides de células cancerosas de ovario cultivadas *in vitro*

Muchos cultivos *in vitro* de células cancerosas de ovario pueden propagarse como esferoides multi-dimensionales (Casey, R.C et al., 2001). Los esferoides multi-celulares simulan los agregados multicelulares habitualmente 40 encontrados en el fluid ascítico de pacientes con carcinoma de ovario en fase avanzada. Habiendo establecido que los cultivos en monocapa de ovario son altamente susceptibles a infección lítica por EV1, se expusieron esferoides celulares de múltiples cánceres de ovario con EV1. El análisis citométrico de flujo determinó que los niveles de expresión en superficie del receptor celular de EV1, $\alpha 2\beta 1$ eran comparables, tanto si las células OVHS-1 se cultivaban en monocapa como en formación esferoide. Se administró EV1 (10^5 TCID₅₀) al medio de agarosa semi-sólido que rodeaba los esferoides con imágenes fotomicroscópicas de la morfología esferoide obtenidas en diversos 45 intervalos tras la exposición viral. La Figura 18 muestra que los esferoides no infectados de control estaban proliferando activamente, provocando aumentos constantes en el volumen durante todo el periodo de incubación de 9 días. En contraste, los esferoides infectados por EV1 mostraban ligeras disminuciones en el volumen durante los primeros 7 días después de la inoculación, sucediendo disgregación estructural significativa y destrucción celular durante los siguientes 48 h. Los datos muestran que EV1 inicia una infección lítica productiva célula a célula dentro 50 del esferoide canceroso que es eficaz en retardar el crecimiento del esferoide independientemente del volumen inicial del esferoide previo a la inoculación (es decir, 5×10^2 o 5×10^3 células).

4.2 Efecto de echovirus 1 sobre modelo de ascitis de cáncer de ovario humano

55

En las últimas fases de cáncer de ovario metastásico, las células tumorales migran por toda la cavidad peritoneal y/o colonizan sitios tisulares distantes. Para determinar si la oncolisis mediada por EV1 es una terapia eficaz para fases avanzadas de cáncer de ovario peritoneal, se empleó un modelo de ascitis en ratón SCID que alberga xenoinjertos de carcinoma de ovario humano. Se inyectó a los ratones SCID mediante vía intraperitoneal 2×10^6 células OVHS-1 60 14 días antes de la administración de EV1 vivo. El régimen de tratamiento experimental constaba de una única dosis de PBS, EV1 inactivado por UV o EV1 vivo (10^5 TCID₅₀) inyectado mediante vía intraperitoneal. Se usaron los cambios en el peso corporal de los ratones que recibieron los diversos tratamientos relativos a los de ratones que no albergaban xenoinjertos de cáncer de ovario como marcador del desarrollo de carga ascítica.

65 A las 3 semanas después del tratamiento los ratones a los que se administró PBS o EV1 inactivado por UV mostraron aumentos significativos en el peso pero no se observó ninguna diferencia entre los ratones normales y

tratados con EV1. El peso corporal de los grupos de PBS o EV1 inactivado por UV continuaron aumentando y a las 4 semanas fue evidente hinchamiento abdominal sustancial PI debido a la acumulación de fluido ascítico en todos los ratones pero en el restante grupo de tratamiento (Figura 19A). A las 5 semanas PI, todos los ratones del grupo PBS y EV1 inactivado por UV se sacrificaron debido al excesivo fluido ascítico peritoneal, aunque no se observó ganancia de peso o formación de fluido ascítico detectable entre los ratones tratados con EV1 y los animales que no recibieron xenoinjertos de cáncer de ovario (Figura 19B). Durante todo el transcurso de esta investigación, no se observaron signos de desarrollo drástico de la enfermedad en los ratones a los que se había inyectado EV1 vivo, incluso en presencia de cargas virales en suero 10-100 veces (en los 7-14 días PI; datos no mostrados) en exceso de la dosis de inóculo viral.

4.3 Discusión

Uno de los requisitos principales para una estrategia oncolítica viral satisfactoria usando virus competentes en replicación es la baja patogenicidad viral para el hospedador pero una alta predilección por células neoplásicas.

En el presente estudio, se evaluó la capacidad de echovirus humanos representativos de inducir infección lítica de cultivos celulares *in vitro* de células cancerosas de ovario humano. A pesar de ser altamente oncolíticos para células de melanoma, CVA21 y una cepa prototipo de EV7 no fueron tan potentes como EV1 en inducir infecciones líticas productivas en varias monocapas celulares de cáncer de ovario humano. Los estudios de bloqueo no anticuerpo monoclonal confirmaron que la infección lítica mediada por EV1 de células cancerosas de ovario se iniciaba mediante unión específica de la cápsida viral con la integrina $\alpha 2\beta 1$ expresada en superficie celular. Como la integrina $\alpha 2\beta 1$ no permite la unión simultánea tanto de EV1 como de colágeno, la infección lítica por EV1 de células cancerosas de ovario no solamente media la rápida oncolisis celular, sino que también puede interferir con las interacciones entre colágeno de tipo 1 y la integrina $\alpha 2\beta 1$ reduciendo de este modo de forma potencial la diseminación de la célula cancerosa a través de la superficie peritoneal.

La destrucción de esferoides multi-celulares tridimensionales por exposición a EV1 refleja la utilidad de la oncolisis mediada por EV1 en la reducción *in vivo* de la carga de tumor sólido de ovario. Esta lisis eficaz de esferoides de ovario por EV1 es impresionante considerando que las células individuales en esferoides de ovario parecen ser más robustas que células en formación de monocapa, que poseen resistencia potenciada a radiación y apoptosis inducida químicamente (Frankel, A. et al., 1997).

Los virus oncolíticos terapéuticos deben poseer un mecanismo discriminador para el abordamiento de células malignas. La infección selectiva mediada por EV1 se resaltó por la incapacidad de EV1 de inducir citolisis drástica una línea celular epitelial normal de ovario y linfocitos de sangre periférica (PBL). La producción de elevados títulos de descendencia viral a partir de las células cancerosas de ovario pero no de suspensiones de PBL refuerza la especificidad y naturaleza patogénica baja de la infección por EV1 de células no neoplásicas.

Además de carcinomas de ovario, las células de melanomas malignos también expresan niveles regulados positivamente de integrina $\alpha 2\beta 1$ superficial volviéndolas de este modo susceptibles a exposición a EV1. De forma algo paradójica, la infección con EV1 de células cancerosas de ovario induce expresión superficial aumentada de ICAM-1 (Pietinen, V. et al., 2000), el receptor diana celular para CVA21 en células de melanoma. Por consiguiente, la exposición de cáncer de ovario y/o neoplasias de melanoma por una preparación terapéutica que contenga tanto EV1 vivo como CVA21 puede provocar infecciones oncolíticas más potentes.

La administración intraperitoneal de EV1 fue muy eficaz en el control del desarrollo de xenoinjertos de tumor de ovario en la cavidad peritoneal de ratones SCID. Todos los ratones a los que se inyectó EV1 vivo no lograron presentar ganancia de peso aumentada (relativa a ratones a los que no se inyectó xenoinjertos de cáncer de ovario) y el desarrollo de ascitis peritoneal detectable. La descendencia EV1 generada por infección lítica *in vivo* de las células de ovario neoplásicas se detectó en la sangre de ratones a los 7 días PI (datos no mostrados). EV1 virémico puede verse como un depósito atractivo para el control de enfermedad diseminada y su detección a niveles significativos (aproximadamente 10^6 TCID₅₀) también indica que la dosis de entrada viral de 10^5 TCID₅₀ puede reducirse significativamente manteniendo al mismo tiempo la potencia oncolítica. El fracaso en detectar EV1 virémico a los 7 días PI en ratones que no albergan xenoinjertos de cáncer de ovario (datos no mostrados) sugiere que en ausencia de células neoplásicas susceptibles, EV1 se elimina rápidamente y de forma eficaz de la circulación sistémica.

Globalmente, los resultados resaltan que la terapia oncolítica con EV1 es muy eficaz *in vitro* e *in vivo* para el control de cánceres peritoneales de ovario. El uso de la terapia de EV1 relativamente no invasiva puede verse como una alternativa atractiva a los actuales regímenes de tratamiento que implican citorreducción quirúrgica seguida de quimioterapia de combinación. La terapia con EV1 también puede emplearse como terapia adyuvante después de operaciones de citorreducción tumoral, que se centra en el abordamiento y destrucción de células neoplásicas liberadas durante la mecánica de la cirugía. La terapia oncolítica con EV1 también puede usarse como nueva terapia en el tratamiento de otras neoplasias humanas que expresan altos niveles de integrina $\alpha 2\beta 1$. Además, como EV1 y EV8 compiten por el mismo epítipo de unión en la integrina $\alpha 2\beta 1$, EV8 puede ser una elección alternativa a EV1

para inducir infecciones líticas rápidas de células de carcinoma de ovario. La disponibilidad de dos serotipos virales distintos permite la exposición secuencial de carcinomas de ovario mediante el abordamiento de integrina $\alpha 2\beta 1$, independiente de una respuesta inmune protectora generada como resultado de la administración primaria de virus. La disponibilidad de un potente fármaco anti-enteroviral (pleconaril) para EV1 (Pevear, D.C. et al., 1999) potencia
 5 adicionalmente lo atractivo de esta terapia, ya que provoca un control directo de la replicación viral no específica y la descendencia viral diseminada. La sinergia potencial entre el pleconaril y EV1 también puede permitir la inyección sistémica de multiplicidades muy elevadas de entrada viral seguida de administración de pleconaril (para inactivar el virus libre) poco después de haber dirigido el virus y haber comenzado la infección lítica de las células malignas.

