

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 952 055**

51 Int. Cl.:

<b>C07D 207/38</b>	(2006.01)	<b>A61K 31/402</b>	(2006.01)
<b>A61P 31/12</b>	(2006.01)		
<b>A61P 37/04</b>	(2006.01)		
<b>C07D 237/14</b>	(2006.01)		
<b>C07D 307/60</b>	(2006.01)		
<b>C07D 307/66</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/00</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/07</b>	(2010.01)		
<b>C12N 7/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/4015</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.01.2016 PCT/CA2016/050061**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2016 WO16119051**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2016 E 16742609 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2023 EP 3250550**

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

30 Prioridad:

**26.01.2015 US 201562107908 P**  
**26.01.2015 US 201562107923 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.10.2023**

73 Titular/es:

**OTTAWA HOSPITAL RESEARCH INSTITUTE**  
**(50.0%)**  
**501 Smyth Road**  
**Ottawa, Ontario K1H 8L6, CA y**  
**UNIVERSITY OF OTTAWA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DIALLO, JEAN-SIMON;**  
**BODDY, CHRISTOPHER NOYCE;**  
**DORNAN, MARK;**  
**KRISHNAN, RAMYA;**  
**ARULANANDAM, ROZANNE;**  
**LE BOEUF, FABRICE;**  
**SMITH, JEFFREY y**  
**MACKLIN, ANDREW**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

**ES 2 952 055 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para la sensibilización viral

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos, métodos y composiciones que mejoran la infección, el crecimiento, la propagación y/o la productividad virales.

10 **Antecedentes de la invención**

Las vacunas han sido históricamente la estrategia más exitosa de la sociedad para la prevención de enfermedades humanas mortales. La viruela, la polio, el sarampión, la parotiditis (paperas) y la rubéola se han eliminado esencialmente de la población humana allí donde se han aplicado con éxito programas de vacunación generalizados.

La respuesta antiviral celular innata es la primera línea de defensa para controlar la replicación y propagación víricas y constituye un impedimento importante para la expresión del material genético codificado por virus. La maquinaria de detección del virus celular detecta proteínas virales y/o ácidos nucleicos a través de receptores de reconocimiento de patrones. Por ejemplo, la activación de receptores de tipo Toll (TLR) y sensores intracelulares tales como RIG-I y PKR conduce a la activación aguas abajo de factores de transcripción tales como NF- $\kappa$ B e IRF (factores reguladores de interferón) e inducción de interferones de tipo I (IFN). Los IFN secretados actúan de manera distal para inhibir la infección vírica en células no infectadas a través de la activación de Jak/STAT y la regulación positiva de los productos génicos estimulados con interferón que tienen actividades antivirales directas e indirectas [3, 4].

Los virus patógenos de tipo salvaje a menudo portan factores de virulencia que antagonizan con éxito las respuestas antivirales celulares. La mutación de estos factores de virulencia, diseñados o seleccionados, puede conducir a la atenuación viral y al intervalo de células huésped restringido [5, 6]. Este concepto fundamental es la base de los productos terapéuticos basados en virus modernos, que permiten la generación de vacunas vivas atenuadas, así como otros virus terapéuticos tales como virus oncolíticos y vectores de terapia génica. Sin embargo, la atenuación de los virus puede comprometer su crecimiento en células que se requieren para su producción. Esto incluye células normales (p. ej., MRC-5, WI-38, fibroblastos embrionarios de pollo o CEF), células inmortalizadas (p. ej., células Vero, células HEK293), células cancerosas (p. ej., HeLa, BHK21), así como células contenidas en óvulos embrionados. Para este fin, se necesitan estrategias rentables para aumentar la productividad de las vacunas y virus atenuados de las células.

Se ha descubierto recientemente una entidad química denominada Sensibilizante Viral 1 (VSe1) ([18]) que mejora la productividad de virus atenuados en las células. Los datos recopilados hasta la fecha sugieren que VSe1 impide los sistemas clave de señalización antiviral, pero sus dianas moleculares precisas permanecen elusivas. VSe1 puede suprimir la protección mediada por IFN de las células de glioma humano U251 que responden a IFN a la infección por VSV $\Delta$ 51 e inhibir la actividad transcripcional inducida por IFN de un promotor sensible a IFN [18]. Además, el tratamiento de las células con VSe1 reprime uniformemente la transcripción de >95 % de los genes celulares inducidos por virus, siendo la mayoría genes estimulados con IFN antiviral según se evalúa mediante micromatrices de expresión génica [18]. A pesar de los mecanismos de acción potenciales adicionales, estos datos sugieren que VSe1 interfiere con la función adecuada de propagación de la señal inducida por IFN. Se ha demostrado que VSe1 puede usarse para aumentar la productividad de las vacunas y virus oncolíticos atenuados (documento WO/2011/003191). Sin embargo, también se ha descubierto que VSe1 es altamente electrófilo y susceptible a ataque nucleofílico y altamente lábil en medios acuosos a pH neutro.

Una serie de 5-alcoxiladas 3,4-dicloro-2 (5H)-furanonas Sa-o se han sintetizado y evaluado en cultivo de tejidos en líneas celulares cancerosas (Lattmann et al., Cytotoxicity of 3,4-dihalogenated 2(5H)-furanones, Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol. 56, Núm. 9, 1 de septiembre de 2004, páginas 1163-1170).

El documento WO 2009/031040 describió compuestos de diona de azol sustituidos que tienen actividad contra el cáncer y/o actividad contra las células proliferantes y el documento CA2765066 presentaba compuestos que potencian el crecimiento, la diseminación o la citotoxicidad viral.

Un cribado para compuestos que inhiben la capacidad de HPV-E7 para alterar los complejos pRb/E2F condujo a la identificación de compuestos de tiadiazolidindiona que se unen a pRb con constantes de disociación nanomolar media-alta, son competitivos con la unión de oncoproteínas virales que contienen un motivo LxCxE, y son selectivamente citotóxicas en células positivas para VPH solas y en ratones (Fera et al., Identification and characterization of small molecule antagonists of pRb inactivación by viral oncoproteins, Chemistry and Biology, Current Biology, Londres, GB, Vol. 19, Núm. 4, 20 de abril de 2012, páginas 518-528).

65

Existe una necesidad en la técnica de identificar compuestos y composiciones que mejoren la productividad del virus a partir de células. También existe una necesidad en la técnica de identificar compuestos que mejoren la productividad de virus a partir de células tales como VSe1 pero con electrofilia reducida y estabilidad mejorada y reteniendo un perfil de mutagenicidad favorable.

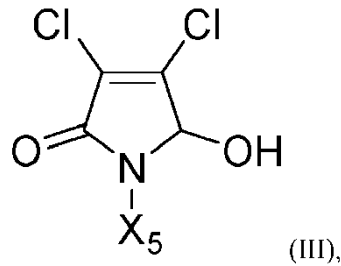
5

**Resumen de la invención**

La presente invención se refiere a compuestos, métodos y composiciones que mejoran la infección, el crecimiento, la propagación y/o la productividad virales. La materia objeto para la que se busca protección es como se define en las reivindicaciones. Cualquier referencia a “descripción” o una “realización” que no se encuentre dentro del alcance de las reivindicaciones está presente solo con fines explicativos y no forma parte de la invención. Cualquier referencia a los métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción debe interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o diagnóstico).

15

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un compuesto sensibilizante viral que se define por la fórmula (III):



20

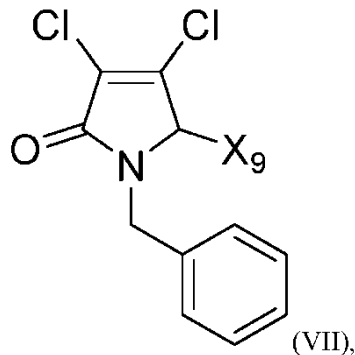
en donde X<sub>5</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> o alquino C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, mono- o bi-cicloarilo o -heteroarilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, alquilfenilo, bencilo sustituido, tiofenilo, sulfonobencilo, metilsulfonobencilo, alquinoxil sustituido o no sustituido;

25

para su uso en un método para potenciar la infección, crecimiento, propagación y/o productividad virales en terapia génica, vacuna o terapia oncolítica, como se define en la reivindicación 1.

30

En otra realización más, se proporciona en la presente memoria un compuesto sensibilizante viral definido por la fórmula (VII):



35

en donde X<sub>9</sub> es OH.

40

En otra realización más, un compuesto como el descrito anteriormente puede ser un compuesto que presenta una actividad sensibilizante viral en VSVΔ51 en células 786-0 que es aproximadamente 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, o mayor, o cualquier intervalo limitado en un extremo inferior por cualquiera de estos valores, cualquier intervalo limitado en un extremo superior por cualquiera de estos valores, o cualquier intervalo comprendido entre cualquiera de estos dos valores, cuando se informa como nivel de cambio máximo en la unidad de expresión viral normalizada a 3,4-dicloro-5-fenil-2,5-dihidrofuran-2-ona. En una realización, por ejemplo, el compuesto puede ser un compuesto que presenta una actividad sensibilizante viral en VSVΔ51 en células 786-0, que es mayor o igual (≥) que aproximadamente 0,01, cuando se informa como nivel de cambio máximo en la unidad de expresión viral normalizada a 3,4-dicloro-5-fenil-2,5-dihidrofuran-2-ona.

45

En otra realización más, un compuesto como el descrito anteriormente puede ser un compuesto para el que más de, aproximadamente, el 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, o más, o cualquier intervalo limitado en un extremo inferior por cualquiera de estos valores, cualquier intervalo limitado en un extremo superior por cualquiera de estos valores, o cualquier intervalo comprendido entre cualquiera de estos dos valores, del compuesto permanece después de 3 horas de incubación a 37 °C en plasma acuoso de ratón Balb/c rico en proteínas tamponado 1:1 con solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4 (PBS). Por ejemplo, un compuesto como el descrito anteriormente puede ser un compuesto para el cual más o igual ( $\geq$ ) que aproximadamente el 0,5 % del compuesto permanece después de 3 horas de incubación a 37 °C en plasma acuoso de ratón Balb/c rico en proteínas rico tamponado 1:1 con solución salina tamponada con fosfato (PBS) de pH 7,4.

En otra realización más, un compuesto como el descrito anteriormente puede ser un compuesto que tiene un LD<sub>50</sub> en presencia de virus que es menor o igual ( $\leq$ ) a aproximadamente 1  $\mu$ m, 5  $\mu$ m, 10  $\mu$ m, 15  $\mu$ m, 20  $\mu$ m, 25  $\mu$ m, 30  $\mu$ m, 35  $\mu$ m, 40  $\mu$ m, 45  $\mu$ m, 50  $\mu$ m, 55  $\mu$ m, 60  $\mu$ m, 65  $\mu$ m, 70  $\mu$ m, 75  $\mu$ m, 80  $\mu$ m, 85  $\mu$ m, 90  $\mu$ m, 95  $\mu$ m, 100  $\mu$ m, 105  $\mu$ m o 110  $\mu$ m, o cualquier intervalo comprendido entre dos de estos valores, diferente (más o menos) del LD<sub>50</sub> del mismo compuesto en ausencia de virus según se determina en, por ejemplo, células 786-0 donde el virus es VSV.

En otra realización más, se proporciona en la presente memoria una composición para aumentar la producción vírica a partir de una célula, comprendiendo la composición VSe1 y MD03011 (véase la Tabla 1 a continuación).

La presente invención también proporciona una composición que comprende uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria, y un portador, diluyente o excipiente aceptable, para su uso en un método de mejora de la infección, el crecimiento, la propagación y/o la productividad virales en terapia génica, vacuna o terapia oncolítica, tal como se define en la reivindicación 4. En una realización adicional, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, se proporciona en la presente memoria una composición que comprende uno o más compuestos como se ha descrito anteriormente, y uno o más de a) un virus, un virus genéticamente modificado, un virus atenuado, una vacuna, un vector de terapia génica o un virus oncolítico, b) una o más células cancerosas, c) un portador, diluyente o excipiente, d) un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, e) células no cancerosas; f) medios de cultivo celular; g) una o más células derivadas de, o contenidas en, óvulos embrionados no humanos; o cualquier combinación de a)-g) para su uso en un método para potenciar la infección, el crecimiento, la propagación y/o la productividad virales en terapia génica, vacuna o terapia oncolítica, tal como se define en la reivindicación 5.

La presente invención proporciona además un kit para su uso en un método para potenciar la infección, crecimiento, propagación y/o productividad virales en terapia génica, vacuna o terapia oncolítica, que comprende los uno o más compuestos como se describe en la presente memoria, y uno o más de a) un virus, un virus genéticamente modificado, un virus atenuado, una vacuna, un vector de terapia génica o un virus oncolítico, b) una o más células cancerosas, c) un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, d) células no cancerosas; e) medios de cultivo celular; f) células derivadas de, o contenidas en, óvulos embrionados no humanos; g) una placa de cultivo celular o placa de múltiples pocillos; h) un aparato para administrar el compuesto a una célula, medio o a óvulos no humanos; i) instrucciones para usar el compuesto o cualquier componente en el kit, o cualquier combinación de a)- i), tal como se define en la reivindicación 7.

También se describe, pero no se reivindica, un método para potenciar o aumentar la infección, la propagación y/o el título de un virus en o a partir de células, y/o aumentar la producción viral en o a partir de células, que comprende, administrar uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria a las células antes, después o simultáneamente con el virus, y cultivar el virus y las células para potenciar la infección, propagación y/o título del virus en dichas células y/o para aumentar la producción viral a partir de las células. En tales realizaciones, debe entenderse que las células descritas pueden ser infectadas por el virus y de que el virus puede infectar las células.

En otra realización de un método como el descrito anteriormente, las células pueden ser células cultivadas, células adherentes o en suspensión, células cancerosas, células tumorales o células que se han inmortalizado, células primarias, células no inmortalizadas, células normales, óvulos no humanos o células de óvulo contenidas dentro o derivadas de óvulos embrionados no humanos.

En una realización adicional, las células pueden ser, a modo de ejemplo no limitante, células cultivadas, células primarias, células no cancerosas, células inmortalizadas, células cancerosas o células tumorales, o células contenidas dentro de un óvulo embrionado no humano, o células que son CEF, MDCK, HEK293, 4T1, A549, 786-0, células de tejido cerebral, células de tejido muscular, Vero, HeLa, MRC-5, WI-38, BHK21, PER.C6, EB66, AGE1.CR o células EBx.

En otra realización más de un método como el descrito anteriormente, las células pueden ser células cancerosas o no cancerosas *in vitro*.

En otra realización de un método como el descrito anteriormente, el virus puede ser un virus atenuado, un virus genéticamente modificado o un virus usado para producir antígenos virales para una vacuna. Los ejemplos pueden incluir, aunque no de forma limitativa, un derivado natural o genéticamente modificado o atenuado de rotavirus, rabia, hepatitis A, gripe B, virus adenoasociado, virus del dengue, virus del sarampión, reovirus, virus de las paperas, virus de la rubéola, virus de la encefalitis japonesa, poliovirus, lentivirus, retrovirus, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), un rhabdovirus (tal como, aunque no de forma limitativa, VSV o un virus maraba tal como MG1), HSV, virus Vaccinia, cepa de vacuna de Vaccinia Ankara modificada (MVA), adenovirus, gripe, H1N1, A/FM1 (H1N1), un virus de la gripe, un rinovirus, gripe A o cualquier otro virus que pueda cultivarse en células y utilizarse en la producción de una vacuna.

En otra realización más de un método como el descrito anteriormente, potenciar o aumentar la producción viral puede comprender una o más de las siguientes acciones: potenciar o aumentar la infección de células y/o su tasa, potenciar o aumentar la capacidad reproductiva de un virus y/o su tasa, potenciar o aumentar la propagación y/o el título de un virus y/o la tasa a la que puede alcanzarse el título completo del virus, potenciar o aumentar la expresión de antígenos de un virus y/o su tasa, potenciar o aumentar la expresión de genes o transgenes de un virus y/o su tasa, o potenciar o aumentar la expresión de proteínas víricas en células y/o su tasa, o cualquier combinación de las mismas.

En otra realización más, se proporciona en la presente memoria un método para potenciar o aumentar la producción vírica en células, que comprende administrar VSe1 y MD03011 simultáneamente, secuencialmente o en combinación, a dichas células antes, después o simultáneamente con un virus, y cultivar el virus y las células.

Además, la presente descripción proporciona una composición que comprende uno o más de los compuestos descritos anteriormente y, opcionalmente, uno o más de a) un virus, un virus atenuado, un virus genéticamente modificado, una vacuna, un vector de terapia génica o un virus oncolítico; b) una o más células cancerosas; c) un portador, diluyente o excipiente; d) un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; e) células no cancerosas o normales; f) medios de cultivo celular; g) factores de crecimiento celular; h) óvulos no humanos o células de óvulos o cualquier combinación de a)-h). La presente descripción también contempla realizaciones en donde una cualquiera o una combinación de a)-h) se excluyen específicamente de la composición o kit. Si se desea, puede excluirse cualquier componente o grupo de componentes.

En otra realización de una composición como la descrita anteriormente que comprende uno o más compuestos como los descritos anteriormente, la composición puede comprender un virus que es capaz de infectar a una célula, y una célula que es capaz de ser infectada por el virus, en donde el compuesto o compuestos actúan para potenciar o aumentar la producción de virus.

En una realización particular, se proporciona un compuesto como el descrito anteriormente, y un medio, para hacer crecer, cultivar o infectar a células con un virus y opcionalmente, una o más células que son capaces de ser infectadas por el virus. En una realización adicional, las células son células cultivadas, células primarias, células no cancerosas, células inmortalizadas, células cancerosas o células tumorales, o células contenidas dentro de un óvulo embrionado no humano. En una realización alternativa, que no pretende ser limitante, las células son CEF, MDCK, HEK293, 4T1, A549, 786-0, Vero, HeLa, MRC-5, WI-38, BHK21, PER.C6, EB66, AGE1.CR o EBx.

También se proporciona un kit que comprende el compuesto como el descrito anteriormente y a) un virus, un virus atenuado o genéticamente modificado, una vacuna, un vector de terapia génica o un virus oncolítico; b) una o más células cancerosas; c) un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable; d) células no cancerosas; e) medios de cultivo celular; f) factores de crecimiento celular, g) una placa de cultivo celular o una placa de pocillos múltiples; h) uno o más óvulos no humanos o células de óvulo; i) un aparato para suministrar el compuesto sensibilizante viral a una célula, medio u óvulos no humanos; j) instrucciones para usar el compuesto o agente sensibilizante viral; k) un portador, diluyente o excipiente, o cualquier combinación de a)-k). La presente descripción también contempla kits en donde se excluye específicamente uno cualquiera o una combinación de los mismos de a)-k).

En una realización particular, se proporciona un kit que comprende un compuesto como el descrito anteriormente, y un medio, para hacer crecer, cultivar o infectar a células con un virus y, opcionalmente, una o más células que son capaces de ser infectadas por el virus. El kit también puede comprender instrucciones para utilizar cualquier componente o combinación de componentes y/o poner en práctica cualquier método como el descrito en la presente memoria.

La presente invención también proporciona un método para potenciar o aumentar la producción viral en células *in vitro* que comprende, administrar el compuesto como se ha descrito anteriormente a las células antes, después o simultáneamente con el virus, y cultivar el virus y las células como se define en la reivindicación 8. El método se lleva a cabo preferiblemente *in vitro* y/o *in ovo* en óvulos no humanos.

La presente descripción también contempla un método para potenciar la infección, propagación y/o título de un virus atenuado o un virus genéticamente modificado en o a partir de células que comprende, administrar el compuesto como se describió anteriormente a las células antes, después o simultáneamente con el virus atenuado o genéticamente modificado.

5 La presente descripción también contempla un método para producir un virus haciendo crecer el virus en un medio apropiado en presencia del compuesto descrito anteriormente.

10 La presente descripción también contempla un método para producir un virus atenuado haciendo crecer el virus en un medio apropiado en presencia del compuesto descrito anteriormente.

La presente descripción también contempla un método para producir un virus genéticamente modificado haciendo crecer el virus en un medio apropiado en presencia del compuesto descrito anteriormente.

15 La presente descripción también contempla un método para producir una vacuna haciendo crecer el virus en un medio apropiado en presencia del compuesto descrito anteriormente.

La presente descripción también contempla un método para producir un vector de terapia génica haciendo crecer el virus en un medio apropiado en presencia del compuesto descrito anteriormente.

20 La presente descripción también contempla un método para producir un virus oncolítico haciendo crecer el virus en un medio apropiado en presencia del compuesto descrito anteriormente.

### Breve descripción de los dibujos

25 Estas y otras características de la descripción resultarán más evidentes a partir de la siguiente descripción en la que se hace referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

30 La **FIGURA 1** muestra una descripción representativa del flujo de trabajo de un ensayo de cuantificación del virus de alto rendimiento utilizado en la presente memoria. A) Flujo de trabajo del ensayo de cuantificación de virus de alto rendimiento. Flujo de trabajo específico para cuantificación de alto rendimiento de la producción de VSVd51-Fluciferasa en células de carcinoma renal humano (786-0). Las preparaciones madre de compuestos están en dimetilsulfóxido (DMSO). Estos se diluyeron primero en DMSO al 5 % (en agua) y luego en medio de cultivo celular para obtener las concentraciones deseadas. El vehículo solo (DMSO) se usó como control negativo. Para generar la curva estándar, se añadieron cantidades conocidas de virus (en unidades formadoras de placas o pfu) a las células Vero al mismo tiempo que la transferencia del sobrenadante de 786-0. Tras la medición de la bioluminiscencia, se trazaron pfu de entrada frente a unidades de luz relativas medias. El análisis de regresión no lineal de cuatro parámetros genera una curva estándar a partir de la cual se interpolaron unidades de expresión viral (VEU). B) Ejemplo de cuantificación simultánea de la producción viral y citotoxicidad para VSe1. La línea negra está asociada al eje y izquierdo e indica el nivel de cambio en VEU. Las líneas grises indican actividad metabólica relativa en las células 786-0 según lo determinado mediante el uso de alamarBlue® (viabilidad celular, 1 significa 100 % viable) y están asociadas con el eje y derecho. La línea gris sólida (cuadrados rellenos) representa la citotoxicidad del fármaco solo, mientras que la línea gris discontinua (cuadrados vacíos) indica citotoxicidad del fármaco en combinación con virus. La flecha apunta a lo que se denomina en la presente memoria “nivel de cambio máximo”;

45 La **FIGURA 2** muestra las rutas de síntesis química para análogos de VSe1 (DCPDF) a partir de ácido muoclorico. (a) AlCl<sub>3</sub> (1,5 equiv.), benceno, ta, 16 h (b) amina (3 equiv.), DMF (c) NaBH<sub>4</sub> (1,5 equiv.), MeOH, 0 °C, 30 min. después, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 equiv.), 20 min., 0 °C hasta ta. (d) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cat., alcohol, ta. (e) NH<sub>4</sub>OH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, 0 °C a ta, 16 h (f) EtOAc, reflujo, 3 h. (g) bencilamina (1,1 equiv.), NaBH(OAc)<sub>3</sub> (1,5 equiv.), CHCl<sub>3</sub>, 2 h., ta. (h) SOCl<sub>2</sub>, DMF, reflujo, 16 h. (i) amina (2,2 equiv.), dioxano, ta, 16 h. (j) MeOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, reflujo, 16 h. (k) piridina (2 equiv.), Ac<sub>2</sub>O, ta, 6 h. (l) CuI (0,1 equiv.), -78 °C, 20 min., después RMgCl (2,5 equiv.) -78 °C a ta, 16 h. (m) SNAC, DMSO, 40 °C, 3 h;

50 La **FIGURA 3** muestra la actividad estructural y la relación de propiedades físico-químicas de los derivados de VSe1 (DCPDF). Los compuestos se evaluaron para determinar la actividad sensibilizante viral sobre VSV en células 786-0 como se describe en la Figura 1. La actividad sensibilizante viral se indica como nivel de cambio máximo (PFC) en la unidad de expresión viral normalizada a VSe1<sup>a</sup>. El valor entre paréntesis (uM) indica, una dosis probada particularmente eficaz. La LD<sub>50</sub> indica una dosis letal al 50 % *in vitro*, que se proporciona con y sin adición de virus.<sup>b</sup> La semivida de GSH se determinó según la metodología proporcionada y es una medida de la electrofilicidad del compuesto (valores bajos significan alta electrofilicidad) y de estabilidad. La estabilidad en plasma de ratón acuoso rico en proteínas se midió según la metodología proporcionada. Un % alto restante después de 3 horas indica una alta estabilidad.<sup>c</sup> NE indica que el compuesto no aumentó de forma detectable la producción viral. <sup>d</sup> ND indica no determinado. <sup>e</sup>NR indica no reactivo;

