

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 930 046**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

A61K 35/763 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.02.2017 PCT/US2017/018539**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.08.2017 WO17143308**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2017 E 17754008 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2022 EP 3416680**

54 Título: **Composiciones y métodos de uso de inhibidores de STAT1/3 con virus del herpes oncolíticos**

30 Prioridad:

19.02.2016 US 201662297739 P

26.09.2016 US 201662399989 P

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

05.12.2022

73 Titular/es:

VIROGIN BIOTECH CANADA LTD (100.0%)

150-13511 Commerce Parkway

Richmond, BC V6V 2J8, CA

72 Inventor/es:

JIA, WILLIAM y

DELWAR, ZAHID

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 930 046 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 de uso de inhibidores de STAT1/3 con virus del herpes oncolíticos

Campo de la invención

5 Esta solicitud de patente se refiere en general a composiciones y al tratamiento del cáncer con HSV oncolíticos y un inhibidor de STAT1/3.

Antecedentes

10 Los virus oncolíticos (VO) han sido un arsenal terapéutico para destruir específicamente las células cancerosas a través de la oncolisis, que es un mecanismo de destrucción caracterizado por la lisis de las células cancerosas durante el transcurso de la replicación lítica del virus. Además de la destrucción celular directa por parte del virus, se ha demostrado que la respuesta inmunitaria inducida por el virus desempeña un papel fundamental en la terapia con VO. Dado que los VO pueden eliminar las células cancerosas a través de un mecanismo distinto de los efectos letales de la quimioterapia y la radioterapia convencionales, los VO son potencialmente ideales para tratar los cánceres que no responden al tratamiento convencional. Entre los diversos VO, los VO basados en el virus del herpes simple tipo 1 son los más avanzados, por ejemplo, la FDA de EE. UU. ha aprobado un VO basado en el virus del herpes (T-Vec) para el tratamiento del melanoma.

15 El virus oncolítico investigado con mayor frecuencia para tratar el cáncer, como el glioblastoma multiforme (GBM), es un HSV-1 mutante (virus del herpes simple tipo 1) con una delección γ 34.5. A pesar de un excelente perfil de seguridad, la eficacia clínica de muchos oHSV-1 ha sido decepcionante.

20 La presente invención supera las deficiencias de los virus oncolíticos comerciales actuales y además proporciona beneficios adicionales inesperados.

Wu, J., Feng, X., Zhang, B. et al., *J Neurooncol* 120, 33-41 (2014) describe el bloqueo de la interacción bFGF/STAT3 a través de rutas de señalización específicas que induce la apoptosis en células de glioblastoma.

25 R. Kanai et al., *Clinical Cancer Research*, vol. 17, n.º 11 (2011) describe un virus del herpes simple oncolítico que actúa de manera sinérgica con los inhibidores de la ruta de la fosfoinosítido 3-quinasa/Akt para seleccionar como objetivo las células madre de glioblastoma.

Christine A. King et al., *Journal of Virology*, vol. 89, n.º 22 (2015) describe STAT3 que regula la activación lítica del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi.

30 J.D. Jackson et al., *Molecular Cancer Research*, vol. 14, n.º 5 (2016) describe inhibidores de STAT1 y NF-Kb que disminuyen la expresión génica estimulada por interferón basal y mejoran la infección productiva de HSV oncolítico en células MPNST.

Resumen

La invención está definida por las reivindicaciones.

35 Dicho brevemente, la presente invención proporciona composiciones y métodos para tratar el cáncer. En ciertos aspectos, se proporcionan métodos que comprenden la administración simultánea o secuencial de un virus oncolítico y un inhibidor de STAT1/3. En algunos aspectos, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma), cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de próstata. En algunos aspectos, el virus oncolítico es el virus del herpes simple y, en ciertos aspectos, el HSV es HSV-1. En ciertos aspectos de la invención, el virus oncolítico es un HSV-1 con un gen defectuoso de la ribonucleasa reductasa viral y, opcionalmente, un gen ICP34.5 por lo demás intacto.