10 Referencias

1. Andreansky SS, He B, Gillespie GY, Soroceanu L, Markert J, Chou J, Roizman B y Whitley RJ (1996). The application of genetically engineered herpes simplex viruses to the treatment of experimental brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11313-8.
 15
2. Ansardi, D.C., Porter, D.C., Jackson, G., Gillespie, Y. y Morrow, C.D. RNA replicons derived from poliovirus are directly oncolytic for human tumor cells of diverse origins. *Cancer Res*, 2001, 61:8470-8479.
3. Bartolazzi, A., J. Kaczmarek, G. Nicolo, A.M. Risso, G. Tarone, P. Rossino, P. Defilippi, y P. Castellani, Localization of the alpha 3 beta 1 integrin in some common epithelial tumors of the ovary and in normal equivalents. *Anticancer Res*, 1993. 13(1): pág. 1-11.
 20
4. Bergelson, J.M., B.M. Chan, R.W. Finberg, y M.E. Hemler, The integrin VLA-2 binds echovirus 1 and extracellular matrix ligands by different mechanisms. *J Clin Invest*, 1993. 92(1): pág. 232-9.
 25
5. Cannistra, S.A., C. Ottensmeier, J. Niloff, B. Orta, y J. DiCarlo, Expression and function of beta 1 and alpha v beta 3 integrins in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 1995. 58(2): pág. 216-25.
6. Cardarelli, P.M., S. Yamagata, I. Taguchi, F. Gorcsan, S.L. Chiang, y T. Lobl, The collagen receptor alpha 2 beta 1, from MG-63 and HT1080 cells, interacts with a cyclic RGD peptide. *J Biol Chem*, 1992. 267(32): pág. 23159-64.
 30
7. Casey, R.C. et al, (2001), Beta 1-integrins regulate the formation and adhesion of ovarian carcinoma multicellular spheroids. *Am J Pathol*. 159:2071-80.
8. Chan, B.M., N. Matsuura, Y. Takada, B.R. Zetter, y M.E. Hemler, In vitro and in vivo consequences of VLA-2 expression on rhabdomyosarcoma cells. *Science*, 1991. 251(2001): pág. 1600-2.
 35
9. Fenner, F. et al., *The Biology of Animal Viruses*. Academic Press. Nueva York, 1974 Segunda Edición.
10. Fields, B.N. y D.M. Knipe, *Fields Virology*. 4ª Edición ed. Vol. 1. 2000, Nueva York: Raven Press.
 40
11. Flint, S.J. et al., 2000, *Principles of Virology: Molecular Biology, pathogenesis and control*, ASM Press, Washington.
12. Frankel, A. et al., (1997), Abrogation of taxol-induced G2-M arrest and apoptosis in human ovarian cancer cells grown as multicellular tumor spheroids. *Cancer Res*. 57:2388-93.
 45
13. Harris, R.E. y Pindak, F.F. (1975). Viral replication in human ovarian cell culture. *Gynecol*. 46(2):227-230.
14. He, T.C., A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc., Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95:2509-2514.
 50
15. Kamata, T. y Y. Takada, Direct binding of collagen to the I domain of integrin alpha 2 beta 1 (VLA-2, CD49b/CD29) in a divalent cation-independent manner. *J Biol Chem*, 1994. 269(42): pág. 26006-10.
 55
16. Kramer, R.H. y N. Marks, Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells. *J Biol Chem*, 1989. 264(8): pág. 4684-8.
17. McCracken, A.W. y K.M. Wilkie, Epidemic pleurodynia in Aden associated with infection by echovirus type 1. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1969. 63(1): pág. 85-8.
 60
18. Moser, T.L., S.V. Pizzo, L.M. Bafetti, D.A. Fishman, y M.S. Stack, Evidence for preferential adhesion of ovarian epithelial carcinoma cells to type I collagen mediated by the alpha2beta1 integrin. *Int J Cancer*, 1996. 67(5): pág. 695-701.
 65

19. Natalie PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicotra MR, Di Filippo F, Giannarelli D, Temponi M, Ferrone S (1997). Clinical significance of alpha(v)beta3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res.* Abril 15; 57(8):1554-60.
- 5 20. Nemunaitis J (1999). Oncolytic viruses. *Investigational New Drugs* 17:375-386.
21. Pietianen, V. et al., (2000). Effects of echovirus 1 infection on cellular gene expression. *Virology.* 276:253-50.
- 10 22. Pevear, D.C. et al., (1999). Activity of pleconaril against enteroviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2109-15.
23. Ramos, D.M., E.D. Berston, y R.H. Kramer, Analysis of integrin receptors for laminin and type IV collagen on metastatic B16 melanoma cells. *Cancer Res.* 1990. 50(3): pág. 728-34.
- 15 24. Randazzo BP, Kesari S, Gesser RM, Alsop D, Ford JC, Brown SM, Maclean A y Fraser NW (1995). Treatment of experimental intracranial murine melanoma with a neuroattenuated herpes simplex virus 1 mutant *Virology* 211:94-101.
- 20 25. Reed, L.J. y H.A. Muench, A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg.* 1938. 27: pág. 493-497.
26. Rossmann, M.G., J. Bella, P.R. Kolatkar, Y. He, E. Wimmer, R.J. Kuhn, y T.S. Baker, Cell recognition and entry by rhino- and enteroviruses. *Virology*, 2000. 269(2): pág. 239-47.
- 25 27. Satyamoorthy K, Soballe PW, Soans F y Herlyn M (1997). Adenovirus infection enhances killing of melanoma cells by a mitotoxin. *Cancer Research* 57:1873-1876.
- 30 28. Shafren DR, Dorahy DJ, Ingham RA, Burns GF y Barry RD (1997). Coxsackievirus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. *J Virol.* Jun; 71(6):4736-43.
29. Strong JE, Coffey MC, Tang D, Sabinin P y Lee PWK (1998). The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signalling pathway by reovirus. *J Virol.* 72(12):3351-3362.
- 35 30. Tsao, S.W. et al., (1995). Characterisation of human ovarian surface cells immortalised by human papilloma viral oncogenes (HPV-E6E7 ORFS), *Exp Cell Res.* 218:499-507.
- 40 31. Xiao, C., C.M. Bator, V.D. Bowman, E. Rieder, Y. He, B. Hebert, J. Bella, T.S. Baker, E. Wimmer, R.J. Kuhn, y M.G. Rossmann, Interaction of coxsackievirus A21 with its cellular receptor, ICAM-1. *J Virol.* 2001. 75(5): pág. 2444-51.
32. Xing, L., Non-enveloped virus infection probed with host cellular molecules: a structural study, in Department of Biosciences. 2002, Karolinska Institutet, Suecia: Estocolmo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de echovirus EV1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer en un mamífero, donde las células cancerosas se **caracterizan por que** expresan integrina $\alpha_2\beta_1$.
2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el tratamiento implica la administración del virus en varias etapas de tratamiento.
- 10 3. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el tratamiento implica la administración del virus en combinación con un virus adicional que infecta las células cancerosas, donde las células cancerosas expresan ICAM-1 y el virus adicional es un Coxsackievirus que reconoce ICAM-1 para la infectividad de las células cancerosas.
- 15 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el Coxsackievirus es un serotipo de Coxsackievirus seleccionado entre CVA13, CVA15, CVA18 y CVA21.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el Coxsackievirus es CVA21.
- 20 6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde las células cancerosas son células de un cáncer seleccionado entre un grupo que consiste en cáncer de ovario, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de colon y cáncer colorrectal, o se han propagado desde cáncer de ovario, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de colon o cáncer colorrectal.
- 25 7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde las células cancerosas tienen expresión regulada positivamente de $\alpha_2\beta_1$.
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el medicamento es adecuado para administración tópica, sistémica o intratumoral al mamífero.
- 30 9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la concentración de virus en el medicamento es de aproximadamente 1×10^2 a aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de placas por ml.
10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la concentración de virus en el medicamento es mayor de aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de placas por ml.
- 35 11. Echovirus EV1 para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero, donde las células cancerosas expresan integrina $\alpha_2\beta_1$.
- 40 12. Echovirus EV1 para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 11, donde el tratamiento implica la administración del virus en varias etapas de tratamiento.
- 45 13. Echovirus EV1 para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, donde el tratamiento implica la administración del virus en combinación con un virus adicional que infecta las células cancerosas, donde las células cancerosas expresan ICAM-1 y el virus adicional es un Coxsackievirus que reconoce ICAM-1 para la infectividad de las células cancerosas.
- 50 14. Echovirus EV1 para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 13, donde el Coxsackievirus es un serotipo de Coxsackievirus seleccionado entre CVA13, CVA15, CVA18 y CVA21.
- 55 15. Echovirus EV1 para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 14, donde el Coxsackievirus es CVA21.
16. Echovirus EV1 para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 11, donde las células cancerosas son células de un cáncer seleccionado entre un grupo que consiste en cáncer de ovario, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de colon y cáncer colorrectal, o se han propagado desde cáncer de ovario, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer pancreático, cáncer de colon o cáncer colorrectal.
- 60 17. Echovirus EV1 para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, donde las células cancerosas tienen expresión regulada positivamente de $\alpha_2\beta_1$.
18. Echovirus EV1 para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 11, formulado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 65 19. Echovirus EV1 para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 18, en una forma adecuada para administración tópica, sistémica o intratumoral al mamífero.

20. Echovirus EV1 para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 19, donde la concentración de virus es de aproximadamente 1×10^2 a aproximadamente 1×10^{10} unidades formadoras de placas por ml.
- 5 21. Echovirus EV1 para su uso en el tratamiento de cáncer en un mamífero de acuerdo con la reivindicación 19, donde la concentración de virus es mayor de aproximadamente 1×10^5 unidades formadoras de placas por ml.