65 La **FIGURA 4** muestra que el sensibilizador viral 1 (VSe1; 3,4 dicloro-5-fenil-2,5-dihidrofuranona (DCPDF) y análogos activos representativos de los mismos pueden potenciar la replicación del virus oncolítico MG1 en células cancerosas. Se trataron células de carcinoma mamario de ratón (4T1) con concentraciones variables de análogos de

VSe1 y VSe1. Después de 4 horas, las células se infectaron con el virus VSV-Maraba-MG1-eGFP a una MOI de 0,01. Se detectó la expresión de eGFP 40 horas después de la infección por MG1;

La **FIGURA 5** muestra que VSe1 y análogos de VSe1 activos representativos mejoran la replicación del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1) en células cancerosas. A) Las células de carcinoma mamario de ratón (4T1) se dejaron sin tratar o se trataron con VSe1 o análogos de VSe1 CMO1025, MDO1151, MDO1145 durante 4 h a varias concentraciones: 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M o 20  $\mu$ M. Después se añadió HSV-N212eGFP nulo de ICP0 a MOI de 0,005. Se detectó fluorescencia de eGFP 48 h después de la infección por HSV. B) Los títulos de HSV se determinaron 48 h después de la infección. Media  $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes cuando se muestran las barras de error;

La **FIGURA 6** muestra que los análogos de VSe1 mejoran la producción de la gripe A PR8 (InflA-PR8) de líneas celulares no cancerosas, tales como células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y células Vero. A-B) Las células MDCK se trataron con concentraciones variables de análogo de VSe1 CM01031. 24 horas después, las células se infectaron con gripe H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) a una MOI de 0,01. Los títulos PR8 se determinaron 48 horas después de la infección. A) Mejora de PR8 en células MDCK.2. B) Mejora de PR8 en células MDCK (NBL-2). C) Las células Vero se trataron con las concentraciones indicadas de VSe1 o análogos en las mismas durante 24 h y se infectaron con gripe H1N1 A/FM/1/47 a una MOI de 0,01. La producción después de 48 horas después de la infección se midió mediante ELISA y el ensayo de placa (donde se indica);

La **FIGURA 7** muestra que VSe1 y análogos de VSe1 activos representativos mejoran la producción de vectores de terapia génica de adenovirus y de virus adenoasociados. Las células de carcinoma de pulmón humano (A549) se trataron con análogos de VSe1 o VSe1 a diversas concentraciones. 4 horas después, las células se infectaron con A) adenovirus que expresan luciferasa de luciérnaga a una MOI de 1, o B) virus adenoasociados que expresan luciferasa de luciérnaga. 24 horas después, se midió la actividad de luciferasa. Los datos se representan como el aumento del nivel en unidades de luz relativas medias de las muestras tratadas frente a los controles no tratados. VSe1 se muestra en la barra de datos más a la izquierda en cada conjunto, el análogo de VSe1 MD01145 se muestra como la barra de datos central en cada conjunto y el análogo de VSe MD02026 se muestra como la barra de datos más a la derecha en cada conjunto;

La **FIGURA 8** muestra que el análogo de VSe1 MD01145 no es mutagénico. El ensayo de mutación inversa de salmonella (Ensayo de Ames) se empleó para evaluar el potencial mutagénico de los análogos de VSe1 y VSe1. A) Los datos proceden de los resultados obtenidos con la cepa TA100 de Salmonella typhimurium, sin la fracción S9. Se usó DMSO como control negativo y se usó metanosulfonato de metilo (MMS) como control positivo para la mutagenicidad. Un alto número de revertistas, tales como en el control positivo (MMS), es una indicación de potencial mutagénico. El tratamiento con MD01145 condujo a una tasa de reversión similar a la de DMSO e incluso menor que el compuesto original VSe1. B) M01145 no produce un aumento dependiente de la dosis en el número de revertistas en las cepas TA98 y TA100, con o sin la fracción enzimática hepática S9, lo que sugiere que sus metabolitos tampoco son mutagénicos;

La **FIGURA 9** muestra que VSe1 y sus análogos pueden combinarse para efectos sinérgicos. Las células de carcinoma renal humano (786-0) se trataron con diversas concentraciones de VSe1 solo, MD03011 solo o se trataron conjuntamente con ambos compuestos. Después de 4 horas, las células se infectaron con VSV $\Delta$ 51 que expresa luciferasa de luciérnaga (VSV $\Delta$ 51Fuc) a una MOI de 0,005. 40 horas después, se midió la producción del virus en unidades de expresión viral (VEU) por mililitro con un ensayo indicador de luciferasa descrito previamente. Los datos se informan como nivel de cambio en la VEU con respecto a la condición VSe1 19  $\mu$ M (García et al. J Vis Exp 2014);

La **FIGURA 10** muestra que VSe1 y sus análogos pueden potenciar la infección de células con una cepa de vacuna de vacuna modificada ankara (MVA) (48 h después de la infección). Las células de carcinoma renal humano (786-0) se dejaron sin tratar, o se trataron con compuesto a diversas concentraciones, según se indica. Después de 4 horas, las células se infectaron con MVA-eGFP a una MDI de 0,01. La fluorescencia de eGFP se detectó 48 h después de la infección por MVA y se cuantificó usando un microscopio de cribado de alto contenido Cellomics ArrayScan;

La **FIGURA 11** muestra que VSe1 y sus análogos pueden potenciar la infección de las células con cepa de vacuna de MVA (64 h después de la infección). Las células de carcinoma renal humano (786-0) se dejaron sin tratar o se trataron con compuesto a diversas concentraciones. Después de 4 horas, se infectaron las células con MVA a una MDI de 0,01. La fluorescencia de eGFP se detectó 64 h después de la infección por MVA y se cuantificó usando un microscopio de cribado de alto contenido Cellomics ArrayScan;

La **FIGURA 12** muestra que VSe1 y el análogo MD01151 mejoran la transducción de Adenovirus en células cancerosas. Las células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas A549 se sembraron en placas a 20.000 células por pocillo en un formato de placa de 96 pocillos. 24 horas después, las células se pre-trataron con VSe1; MDO1151 a varias concentraciones entre 21  $\mu$ M y 120  $\mu$ M o con DMSO durante 2 horas. El Adenovirus que expresa luciferasa de luciérnaga se añadió a continuación a una MOI de 0,1. 40 horas después de la infección, la expresión de luciferasa se evaluó agregando luciferina y midiendo la luminiscencia asociada. La curva representa el

nivel de aumento de la expresión de luminiscencia de luciferasa en relación con la afección adenovirus solo. El experimento se realizó por triplicado;

La **FIGURA 13** muestra que VSe1 y el análogo MD03009 mejoran la transducción de Adenovirus en células cancerosas. Las células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas A549 se sembraron en placas a 20.000 células por pocillo en un formato de placa de 96 pocillos. 24 horas después, las células se pre-trataron con VSe1; MDO3009 a varias concentraciones entre 21  $\mu$ M y 120  $\mu$ M o con DMSO durante 2 horas. El Adenovirus que expresa luciferasa de luciérnaga se añadió a continuación a una MOI de 0,1. 40 horas después de la infección, la expresión de luciferasa se evaluó agregando luciferina y midiendo la luminiscencia asociada. La curva representa el nivel de aumento de la expresión de luminiscencia de luciferasa en relación con la afección adenovirus solo. El experimento se realizó por triplicado;

La **FIGURA 14** muestra que VSe1 y el análogo MD03011 mejoran la transducción de Adenovirus en células cancerosas. Las células epiteliales basales alveolares humanas adenocarcinómicas A549 se sembraron en placas a 20.000 células por pocillo en un formato de placa de 96 pocillos. 24 horas después, las células se pre-trataron con VSe1; MDO3011 a varias concentraciones entre 21  $\mu$ M y 160  $\mu$ M o con DMSO durante 2 horas. El Adenovirus que expresa luciferasa de luciérnaga se añadió a continuación a una MOI de 0,1. 40 horas después de la infección, la expresión de luciferasa se evaluó agregando luciferina y midiendo la luminiscencia asociada. La curva representa el nivel de aumento de la expresión de luminiscencia de luciferasa en relación con la afección adenovirus solo. El experimento se realizó por triplicado;

La **FIGURA 15** muestra que los análogos de VSe1 pueden potenciar la transducción de Adenovirus en tejido cerebral normal. Se extrajo cerebro de ratón fresco y los núcleos se colocaron en una placa de formato de 96 pocillos con 1 núcleo por pocillo. Después los núcleos cerebrales se trataron previamente con MD02026 a 10; 20 o 40  $\mu$ M, MDO1145 a 10; 20 o 40  $\mu$ M, o con MDO3011 a 10, 20 o 40  $\mu$ M durante 4 horas. A continuación, se añadió adenovirus que expresa luciferasa de luciérnaga ( $1 \times 10^6$  pfu/pocillo). 36 horas después de la infección, la expresión de luciferasa se evaluó agregando luciferina y midiendo la luminiscencia asociada. Las barras representan el nivel de aumento de la expresión de luminiscencia de luciferasa en relación con la afección adenovirus solo. El experimento se realizó por cuadruplicado;

La **FIGURA 16** muestra que los análogos de VSe1 pueden potenciar la transducción de Adenovirus en tejido muscular normal. Se extrajo tejido muscular de ratón fresco y los núcleos se colocaron en una placa de formato de 96 pocillos con 1 núcleo por pocillo. Después los núcleos musculares se trataron previamente con MD02026 a 10; 20 o 40  $\mu$ M, MD01145 a 10; 20 o 40  $\mu$ M, o con MDO3011 a 10, 20 o 40  $\mu$ M durante 4 horas. A continuación, se añadió adenovirus que expresa luciferasa de luciérnaga ( $1 \times 10^6$  pfu/pocillo). 36 horas después de la infección, la expresión de luciferasa se evaluó agregando luciferina y midiendo la luminiscencia asociada. Las barras representan el nivel de aumento de la expresión de luminiscencia de luciferasa en relación con la afección adenovirus solo. El experimento se realizó por cuadruplicado; y

La **FIGURA 17** muestra el efecto del análogo de VSe1 MD03011 sobre la producción de A/FM1 (H1N1) *in ovo*. El inóculo para la inyección en los óvulos se preparó usando FM1 (dilución  $10^{-3}$ ) y 1 mg/kg de MD03011 en DMSO al 15 % o PBS como control. Las preparaciones de inóculo se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y se inyectaron 100  $\mu$ l por óvulo (n= 8 óvulos por grupo). El fluido alantoico se recogió siguiendo el SOP. Los datos representan el título (pfu/ml) de las muestras agrupadas mediante el ensayo de placa (A) y el título de HA mediante el área de HPLC bajo la curva (AUC) en comparación con el control de PBS (B).

### Descripción detallada

En un primer aspecto, se proporciona un compuesto como se define en las reivindicaciones 1-3, para su uso en un método de mejora de la infección, el crecimiento, la velocidad y/o la productividad virales en terapia génica, vacuna o terapia oncolítica.

El experto en la técnica entenderá, teniendo en cuenta las enseñanzas de la presente memoria, que potenciar o aumentar la producción viral puede comprender uno o más de las siguientes acciones: potenciar o aumentar la infección de células y/o su tasa, potenciar o aumentar la capacidad reproductiva de un virus y/o la tasa de reproducción viral, potenciar o aumentar la propagación de un virus y/o su tasa, potenciar o aumentar el título de un virus a partir de células y/o la tasa a la que se puede alcanzar el título completo, potenciar o aumentar la expresión de antígenos a partir de un virus y/o su tasa, potenciar o aumentar la expresión de genes o transgenes a partir de un virus y/o su tasa, potenciar o aumentar la expresión de proteínas virales en células y/o su tasa, o cualquier combinación de las mismas.

Por la expresión "virus oncolítico" se entiende un virus que infecta y lisa preferiblemente células cancerosas o tumorales en comparación con células normales o no cancerosas o no tumorales. La actividad citotóxica/oncolítica del virus puede estar presente, observarse o demostrarse *in vitro*, *in vivo*, o ambos. Preferiblemente, el virus presenta actividad citotóxica/oncolítica *in vivo*. Ejemplos de virus oncolíticos conocidos en la técnica incluyen, sin limitación, derivados o variantes basados en reovirus, virus de la enfermedad de Newcastle, adenovirus, virus del

herpes, virus de la polio, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la gripe, virus vaccinia, rhabdovirus tales como el virus de la estomatitis vesicular y derivados/variantes de los mismos.

5 Por "derivado" o "variante" de un virus, se entiende un virus obtenido mediante la selección del virus en condiciones de crecimiento diferentes, un virus que ha sido sometido a una serie de presiones de selección, que ha sido modificado genéticamente mediante técnicas recombinantes conocidas en la técnica, o cualquier combinación de las mismas, un virus que ha sido genomanipulado para tener replicación defectuosa y/o expresar transgenes. Ejemplos de tales virus son conocidos en la técnica, por ejemplo de las solicitudes de patente US-20040115170, 20040170607, 20020037543, WO 00/62735; las patentes US-7.052.832, 7.063.835, 7.122.182 y otras. En una  
10 realización, el virus es un virus de la estomatitis vesicular (VSV), o una variante/derivado de rhabdovirus relacionado del mismo, por ejemplo, seleccionado en condiciones de crecimiento específicas, un virus que haya sido sometido a una serie de presiones de selección, un virus que haya sido modificado genéticamente usando técnicas recombinantes conocidas en la técnica, o una combinación de los mismos. En una realización más, el virus es VSVΔ51 (Stojdl et al., VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-  
15 cancer agents, Cancer Cell. octubre de 2003;4(4):263-75.

En otra realización adicional, se proporciona uno o más compuestos para su uso en un método para potenciar y/o aumentar la producción de vacunas en células por, al menos, uno de los siguientes procedimientos: aumento de la infección por el virus de la vacuna y/o su tasa, aumento de los títulos de vacunas en o a partir de las células y/o la  
20 tasa a la que se puede alcanzar el título completo, aumento de la propagación de la vacuna en las células y/o su tasa, aumento de la expresión del antígeno de la vacuna y/o su tasa, aumento de la expresión de la proteína de la vacuna y/o su tasa, aumento del gen o transgén de la vacuna en las células y/o su tasa, o cualquier combinación de las mismas, en comparación con cuando los uno o más compuestos no se emplean.

En otra realización adicional, se proporciona uno o más compuestos para su uso en un método para potenciar y/o aumentar la producción del vector de terapia génica en o a partir de las células por al menos uno de los siguientes procedimientos: aumento de la infección por el vector de terapia génica creciente y/o una tasa del mismo, aumento de los títulos de los vectores de terapia génica en las células y/o la tasa a la que se puede alcanzar el título completo, aumento de la propagación del vector de terapia génica en células y/o una tasa del mismo, aumento de la  
25 expresión del antígeno del vector de terapia génica y/o una tasa del mismo, aumento de la expresión de proteínas del vector de terapia génica y/o una tasa del mismo, aumento de la expresión transgénica del vector de terapia génica en células y/o una tasa del mismo, o cualquier combinación de los mismos, en comparación con cuando los uno o más compuestos no se emplean.

En otra realización adicional, se proporciona uno o más compuestos, para su uso en un método para potenciar y/o aumentar la producción vírica en huevos de gallina embrionados mediante, al menos, uno de los siguientes procedimientos: aumento de la infección viral y/o una tasa de la misma, aumento de los títulos virales en los huevos y/o la tasa a la que se puede alcanzar el título completo, aumento de la propagación viral en los huevos y/o una tasa de la misma, aumento de la expresión del antígeno viral y/o una tasa del mismo, aumento de la expresión de la  
35 proteína viral y/o una tasa de la misma, aumento de la expresión de transgenes víricos en los huevos y/o una tasa de los mismos, o cualquier combinación de los mismos, en comparación con cuando los uno o más compuestos no se emplean.

En una realización, se proporciona en la presente memoria un método para potenciar o aumentar la infección, la propagación y/o el título de un virus en o a partir de células, y/o aumentar la producción viral en o a partir de células, que comprende, administrar uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria a las células antes, después o simultáneamente con el virus, y cultivar el virus y las células para potenciar la infección, propagación y/o título del virus en dichas células y/o para aumentar la producción viral a partir de las células. En tales realizaciones, debe entenderse que las células descritas pueden ser infectadas por el virus y de que el virus puede infectar las  
40 45 50 células.

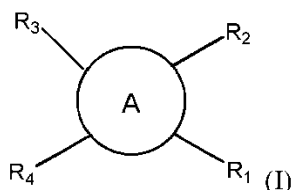
El experto en la técnica que tiene en cuenta las enseñanzas de la presente memoria entenderá que puede usarse un método tal como el descrito anteriormente, por ejemplo, en la producción de una vacuna. La producción de vacunas puede implicar la producción de virus atenuados o genéticamente modificados, o antígenos virales, útiles para  
55 establecer la inmunidad viral en un sujeto. Por lo tanto, un método para potenciar la producción viral a partir de células como el descrito anteriormente puede usarse para mejorar la producción de virus atenuados o genéticamente modificados, o antígenos virales, útiles en aplicaciones de vacunas a partir de una célula infectada con el virus.

Se entenderá que los virus atenuados o genéticamente modificados para vacunas, o los virus utilizados para obtener antígenos virales para una vacuna, pueden incluir cualquier virus adecuado conocido en la técnica que se usa para la producción de vacunas. A modo de ejemplo no limitante, dicho virus, virus genéticamente modificado o virus atenuado, puede incluir un derivado natural o genéticamente modificado o atenuado de rotavirus, rabia, hepatitis A, gripe B, virus adenoasociado, virus del dengue, virus del sarampión, reovirus, virus de las paperas, virus de la rubéola, virus de la encefalitis japonesa, poliovirus, lentivirus, retrovirus, virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), un rhabdovirus (tal como, aunque no de forma limitativa, VSV o un virus maraba tal como MG1), HSV, virus  
60 65

5 Vaccinia, cepa de vacuna de Vaccinia Ankara modificada (MVA), adenovirus, gripe, H1N1, A/FM1 (H1N1), un virus de la gripe, un rinovirus, gripe A o cualquier otro virus que pueda cultivarse en células y utilizarse en la producción de una vacuna. A modo de ejemplo no limitante, dicho virus, virus genéticamente modificado o virus atenuado, puede ser VSV, HSV, Vaccinia, cepa de vacuna de Vaccinia Ankara modificada (MVA), adenovirus, gripe, H1N1, A/FM1 (H1N1), un virus de la gripe, MG1, rinovirus, gripe a o cualquier otro virus que pueda cultivarse en células y usarse en la producción de una vacuna.

10 Basándose en los resultados obtenidos para compuestos específicos en diversas pruebas y cribados, como se describe en la presente memoria, y que tiene en cuenta los resultados obtenidos de varios análisis estructurales-funcionales, se identificó una amplia clase de compuestos y varias subclases que presentan una o más de las propiedades descritas anteriormente, o que pueden emplearse como controles o de otro modo en experimentos *in vivo* o *in vitro* o en análisis adicionales de estructura-función para determinar compuestos adicionales con características interesantes como se describe en la presente memoria.

15 La presente descripción contempla los compuestos de la fórmula



20 un N-óxido, una sal de adición farmacéuticamente aceptable, una amina cuaternaria o una forma estereoquímicamente isomérica de la misma, en donde:

A es un anillo heterocíclico de 5 miembros que comprende 0 o 1 doble enlace y 1 heteroátomo seleccionado de O, y N sustituido o no sustituido;

25 R<sub>1</sub> y R<sub>4</sub> son cada uno independientemente H, oxo, hidroxilo, alquiloxi, fenilo, fenilo sustituido, bencilo, bencilo sustituido, triazolilo, triazolilo sustituido o indolilo;

R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> son cada uno independientemente hidrógeno, halógeno, alquilamino, isobutilamino o bencilamino.

30 En una realización particular, R<sub>4</sub> es oxo. En una realización adicional R<sub>1</sub> es hidroxilo. En otra realización adicional, R<sub>4</sub> es oxo y R<sub>1</sub> es hidroxilo.

35 En una realización, se proporciona un compuesto sensibilizante viral como se ha descrito anteriormente, en donde A es un anillo heterocíclico de 5 miembros que comprende, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, N no sustituido o N sustituido con alquilo C1-C12, alquenilo, alquino, alquiloxi, fenilo, fenilo sustituido, bencilo, bencilo sustituido, triazolilo, triazolilo sustituido, naftalenilo, piridinilo, furanilo, tiofenilo, sulfonobencilo, metilsulfonobencilo, pirrolilo o una combinación de los mismos. También se contemplan otros sustituyentes.

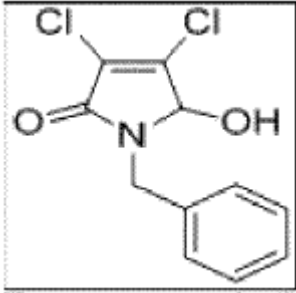
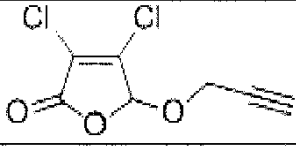
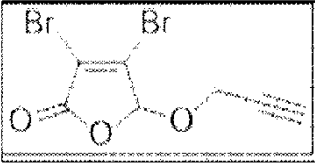
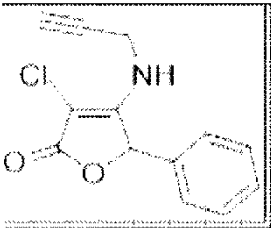
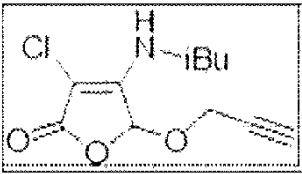
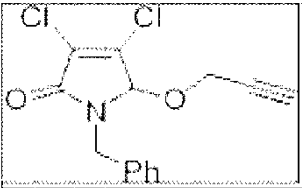
40 En una realización particular, el N en el anillo heterocíclico de 5 miembros no está sustituido. En una realización adicional, el N en el anillo heterocíclico de 5 miembros está sustituido, por ejemplo, pero sin limitación, con fenilo o bencilo.

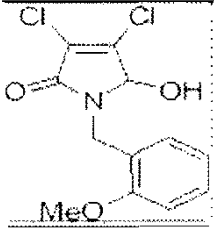
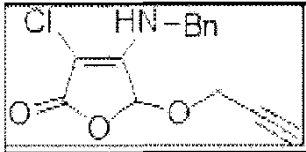
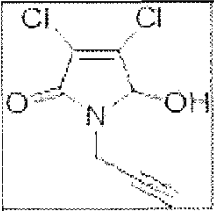
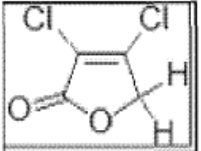
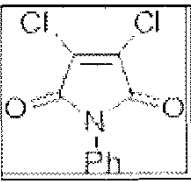
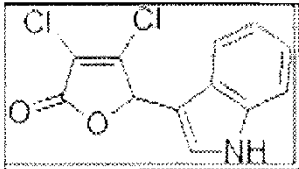
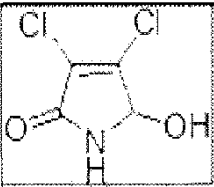
45 En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona un compuesto sensibilizante viral como se describió anteriormente, en donde A es un anillo heterocíclico de 5 miembros que comprende, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, N sustituido con metilo, etilo, propilo, ciclopropilo, fenilo, bencilo, bencilo sustituido con halógeno, metoxibencilo, bencilotriazolilo, morfolinoetilo, -CH<sub>2</sub>-C≡CH, -C≡CH, mercaptoetilo, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>; CH<sub>2</sub>-C≡C-fenilo, trifluorometilbencilo o fluoroetilo. También se contemplan otros sustituyentes.

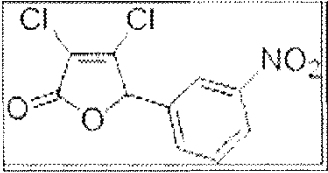
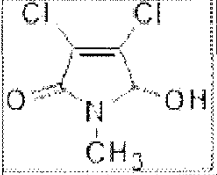
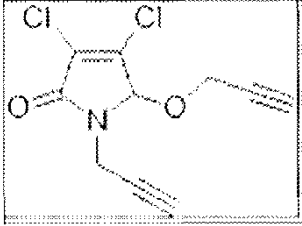
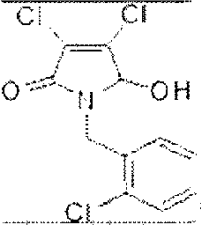
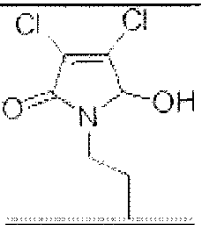
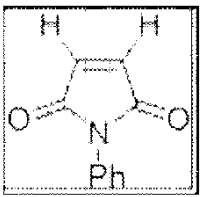
50 Los compuestos sensibilizantes virales interesantes adicionales se describen a continuación en la Tabla 1 y pueden denominarse por su nombre químico, nombre de código de referencia o estructura en la presente memoria.