40 En algunos aspectos, todas las copias del gen ICP34.5 en el genoma del virus del herpes simple oncolítico se modifican de manera que el gen ICP34.5 es incapaz de expresar un producto funcional del gen ICP34.5. En otros aspectos, el gen ICP6 se modifica de manera que el gen ICP6 es incapaz de expresar un producto funcional del gen ICP6. En otros aspectos, el gen ICP47 se modifica de manera que el gen ICP47 es incapaz de expresar un producto funcional del gen ICP47. En algunos aspectos, el oHSV tiene modificaciones de los genes ICP34.5 e ICP47. En algunos aspectos, el virus del herpes simple oncolítico es un mutante de la cepa 17. En otros aspectos, el virus oncolítico es la cepa HrR3 del HSV-1. En algunos aspectos, el inhibidor de STAT1/3 es un nitrofurano; en ciertos aspectos, el nitrofurano es nifuroxazidas o un derivado o análogo de las mismas. En otros aspectos, el inhibidor de STAT1/3 es C16 o un derivado o análogo del mismo.

50 Las reivindicaciones también se refieren a composiciones farmacéuticas que comprenden un virus oncolítico y un inhibidor de STAT1/3. En algunos aspectos, el virus oncolítico es el virus del herpes simple y, en ciertos aspectos, el HSV es HSV-1. En ciertos aspectos de la invención, el virus oncolítico es un HSV-1 con un gen defectuoso de la ribonucleasa reductasa viral y, opcionalmente, un gen ICP34.5 por lo demás intacto. En algunos aspectos, todas las copias del gen ICP34.5 en el genoma del virus del herpes simple oncolítico se modifican de manera que el gen ICP34.5

es incapaz de expresar un producto funcional del gen ICP34.5. En otros aspectos, el gen ICP6 se modifica de manera que el gen ICP6 es incapaz de expresar un producto funcional del gen ICP6. En otros aspectos, el gen ICP47 se modifica de manera que el gen ICP47 es incapaz de expresar un producto funcional del gen ICP47. En algunos aspectos, el oHSV tiene modificaciones de los genes ICP34.5 e ICP47. En algunos aspectos, el virus del herpes simple oncolítico es un mutante de la cepa 17. En algunos aspectos, el inhibidor de STAT1/3 es un nitrofurano; en ciertos aspectos, el nitrofurano es nifuroxazidas o un derivado o análogo de las mismas. En otros aspectos, el inhibidor de STAT1/3 es C16 o un derivado o análogo del mismo.

Las reivindicaciones también se refieren a un kit que comprende una cantidad predeterminada de un virus oncolítico, que puede ser el virus del herpes simple, y una cantidad predeterminada de un agente terapéutico, en el que el agente terapéutico es un inhibidor de STAT1/3. En algunos aspectos, el virus oncolítico es el virus del herpes simple y, en ciertos aspectos, el HSV es HSV-1. En ciertos aspectos de la invención, el virus oncolítico es un HSV-1 con un gen defectuoso de la ribonucleasa reductasa viral y, opcionalmente, un gen ICP34.5 por lo demás intacto. En otros aspectos, todas las copias del gen ICP34.5 en el genoma del virus del herpes simple oncolítico se modifican de manera que el gen ICP34.5 es incapaz de expresar un producto funcional del gen ICP34.5. En otros aspectos, el gen ICP47 se modifica de manera que el gen ICP47 es incapaz de expresar un producto funcional del gen ICP47. En otros aspectos, el gen ICP6 se modifica de manera que el gen ICP6 es incapaz de expresar un producto funcional del gen ICP6. En algunos aspectos, el oHSV tiene modificaciones de los genes ICP34.5 e ICP47. En algunos aspectos, el virus del herpes simple oncolítico es un mutante de la cepa 17. En algunos aspectos, el inhibidor de STAT1/3 es un nitrofurano; en ciertos aspectos, el nitrofurano es nifuroxazidas o un derivado o análogo de las mismas. En otros aspectos, el inhibidor de STAT1/3 es C16 o un derivado o análogo del mismo.