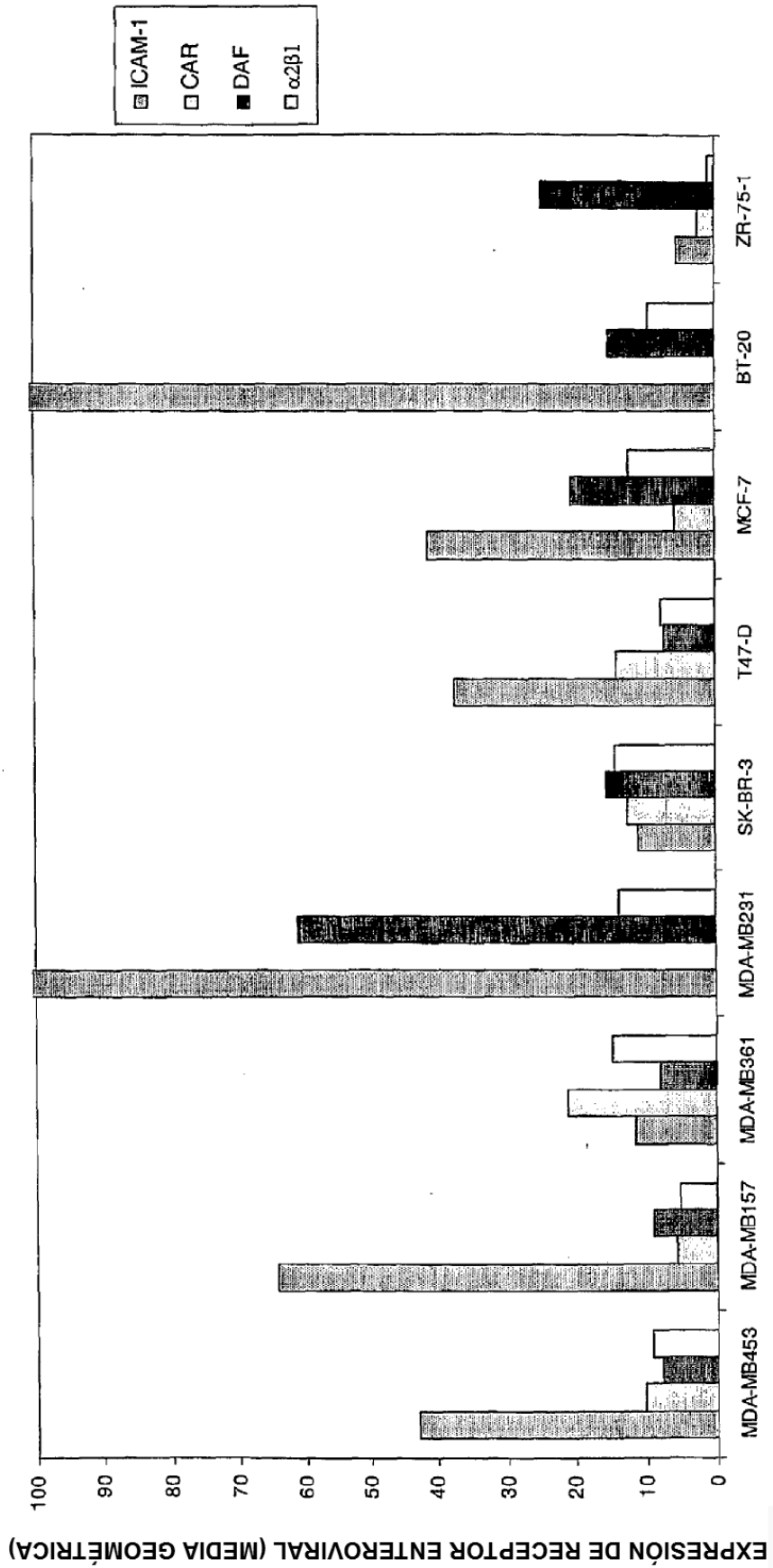


Fig. 1

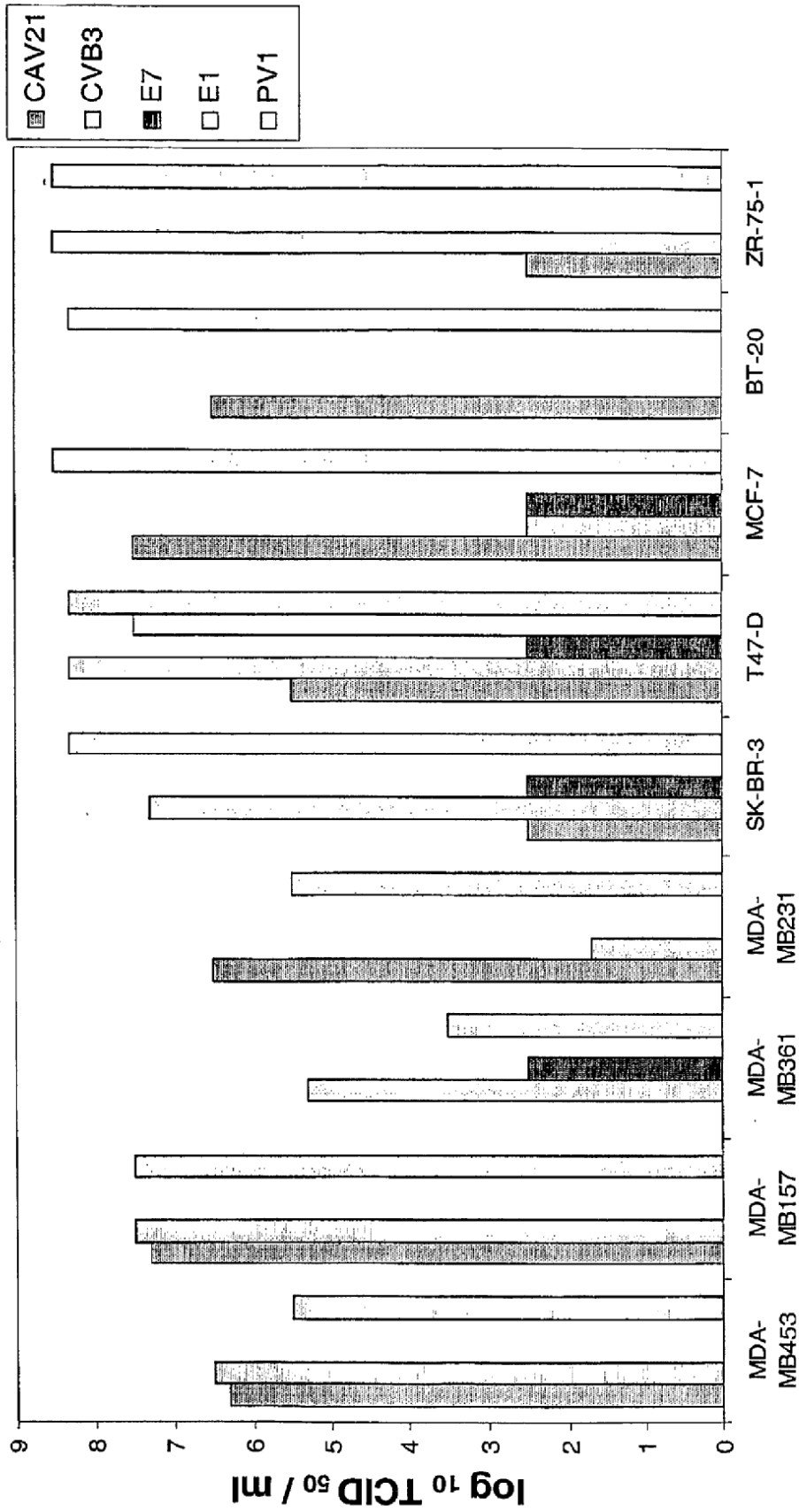


Fig. 2

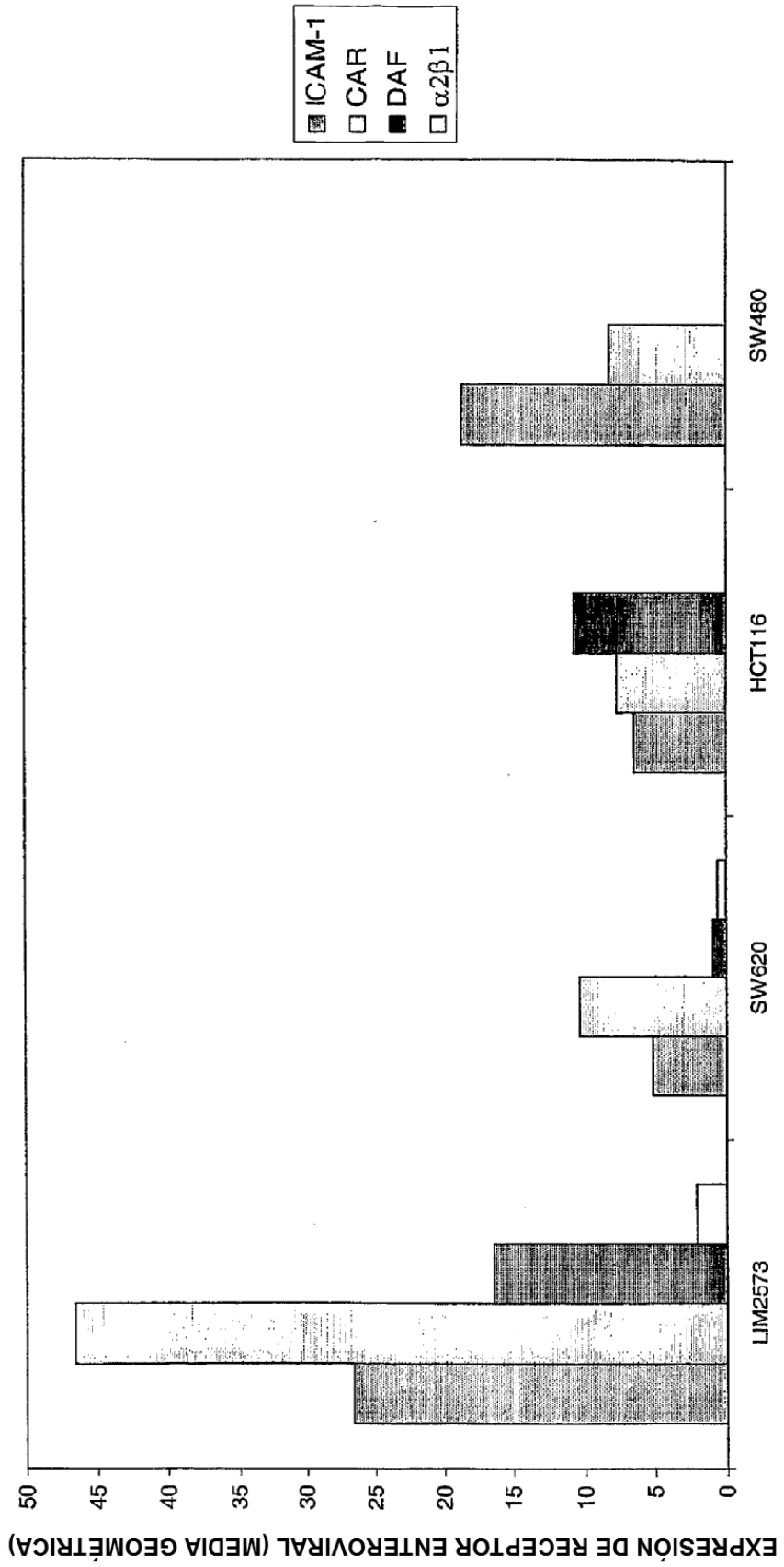