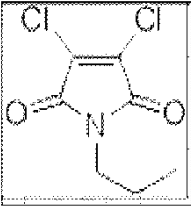
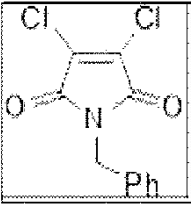
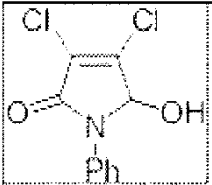
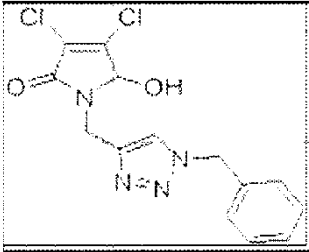
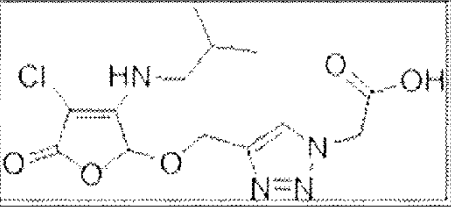
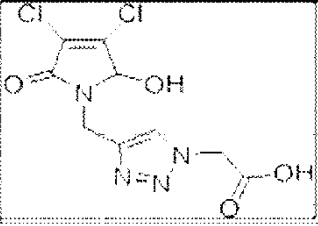
Tabla 1: Estructuras, nombres químicos y códigos de referencia para compuestos sensibilizantes al virus

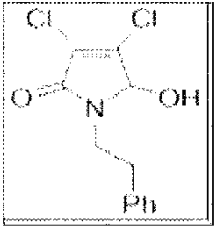
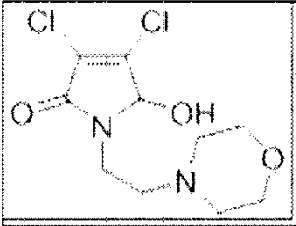
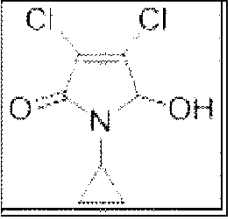
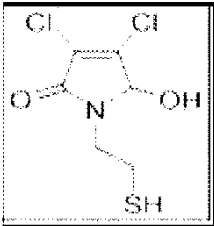
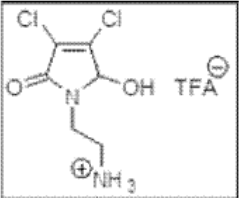
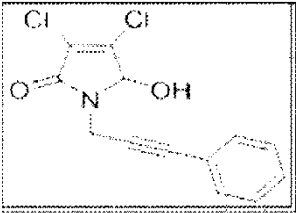
Nombre	Nombre químico	Estructura
MD01145	α, β-dicloro-γ-hidroxi-N-bencil-crotónica lactama	

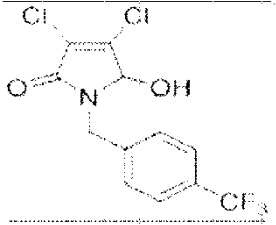
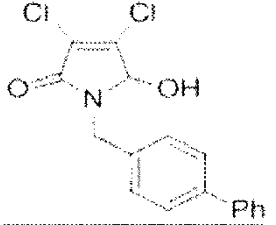
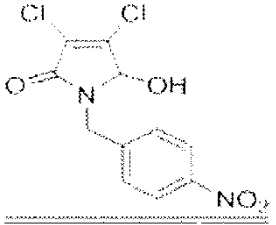
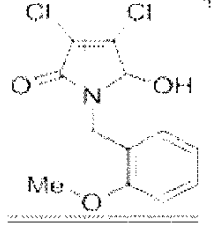
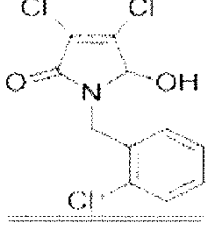
Nombre	Nombre químico	Estructura
		
MD01155, MD02140	3,4-Dicloro-5-prop-2-iniloxi-5H-furan-2-ona,	
CM01013, MD02182	3,4-Dibromo-5-prop-2-iniloxi-5H-furan-2-ona	
CM01027	3-Cloro-5-fenil-4-prop-2-inilamino-5H-furan-2-ona	
MD01165, MD02142	3-Cloro-4-isobutilamino-5-prop-2-iniloxi-5H-furan-2-ona	
MD01171, MD02180	1-Benzil-3,4-dicloro-5-prop-2-iniloxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
CM01025	3,4-Dicloro-5-hidroxi- 1-(2-metoxi-bencil)-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	

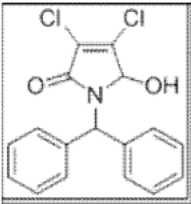
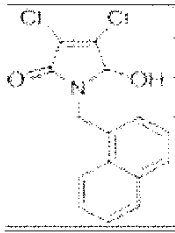
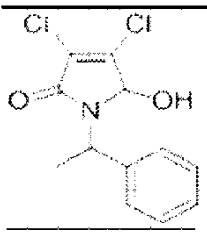
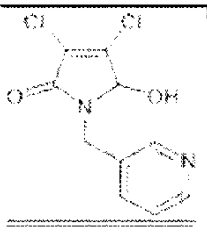
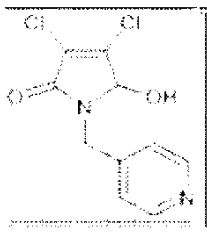
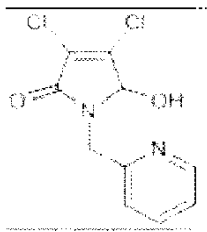
Nombre	Nombre químico	Estructura
		
MD01159	4-Benzilamino-3-cloro-5-prop-2-iniloxi-5H-furan-2-ona	
MD01151	3,4-Dicloro-5-hidroxi-1-prop-2-inil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
MD02068	3,4-Dicloro-5H-furan-2-ona	
MD01139	3,4-Dicloro-1-fenil-pirrol-2,5-diona	
MD01041	Ácido 3,4-dicloro-5-(1H-indol-3-il)-5H-furan-2-ona, indol-3-crotónico	
MD01033, MD02052	3,4-Dicloro-5-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	

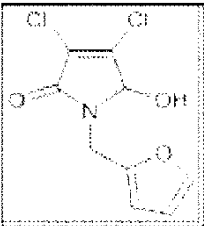

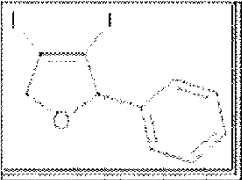
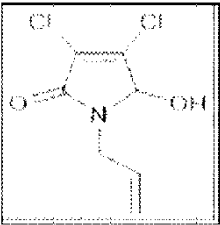
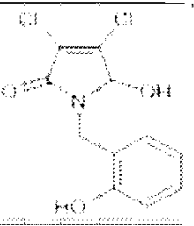
Nombre	Nombre químico	Estructura
MD01085	3,4-Dicloro-5-(3-nitro-fenil)-5H-furan-2-ona	
CM01031, CP01026	3,4-Dicloro-5-hidroxi-1-metil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
MD01169	3,4-Dicloro-1-prop-2-inil-5-prop-2-iniloxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
MD01179	3,4-Dicloro-1-(2-cloro-bencil)-5-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
MD02010	3,4-Dicloro-5-hidroxi-1-propil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
MD01037	1-Fenil-pirrol-2,5-diona	
MD01129	3,4-Dicloro-1-propil-pirrol-2,5-diona	

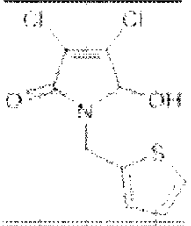
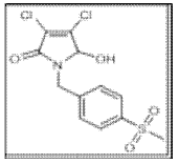
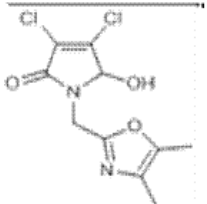
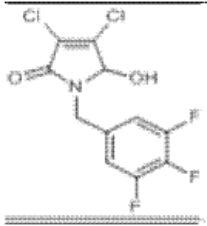
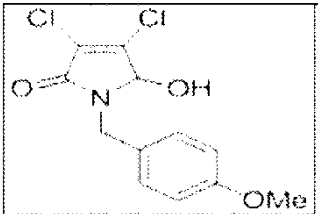
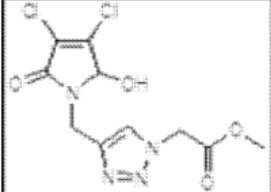
Nombre	Nombre químico	Estructura
		
MD01133	1-Benzil-3,4-dicloro-pirrol-2,5-diona	
MD01147	3,4-Dicloro-5-hidroxi-1-fenil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
CM01099	1-(1-Benzil-1H-[1,2,3] triazol-4-ilmetil)-3,4-dicloro-5-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona	
MD02136	Ácido [4-(4-Cloro-3-isobutilamino-5-oxo-2,5-dihidro-furan-2-iloximetil)-[1,2,3]triazol-1-il]-acético	
MD02124	Ácido [4-(3,4-Dicloro-2-hidroxi-5-oxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilmetil)-[1,2,3] triazol-1-il]-acético	
MD03009	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-fenetil-1H-pirrol-2(5H)-ona	

Nombre	Nombre químico	Estructura
		
MD03011	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(2-morfolinoetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	
MD03013	3,4-dicloro-1-ciclopropil-5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona	
MD03007	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(2-mercaptoetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	
CP01046	2,2,2-trifluoroacetato de 2-(3,4-dicloro-2-hidroxi-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etanaminio	
MD01183	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(3-fenilprop-2-inil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	

Nombre	Nombre químico	Estructura
MD03017	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(4-(trifluorometil)bencil) -1H-pirrol-2(5H)-ona	
CP01042	1-(bifenil-4-ilmetil)-3,4-dicloro-5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona	
CP01001	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(4-nitrobencil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	
CP01005	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(2-metoxibencil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	
CP01011	3,4-dicloro-1-(2-clorobencil) -5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona	
CP01035	1-benzhidril-3,4-dicloro-5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona	

Nombre	Nombre químico	Estructura
		
CP01039	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(naftalen-1-ilmetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	
CP01037	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(1-feniletíl)-1H-pirrol-2(5H)-ona	
CP01047	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	
CP01048	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	
CP01036	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(piridin-2-ilmetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	

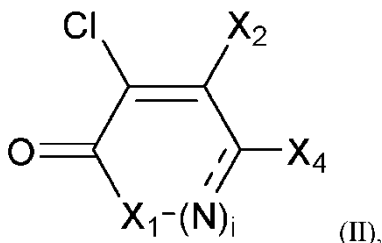
Nombre	Nombre químico	Estructura
PL01010	3,4-dicloro-1-(furan-2-ilmetil)-5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona	
CP01020	N-(2-(3,4-dicloro-2-hidroxi-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il) etil)-5-(dimetilamino) naftalen-1-sulfonamida	
CP01012	3,4-diyodo-2-fenil-2,5-dihidrofurano	
PL01013	1-ailil-3,4-dicloro-5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona	
PL01017	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(2-hidroxibencil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	
PL01018	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(tiofen-2-ilmetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	

Nombre	Nombre químico	Estructura
		
PL01019	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(4-(metilsulfonyl) bencil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	
PL01020	3,4-dicloro-1-((4,5-dimetiloxazol-2-il)metil)-5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona	
PL01021	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(3,4,5-trifluorobencil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	
MD01187	3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(4-metoxibencil)-1H-pirrol-2(5H)-ona	
PL01012	2-(4-((3,4-dicloro-2-hidroxi-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il) metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetato de metilo	

Como VSe1 (compuesto 1) se conoce en la técnica, se contempla que cualquiera de los compuestos, composiciones, usos y métodos descritos en la presente memoria pueden, en una realización, excluir específicamente VSe1. Cualquier otro compuesto, como se describe en la presente memoria, puede excluirse

específicamente si ese compuesto y/o su uso, como se describe en la presente memoria, se describe en la técnica o no entra dentro del alcance del conjunto actual de reivindicaciones.

En una realización, se proporciona en la presente memoria un compuesto sensibilizante viral definido por la fórmula (II):



o una sal farmacéuticamente aceptable, o una forma estereoquímicamente isomérica de la misma, en donde:

X<sub>1</sub> es un heteroátomo tal como O, NH o N sustituido;

X<sub>2</sub> es halógeno (tal como, por ejemplo, Cl), o NHX<sub>3</sub>, en donde X<sub>3</sub> es un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado sustituido o no sustituido, o arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido;

i es 0 cuando X<sub>1</sub> es O, o 0 o 1 cuando X<sub>1</sub> es NH o N sustituido;

- - - representa un doble enlace que está presente cuando i es 1, y ausente cuando i es 0 de manera que X<sub>1</sub> se une directamente al carbono que lleva X<sub>4</sub> a través de un enlace sencillo cuando i es 0; y

X<sub>4</sub> es H, OH, =O, mono- o bicicloarilo o -heteroarilo sustituido o no sustituido (tal como, por ejemplo, fenilo sustituido o no sustituido) u OX<sub>10</sub>, en donde X<sub>10</sub> es H, alquilo, alquenilo, alquinilo o acilo sustituido o no sustituido lineal o ramificado. Por ejemplo, X<sub>10</sub> puede ser acetilo, metilo o -CH<sub>2</sub>-C≡CH.

En determinadas realizaciones, N sustituido puede incluir N sustituido con H, alquilo, alquenilo o alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> lineal o ramificado sustituido o no sustituido, mono- o bi-cicloarilo o -heteroarilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, por ejemplo. Por ejemplo, N puede sustituirse con alquiniloxi sustituido o no sustituido, fenilo, alquilfenilo, fenilo sustituido, bencilo, bencilo sustituido, triazolilo, triazolilo sustituido, naftalenilo, naftalenilo sustituido, piridinilo sustituido o no sustituido, furanilo o tiofuranilo sustituido o no sustituido, tiofenilo, sulfonobencilo, metilsulfonobencilo, pirrolilo, morfolina sustituida o no sustituida, cicloalquilo, alquiltiol, alquinamina sustituida o no sustituida u oxazolina sustituida o no sustituida.

En determinadas realizaciones, el alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado sustituido o no sustituido puede incluir cualquier alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado sustituido o no sustituido, tal como un alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado opcionalmente sustituido que comprende una cadena de C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> carbonos y, en el caso de alquenilo o alquinilo, al menos un doble o triple enlace carbono-carbono, respectivamente.

En determinadas realizaciones, el arilo o heteroarilo sustituido o no sustituido puede incluir cualquier grupo arilo o heteroarilo mono- o bicíclico adecuado que pueda estar opcionalmente sustituido. Los ejemplos de grupos arilo y heteroarilo pueden incluir grupos arilo o heteroarilo de 5 miembros, 6 miembros o >6 miembros.

En determinadas realizaciones, el acilo puede incluir un grupo que tiene la fórmula R-C(=O)-, en donde R es alquilo, alquenilo o alquinilo lineal o ramificado sustituido o no sustituido, por ejemplo.

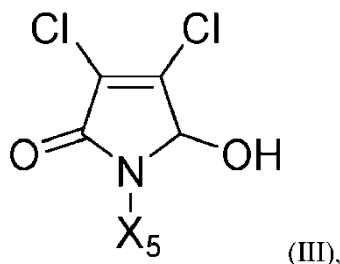
En determinadas realizaciones, el cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido puede incluir cualquier grupo cicloalquilo o heterocicloalquilo adecuado que tenga un tamaño de anillo que sea ≥3, y que pueda estar opcionalmente sustituido.

En determinadas realizaciones, el alquiniloxi sustituido o no sustituido puede incluir cualquier grupo adecuado que tenga la fórmula -O-R, en donde R comprende un grupo alquinilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> lineal o ramificado sustituido o no sustituido (es decir, una cadena de carbono que tiene al menos un triple enlace carbono-carbono).

Se pueden encontrar ejemplos de sustituyentes adecuados de compuestos de fórmula (II) en las estructuras de compuestos mostradas en la Tabla 1 y en la Figura 3, por ejemplo.

Los ejemplos de compuestos de fórmula (II) se describen en detalle en la presente memoria, y pueden encontrarse tanto en la Tabla 1 como en la Figura 3. Los subconjuntos de compuestos de fórmula (II), que comparten ciertas características estructurales y/o farmacofónicas con los mismos, pueden incluir:

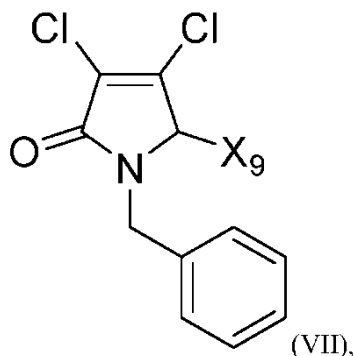
Compuestos sensibilizantes virales de fórmula (III):



5 o una sal farmacéuticamente aceptable, o una forma estereoquímicamente isomérica de la misma, en donde:

10  $X_5$  es un alquilo, alqueno o alquino  $C_1$ - $C_{12}$  lineal o ramificado sustituido o no sustituido, mono- o bicicloarilo o -heteroarilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido. Por ejemplo,  $X_5$  puede ser alquiloxi sustituido o no sustituido, fenilo, alquilfenilo, fenilo sustituido, bencilo, bencilo sustituido, triazolilo, triazolilo sustituido, naftalenilo, naftalenilo sustituido, piridinilo sustituido o no sustituido, furanilo o tiofuranilo sustituido o no sustituido, tiofenilo, sulfonobencilo, metilsulfonobencilo, pirrolilo, morfolina sustituida o no sustituida, cicloalquilo, alquiltiol, alquinamina sustituida o no sustituida u oxazolina sustituida o no sustituida;

15 Compuestos sensibilizantes virales de fórmula (VII):



20 una sal farmacéuticamente aceptable, o una forma estereoquímicamente isomérica de la misma, en donde:

$X_9$  es H, OH,  $OX_{11}$ , o =O, en donde  $X_{11}$  es H, alquilo, alqueno, alquino o acilo lineal o ramificado sustituido o no sustituido. Por ejemplo,  $X_{11}$  puede ser acetilo, metilo o  $-CH_2-C\equiv CH$ .

25 En una realización, uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria pueden ser para su uso como, por ejemplo, un sensibilizante viral. A modo de ejemplo, uno o más compuestos anteriores pueden ser para aumentar la producción viral a partir de una célula después de la infección.

30 En otra realización, uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria pueden usarse en la preparación de una vacuna que incluye un virus atenuado o genéticamente modificado producido a partir de una célula.

35 En otra realización más, un compuesto como se describe en la presente memoria puede ser un compuesto que presenta una actividad sensibilizante viral en VSV $\Delta$ 51 en células 786-0 que es aproximadamente 0,01 o mayor cuando se informa como nivel de cambio máximo (PFC) en la unidad de expresión viral normalizada a 3,4-dicloro-5-fenil-2,5-dihidrofuran-2-ona. El experto en la técnica entenderá, teniendo en cuenta las enseñanzas en la presente memoria, que, en ciertas realizaciones, el PFC entre dos compuestos no necesita ser calculado siempre a la misma concentración de compuesto (aunque esto puede realizarse de hecho). Por ejemplo, el PFC entre dos compuestos podría determinarse a una dosis de cada compuesto que se determina experimentalmente para ser particularmente eficaz o casi óptima, tal como la dosis más eficaz determinada a partir de una curva de dosis-respuesta.

40 Así, en una realización no limitante, un compuesto como se ha descrito anteriormente puede ser un compuesto que presenta una actividad sensibilizante viral en VSV $\Delta$ 51 en células 786-0 que es de aproximadamente 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, o mayor o cualquier intervalo limitado en un extremo inferior por cualquiera de estos valores, cualquier intervalo limitado en un extremo superior por cualquiera de estos valores, o cualquier intervalo comprendido entre cualquiera de estos dos valores, cuando se informa como nivel de cambio máximo en la unidad de expresión viral normalizada a 3,4-dicloro-5-fenil-2,5-

dihidrofurano-2-ona (VSe1) tomada con ambos compuestos utilizados a la misma concentración (por ejemplo, una dosis de VSe1 particularmente eficaz o casi óptima, tal como la dosis más eficaz de VSe1 determinada a partir de una curva de dosis-respuesta), o tomada con el compuesto y VSe1 utilizados a diferentes concentraciones (por ejemplo, una dosis de cada compuesto que se determine experimentalmente que es particularmente eficaz o casi óptima para cada compuesto, tal como la dosis más eficaz para cada compuesto determinada a partir de una curva de dosis-respuesta).

En una realización, por ejemplo, el compuesto puede ser un compuesto que presenta una actividad sensibilizante viral en VSVA51 en células 786-0 que es mayor o igual ( $\geq$ ) a aproximadamente 0,01 cuando se informa como nivel de cambio máximo en la unidad de expresión viral normalizada a 3,4-dicloro-5-fenil-2,5-dihidrofuran-2-ona cuando ambos compuestos se usan a la misma concentración (por ejemplo, una dosis de VSe1 particularmente efectiva o cercana a la óptima, tal como la dosis más efectiva de VSe1 determinada a partir de una curva de dosis-respuesta), o cuando el compuesto y VSe1 se usan a diferentes concentraciones (por ejemplo, una dosis de cada compuesto que se determina experimentalmente que es particularmente eficaz o casi óptima para cada compuesto, tal como la dosis más eficaz para cada compuesto determinado a partir de una curva de dosis-respuesta).

En otra realización más, un compuesto como se describe en la presente memoria puede ser un compuesto para el cual más de aproximadamente 0,5 %, 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, o más, o cualquier intervalo limitado en un extremo inferior por cualquiera de estos valores, cualquier intervalo limitado en un extremo superior por cualquiera de estos valores, o cualquier intervalo que se encuentre entre dos cualesquiera de estos valores, del compuesto permanece después de 3 horas de incubación a 37 °C en plasma acuoso de ratón Balb/c rico en proteínas tamponado 1:1 con solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4 (PBS). Por ejemplo, un compuesto como se describe en la presente memoria puede ser un compuesto para el cual más o igual ( $\geq$ ) que aproximadamente el 0,5 % del compuesto permanece después de 3 horas de incubación a 37 °C en plasma acuoso de ratón Balb/c rico en proteínas tamponado 1:1 con solución salina tamponada con fosfato de pH 7,4 (PBS).

En otra realización más, un compuesto como se describe en la presente memoria puede ser un compuesto que tiene un LD<sub>50</sub> en presencia de virus que es menor o igual ( $\leq$ ) a aproximadamente 1  $\mu$ m, 5  $\mu$ m, 10  $\mu$ m, 15  $\mu$ m, 20  $\mu$ m, 25  $\mu$ m, 30  $\mu$ m, 35  $\mu$ m, 40  $\mu$ m, 45  $\mu$ m, 50  $\mu$ m, 55  $\mu$ m, 60  $\mu$ m, 65  $\mu$ m, 70  $\mu$ m, 75  $\mu$ m, 80  $\mu$ m, 85  $\mu$ m, 90  $\mu$ m, 95  $\mu$ m, 100  $\mu$ m, 105  $\mu$ m o 110  $\mu$ m, o cualquier intervalo que se encuentre entre dos de estos valores, diferente (más o menos) del LD<sub>50</sub> del mismo compuesto en ausencia de virus según se determina en, por ejemplo, células 786-0 donde el virus es VSV.

El experto en la técnica entenderá, teniendo en cuenta las enseñanzas en la presente memoria, que pueden usarse dos o más de los compuestos descritos en la presente memoria en combinación. Por ejemplo, dos o más de los compuestos descritos en la presente memoria pueden administrarse a una célula simultáneamente, secuencialmente o en combinación. Como se muestra en la Figura 9, y se describe con más detalle en los ejemplos siguientes, el uso de VSe1 y MD03011 en combinación produjo un efecto sinérgico notable en las condiciones probadas, lo que demuestra que las combinaciones de dos o más compuestos, como se describe en la presente memoria, pueden ser deseables en determinadas aplicaciones.

La presente descripción también proporciona una composición que comprende dos o más de los compuestos descritos en la presente memoria.

La presente descripción también proporciona una composición que comprende uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria, y un portador, diluyente o excipiente aceptable. En una realización adicional, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, se proporciona en la presente memoria una composición que comprende uno o más compuestos descritos en la presente memoria, y, opcionalmente, uno o más de a) un virus, un virus genéticamente modificado, un virus atenuado, una vacuna, un vector de terapia génica o un virus oncolítico, b) uno o más tipos de células tales como, aunque no de forma limitativa, células cancerosas, c) un portador, diluyente o excipiente, d) un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, e) células no cancerosas o normales; f) medios de cultivo celular; g) un óvulo no humano o célula de óvulo, o una o más células derivadas de o contenidas en óvulos embrionados no humanos; o cualquier combinación de a)-g).