La descripción establece que la combinación de un virus oncolítico y un inhibidor de la fosforilación de STAT1/3 es particularmente eficaz para prevenir, tratar y/o mejorar los efectos de un cáncer (p. ej., cáncer de mama, cáncer de cerebro (p. ej., glioblastoma), cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de próstata). En un aspecto, se proporciona un método para mejorar la eficacia de una viroterapia oncolítica, que comprende las etapas de (a) administrar un virus oncolítico a un sujeto; y (b) administrar un inhibidor de STAT1/3 en una cantidad que sea eficaz para reducir la inhibición de la replicación del virus oncolítico mediada por la microglía o los macrófagos. En algunos aspectos, el virus oncolítico y el inhibidor de STAT1/3 se administran juntos; en otros, el virus oncolítico y el inhibidor de STAT1/3 se administran en serie. En ciertos aspectos, el inhibidor de STAT1/3 es C16, las formas salinas del mismo, los profármacos del mismo o los derivados del mismo. En otros aspectos, el inhibidor de STAT1/3 es nitrofurano y, en aspectos específicos, el nitrofurano es nifuroxazida o un derivado o análogo de la misma.

La administración conjunta de un inhibidor de la fosforilación de STAT1/3 (como C16 y nifuroxazida), junto con un virus oncolítico, es eficaz para prevenir la inhibición de la actividad viral oncolítica por parte de los macrófagos y la microglía, lo que mejora la eficacia del virus oncolítico.

Además de las composiciones descritas en la presente memoria, se proporcionan varios métodos de uso de tales composiciones. Por ejemplo, se proporciona un método para mejorar la eficacia de una viroterapia oncolítica y un método para mejorar la actividad oncolítica en una célula cancerosa (y para prevenir la inhibición de la actividad viral oncolítica por parte de los macrófagos y la microglía en una célula cancerosa).

Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos.

Este breve resumen se ha proporcionado para introducir ciertos conceptos de forma simplificada que se describen con más detalle a continuación en la Descripción detallada. Salvo que se indique expresamente lo contrario, este breve resumen no pretende identificar las características clave o esenciales de la materia reivindicada, ni pretende limitar el alcance de la materia reivindicada.

Los detalles de uno o más aspectos se exponen en la descripción a continuación. Las características ilustradas o descritas en relación con un aspecto ejemplar pueden combinarse con las características de otros aspectos. Por lo tanto, cualquiera de los diversos aspectos descritos en la presente memoria puede combinarse para proporcionar otros aspectos. Los aspectos de los aspectos pueden modificarse, si es necesario, para emplear conceptos de las diversas patentes, solicitudes y publicaciones como se identifican en la presente memoria para proporcionar aún más aspectos. Otras características, objetos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción, los dibujos y las reivindicaciones.

Breve descripción del listado de secuencias

SEQ ID N°:1 Cebador directo de PCR para ICP4.

SEQ ID N°:2 Cebador inverso de PCR para ICP4.

SEQ ID N°:3 Cebador directo de PCR para ICP27.

SEQ ID N°:4 Cebador inverso de PCR para ICP27.

- SEQ ID N°:5 Cebador directo de PCR para β -actina.
 SEQ ID N°:6 Cebador inverso de PCR para β -actina.
 SEQ ID N°:7 Cebador directo de PCR para ICP8.
 SEQ ID N°:8 Cebador inverso de PCR para ICP8.
 5 SEQ ID N°:9 Cebador directo de PCR para GC.
 SEQ ID N°:10 Cebador inverso de PCR para GC.
 SEQ ID N°:11 Cebador directo de PCR para VP5.
 SEQ ID N°:12 Cebador inverso de PCR para VP5.
 SEQ ID N°:13 Cebador directo de PCR para ICP27.
 10 SEQ ID N°:14 Cebador inverso de PCR para ICP27.
 SEQ ID N°:15 Cebador directo de PCR para β -actina.
 SEQ ID N°:16 Cebador inverso de PCR para β -actina.