Fig. 3

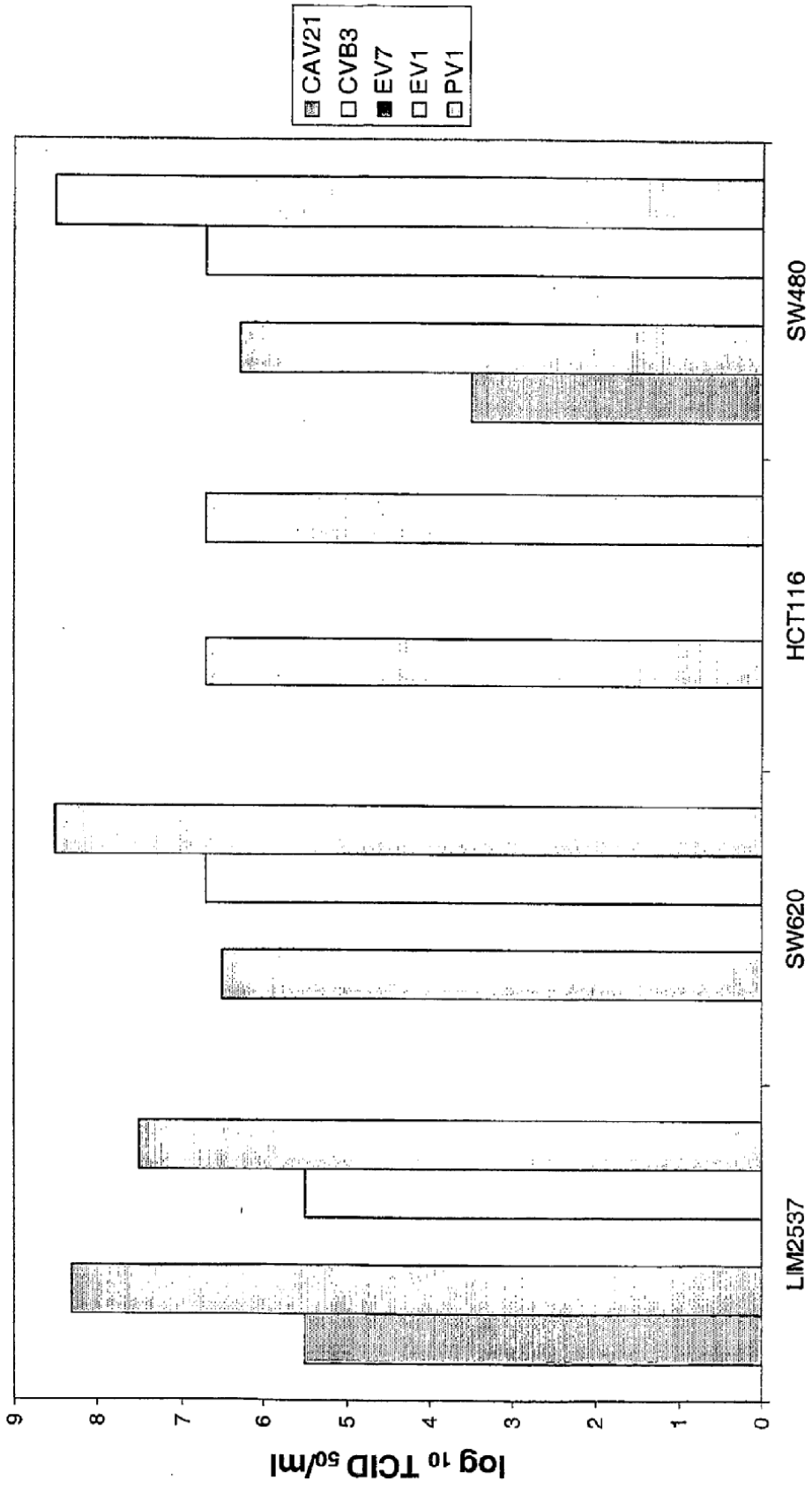


Fig. 4

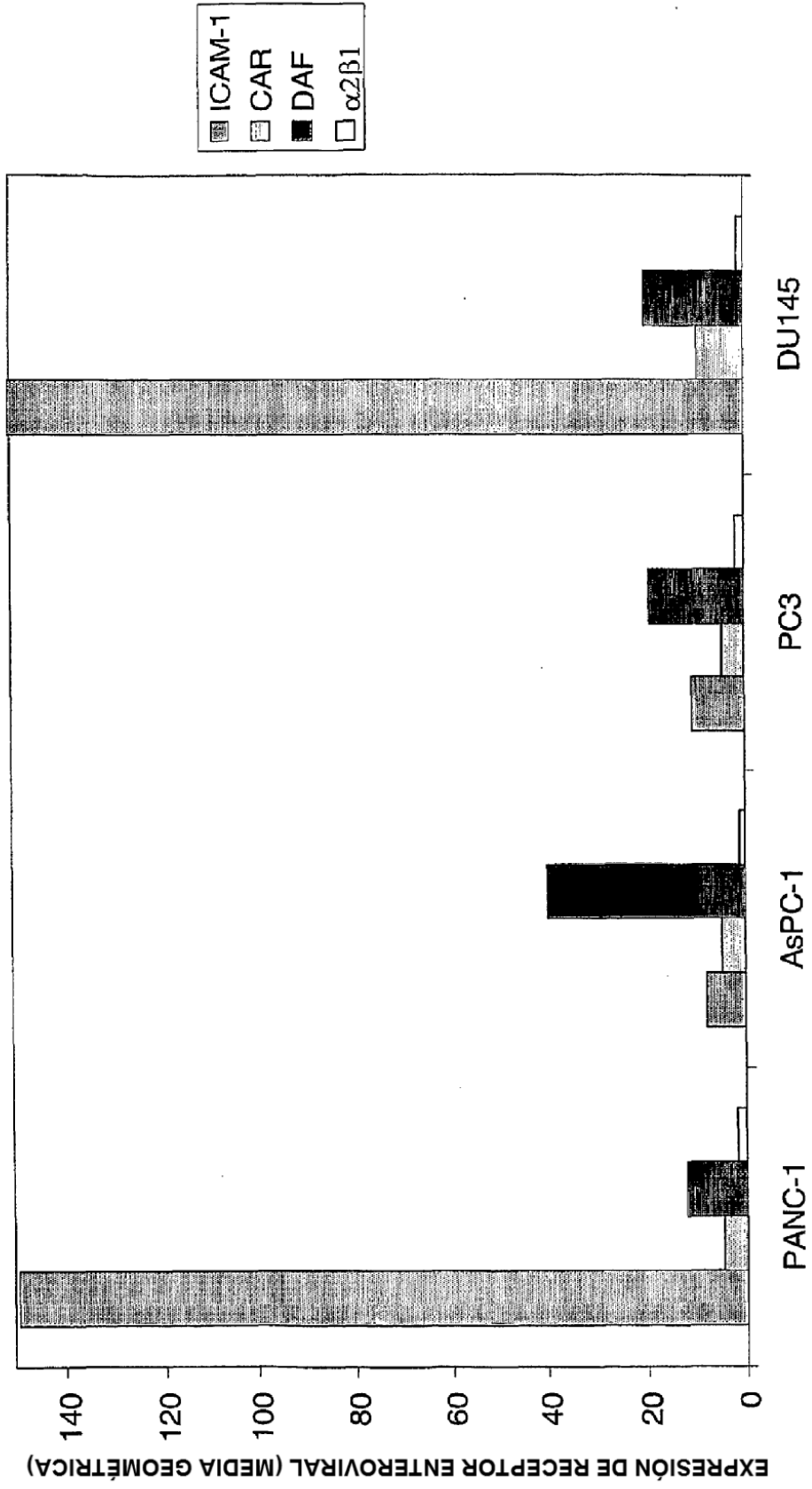


Fig. 5