En otra realización de una composición como la descrita anteriormente que comprende uno o más compuestos como los descritos anteriormente, la composición puede comprender un virus que es capaz de infectar a una célula, y una célula que es capaz de ser infectada por el virus, en donde el compuesto o compuestos actúan para potenciar o aumentar la producción de virus.

Como se ha señalado anteriormente y se describe en la presente memoria, la producción viral puede potenciarse o aumentarse en una variedad de células, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, células normales, células cultivadas, óvulos no humanos, células de óvulos, células inmortalizadas, células cancerosas, células tumorales y similares. Los uno o más tipos de células cancerosas o tumorales pueden ser células cancerosas o tumorales *in vitro*

o *in vivo* de cualquier célula, línea celular, tejido u organismo, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, humano, rata, ratón, gato, perro, cerdo, primate, caballo y similares. En una realización, las una o más células cancerosas o tumorales comprenden células cancerosas o tumorales humanas, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, leucemia linfoblástica, leucemia mieloide, carcinoma corticosuprarrenal, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma, tumor teratoide/rabdoide atípico, carcinoma basocelular, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer óseo, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, glioma de tronco cerebral, tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, craneofaringioma, ependimoblastoma, meduloblastoma, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineoblastoma, glioma hipotalámico y de las vías visuales, tumores de la médula espinal, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, linfoma del sistema nervioso central, cáncer de cuello de útero, cordoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, tumores embrionarios, cáncer de endometrio, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer de esófago, tumor de células germinales extracraneal, tumor de células germinales extragonadal, cáncer de vías biliares extrahepático, cáncer ocular, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (de estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células del estroma gastrointestinal, tumores de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, ovárico, extracraneal, extragonadal, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (de hígado), histiocitosis, cáncer de células de Langerhans, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, tumores de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia linfocítica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y de la cavidad bucal, cáncer de hígado, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, histiocitoma fibroso maligno óseo y osteosarcoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, melanoma intraocular, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, cáncer de la cavidad nasal y de senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, tumores del parénquima pineal, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor hipofisario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales (de riñón), cáncer de pelvis renal y de uréter, cáncer de células de transición, carcinoma de las vías respiratorias, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma uterino, cáncer de piel, carcinoma cutáneo de células de Merkel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de células T, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, tumor trofoblástico, cáncer de uretra, cáncer de útero, cáncer de endometrio, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva o tumor de Wilms. Sin embargo, los compuestos y composiciones descritos en la presente memoria posibles pueden usarse para infectar otras células cancerosas *in vitro*.

La presente descripción también proporciona una composición que comprende a) uno o más compuestos como se describe en la presente memoria y b) uno o más componentes adicionales, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, 1) un portador, diluyente o excipiente, 2) un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, 3) un virus, por ejemplo, aunque no de forma limitativa un virus que existe en la naturaleza, un virus de tipo salvaje, virus atenuado, un virus genéticamente modificado o un virus oncolítico, 4) células cancerosas o tumorales, 5) células no cancerosas o normales, 6) huevos embrionados de gallina, o 7) medios de cultivo celular.

La presente descripción también proporciona un kit que comprende uno o más compuestos solos o en combinación, o una composición como se ha descrito anteriormente. En el kit, los componentes individuales de la composición como se describe en cualquier realización anterior pueden estar separados, combinados o algunos pueden estar separados y otros combinados. El kit también puede comprender una o más de una placa/cubeta de cultivo celular o placa/cubeta de múltiples pocillos, un aparato o dispositivo(s) para suministrar el compuesto o compuestos o la composición a una célula, cultivo celular o medio de cultivo celular, o *in ovo*. El kit también puede comprender instrucciones para administrar o usar el compuesto o compuestos, virus y/o células solas o en combinación.

Para aplicaciones *in ovo*, se proporciona preferiblemente una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos como los descritos en la presente memoria y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, que contiene opcionalmente otros solutos tales como sales disueltas y similares. En una realización preferida, la solución comprende suficiente solución salina, glucosa o similares para que la solución sea isotónica. Las composiciones farmacéuticas y los métodos para preparar composiciones farmacéuticas son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (anteriormente "Remingtons Pharmaceutical Sciences"); Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA (2000).

La administración de dichas composiciones *in ovo* puede ser a través de varias rutas dependiendo del área a tratar. En una primera realización, que no pretende ser limitativa, el compuesto se administra localmente en el área que va a ser infectada por el virus. La administración puede realizarse mediante inyección en el líquido alantoideo, la membrana corioalantoidea, el embrión, el saco vitelino y/o el líquido amniótico. También se contemplan formas de

dosificación y administración alternativas, de manera que permitiría una liberación lenta, sostenida o prolongada, como sería conocido en la técnica.

Los compuestos sensibilizantes virales descritos en la presente memoria pueden emplearse en administración secuencial, por ejemplo, antes, después o tanto antes como después de la administración de un virus, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, un virus atenuado, un virus modificado genéticamente, una vacuna, un vector de terapia génica o un virus oncolítico. Alternativamente, el compuesto sensibilizante viral puede administrarse simultáneamente o concomitantemente en combinación con un virus como se ha descrito anteriormente.

La presente descripción también contempla métodos y usos de los compuestos descritos en la presente memoria para aumentar o potenciar la propagación de un virus, por ejemplo, un virus natural, un virus genéticamente modificado, un virus atenuado, una vacuna, un vector de terapia génica o un virus oncolítico en una o más células, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, células no cancerosas, uno o más tipos de células cancerosas o tumorales, células de huevo de pollo embrionado *in ovo*, aumentar o potenciar la producción de antígeno viral, proteína viral o transgén viral, aumentar o potenciar la producción, el rendimiento o la capacidad reproductiva de un virus, por ejemplo, un virus natural, un virus genéticamente modificado, un virus atenuado, una vacuna, un vector de terapia génica o un virus oncolítico o, cualquier combinación de los anteriores.

En una realización de la presente descripción que no pretende ser limitativa de ninguna manera, los uno o más compuestos son la  $\alpha$ , $\beta$ -dicloro- $\gamma$ -hidroxi-N-bencil-crotónica lactama; 3,4-dicloro-5-prop-2-iniloxi-5H-furan-2-ona; 3,4-dibromo-5-prop-2-iniloxi-5H-furan-2-ona; 3-cloro-5-fenil-4-prop-2-inilamino-5H-furan-2-ona; 3-cloro-4-isobutilamino-5-prop-2-iniloxi-5H-furan-2-ona; 1-bencil-3,4-dicloro-5-prop-2-iniloxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(2-metoxi-bencil)-1,5-dihidro-pirrol-2-ona; 4-bencilamino-3-cloro-5-prop-2-iniloxi-5H-furan-2-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-prop-2-inil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona; 3,4-dicloro-5H-furan-2-ona; benzo[1,3]dioxolo-5,6-diona; 4,5-dicloro-2H-piridazin-3-ona; 4,5-dicloro-2-fenil-2H-piridazin-3-ona; 3,4-dicloro-1-fenil-pirrol-2,5-diona; ácido 3,4-dicloro-5-(1H-indol-3-il)-5H-furan-2-ona, indol-3-crotónico; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona; 5-fenil-4,5-dihidro-3aH-pirrol[1,2-a]quinolin-1-ona; 5-fenil-4,5-dihidro-3aH-pirrol[1,2-a]quinolin-1-ona; 3,4-dicloro-5-(3-nitro-fenil)-5H-furan-2-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-metil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona; 3,4-dicloro-1-prop-2-inil-5-prop-2-iniloxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona; 3,4-dicloro-1-(2-cloro-bencil)-5-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-propil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona; 1-fenil-pirrol-2,5-diona; 3,4-dicloro-1-propil-pirrol-2,5-diona; 1-bencil-3,4-dicloro-pirrol-2,5-diona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-fenil-1,5-dihidro-pirrol-2-ona; 1-(1-bencil-1H-[1,2,3]triazol-4-ilmetil)-3,4-dicloro-5-hidroxi-1,5-dihidro-pirrol-2-ona; ácido [4-(4-cloro-3-isobutilamino-5-oxo-2,5-dihidro-furan-2-iloximetil)-[1,2,3]triazol-1-il]-acético; ácido [4-(3,4-dicloro-2-hidroxi-5-oxo-2,5-dihidro-pirrol-1-ilmetil)-[1,2,3]triazol-1-il]-acético; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-fenil-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(2-morfolinoetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-1-ciclopropil-5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(2-mercaptoetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 2,2,2-trifluoroacetato de 2-(3,4-dicloro-2-hidroxi-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etanaminio; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(3-fenilprop-2-inil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(4-(trifluorometil)bencil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 1-(bifenil-4-ilmetil)-3,4-dicloro-5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(4-nitrobencil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(2-metoxibencil)-1H-pirrol-2(SH)-ona; 3,4-dicloro-1-(2-clorobencil)-5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona; 1-benzhidril-3,4-dicloro-5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(naftalen-1-ilmetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(1-feniletil)-1H-pirrol-2(SH)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(piridin-3-ilmetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(piridin-4-ilmetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(piridin-2-ilmetil)-1H-pirrol-2(SH)-ona; 3,4-dicloro-1-(furan-2-ilmetil)-5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona; N-(2-(3,4-dicloro-2-hidroxi-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)etil)-5-(dimetilamino)naftalen-1-sulfonamida; (3aS)-2,3-dicloro-5-fenil-4,5-dihidropirrol[1,2-a]quinolin-1(3aH)-ona; 3,4-diyodo-2-fenil-2,5-dihidrofurano; D-Gluconamida, N-octilo; Ácido (S)-11-amino-4,7,10,14-tetraoxo-15-(2R,3R,4R,SR,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(hidroximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)-3,6,9,13-tetraazapentadecan-1-oico; 1-alil-3,4-dicloro-5-hidroxi-1H-pirrol-2(SH)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(2-hidroxibencil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(tiofen-2-ilmetil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(4-(metilsulfonil)bencil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-1-((4,5-dimetiloxazol-2-il)metil)-5-hidroxi-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(3,4,5-trifluorobencil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 3,4-dicloro-5-hidroxi-1-(4-metoxibencil)-1H-pirrol-2(5H)-ona; 4,5-dicloro-2-(2,2,2-trifluoroetil)piridazin-3(2H)-ona; 4,5-dicloro-2-ciclohexilpiridazin-3(2H)-ona; 2-(4-((3,4-dicloro-2-hidroxi-5-oxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)metil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)acetato de metilo; 4,5-dicloro-2-o-tolilpiridazin-3(2H)-ona; clorhidrato de 4,5-dicloro-2-(2-(dimetilamino)etil)piridazin-3(2H)-ona; y 4,5-dicloro-2-(4-fluorofenil)piridazin-3(2H)-ona o cualquier compuesto o grupo de compuestos como se describe en la presente memoria.

Como apreciará un experto en la técnica, las estructuras de clase general y los compuestos específicos como se identifican en la presente memoria pueden emplearse solos o en combinación en cualquier variedad de composiciones según lo requiera un experto en la técnica. Sin pretender imponer ninguna teoría, los usos potenciales para los compuestos descritos en la presente memoria pueden incluir la infección, la propagación y/o la titulación viral crecientes en células específicas, por ejemplo, en células no cancerosas, en células/tejidos cancerosos o tumorales, o células derivadas de cultivos que se han inmortalizado, o células derivadas o contenidas en óvulos embrionados no humanos para la producción de virus que pueden usarse posteriormente como virus oncolíticos, vectores de terapia génica y vacunas. Además, lo que es más importante, los compuestos descritos en la presente memoria también pueden emplearse como controles internos o en análisis de estructura-función para determinar clases adicionales o moléculas específicas que presentan propiedades similares o mejoradas a las descritas actualmente en la presente memoria.

5 Se proporciona un método para potenciar o aumentar la infección, la propagación y/o el título de un virus en células, y/o aumentar la producción viral en células, que comprende administrar uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria a las células antes, después o simultáneamente con el virus, y cultivar el virus y las células para potenciar la infección, propagación y/o título del virus en dichas células y/o para aumentar la producción viral a partir de las células. En tales realizaciones, debe entenderse que las células descritas pueden ser infectadas por el virus y de que el virus puede infectar las células.

10 En otra realización de un método como el descrito anteriormente, las células pueden ser células cultivadas, células adherentes o en suspensión, células cancerosas, células tumorales o células que se han inmortalizado, células primarias, células no inmortalizadas, células normales, óvulos no humanos o células de óvulo contenidas dentro o derivadas de óvulos embrionados no humanos.

15 En otra realización más de un método como el descrito anteriormente, las células pueden ser células cancerosas o no cancerosas *in vitro* o *in ovo*.

20 En otra realización más de un método como el descrito anteriormente, potenciar o aumentar la producción viral puede comprender una o más de las siguientes acciones: potenciar o aumentar la infección de células, potenciar o aumentar la capacidad reproductiva de un virus, potenciar o aumentar la propagación y/o el título de un virus, potenciar o aumentar la expresión de antígenos a partir de un virus, potenciar o aumentar la expresión de genes o transgenes de un virus, o potenciar o aumentar la expresión de proteínas virales en células o cualquier combinación de las mismas.

25 En otra realización más, se proporciona en la presente memoria un método para potenciar o aumentar la producción vírica en células, que comprende administrar VSe1 y MD03011 simultáneamente, secuencialmente o en combinación, a dichas células antes, después o simultáneamente con un virus, y cultivar el virus y las células. También se contemplan otras combinaciones de compuestos.

### 30 EJEMPLOS

Líneas celulares: 786-0 (carcinoma renal humano), Vero (riñón de mono) y células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) se obtuvieron de la American Type Culture Collection y se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Corning) suplementado con suero bovino fetal al 10 % y se tamponaron con Hepes 30 mM. Todas las líneas celulares se incubaron a 37 °C con un 5 % de CO<sub>2</sub>.

35 **Virus:** VSVΔ51 es una variante recombinante del serotipo Indiana del VSV que alberga una delección de la 51<sup>a</sup> metionina en la proteína M. VSVΔ51 que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) o luciferasa de luciérnaga (FLuc) son derivados recombinantes de VSVΔ51. Todas las reservas de virus se propagaron en células Vero, se purificaron en gradiente Optiprep y se titularon en células Vero como se describe en (Diallo et al. *Methods Mol Biol.* 2012;797:127-40). HSV-1 N212 (una cepa oncolítica eliminada por ICPO) que expresa GFP, se obtuvo del Dr. Karen Mossman y se ha descrito previamente (Jordan R, *J Vir*, 1997). El virus de la gripe A H1N1 PR/8/34 se obtuvo de ATCC. La gripe A FM/1/47 se obtuvo de Earl Brown y se ha descrito previamente en (Brown EG et. Al., *Virus Res.* 1999). Jack Gouldie, de la Universidad McMaster, proporcionó adenovirus del serotipo 5 con delección E1 que expresa luciferasa. El serotipo 6 de AAV que expresa luciferasa se obtuvo de Sarah Wootton en la Universidad de Guelph.

45 **Cribado analógico:** Los derivados de VSe1 se sintetizaron de acuerdo con la Figura 2. Estos se cribaron posteriormente para determinar la actividad sensibilizante viral observando su capacidad para potenciar la producción de VSVΔ51 que expresa luciferasa (el uso en una multiplicidad de infección de 0,01) de células 786-0 usando un amplio intervalo de dosis. La producción de virus se midió usando el método de alto rendimiento representado en la Figura 1 y descrito con mayor detalle en (Garcia V et al., *J Vis Exp.* 19 de septiembre de 2014;(91):51890). El impacto sobre la viabilidad celular también se midió en presencia y ausencia de virus mediante el uso de Alamar Blue®. En cada experimento se incluyó VSe1 como control. Para cada compuesto, se identificó el nivel de cambio máximo (véase la Figura 1) y se normalizó con respecto al nivel de cambio máximo para VSe1 probado como control en paralelo.

50 **Experimento de estabilidad del glutatión:** La estabilidad del glutatión se evaluó mediante el uso de un ensayo adaptado a partir de un método (11) publicado recientemente. Se añadieron 250 μL de una solución madre de DMSO 40 mM de cada compuesto a L-glutatión (15,4 mg, 5 mol equiv.) suspendido en 250 μL de DMSO. La mezcla resultante se colocó en un agitador a 37 °C. Se extrajeron alícuotas de 10 μL y se inactivaron en 990 μL de agua (que contenía ácido fórmico al 0,5 %) en varios puntos temporales, incluido en t = 0 min, para su análisis mediante ESI-LC-MS. Todos los análisis ESI-LC-MS se recogieron en un sistema de API2000 LC/MS/MS (Applied Biosystems) equipado con una sonda de ESI por pulverización turbo-ion interconectada con un Prominence UFLC (Shimadzu) equipado con una columna de fase inversa BDS Hypersil C18 50 × 2,1 mm, tamaño de partícula 3 μm (Thermo Scientific). La absorción UV HPLC/LCMS se controló a 254 nm y 210 nm. Tanto el compuesto como el aducto de glutatión se identificaron por MS. Se registró el área del pico UV para cada punto temporal.

**Ensayo de estabilidad plasmática:** Antes de los ensayos de estabilidad plasmática, se desarrollaron múltiples protocolos de monitorización de la reacción para cuantificación basada en la espectrometría de masas. Se prepararon soluciones madre 10 mM de cada análogo en metanol y se diluyeron con ácido fórmico acuoso (0,1 %) hasta una concentración final de 1  $\mu$ M. Se insertaron 5  $\mu$ L de la solución diluida en un emisor de nanoelectropulverización Proxeon (Thermo Scientific, Odensas, Dinamarca) y se analizaron en modo de iones positivos mediante nanoESI MS usando un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo cuadrupolar híbrido QStarXL (AB Sciex, Framingham, MA, EE. UU.). Para cada compuesto se recogieron espectros completos de masas e iones producto utilizando una tensión de nanoESI de 1000 V, un potencial de desagrupamiento de 30 V y un potencial de enfoque de 120 V. Los espectros de iones de producto se usaron para determinar dos transiciones de monitorización de reacción múltiple (MRM) para cada compuesto con energías de colisión optimizadas: una “transición cuantitativa” para determinar las cantidades relativas de cada compuesto, así como una “transición confirmatoria” para eliminar la interferencia isobárica en las mediciones.

Posteriormente, se prepararon soluciones madre 1 mM de cada análogo en metanol y se mezclaron con plasma de ratón Balb/c (Innovative Research, Novi, MI, EE. UU.) que se tamponó 1:1 con PBS (pH=7,4). Para aumentar el rendimiento del ensayo, los compuestos se multiplexaron en grupos de tres y se analizaron por triplicado. Los compuestos se añadieron al plasma hasta una concentración final de 10  $\mu$ M en un volumen total de 400  $\mu$ L. Inmediatamente tras la mezcla, se inactivaron 200  $\mu$ L de la mezcla de muestra con 300  $\mu$ L de ácido fórmico acuoso (5 %) para evitar la degradación de los análogos. El resto de la mezcla de muestra se incubó a 37 °C durante tres horas y se inactivó de manera idéntica. Las muestras inactivadas se pasaron a través de un filtro de corte Amicon de peso molecular de 3 kDa (Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) mediante centrifugación a 14 000 rpm durante 15 minutos.

20  $\mu$ L de los filtrados se sometieron a análisis MRM mediante un espectrómetro de masas híbrido de triple cuadrupolo con trampa de iones lineal Qtrap 4000 (AB Sciex, Framingham, MA, EE. UU.) con una fuente de pulverización de iones Turbo V acoplada a un HPLC Dionex Ultimate3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) (véase la información complementaria). Las columnas de sílice fusionadas sinterizadas (200  $\mu$ m ID) (Molex, Lise, IL, EE. UU.) se empaquetaron con perlas de fase inversa Magic C18 (MICHROM Bioresources Inc., Auburn, CA, EE. UU.) de 5  $\mu$ m hasta una longitud de 5 cm utilizando un recipiente interno de alta presión. Se emplearon separaciones cromatográficas usando disolventes de fase inversa (agua y acetonitrilo, que contenían ácido fórmico al 0,1 %) durante 10 minutos. Se obtuvieron espectros usando una tensión de pulverización iónica de 5000 V y un potencial de desagrupamiento de 25 V. La cuantificación automática se logró usando MultiQuant (AB Sciex, Framingham, MA, EE. UU.) mediante la integración de las áreas de pico para el cromatograma de iones extraídos de la transición MRM cuantitativa. La estabilidad plasmática de cada compuesto se calculó como porcentaje del compuesto detectado después de tres horas de incubación en plasma en relación con la cantidad detectada después de la extinción inmediata.

En las Figuras 3A-E se presentan los valores del nivel de cambio máximo normalizado, la LD50 del compuesto con y sin virus, así como el glutatión y la estabilidad plasmática de los compuestos ensayados.

A continuación, se analizaron compuestos representativos con actividad sensibilizante viral con otro rhabdovirus oncolítico relacionado, Maraba MG-1 (Brun J et al. Mol Ther, 2010). La FIGURA 4 muestra que VSe1 y análogos activos representativos de los mismos pueden potenciar la replicación del virus oncolítico MG1 en células cancerosas. Se trataron células de carcinoma mamario de ratón (4T1) con concentraciones variables de análogos de VSe1 y VSe1. Después de 4 horas, las células se infectaron con el virus VSV-Maraba-MG1-eGFP a una MOI de 0,01. Se detectó la expresión de eGFP 40 horas después de la infección por MG1. Se encontró que los análogos ensayados aumentan la propagación de MG-1 según lo evaluado por la expresión del transgén eGFP.

Posteriormente, los compuestos representativos se probaron para determinar su capacidad para aumentar la replicación de otros virus más divergentes. La FIGURA 5 muestra que VSe1 y análogos de VSe1 activos representativos mejoran la replicación del Virus del Herpes simple tipo 1 (HSV-1) en células cancerosas. A) Las células de carcinoma mamario de ratón (4T1) se dejaron sin tratar o se trataron con VSe1 o análogos de VSe1 CMO1025, MDO1151, MDO1145 durante 4 h a varias concentraciones: 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 15  $\mu$ M o 20  $\mu$ M. Después se añadió HSV-N212eGFP nulo de ICP0 a MOI de 0,005. Se detectó la fluorescencia de eGFP 48 h después de la infección de HSV. B) Los títulos de HSV se determinaron 48 h después de la infección. Media  $\pm$ SEM de 3 experimentos independientes cuando se muestran barras de error. Se encontró que los análogos aumentan la propagación del HSV-N212eGFP medido por la expresión de GFP, así como a través del ensayo de placa estándar.

Posteriormente, los compuestos representativos se probaron para determinar su capacidad para aumentar la productividad de virus de la gripe no oncolíticos en células no cancerosas. La FIGURA 6 muestra que los análogos de VSe1 mejoran la producción de la gripe A PR8 (InfA-PR8) de líneas celulares no cancerosas tales como células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) y células Vero. A-B) Las células MDCK se trataron con concentraciones variables de análogo de VSe1 CM01031. 24 horas después, las células se infectaron con gripe H1N1 A/Puerto Rico/8/34 (PR8) a una MOI de 0,01. Los títulos PR8 se determinaron 48 horas después de la infección. A) Mejora de PR8 en células MDCK.2. B) Mejora de PR8 en células MDCK (NBL-2). C) Las células Vero se trataron con las

concentraciones indicadas de VSe1 o análogos en las mismas durante 24 h y se infectaron con gripe H1N1 A/FM/1/47 a una MOI de 0,01. La producción después de 48 h después de la infección se midió mediante ELISA y ensayo de placa (donde se indica). Los resultados obtenidos muestran que varios compuestos aumentan la productividad de las cepas de la gripe A H1N1 en células no cancerosas.

Posteriormente, los compuestos representativos se probaron para determinar su capacidad para aumentar la infección de las células y la producción de transgén mediante vectores de terapia génica comúnmente utilizados. La FIGURA 7 muestra que VSe1 y análogos de VSe1 activos representativos mejoran la producción de vectores de terapia génica de adenovirus y virus adenoasociados. Las células de carcinoma de pulmón humano (A549) se trataron con análogos de VSe1 o VSe1 a diversas concentraciones. 4 horas después, las células se infectaron con A) adenovirus que expresan luciferasa de luciérnaga a una MOI de 1, o B) virus adenoasociados que expresan luciferasa de luciérnaga. 24 horas después, se midió la actividad de luciferasa. Los datos se representan como el nivel de aumento en unidades de luz relativas medias de las muestras tratadas frente a los controles no tratados. VSe1 se muestra en la barra de datos más a la izquierda en cada conjunto, el análogo VSe1 MD01145 se muestra como barra de datos media en cada conjunto y el análogo VSe MD02026 se muestra como la barra de datos más a la derecha en cada conjunto. Los datos revelan un aumento de la expresión de luciferasa en células A549 infectadas por vectores de de terapia génica Adenovirus y AAV que expresan luciferasa, lo que indica una mejora de la infección y/o de la expresión del transgén tras el tratamiento con VSe1 y sus análogos.