Breve descripción de los dibujos

15 Las características ejemplares de la presente descripción, su naturaleza y varias ventajas serán evidentes a partir de los dibujos adjuntos y la siguiente descripción detallada de varios aspectos. Los aspectos no limitantes y no exhaustivos se describen con referencia a los dibujos adjuntos, en los que las etiquetas o los números de referencia similares se refieren a partes similares en las diversas vistas a menos que se especifique lo contrario. Los tamaños y las posiciones relativas de los elementos en los dibujos no están necesariamente a escala. Por ejemplo, las formas de varios elementos se seleccionan, amplían y colocan para mejorar la legibilidad del dibujo. Las formas particulares de los elementos tal como están dibujados han sido seleccionadas para facilitar su reconocimiento en los dibujos. A
 20 continuación se describen uno o más aspectos con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

Las Figuras 1A-1B son gráficos que muestran un efecto antitumoral de la nifuroxazida. (Fig. 1A) Las células se trataron con la concentración indicada de nifuroxazida durante 72 horas. La citotoxicidad se midió usando el ensayo de MTT. (Fig. 1B) Por vía subcutánea, a ratones portadores de tumores U87 se les inyectaron por vía
 25 peritoneal las dosis indicadas de nifuroxazida. El tamaño del tumor se midió usando calibres en el día 7 después del tratamiento con nifuroxazida.

Las Figuras 2A-2B contienen gráficos que muestran el efecto de la nifuroxazida sobre la replicación de oHSV-1. (Fig. 2A) Las células indicadas se infectaron con virus HrR3 a una MOI de 0,1. Los virus se recogieron 48 horas después de la infección y se titularon en células Vero. Los datos se presentan como la D.E. media, * P <0,05 frente al tratamiento con el vehículo correspondiente. (Fig. 2B) Las células U87 o gliales se trataron con HrR3 a una MOI de 1 y la concentración indicada de nifuroxazida durante 48 horas. Se extrajo el ADN total y se sometió a qPCR para detectar el HSV-1 utilizando el cebador ICP27. En la figura se representó el aumento del % de oHSV-1 mediado por nifuroxazida.
 30

Las Figuras 3A-3B son gráficos que muestran el efecto de nifuroxazida y oHSV sobre la proliferación de las células tumorales. Las células U87 se trataron con las dosis indicadas de HrR3 y nifuroxazida. (Fig. 3A) La citotoxicidad se midió mediante un ensayo de MTT 72 horas después del tratamiento. (Fig. 3B) El índice de combinación (IC) se determinó utilizando el programa informático Calcsyn.
 35

Las Figuras 4A-4C muestran el efecto de la nifuroxazida sobre la expresión génica de HSV-1. (Fig. 4A) Se trataron células U87 con virus HrR3 a una MOI de 3 y las dosis indicadas de nifuroxazida. 24 horas después de la infección, se extrajo la proteína total y se sometió a análisis de transferencia de Western. (Fig. 4B) Se trataron células U87 con HrR3 a una MOI de 5 y la concentración indicada de nifuroxazida durante 6 horas. El nivel de ARNm de ICP27 se detectó mediante RT-qPCR. (Fig. 4C) Se muestra el nivel relativo de ARNm ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Los datos se presentan como la D.E. media, * P <0,05 frente al tratamiento con el vehículo correspondiente.
 40

Las Figuras 5A-5C representan el efecto de la nifuroxazida sobre la activación de STAT en células tumorales infectadas con oHSV-1. (Fig. 5A) Las células U87 se trataron con HrR3 a una MOI de 5 y la concentración indicada de nifuroxazida durante 6 horas. A continuación, la proteína extraída se sometió a un ensayo de transferencia de Western. (Fig. 5B) Las células U87 se trataron con la concentración indicada de HrR3 o nifuroxazida o Stattic o en combinación durante 72 horas. La citotoxicidad se midió mediante un ensayo de MTT. (Fig. 5C) Se muestra el nivel relativo de ARNm ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Los datos se presentan como la D.E. media, * P <0,05 frente al tratamiento con el vehículo correspondiente.
 45
 50