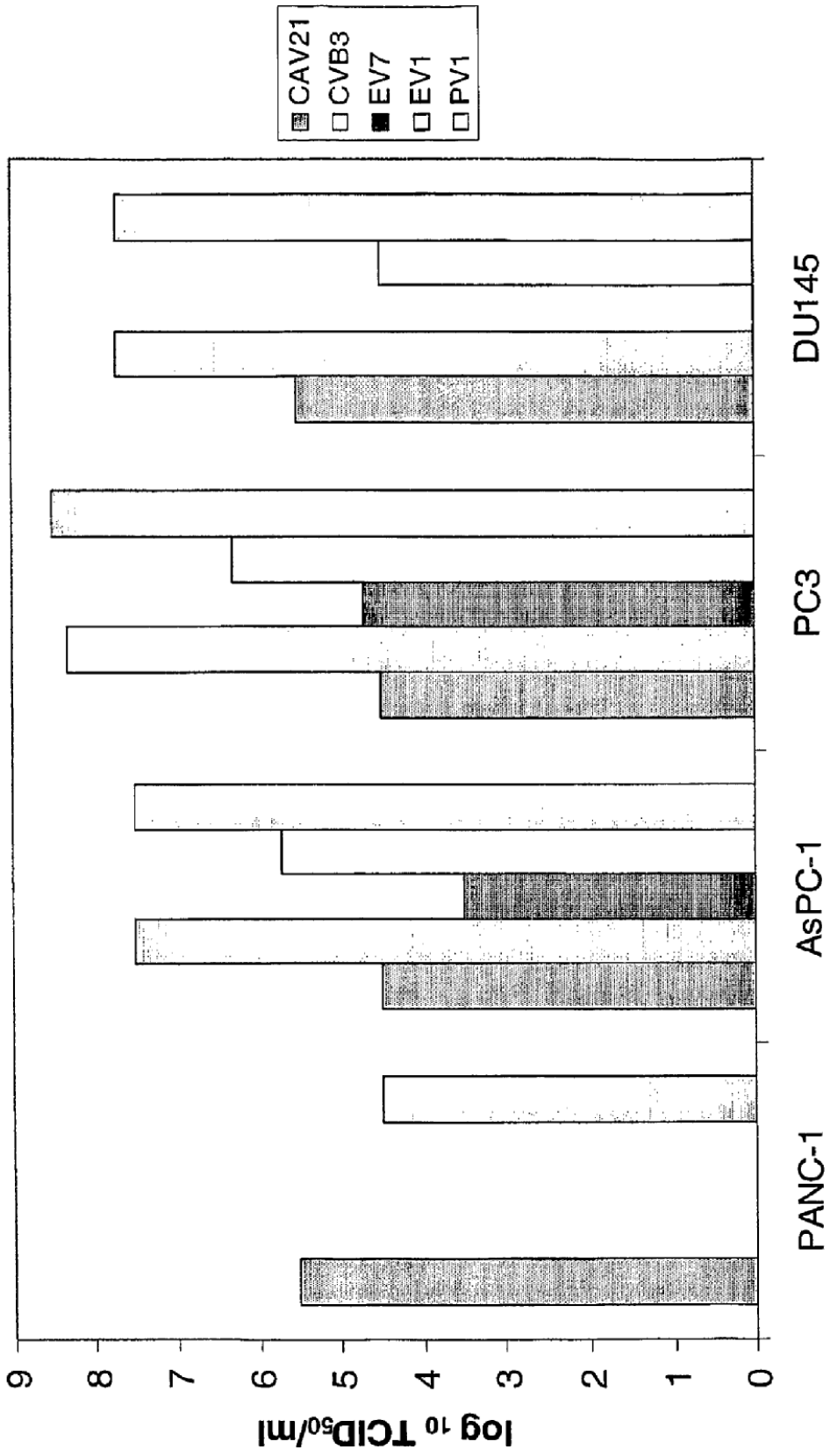


Fig. 6

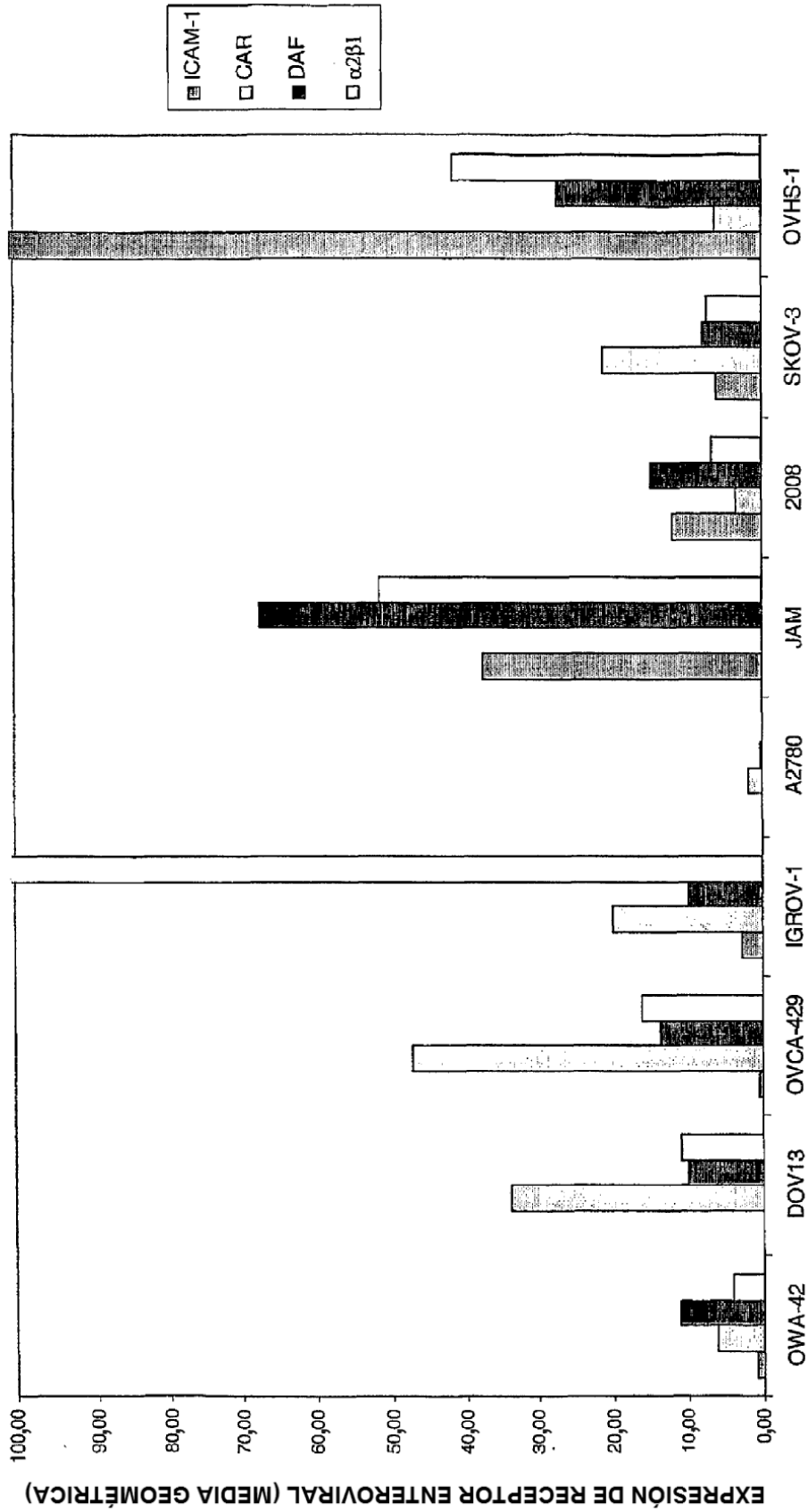


Fig. 7

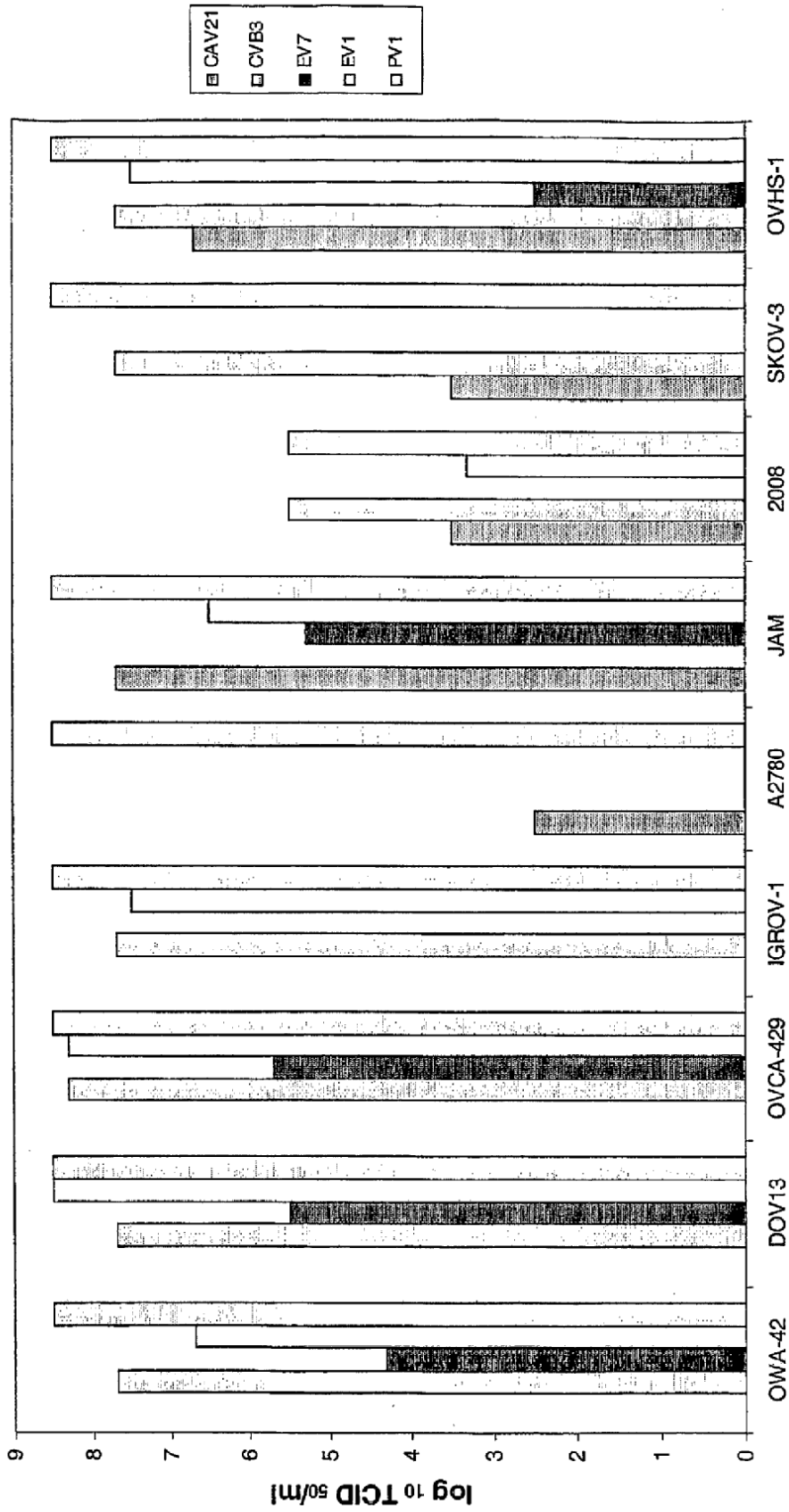


Fig. 8