Posteriormente, se evaluó la mutagenicidad en salmonela de un compuesto representativo a base de pirrol. La FIGURA 8 muestra que el análogo de VSe1 MD01145 no es mutagénico. Ensayo de mutación inversa de salmonella (Ensayo de Ames) se empleó para evaluar el potencial mutagénico de los análogos de VSe1 y VSe1. A) Los datos proceden de los resultados obtenidos con la cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*, sin la fracción S9. Se usó DMSO como control negativo y se usó metanosulfonato de metilo (MMS) como control positivo para la mutagenicidad. Un alto número de revertistas, tales como en el control positivo (MMS), es una indicación de potencial mutagénico. El tratamiento con MD01145 condujo a una tasa de reversión similar a la de DMSO e incluso menor que el compuesto original VSe1. B) MD01145 no produce un aumento dependiente de la dosis en el número de revertistas en las cepas TA98 y TA100, con o sin la fracción enzimática hepática S9, lo que sugiere que sus metabolitos también son no mutagénicos.

**Estudios de efectos sinérgicos:** Se planteó la hipótesis de que también se pueden usar combinaciones de dos o más compuestos como se describe en la presente memoria. Se realizó un ensayo en el que las células de carcinoma renal humano (786-0) se trataron conjuntamente con VSe1 y el análogo de VSe1 MD03011. Los resultados del ensayo se proporcionan en la Figura 9. Como se puede observar, se observó un efecto sinérgico sorprendente cuando las células se trataron tanto con VSe1 como con MD03011, con un aumento sustancial del nivel de cambio en VEU/mL. Estos resultados sugieren que pueden obtenerse efectos sinérgicos mediante el uso de combinaciones de dos o más compuestos como se describe en la presente memoria. En las condiciones probadas, VSe1 combinado con MD03011 proporcionó un excelente efecto sinérgico.

**VSe1 y sus análogos potencian la infección viral de las células:** VSe1 y sus análogos pueden usarse para potenciar la infección de células con virus, virus atenuados y/o virus genéticamente modificados. En las Figuras 10 y 11, se proporcionan datos que indican que la infección de células con una cepa de vacuna de vacuna modificada ankara (MVA) puede potenciarse mediante el uso de VSe1 y varios análogos de los mismos, incluidos MD01145, MD01151, MD03011, MD03009 y MD02026.

**VSe1 y análogos de VSe1 potencian la transducción de adenovirus en células cancerosas:** VSe1 y sus análogos pueden usarse para potenciar la transducción del virus en las células. En la Figura 12, se proporcionan datos que indican que tanto VSe1 como el análogo MD01151 potencian cada uno la transducción de Adenovirus en células cancerosas. En la Figura 13, se proporcionan datos que indican que tanto VSe1 como el análogo MD03009 potencian cada uno la transducción de Adenovirus en células cancerosas. En la Figura 14, se proporcionan datos que indican que tanto VSe1 como el análogo MD03011 potencian cada uno la transducción de adenovirus en células cancerosas.

**Los análogos de VSe1 potencian la transducción de adenovirus en tejidos:** Los análogos de VSe1 se pueden usar para potenciar la transducción del tejido. En la Figura 15, se proporcionan datos que indican que los análogos de VSe1 MD02026, MD01145 y MD03011 potencian cada uno la transducción de adenovirus en tejido cerebral normal. En la Figura 16, se proporcionan datos que indican que los análogos de VSe1 MD02026, MD01145 y MD03011 potencian cada uno la transducción de adenovirus en tejido muscular normal.

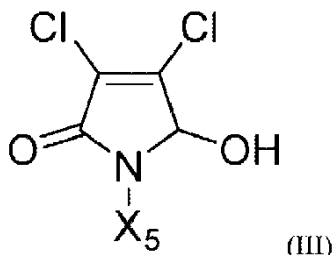
**Efecto del análogo de VSe1 MD03011 en la producción de A/FM1 (H1N1) *in ovo*:** Los análogos de VSe1 se pueden usar para potenciar la producción de virus *in ovo*. En la Figura 17, se proporcionan datos que indican que el análogo de VSe1 MD03011 potencia la producción de A/FM1 (H1N1) *in ovo*. Estos resultados sugieren que los análogos de VSe1 tales como el MD03011 pueden ser particularmente útiles en ciertas aplicaciones de producción de vacunas donde se va a producir virus *in ovo*, por ejemplo.

## Referencias

1. Kay, M.A., J.C. Glorioso y L. Naldini, Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*, 2001. 7(1): p. 33-40.
- 5 2. Parato, K. A., et al., Recent progress in the battle between oncolytic viruses and tumours. *Nat Rev Cancer*, 2005. 5(12): p. 965-76.
3. Sadler, A.J. y B.R. Williams, Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol*, 2008. 8(7): p. 559-68.
- 10 4. Wilkins, C. y M. Gale, Jr., Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr Opin Immunol*.
5. Sutter, G., et al., Stable expression of the vaccinia virus K1L gene in rabbit cells complements the host range defect of a vaccinia virus mutant. *J Virol*, 1994. 68(7): p.4109-16.
- 15 6. Richt, J.A. y A. Garcia-Sastre, Attenuated influenza virus vaccines with modified NS1 proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009. 333: p. 177-95.
7. Alina, T., et al., Vesicular stomatitis virus oncolysis is potentiated by impairing mTORC1-dependent type IIFN production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(4): p. 1576-81.
- 20 8. Kurozumi, K., et al., Effect of tumor microenvironment modulation on the efficacy of oncolytic virus therapy. *J Natl Cancer Inst*, 2007. 99(23): p.1768-81.
9. Hanahan, D. y R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011. 144(5): p. 646-74.
- 25 10. Stojdl, D.F., et al., Exploiting tumor-specific defects in the interferon pathway with a previously unknown oncolytic virus. *Nat Med*, 2000. 6(7): p. 821-5.
11. Stojdl, D.F., et al., VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*, 2003. 4(4): p. 263-75.
- 30 12. Bell, J.C., B. Lichty y D. Stojdl, Getting oncolytic virus therapies off the ground. *Cancer Cell*, 2003. 4(1): p. 7-11.
13. Thaci, B., et al., The challenge for gene therapy: innate immune response to adenoviruses. *Oncotarget*, 2011. 2(3): p. 113-21.
- 35 14. Apostolidis, L., V. Schirmacher y P. Fournier, Host mediated anti-tumor effect of oncolytic Newcastle disease virus after locoregional application. *Int J Oncol*, 2007. 31(5): p. 1009-19.
15. Kaufman, H.L., et al., Local and Distant Immunity Induced by Intralesional Vaccination with an Oncolytic Herpes Virus Encoding GM-CSF in Patients with Stage IIIc and IV Melanoma. *Ann Surg Oncol*, 2010.
16. Park, B.H., et al., Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *Lancet Oncol*, 2008. 9(6): p. 533-42.
- 45 17. Breitbach, C.J., et al., Targeted inflammation during oncolytic virus therapy severely compromises tumor blood flow. *Mol Ther*, 2007. 15(9): p. 1686-93.
18. Diallo, J.S., et al., A high-throughput pharmacoviral approach identifies novel oncolytic virus sensitizers. *Mol Ther*, 2010. 18(6): p. 1123-9.
- 50 19. Breitbach, C.J., et al., Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature*, 2011. 477(7362): p. 99-102.
20. Harrington, K.J., et al., Phase I/II study of oncolytic HSV GM-CSF in combination with radiotherapy and cisplatin in untreated stage III/IV squamous cell cancer of the head and neck. *Clin Cancer Res*, 2010. 16(15): p. 4005-15.
21. Wakiimoto, H., et al., Effects of innate immunity on herpes simplex virus and its ability to kill tumor cells. *Gene Ther*, 2003. 10(11): p. 983-90.
- 60

## REIVINDICACIONES

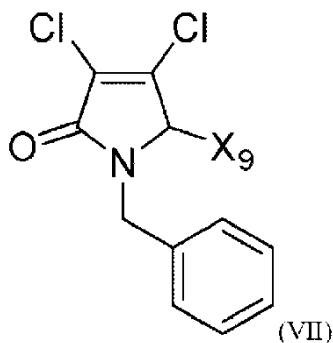
1. Un compuesto que se define por la fórmula (III):



en donde  $X_5$  es alquilo  $C_1-C_{12}$ , alqueno  $C_2-C_{12}$  o alquino  $C_2-C_{12}$  lineal o ramificado sustituido o no sustituido, mono- o bi-cicloarilo o heteroarilo sustituido o no sustituido, cicloalquilo o heterocicloalquilo sustituido o no sustituido, alquilfenilo, bencilo sustituido, tiofenilo, sulfonbencilo, metilsulfonbencilo o alquiloxi sustituido o no sustituido; para su uso en un método para potenciar la infección, el crecimiento, la propagación y/o la productividad virales en terapia génica, vacuna o terapia oncolítica.

2. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde  $X_5$  es fenilo, fenilo sustituido, bencilo, bencilo sustituido, tiofuranilo sustituido o no sustituido, tiofenilo, sulfonbencilo, metilsulfonbencilo, morfolina sustituida o no sustituida, alquiltiol, alquilamina sustituida o no sustituida, u oxazolina sustituida o no sustituida.

3. El compuesto para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que se define por la fórmula (VII): en donde  $X_9$  es OH.



4. Una composición que comprende uno o más compuestos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un portador, diluyente o excipiente para su uso en un método para potenciar la infección, el crecimiento, la propagación y/o la productividad virales en terapia génica, vacuna o terapia oncolítica.

5. Una composición que comprende uno o más compuestos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y uno o más de a) un virus, un virus genéticamente modificado, un virus atenuado, una vacuna, un vector de terapia génica o un virus oncolítico, b) una o más células cancerosas, c) un portador, diluyente o excipiente, d) un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, e) células no cancerosas; f) medios de cultivo celular; g) una o más células derivadas de o contenidas en óvulos embrionados no humanos; o cualquier combinación de a)-g), para su uso en un método para potenciar la infección, el crecimiento, la propagación y/o la productividad virales en terapia génica, vacuna o terapia oncolítica.

6. El compuesto para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición de la reivindicación 4 o 5, en donde la terapia oncolítica comprende el tratamiento de cáncer humano o células tumorales seleccionadas del grupo que consiste en leucemia linfoblástica, leucemia mieloide, carcinoma corticosuprarrenal, cánceres relacionados con el SIDA, linfoma relacionado con el SIDA, cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma, tumor teratoide/rabdoide atípico, carcinoma basocelular, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer óseo, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, glioma de tronco cerebral, tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, craneofaringioma, ependimoblastoma, meduloblastoma, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineoblastoma, glioma hipotalámico y de las vías visuales,

- tumor de la médula espinal, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, linfoma del sistema nervioso central, cáncer de cuello de útero, cordoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, tumores embrionarios, cáncer de endometrio, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer de
- 5 esófago, tumor de células germinales extracraneal, tumor de células germinales extragonadal, cáncer de vías biliares extrahepático, cáncer ocular, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (de estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células del estroma gastrointestinal, tumores de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, ovárico, extracraneal, extragonadal, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y
- 10 cuello, cáncer hepatocelular (de hígado), histiocitosis, cáncer de células de Langerhans, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, tumores de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia linfocítica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y de la cavidad bucal, cáncer de hígado, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer pulmonar microcítico, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, histiocitoma fibroso maligno óseo y osteosarcoma, meduloblastoma, meduloepitelioma,
- 15 melanoma, melanoma intraocular, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, cáncer de la cavidad nasal y de senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer oral, cáncer orofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, tumores del parénquima pineal, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor hipofisario, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, linfoma primario del sistema nervioso
- 20 central, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales (de riñón), cáncer de pelvis renal y de uréter, cáncer de células de transición, carcinoma de las vías respiratorias, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, sarcoma uterino, cáncer de piel, carcinoma cutáneo de células de Merkel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejidos blandos, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de células T, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, tumor trofoblástico, cáncer de uretra, cáncer de útero, cáncer de endometrio, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer de vulva y tumor de Wilms.
- 25
- 30
7. Un kit para su uso en un método para potenciar la infección, el crecimiento, la propagación y/o la productividad virales en terapia génica, vacuna o terapia oncolítica, comprendiendo dicho kit uno o más compuestos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y uno o más de a) un virus, un virus genéticamente modificado, un virus atenuado, una vacuna, un vector de terapia génica o un virus oncolítico,
- 35 b) una o más células cancerosas, c) un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, d) células no cancerosas; e) medios de cultivo celular; f) células derivadas de o contenidas en óvulos embrionados no humanos, g) una placa de cultivo celular o una cubeta de múltiples pocillos; h) un aparato para administrar el compuesto a una célula, a un medio o a óvulos no humanos; i) instrucciones para usar el compuesto o de cualquier componente del kit, o cualquier combinación de a)-i).
- 40
8. Un método para potenciar o aumentar la producción viral en células *in vitro* que comprende, administrar el (los) compuesto (s) de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o cualquier combinación de los mismos, a dichas células antes, después o simultáneamente con un virus, y cultivar el virus y las células.
- 45
9. El método de la reivindicación 8, en donde potenciar o aumentar la producción vírica comprende uno o más de las siguientes acciones: potenciar o aumentar la infección de células y/o su tasa, potenciar o aumentar la capacidad reproductiva de un virus y/o su tasa, potenciar o aumentar la propagación y/o el título de un virus y/o la tasa a la que se puede alcanzar el título completo, potenciar o aumentar la expresión de antígeno de un virus y/o una tasa del mismo, potenciar o aumentar la expresión génica o transgénica de un virus y/o una tasa del mismo, o potenciar o aumentar la expresión de proteínas de virus en células y/o una tasa de las mismas, o cualquier combinación de los mismos.
- 50

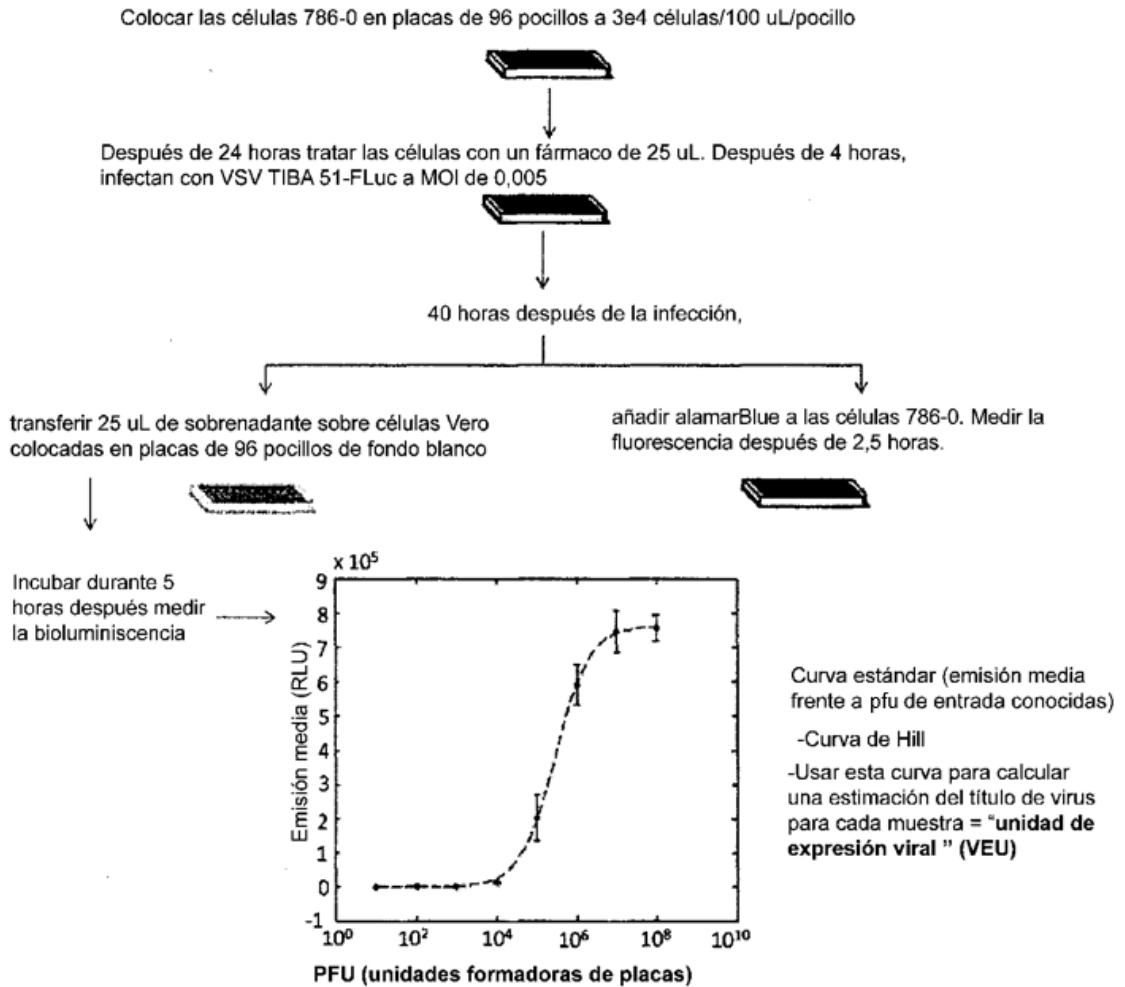


Figura 1A

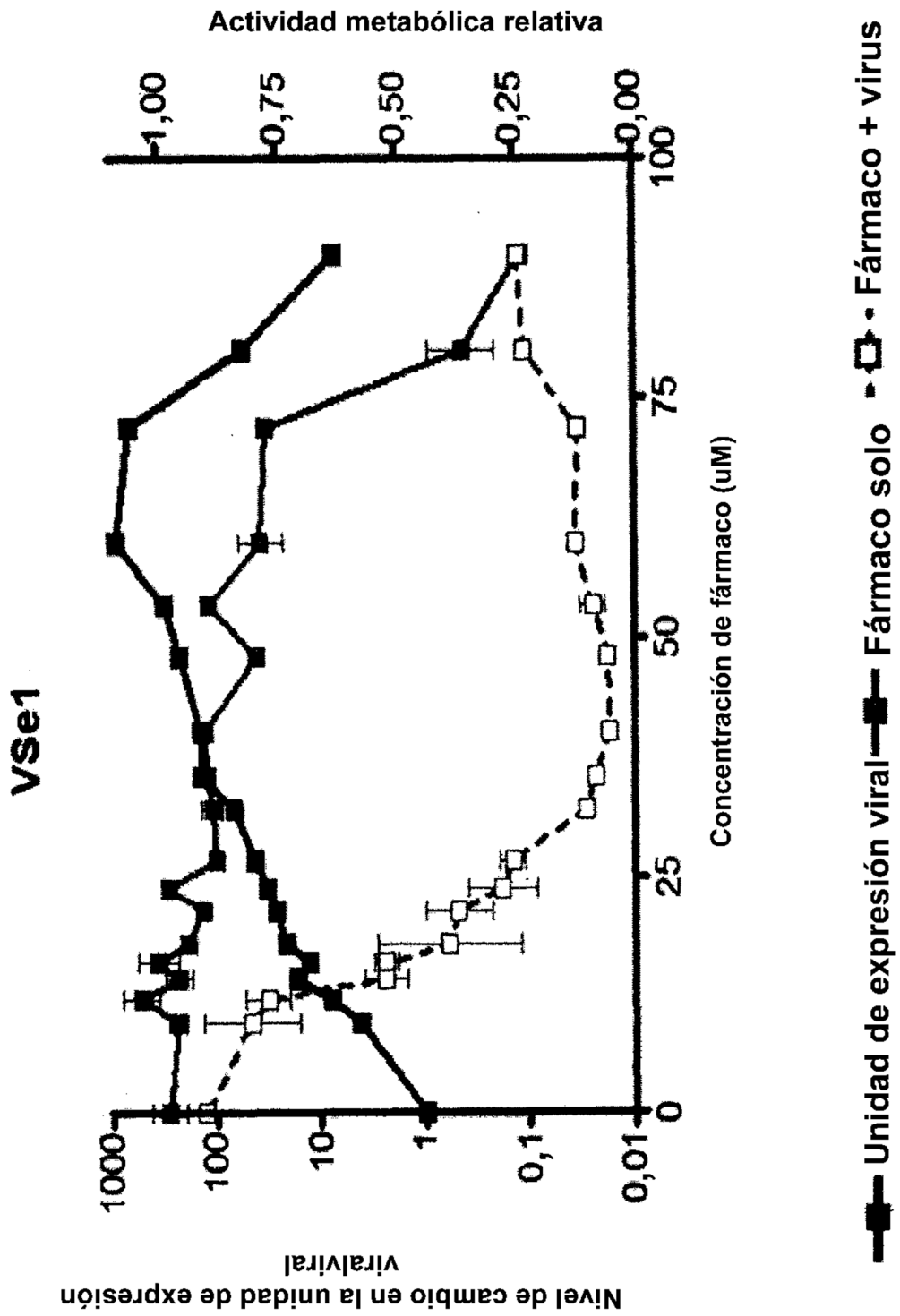


Figura 1B

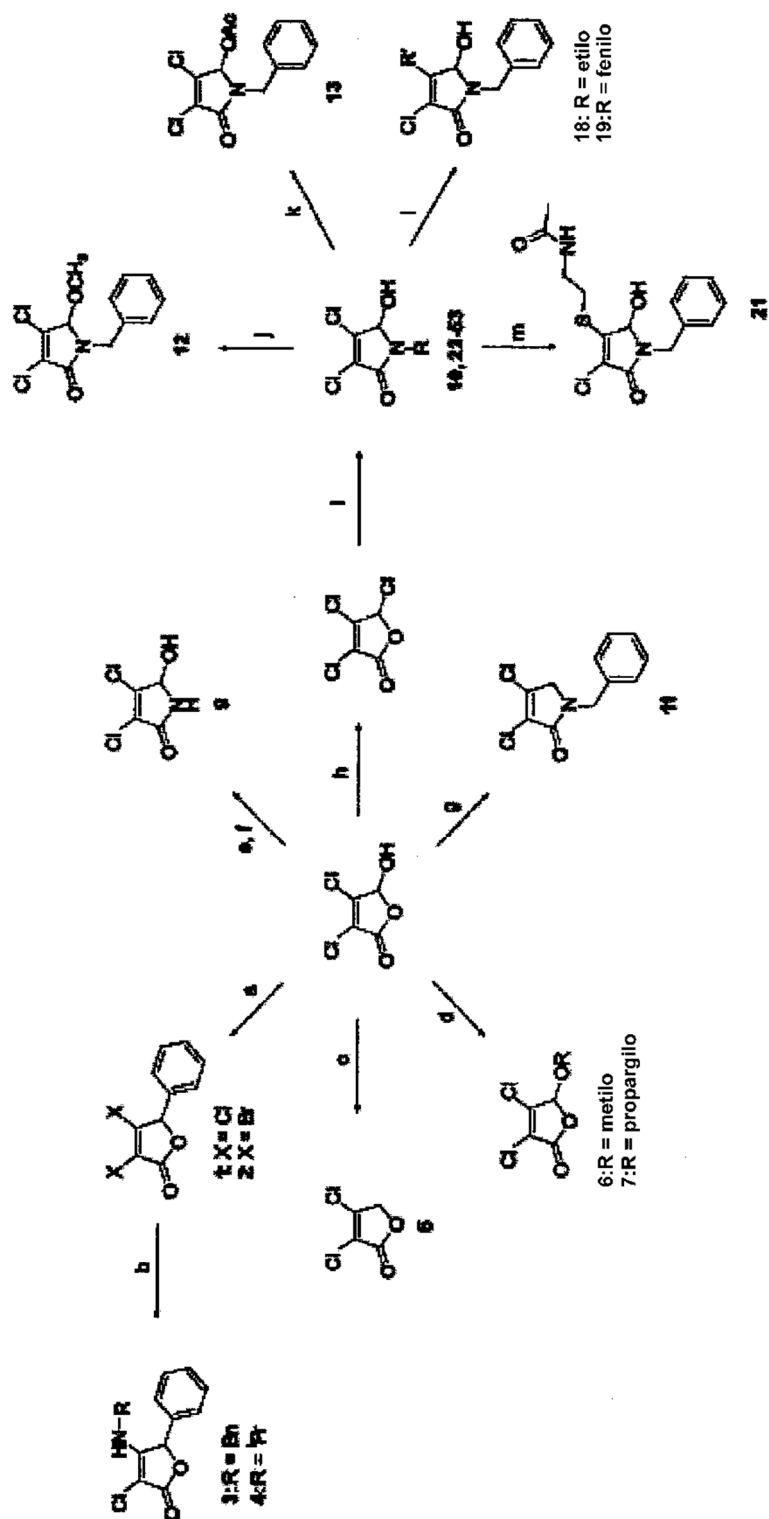


Figura 2

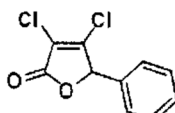
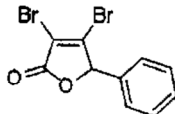
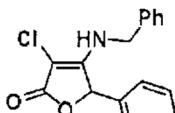
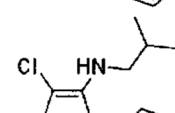
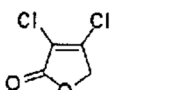
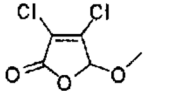
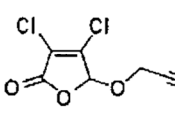
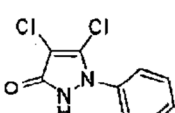
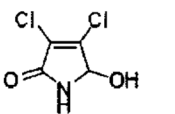
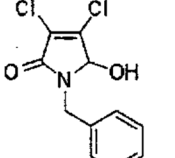
Compuesto	Estructura	PFC normalizada (dosis de PFC ( $\mu\text{M}$ )) <sup>a</sup>	LD50 ( $\mu\text{M}$ )	LD50 con virus ( $\mu\text{M}$ )	semivida de GSH (min) <sup>b</sup>	% de estab del plasma restante a las 3 h
1		1,00 (60 $\mu\text{M}$ )	79	16	<5	0
2		0,37 (72 $\mu\text{M}$ )	87	50	<5	0
3		0,19 (96 $\mu\text{M}$ )	140	140	NR <sup>c</sup>	65,6 $\pm$ 6,5
4		0,18 (80 $\mu\text{M}$ )	90	90	NR	0
5		0,27 (36 $\mu\text{M}$ )	41	27	<5	0
6		0,21 (60 $\mu\text{M}$ )	73	51	<5	0
7		0,17 (60 $\mu\text{M}$ )	52	17	<5	0
8		NE <sup>c</sup>	>180	>180	NR	88,3 $\pm$ 9,3
9		0,67 (120 $\mu\text{M}$ )	148	87	117	0
10		0,37 (48 $\mu\text{M}$ )	67	51	32	19,8 $\pm$ 0,4