Las Figuras 6A y 6B muestran los resultados del aumento de la replicación de HrR3 dependiente de la dosis *in vivo* mediante nifuroxazida. A los ratones portadores de tumores U87 subcutáneos se les inyectó intratumoralmente una dosis única del virus HrR3 ($n = 2$; 1×10^6 UFP/ml) o se les inyectó peritonealmente la concentración indicada de nifuroxazida o ambos en combinación. Los tumores se recolectaron el día 10 después del tratamiento (Fig. 6A). Se extrajo el ADN genómico total de los tumores recolectados. Las partículas de ADN viral (ICP27) se detectaron mediante qPCR y se normalizaron respecto de β -actina. (Fig. 6B) Se determinó la expresión de ICP4 y STAT1 mediante un ensayo inmunohistoquímico en los tejidos tumorales recolectados. A continuación, se tomaron imágenes de los cortes teñidos mediante microscopía confocal.

Las Figuras 7A-7L muestran los resultados del tratamiento de células tumorales con nifuroxazida y oHSV-1. Las Fig. 7A-7C muestran la supervivencia celular para las células tumorales CT26, LL2 y U87 tratadas con nifuroxazida o HrR3 o KOS. Las Fig. 7D-7G muestran la supervivencia celular de células tumorales, U87, CT26, 4T1 y LL2, tratadas primero con nifuroxazida y luego con el virus HrR3. Las Fig. 7H-7K muestran los valores del índice de combinación (IC) para las células tumorales tratadas con dosis variables de nifuroxazida o los virus, HrR3 o KOS, o VG12TR, solos o en combinación. La Fig. 7L es una tabla que presenta el índice de reducción de la dosis para una combinación de nifuroxazida y virus HrR3.

La Figura 8 representa la estructura química de la nifuroxazida.

La Figura 9A es un gráfico de líneas que muestra el crecimiento de G207 en células U87, determinado mediante un ensayo de crecimiento de una sola etapa.

La Figura 9B es un gráfico de líneas que muestra el efecto citotóxico de G207, medido mediante el ensayo de proliferación de células MTT descrito en la presente memoria 3 días después de la infección en células U87.

La Figura 9C es un gráfico de barras que muestra el efecto de la microglía sobre el crecimiento de G207 en células U87 (5×10^4) solas o con diferentes cantidades de células de microglía primaria (MG) de rata (las células se infectaron con G207 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1).

La Figura 9D es un gráfico de barras que muestra los resultados de células U87 (5×10^4) solas o U87 (5×10^4) + cocultivo con MG (5×10^4) que se infectaron a una MOI = 1 con oHSV-1 hRr3 mutado en el gen ICP6, oHSV-1 b17-TK con eliminación de TK, o HSV-1 KOS de tipo natural (la eficacia de replicación del virus se determinó mediante un ensayo de crecimiento de virus de una sola etapa a los 4 días después de la infección (media \pm D.E.)).

La Figura 10A muestra los resultados histológicos de microglía primaria (MG) o células BV2 de rata que se infectaron con el virus G207 a una MOI de 3 o preparaciones simuladas (para detectar la expresión del gen indicador viral, las células se tiñeron para β -galactosidasa (flecha) después de 24 horas de infección).

La Figura 10B es un gráfico de barras que muestra los resultados de las células BV2 que se infectaron de manera simulada o con G207 a las MOI indicadas durante 24 horas, midiéndose luego la expresión de LacZ a 420 nm.