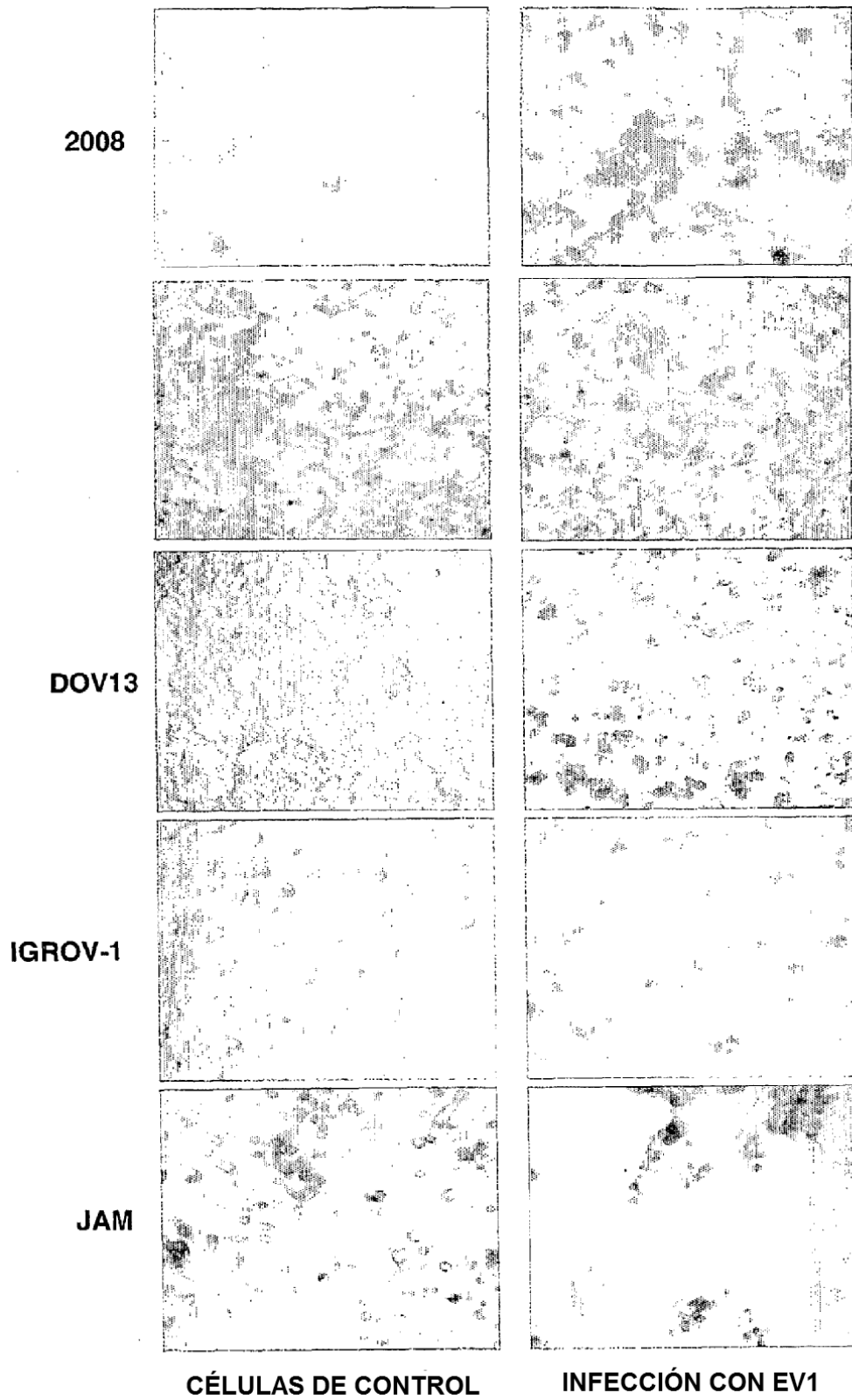


Fig. 9a

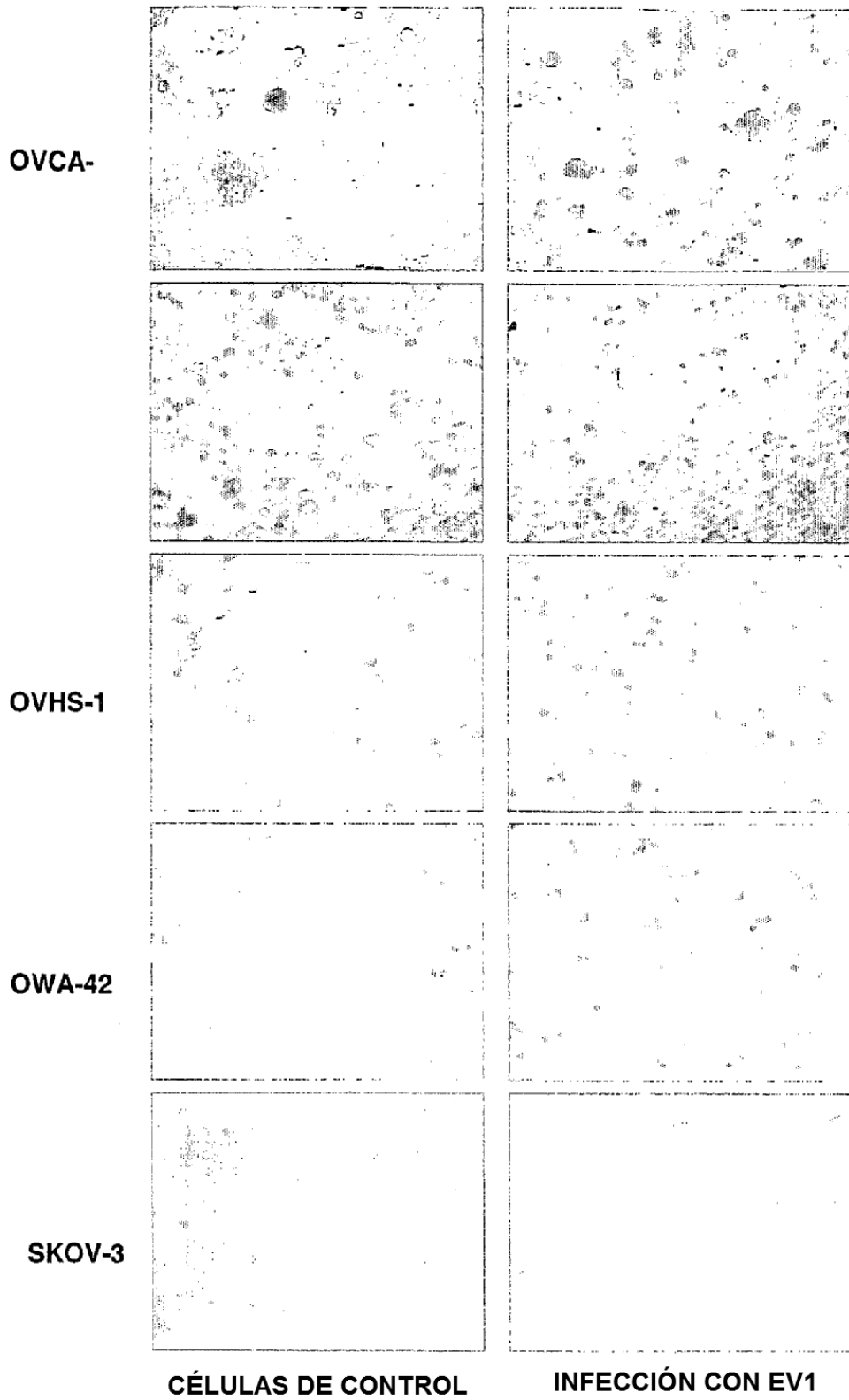
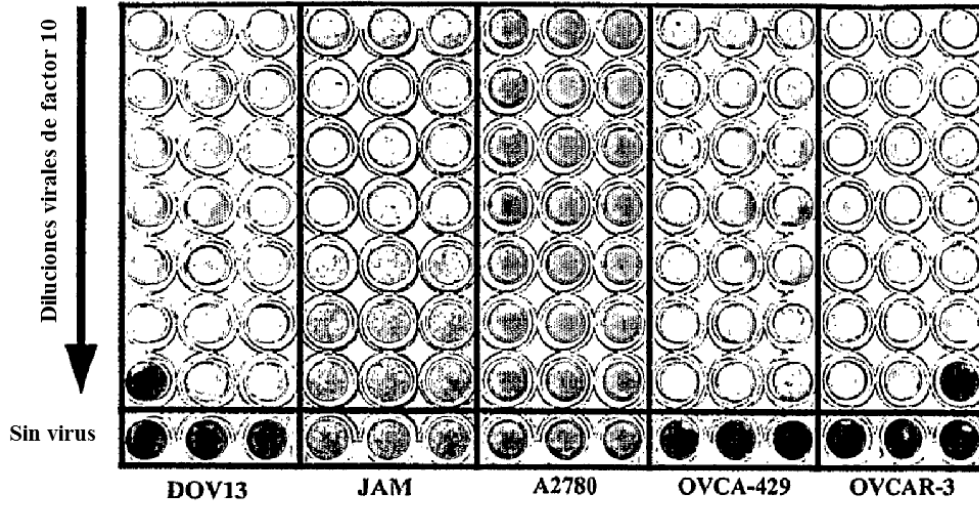