Figura 3A

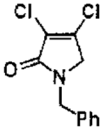
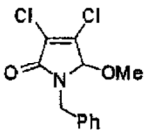
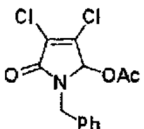
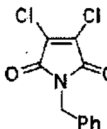
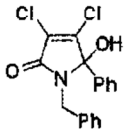
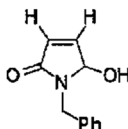
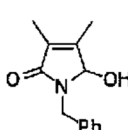
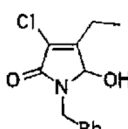
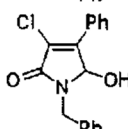
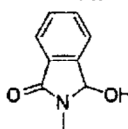
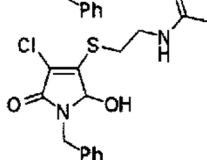
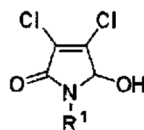
Compuesto	Estructura	PFC normalizada (dosis de PFC ( $\mu\text{M}$ )) <sup>a</sup>	LD50 ( $\mu\text{M}$ )	LD50 con virus ( $\mu\text{M}$ )	semivida de GSH (min) <sup>b</sup>	% de estab del plasma restante a las 3 h
11		0,03 (240 $\mu\text{M}$ )	332	332	64	42,5 $\pm$ 9,6
12		0,28 (180 $\mu\text{M}$ )	206	203	118	47,6 $\pm$ 1,4
13		0,16 (60 $\mu\text{M}$ )	61	45	21	0
14		0,03 (17.8 $\mu\text{M}$ )	104	98	<5	70,2 $\pm$ 8,4
15		NE	66	66	340	14,9 $\pm$ 7,1
16		NE	>360	>360	NR <sup>e</sup>	98,2 $\pm$ 3,7
17		NE	>360	>360	NR	82,0 $\pm$ 10,2
18		NE	>360	>360	-	ND <sup>d</sup>
19		NE	250	245	-	ND
20		NE	>360	>360	NR	102,9 $\pm$ 1,6
21		NE	>90	>90	NR	102,7 $\pm$ 10,8

Figura 3B



Compuesto	Estructura	PFC normalizada (dosis de PFC ( $\mu\text{M}$ )) <sup>a</sup>	LD50 ( $\mu\text{M}$ )	LD50 con virus ( $\mu\text{M}$ )	Duración media de GSH (min) <sup>b</sup>	Plasma stab porcentaje restante a las 3 horas
22		0,47 (96 $\mu\text{M}$ )	119	76	68	72,0 $\pm$ 3,0
23		0,06 (72 $\mu\text{M}$ )	>90	55	-	ND
24		0,48 (120 $\mu\text{M}$ )	174	96	61	91,6 $\pm$ 5,2
25		0,74 (80 $\mu\text{M}$ )	127	51	53	54,8 $\pm$ 3,6
26		0,52 (96 $\mu\text{M}$ )	110	66	46	64,8 $\pm$ 7,7
27		0,04 (80 $\mu\text{M}$ )	100	60	21	9,0 $\pm$ 1,4
28		1,00 (80 $\mu\text{M}$ )	153	55	96	38,9 $\pm$ 5,2
29		0,51 (72 $\mu\text{M}$ )	74	27	74	57,6 $\pm$ 6,6
30		0,57 (32 $\mu\text{M}$ )	36	20	50	42,9 $\pm$ 7,2
31		0,26 (40 $\mu\text{M}$ )	40	34	72	40,1 $\pm$ 9,8
32		0,11 (27 $\mu\text{M}$ )	28	5	24	ND
33		0,30 (18 $\mu\text{M}$ )	18	12	24	0

Figura 3C




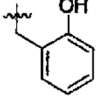

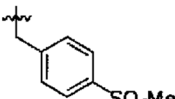
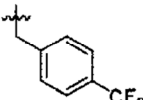
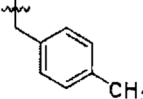
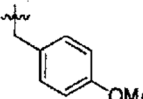
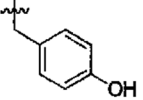

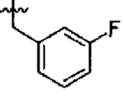
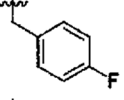
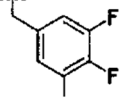
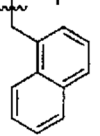
34		0,33 (72 $\mu$ M)	74	6	31	48,0 $\pm$ 16,5
35		0,14 (27 $\mu$ M)	36	23	43	63,8 $\pm$ 3,2
36		0,07 (180 $\mu$ M)	>180	>180	34	28,2 $\pm$ 2,6
37		0,56 (48 $\mu$ M)	58	38	41	0,7 $\pm$ 0,1
38		0,35 (216 $\mu$ M)	215	107	32	25,7 $\pm$ 2,9
39		0,51 (60 $\mu$ M)	>90	25	34	41,4 $\pm$ 5,4
40		1,6 (27 $\mu$ M)	36	13	32	15,3 $\pm$ 2,5
41		0,19 (40 $\mu$ M)	39	30	35	51,4 $\pm$ 8,2
42		0,03 (40 $\mu$ M)	55	17	40	49,1 $\pm$ 12,4
43		0,15 (60 $\mu$ M)	>90	45	69	58,3 $\pm$ 0,6
44		0,08 (60 $\mu$ M)	63	39	31	45,9 $\pm$ 8,1
45		0,06 (48 $\mu$ M)	43	37	31	54,2 $\pm$ 4,2
46		0,09 (40 $\mu$ M)	42	36	32	23,1 $\pm$ 0,8
47		0,10 (40 $\mu$ M)	36	35	35	22,7 $\pm$ 8,4
48		0,65 (32 $\mu$ M)	38	24	14	36,5 $\pm$ 7,6

Figura 3D

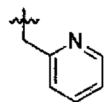
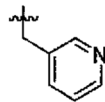
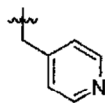
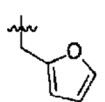
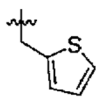
49		0,31 (96 $\mu\text{M}$ )	131	67	64	$44,6 \pm 1,2$
50		0,42 (60 $\mu\text{M}$ )	85	29	54	$39,6 \pm 2,6$
51		0,31 (72 $\mu\text{M}$ )	89	28	53	$44,0 \pm 1,0$
52		0,25 (60 $\mu\text{M}$ )	67	28	45	$54,1 \pm 5,1$
53		0,51 (60 $\mu\text{M}$ )	64	27	40	$50,1 \pm 10,5$

Figura 3E

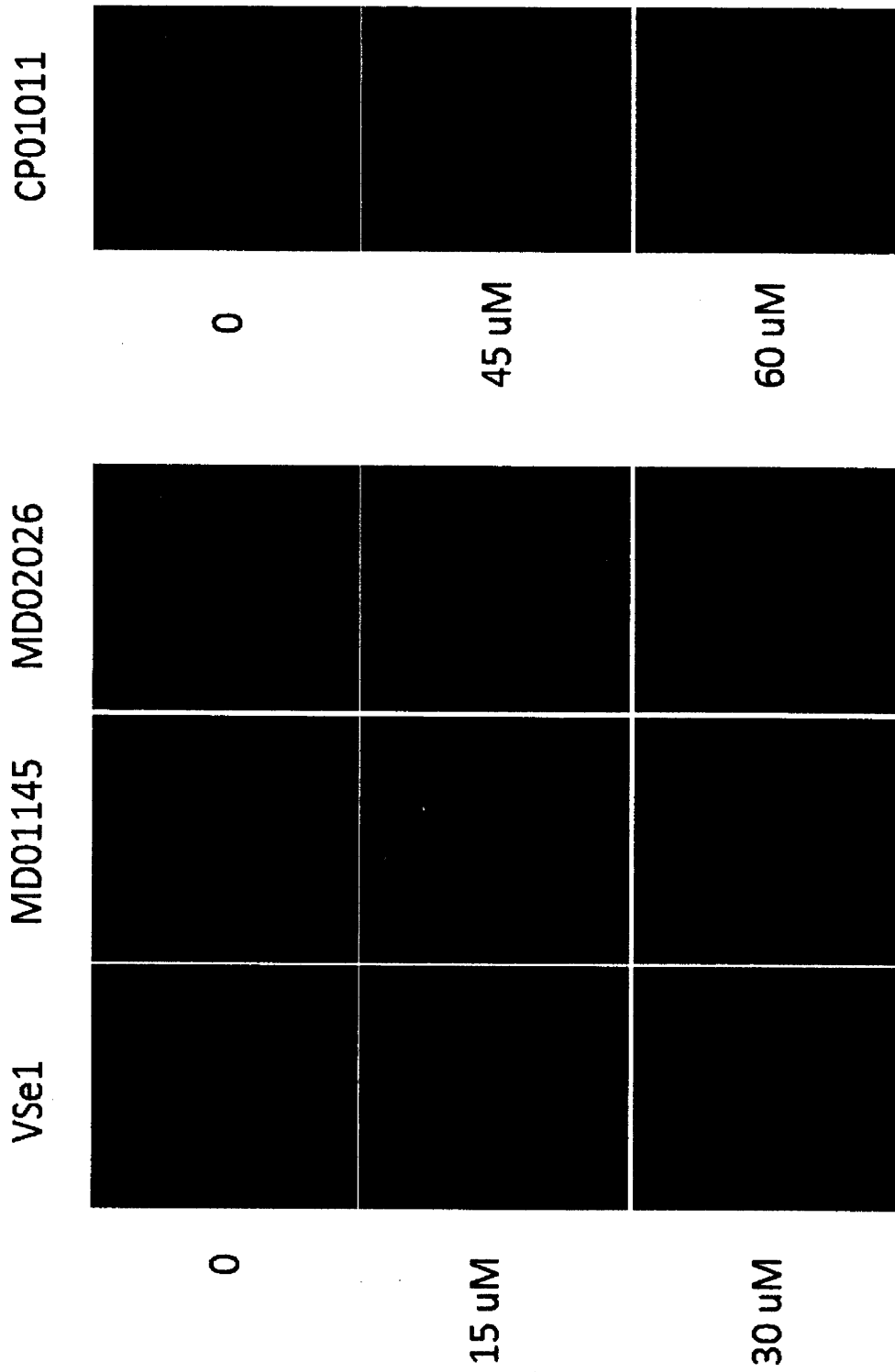


Figura 4

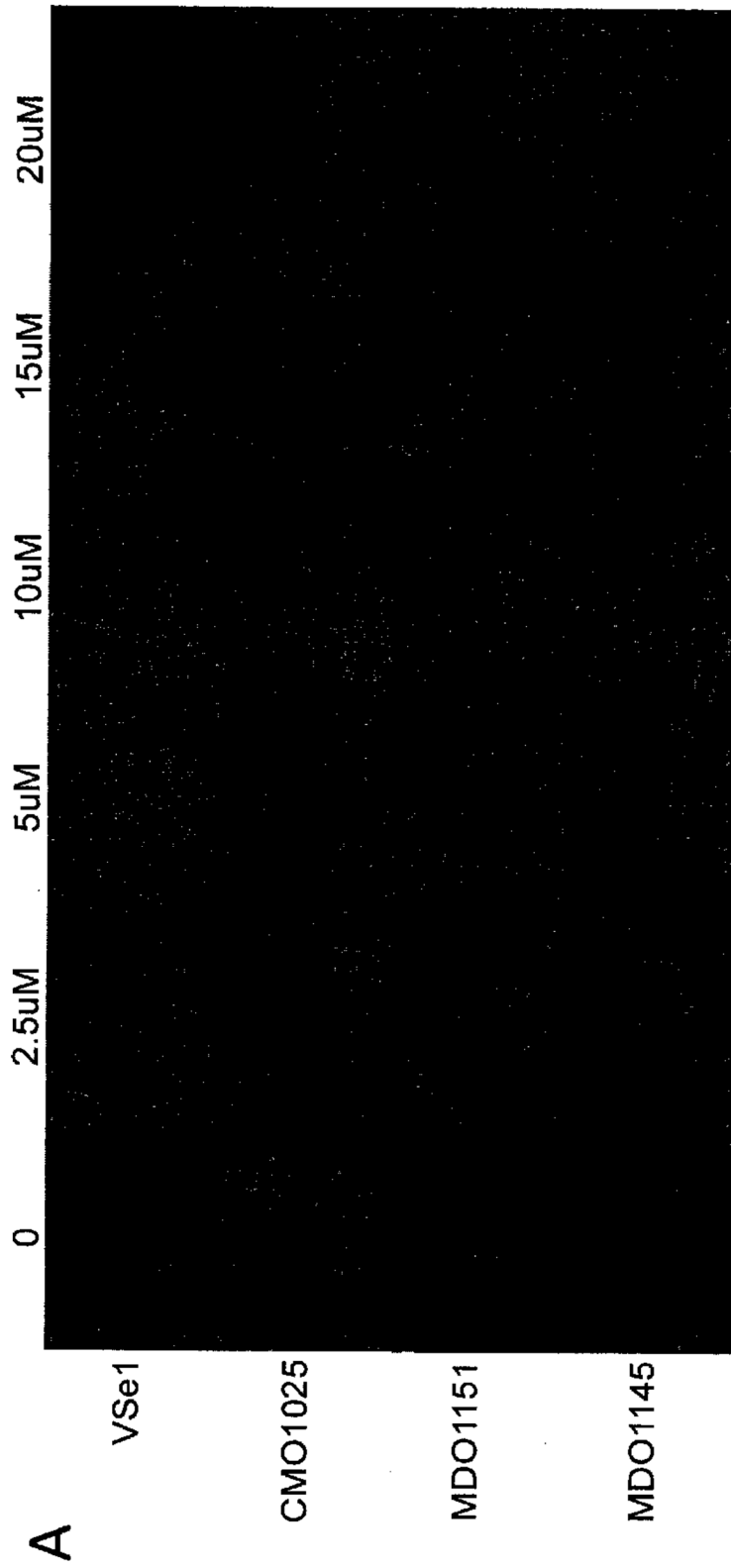
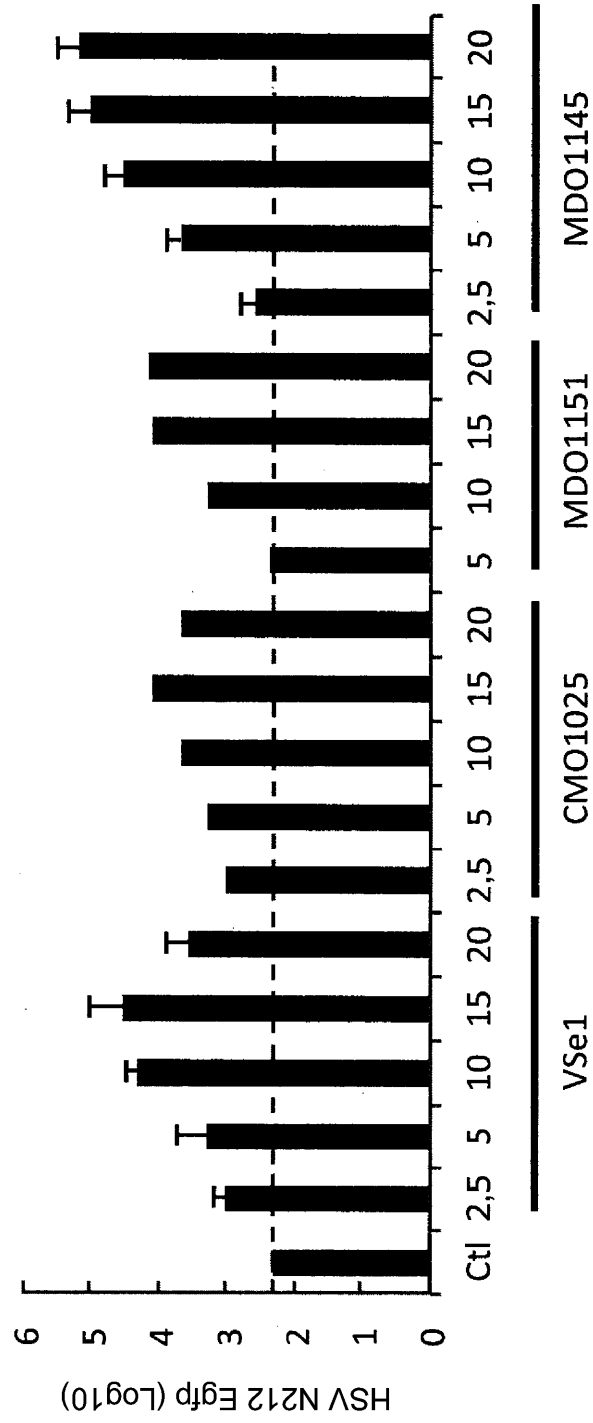


Figura 5A



**B**

Figura 5B

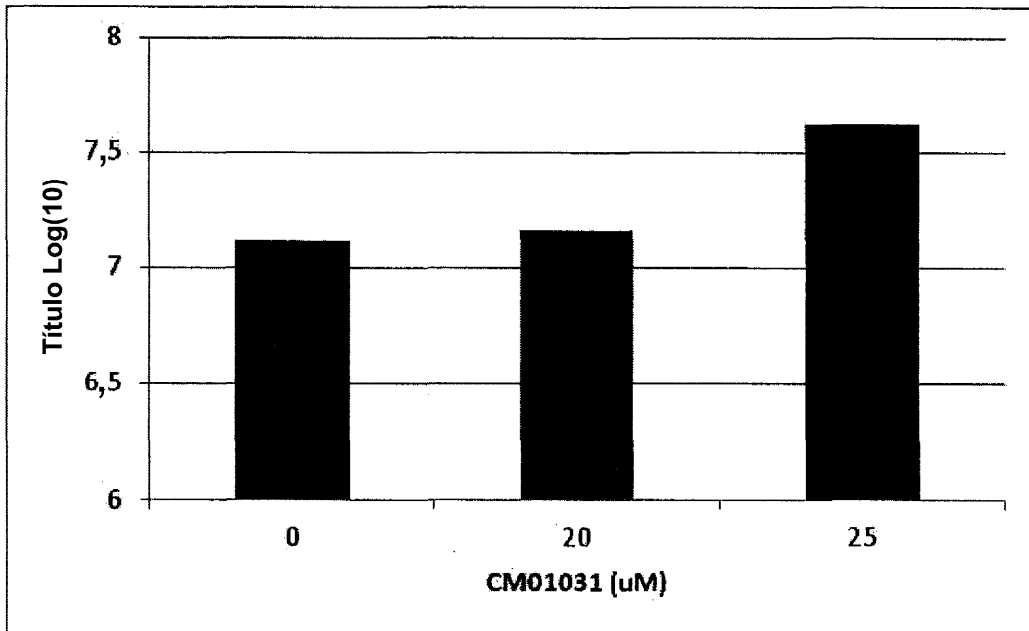


Figura 6A

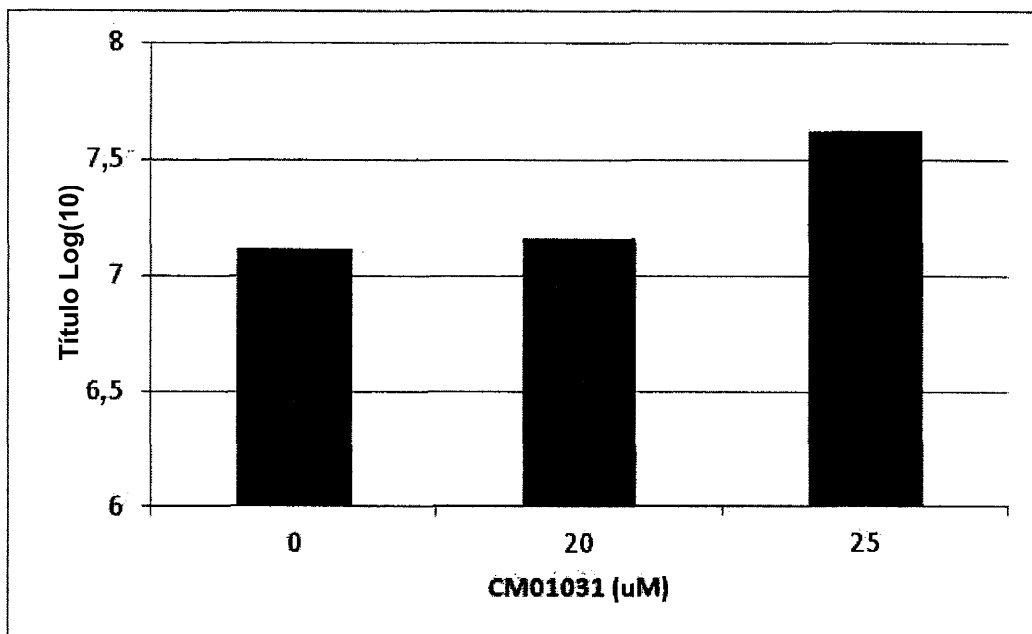


Figura 6B

	DOSIS	TÍTULO	NIVEL DE CAMBIO	TÍTULO	NIVEL DE CAMBIO
	uM	ELISA		ENSAYO DE PLACA	
VSe1	0	1,16E+05	9,32	5,78E+03	3,94
	14	1,09E+06		2,27E+04	
MD03011	0	1,16E+05	18,01	3,84E+03	25,13
	68	2,10E+06		9,64E+04	
KK01007	0	1,16E+05	11,48	1,67E+02	18,40
	14	1,34E+06		3,07E+03	
MD03007	0	1,23E+05	6,82	1,71E+03	37,77
	34	8,37E+05		6,45E+04	
MD03009	0	1,23E+05	3,54	1,71E+03	11,02
	26	4,35E+05		1,88E+04	
MD02026	0	1,04E+05	2,86		
	68	2,99E+05			
MD03013	0	1,35E+05	2,43		
	29	3,28E+05			
MD02054	0	4,10E+05	2,80		
	12	1,15E+06			
MD01145	0	4,10E+05	2,40		
	26	9,82E+05			
CM01031	0	1,04E+05	1,60		
	7	1,68E+05			
MD03017	0	2,67E+05	1,15	3,69E+03	2,43
	3	3,07E+05		8,97E+03	