La Figura 10C muestra gráficos de líneas de los resultados de células de la microglía MG o BV2 que se infectaron con G207 a una MOI de 1 para examinar la capacidad de replicación de G207. Los virus se recogieron a las 24 horas, 48 horas y 72 horas después de la infección y luego se titularon en células Vero.

La Figura 11 es un gráfico de barras que muestra la expresión del gen oHSV-1 en células de la microglía. Se detectaron los niveles de ARNm de diferentes genes del virus G207 (ICP4, ICP27, ICP8, VP5 y GC) mediante RT-qPCR. Las proporciones del nivel relativo de ARNm ($2^{-\Delta\Delta CT}$) de las células BV2 y U87 infectadas con G207 (BV2/U87) se presentan en los gráficos de barras.

La Figura 12A contiene gráficos de barras que muestran los resultados de las células BV2 que se trataron previamente con los compuestos químicos indicados durante 1-2 horas y luego se infectaron con oHSV-1 a una MOI de 1. Los virus se recolectaron después de 48 horas del tratamiento con oHSV-1 (G207) y el inhibidor químico indicado.

La Figura 12B representa un gel de electroforesis que muestra las proteínas totales que se recolectaron de las células de la microglía infectadas con G207 24 horas después del tratamiento con 1 μ M de C16, 1 μ M de Bay11 o 100 μ M de AG. La expresión de ICP27, ICP4 y β -actina se midió mediante un ensayo de transferencia de Western. El cocultivo de U87 y MG se pretrató con 0,5 μ M de C16 durante 1 hora.

La Figura 12C representa un gel de electroforesis que muestra las proteínas totales que se recolectaron de las células de la microglía infectadas con HrR3 o KOS 24 horas después del tratamiento con 1 μ M de PKR-i (C16). La expresión de ICP27, ICP4 y β -actina se midió mediante un ensayo de transferencia de Western. El cocultivo de U87 y MG se pretrató con 0,5 μ M de C16 durante 1 hora.

La Figura 12D es un gráfico de barras que muestra el aumento de la replicación viral de G207 en un 33 % en cocultivos de glioma-microglía tratados con C16.

La Figura 12E es un gráfico de barras que muestra los resultados de las células BV2 que se pretrataron con los compuestos químicos indicados durante 1-2 horas y luego se infectaron con HrR3 o KOS a una MOI de 1. Los virus se recolectaron después de 48 horas del tratamiento con HrR3/KOS y el inhibidor químico indicado. Después de 48 horas de tratamiento con HrR3/KOS y C16, los virus se recogieron y se titularon mediante un ensayo de formación de placas en células Vero.

La Figura 12F es un gráfico de barras que muestra los resultados de las células BV2 que se trataron previamente con los compuestos químicos indicados durante 1-2 horas y luego se infectaron con oHSV-1 a una MOI de 1. Los virus se recolectaron después de 48 horas del tratamiento con oHSV-1 (G207) y el inhibidor químico indicado. Después de 48 horas de tratamiento con oHSV-1 (G207) y C16, los virus se recogieron y titularon mediante un ensayo de formación de placas en células Vero.

La Figura 13A representa un gel de electroforesis que muestra que C16 inhibe la fosforilación de STAT 1 y STAT 3. Las células BV2 se pretrataron con vehículo o C16 (1 μ M) durante 2 horas y luego se incubaron con vehículo u oHSV-1 (G207) a una MOI de 1 o una combinación de oHSV-1 y C16 durante 24 horas. Se recogió la proteína total y se sometió a un ensayo de transferencia de Western. Se usó la expresión de β -actina para el control de carga (medias \pm E.E.).

La Figura 13B es un gráfico de barras que resume los resultados de la Figura 5A.