Fig. 9b

Infecciones de 72 horas con echovirus 1



Infecciones de 72 horas con echovirus 1

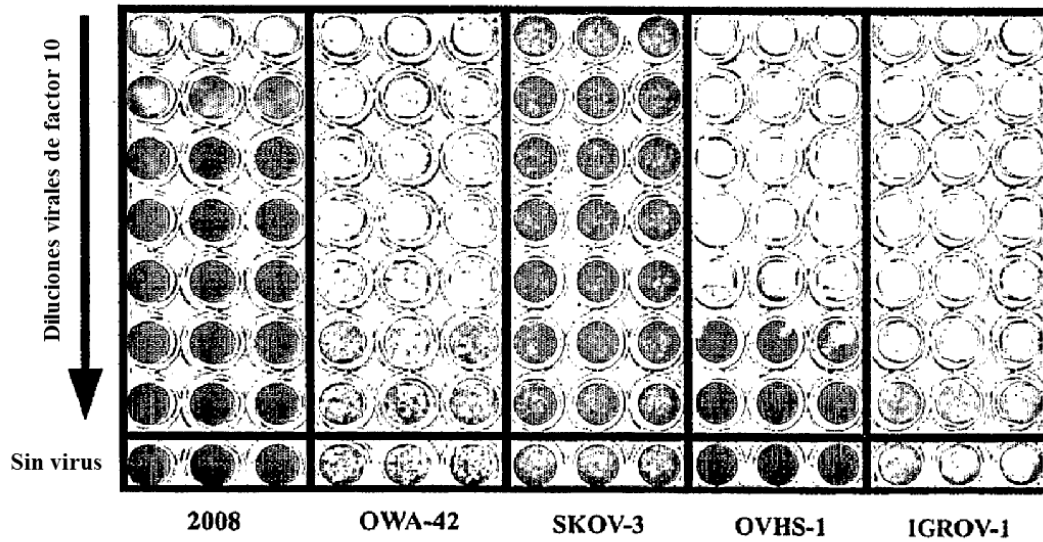


Fig. 10

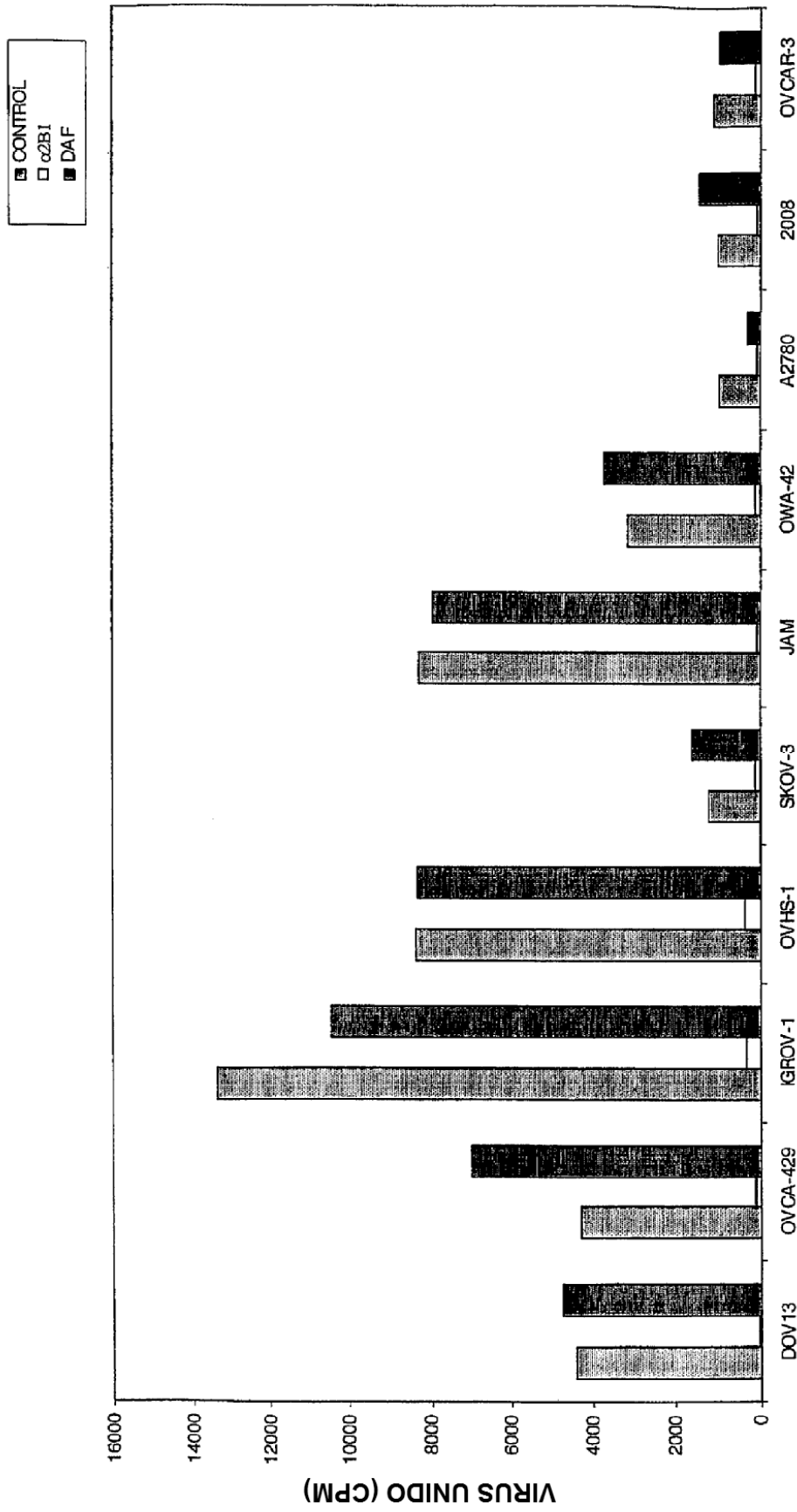


Fig. 11

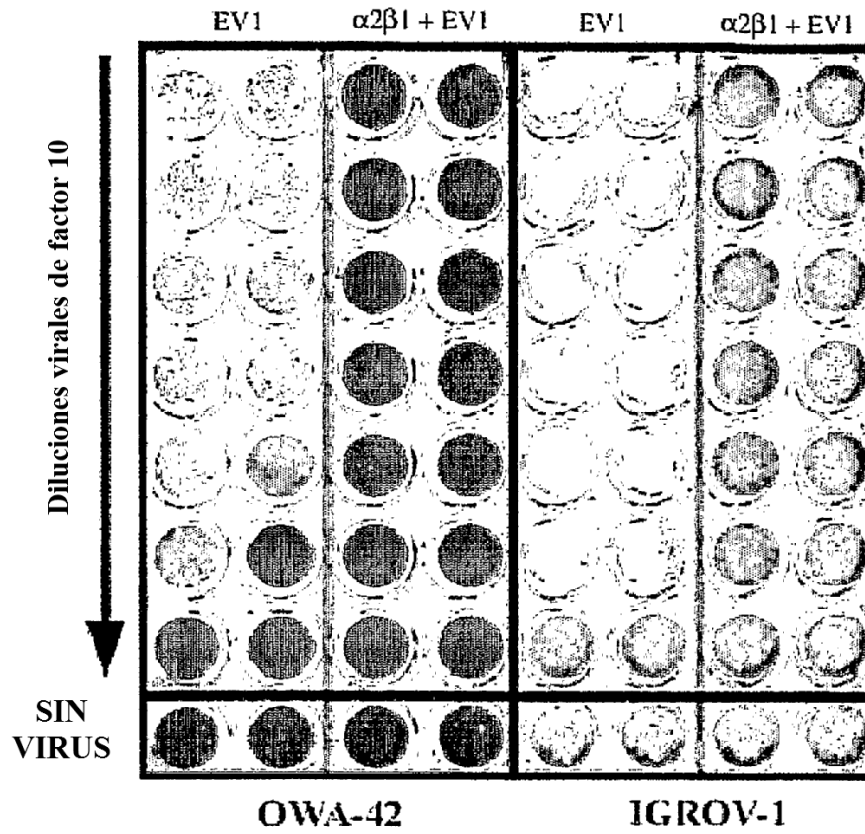


Fig. 12

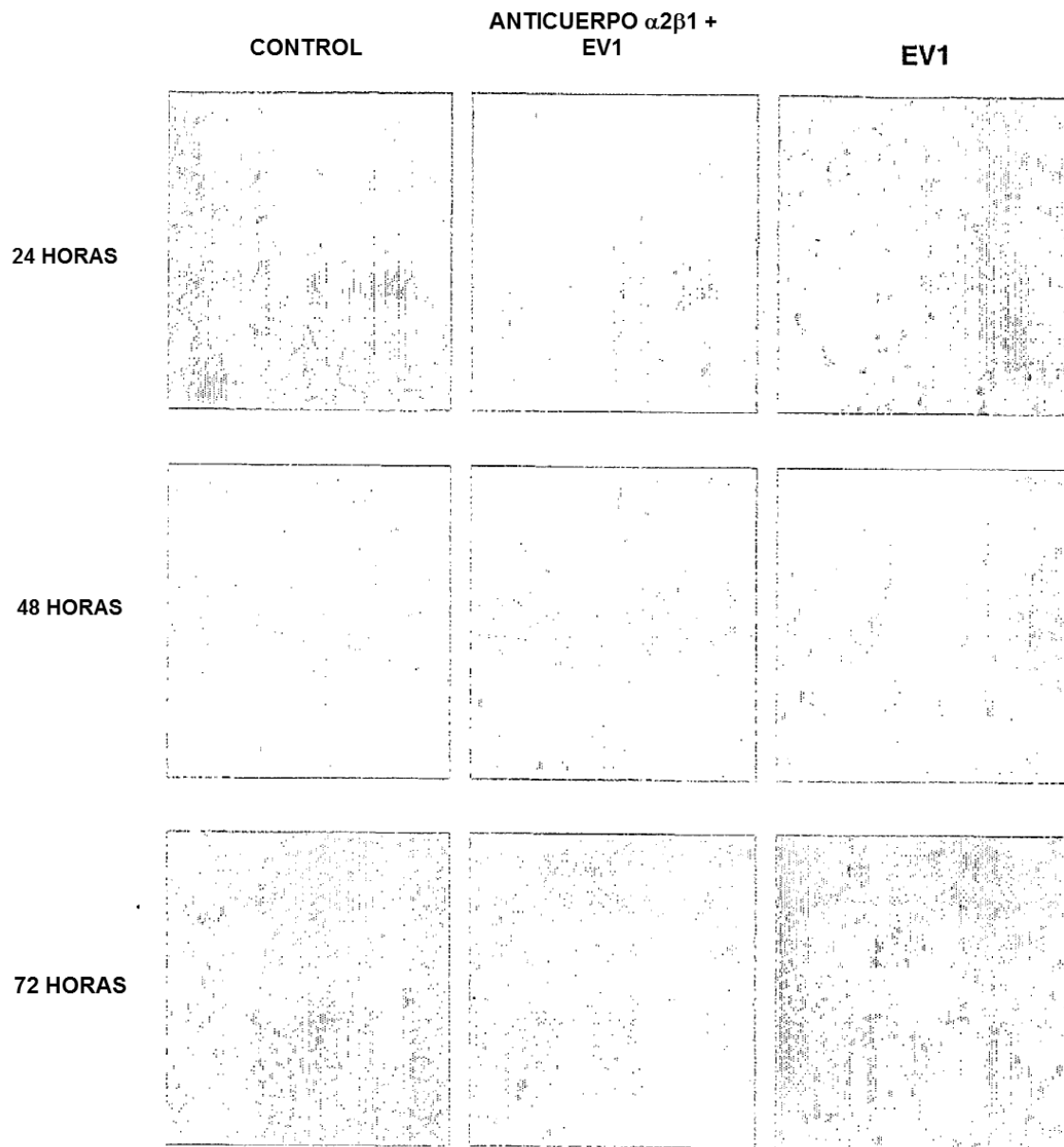


Fig. 13

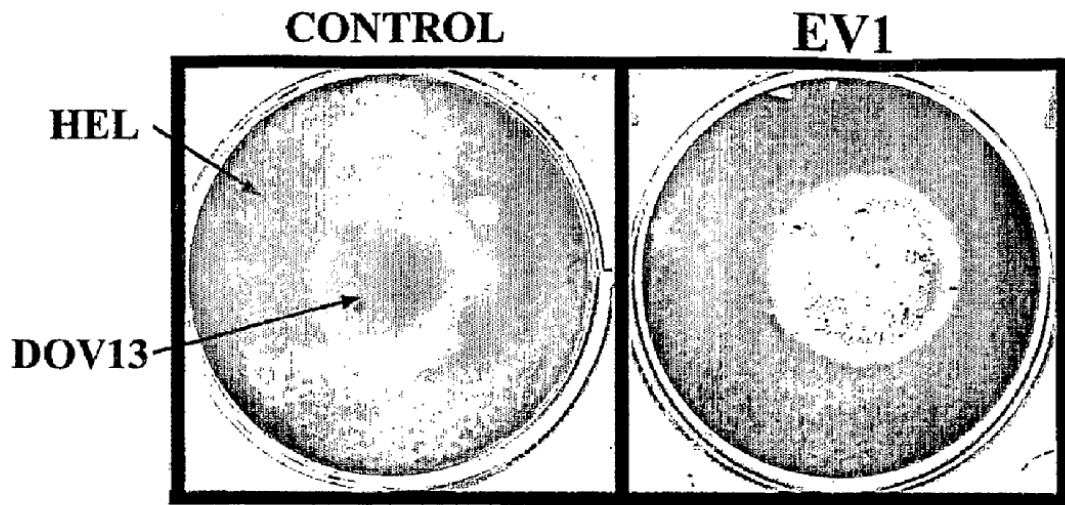


Fig. 14