Figura 6C

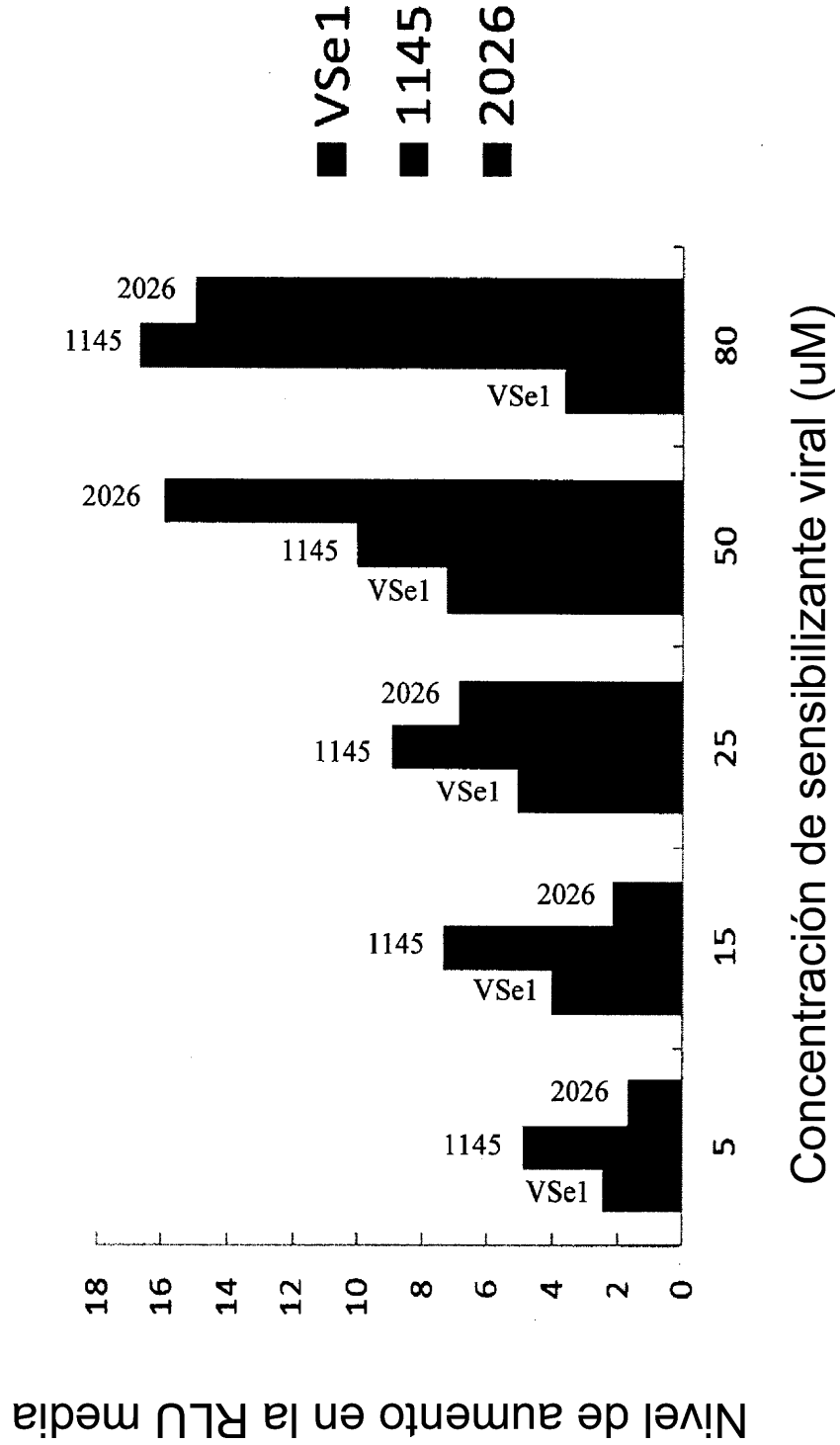


Figura 7A

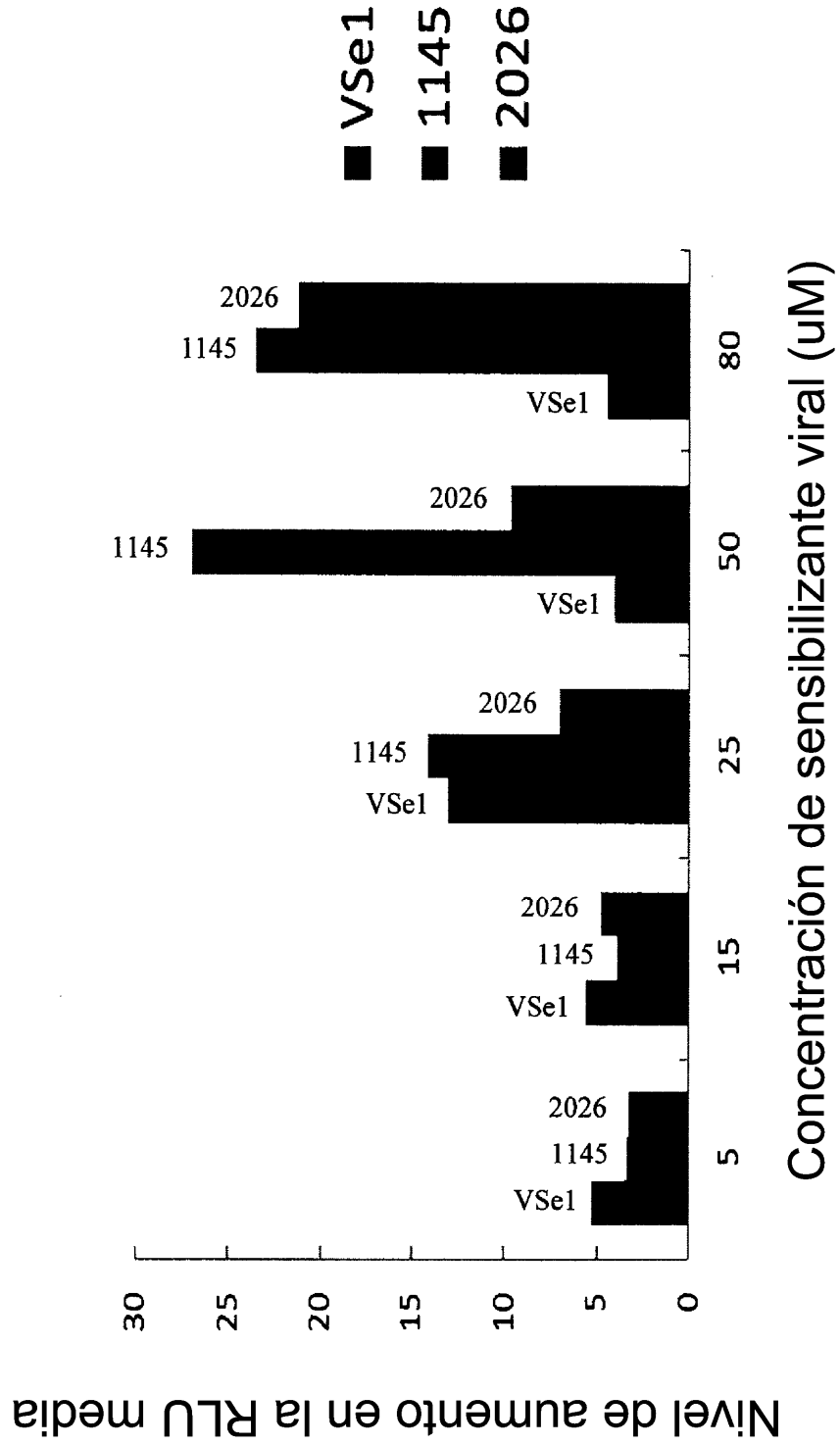


Figura 7B

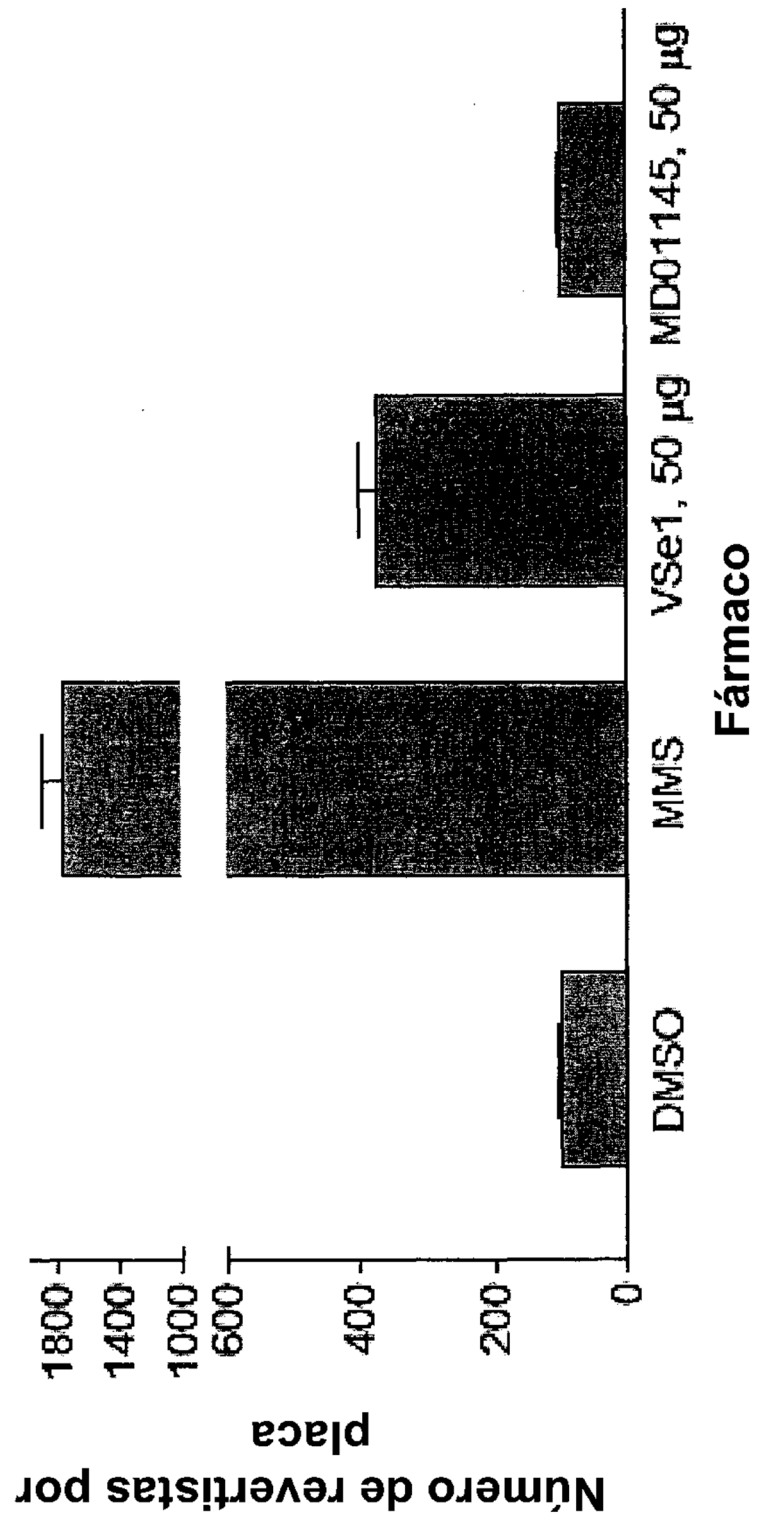


Figura 8A

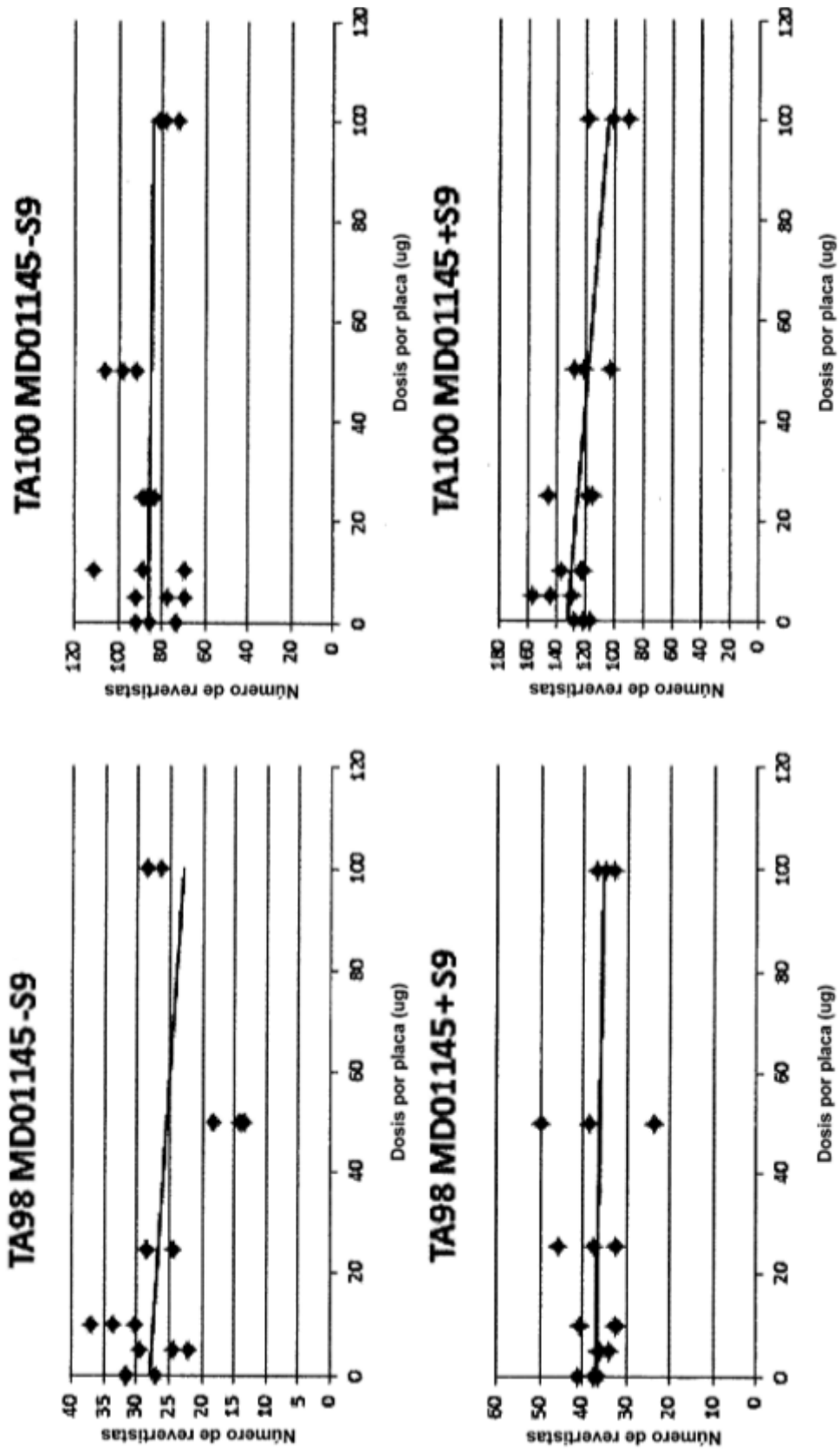


Figura 8B

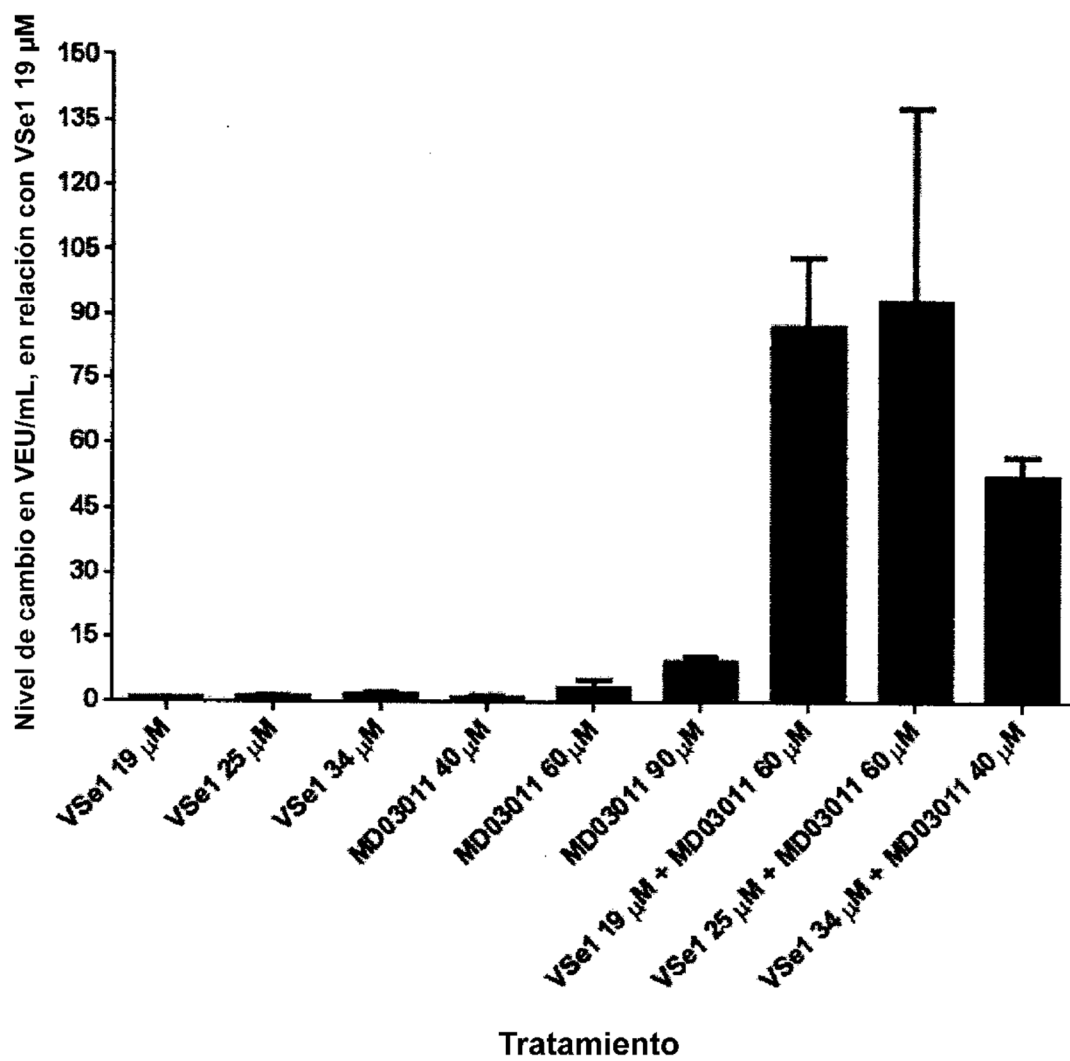


Figura 9

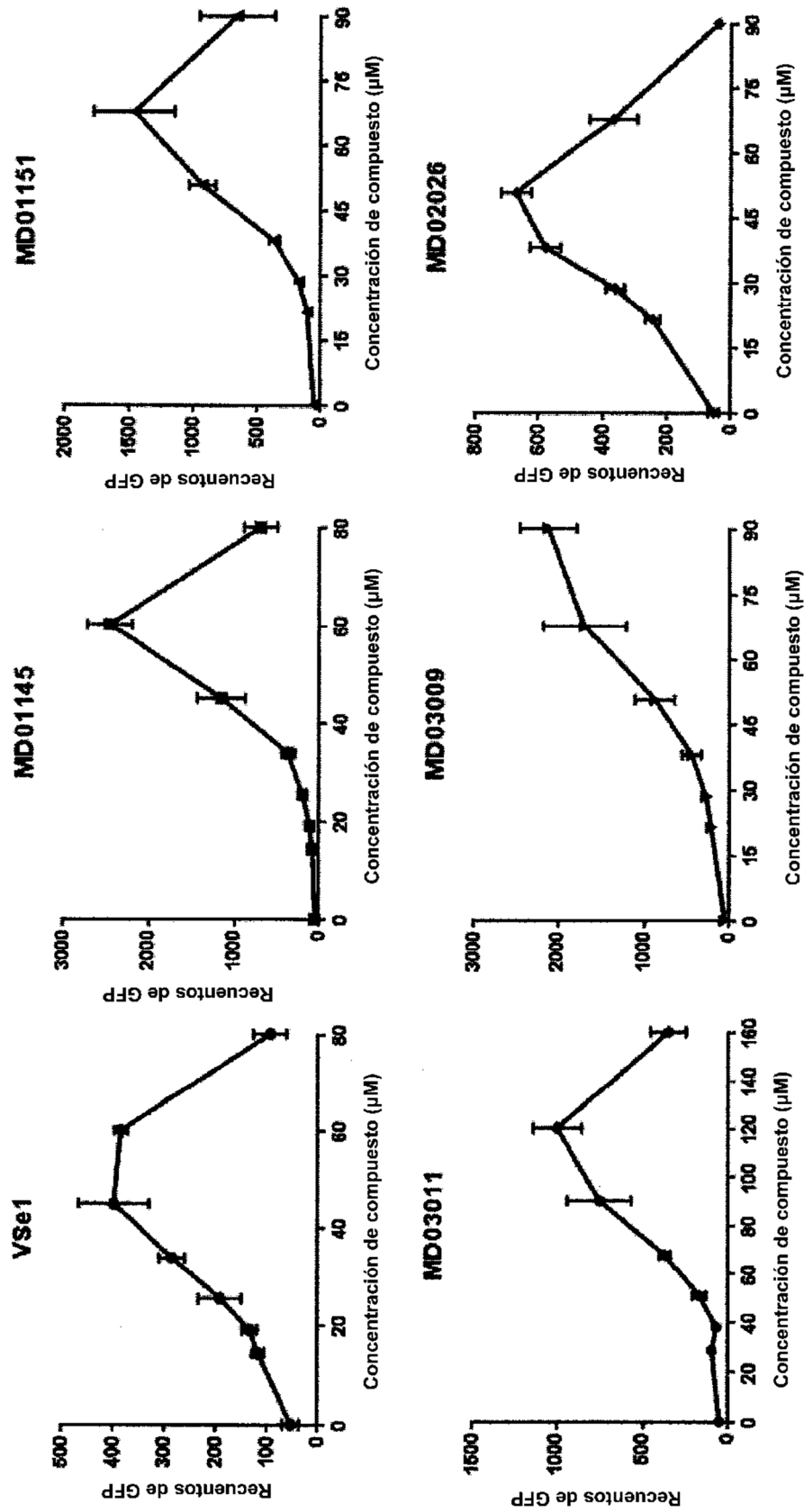


Figura 10

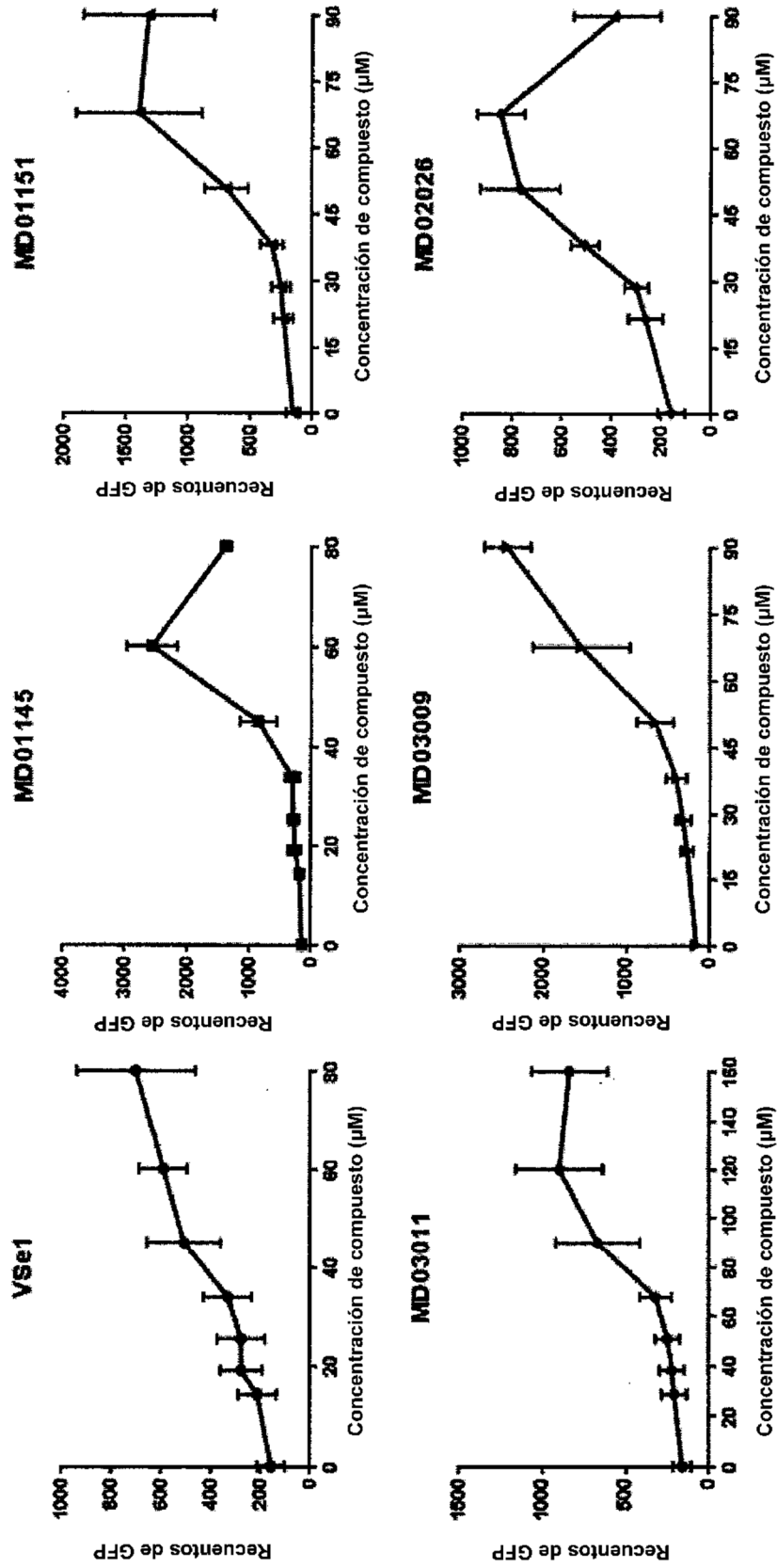


Figura 11

# Adeno-fluc en A549; Vse1/MD01151

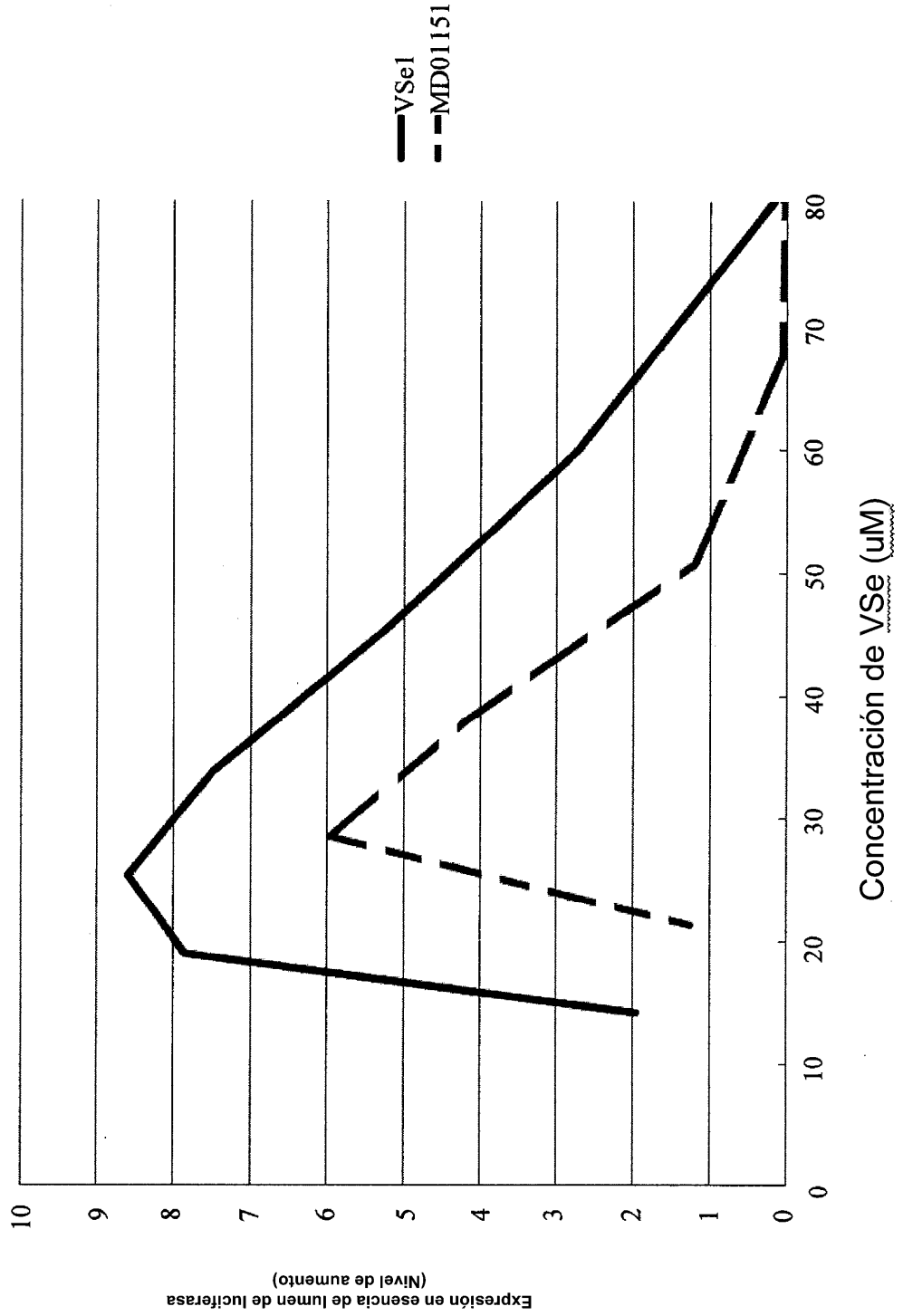


Figura 12

# Adeno-fLuc en A549; Vse1/MD03009

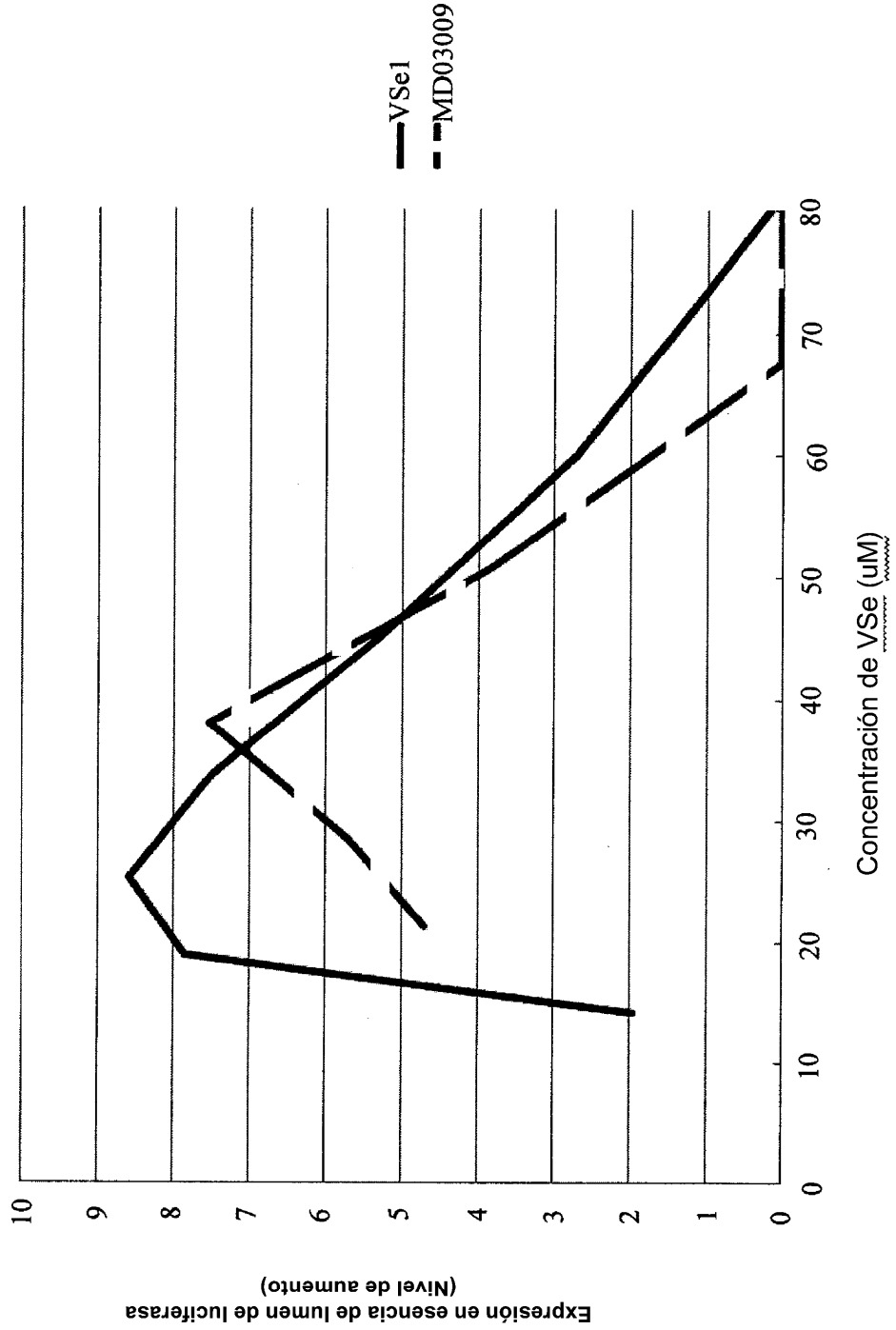


Figura 13

# Adeno-fluc en A549; Vse1/MD03011

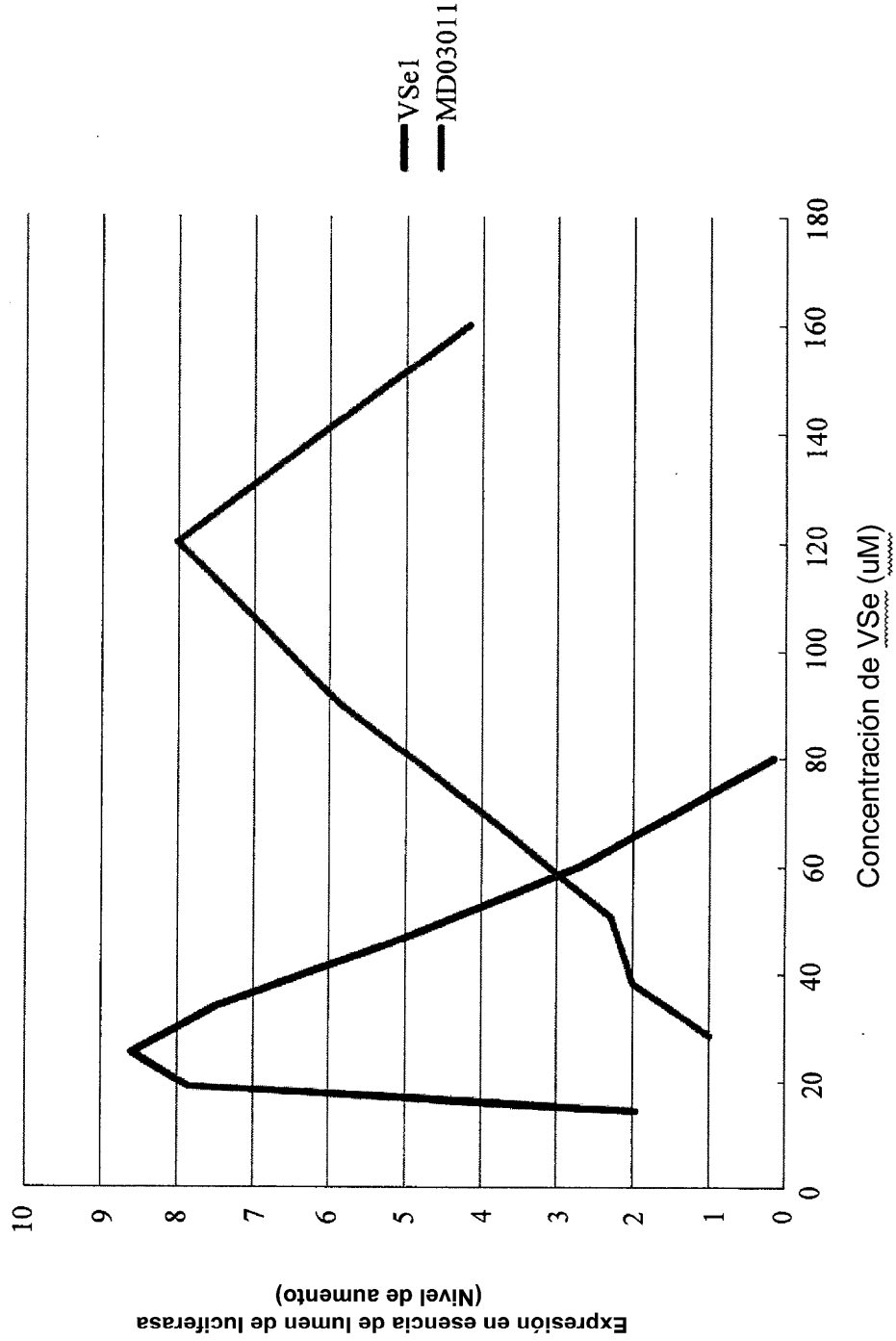


Figura 14

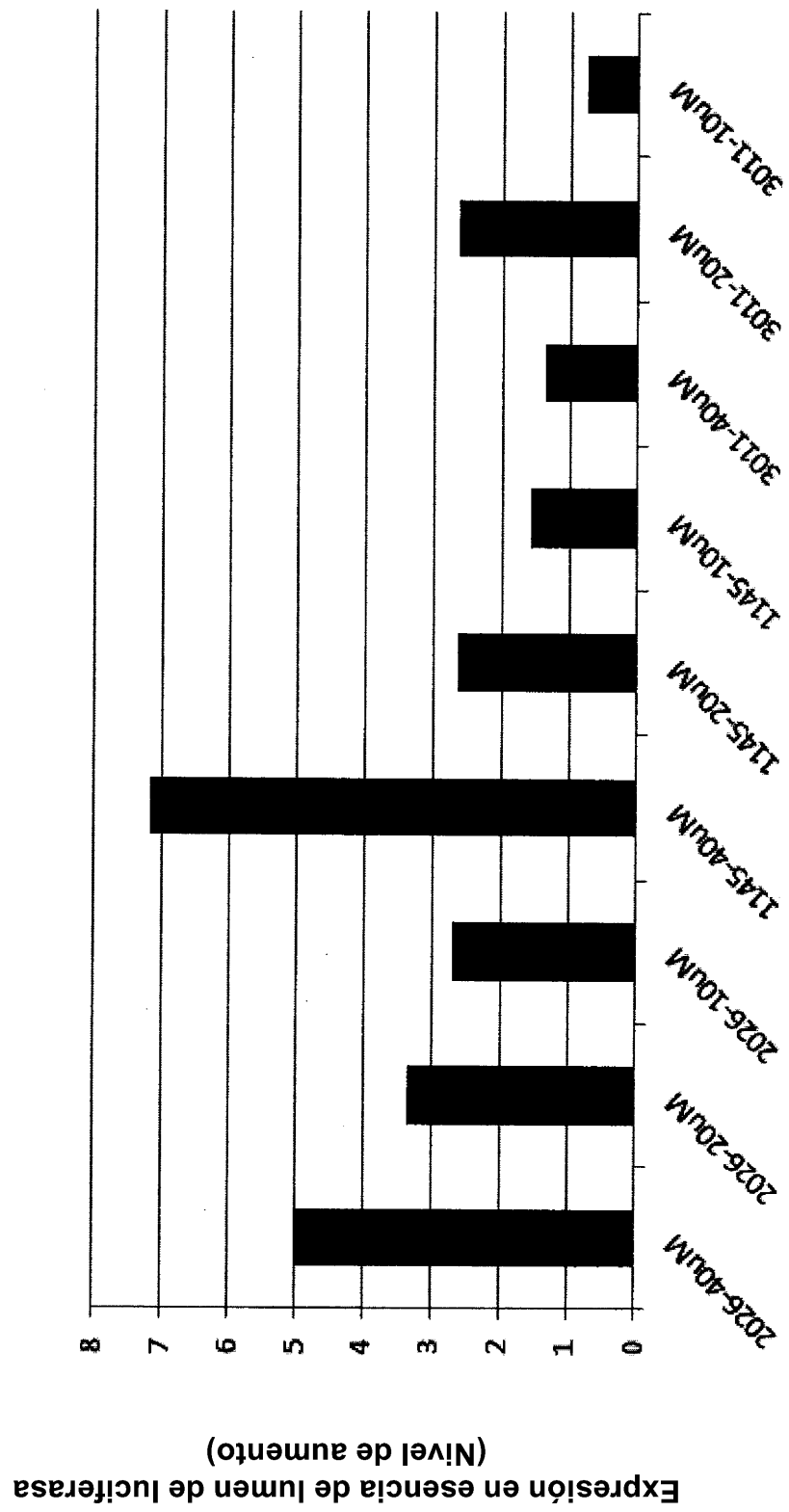


Figura 15

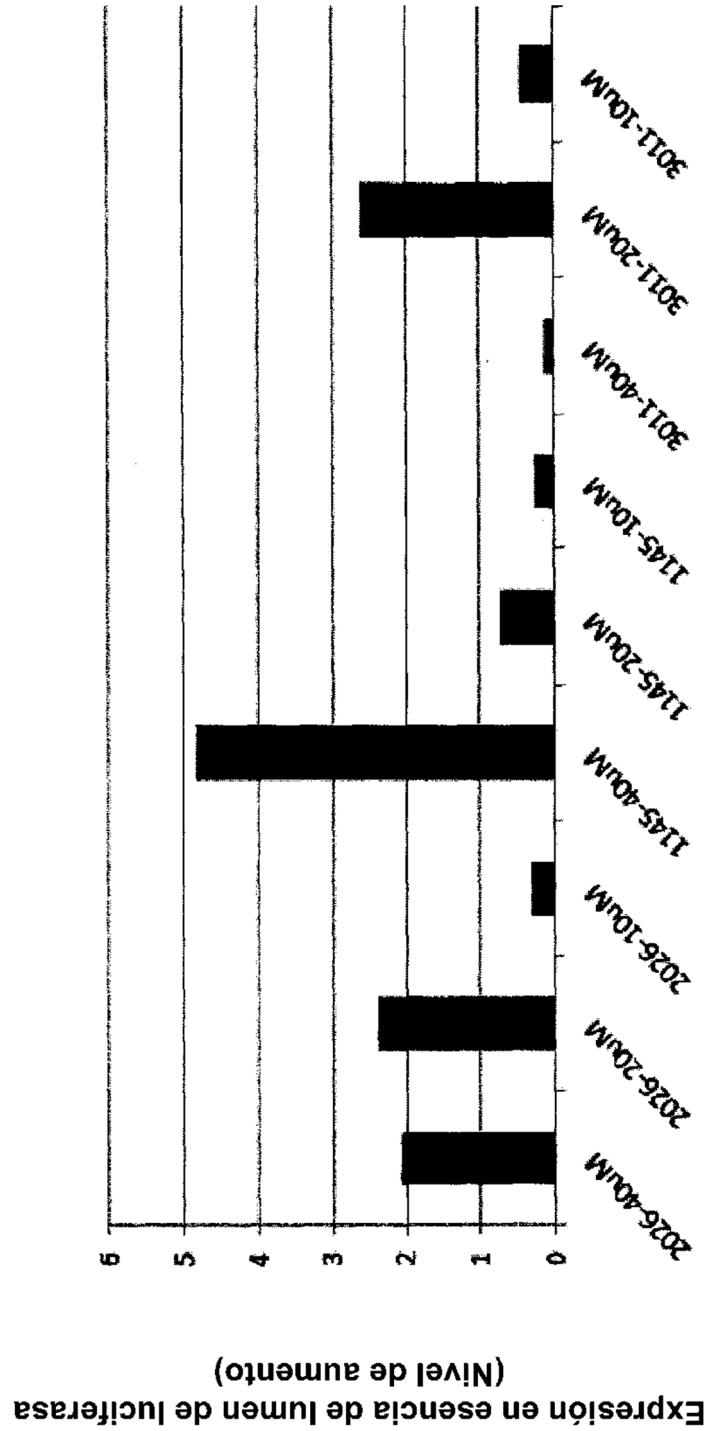
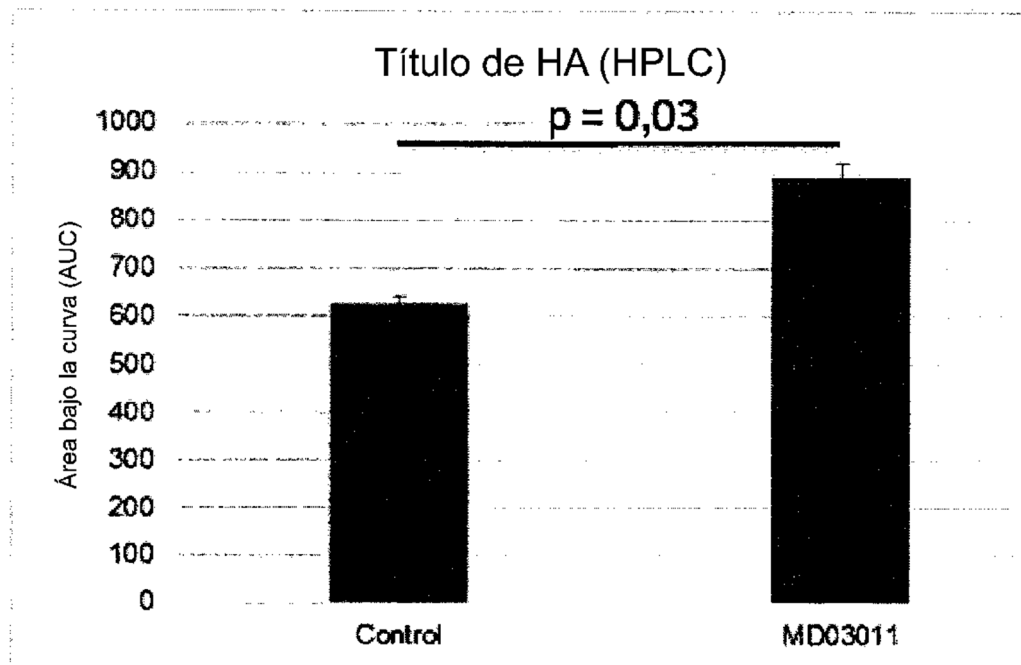
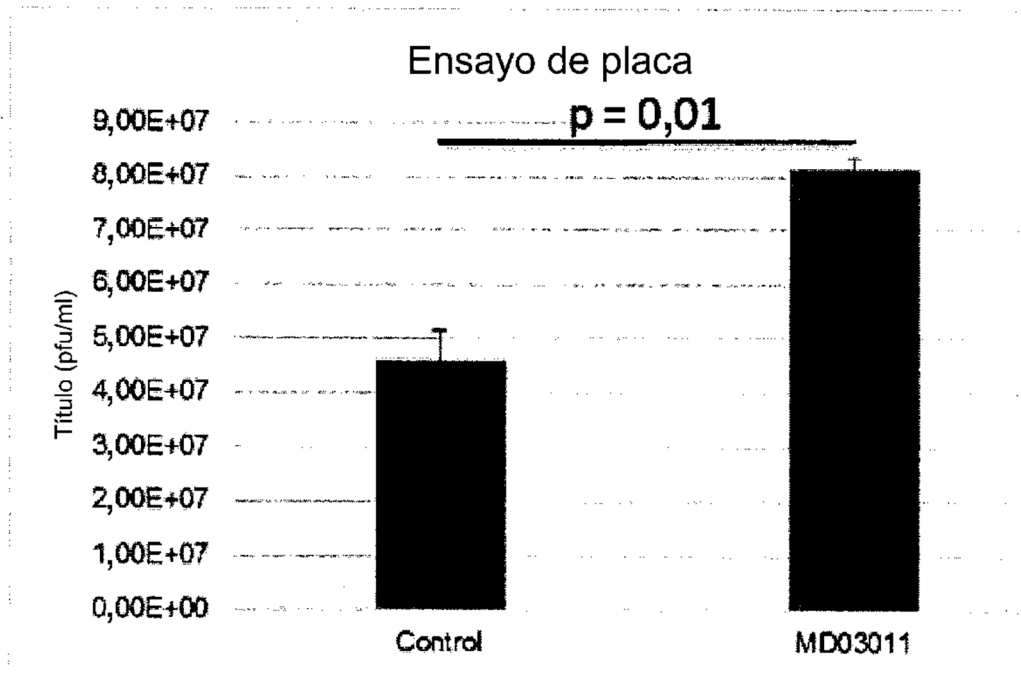


Figura 16

A



B

Figura 17A y Figura 17B