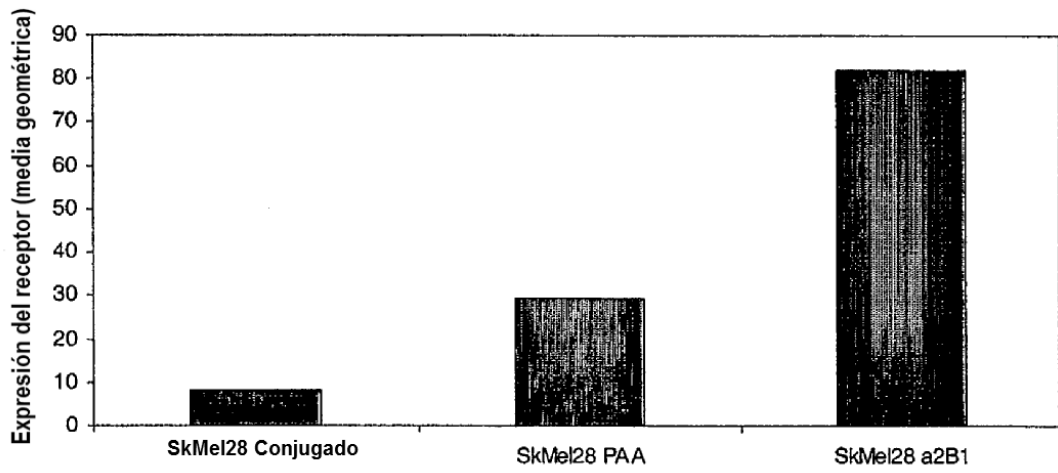


Fig. 15

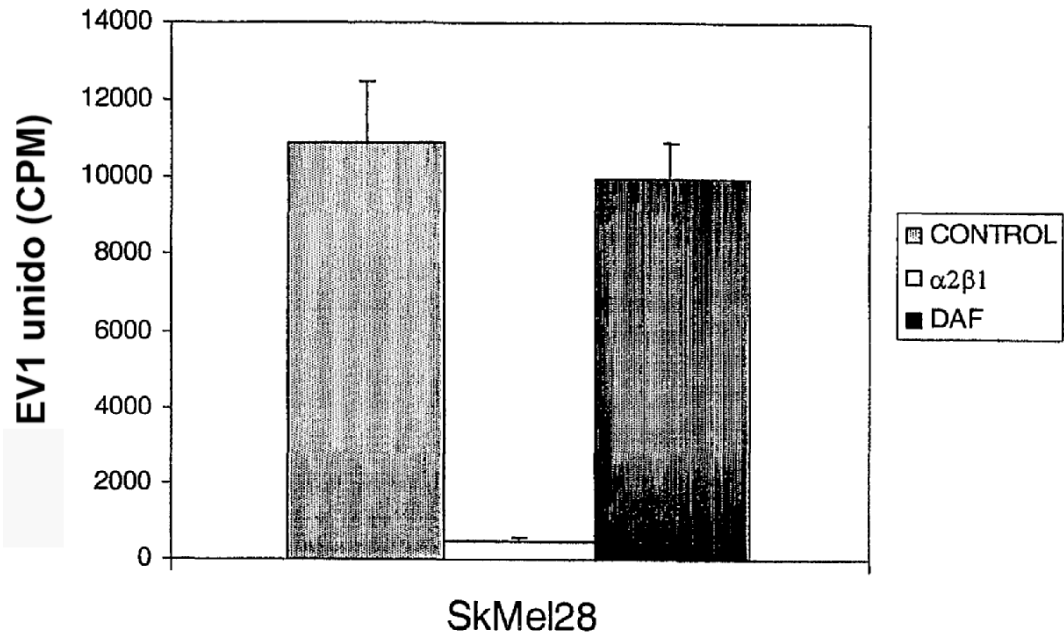


Fig. 16

SkMel28 infectada con EV1

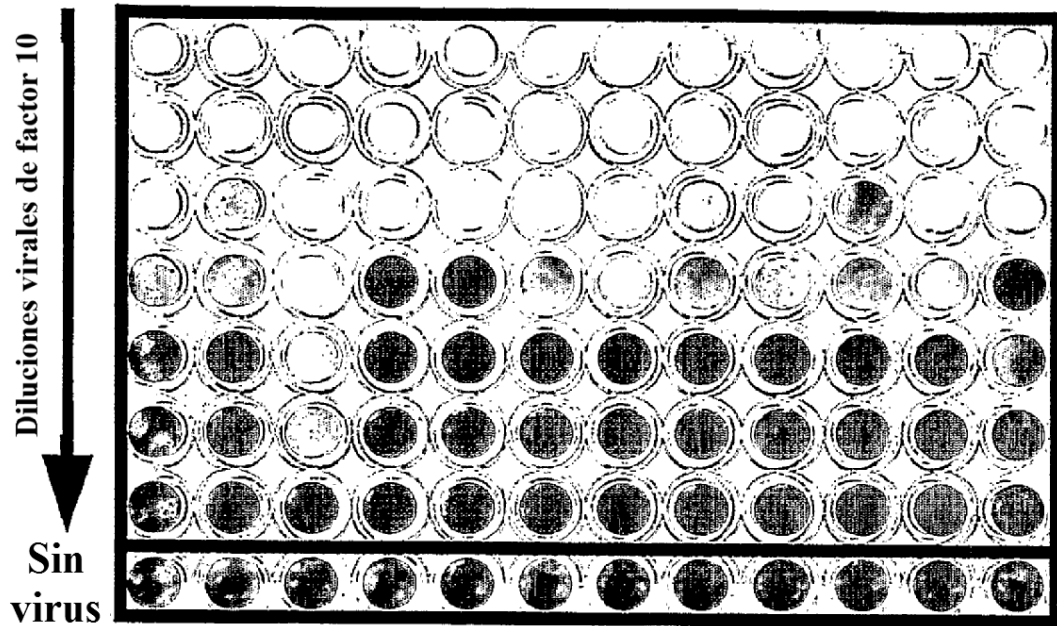
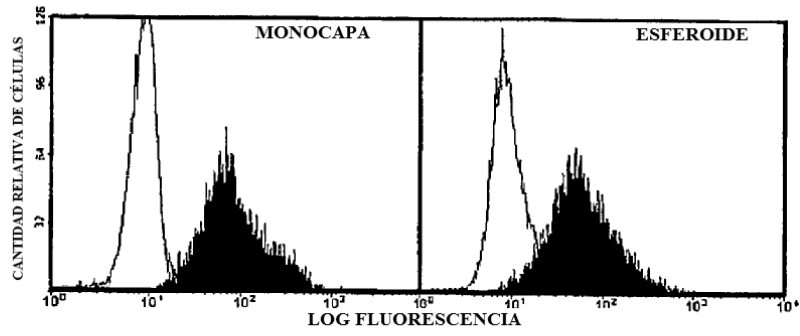


Fig. 17

A



B

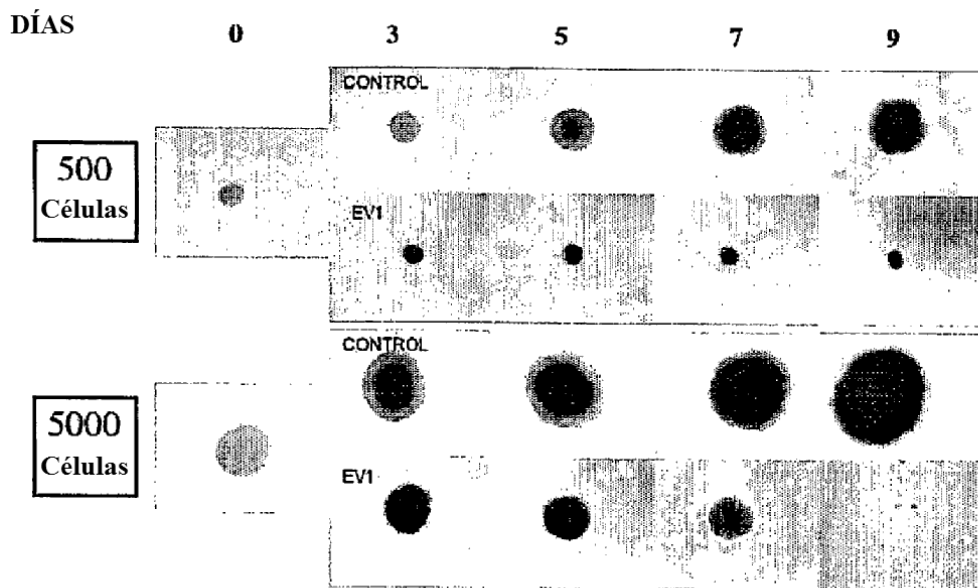


Fig. 18

A

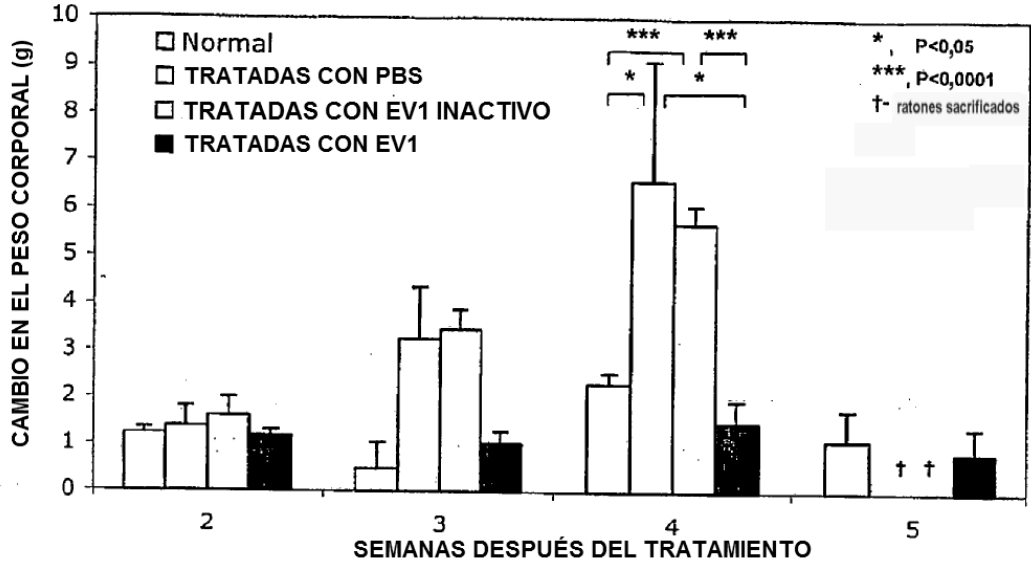


Fig. 19a

B

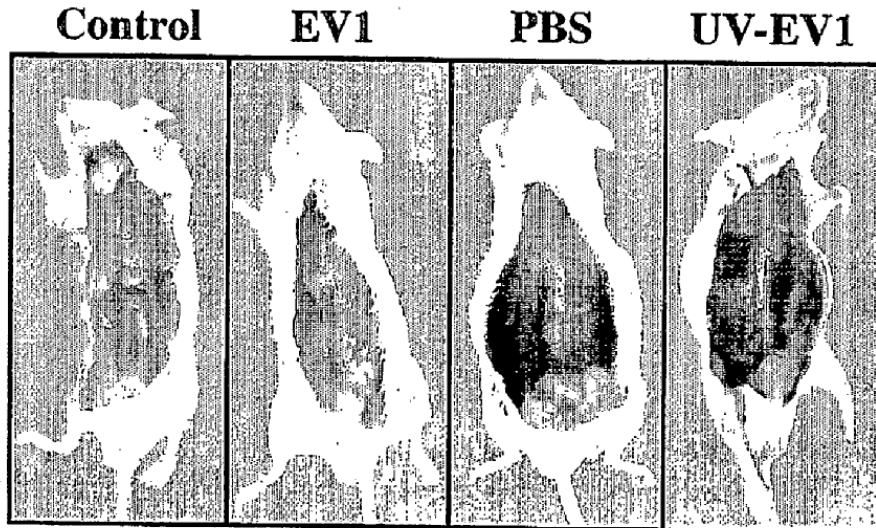


Fig. 19b