La Figura 14A es un gráfico de barras que muestra que C16 desencadena la expresión de proteínas de oHSV-1 en la microglía/macrófagos y aumenta la concentración de virus en el glioblastoma *in vivo*. Se trataron ratones con xenoinjerto de U87 con vehículo o 5 mg/kg de C16 con o sin 6×10^6 UFP/ml de virus oHSV-1 (G207) (n=2). Se administraron en total dos dosis de G207 o vehículo y 4 dosis (cada 3 o 4 días) de C16. Los tumores se recogieron el día 13 después del tratamiento. Se extrajo el ADN genómico total de los tumores recolectados (n = 2) y se midió el ADN viral (ICP27) mediante qPCR (normalizado respecto de β -actina). Los datos que se muestran son el valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$ relativo \pm E.E.

La Figura 14B muestra la inmunotinción de macrófagos infiltrados (f4/80) y HSV-1 replicables en tumores U87 de ratones.

Figura 15A: Gráfico de líneas que muestra el volumen tumoral de ratones con xenoinjerto de U87 que se trataron con vehículo o 5 mg/kg de C16 con o sin una dosis única de 1×10^8 UFP/ml de virus oHSV-1 (HrR3) (n=5). Se inyectaron múltiples dosis de vehículo o C16 por vía intraperitoneal (IP) en días alternos. La designación (*) representa una regresión tumoral significativa ($P \leq 0,05$) mediante la combinación de oHSV-1 y C16 frente al tratamiento con vehículo o con C16 individual o con oHSV-1 individual (\pm E.E.).

La Figura 15B es un gráfico de barras que muestra el ADN genómico total que se extrajo de los órganos recolectados (n=3). El ADN viral (ICP27) se midió mediante qPCR (normalizado respecto de β -actina). Los datos que se muestran son valores de $2^{-\Delta\Delta CT}$ relativos \pm E.E.

La Figura 15C es un gráfico de líneas que muestra un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de los ratones-sujetos de los Ejemplos resumidos en las Figuras 7A y 7B.

La Figura 16 presenta datos que muestran que el tratamiento con C16 inhibe la activación de STAT1/3 inducida por LPS. Se trataron células BV2 con vehículo o Lps (1 μ g/ml) o Lps (1 μ g/ml) con C16 (1 μ M) durante 24 horas. Se recogió la proteína total y se sometió a un ensayo de transferencia de Western. La expresión de β -actina se usó para el control de carga (medias \pm E.E.).

La Figura 17 presenta datos que muestran el efecto de inhibición de la fosforilación de eIF2 α de C16 en diferentes tipos de células infectadas con oHSV-1. Las células indicadas se pretrataron con vehículo o C16 1 μ M durante 2 horas antes de la infección con G207 a una MOI de 1. La proteína total se extrajo 24 horas después del tratamiento y se sometió a análisis de transferencia de Western.

La Figura 18 presenta datos que muestran el efecto de C16 sobre la replicación de G207 en diferentes tipos de células. Las células indicadas se pretrataron con vehículo o C16 1 μ M durante 2 horas antes de la infección con oHSV-1 (G207) a una MOI de 1. La proteína total se extrajo a las 24 horas.

Las Figuras 19A-C muestran la inhibición de STAT mediante la combinación de NF y oHSV-1. Fig. 19A y Fig. 19B, se trataron células U87 (A) o células CT26 (B) con las concentraciones indicadas de HrR3 o NF o una combinación. La proteína total se extrajo después de 24 horas y se sometió a análisis de transferencia de Western. Se midió la intensidad de las bandas usando el programa informático Image J y se normalizó respecto de β -actina. Las muestras se analizaron por triplicado y los datos son las medias \pm E.E. Las diferencias estadísticamente significativas se indican mediante $P < 0,05$ o $P < 0,01$. Fig. 19C, se inyectó intratumoralmente a ratones que portaban tumores U87 por vía subcutánea una dosis única de virus HrR3 (1×10^6 UFP) y/o dosis de NF inyectadas por vía peritoneal como se indica. Los tumores se recogieron el día 10 después del tratamiento y se extrajo la proteína total de un ratón de cada grupo de tratamiento y se sometió a análisis de transferencia de Western por triplicado. Los resultados se informan como las medias \pm E.E.

La Figura 20 muestra el efecto antitumoral mejorado de la combinación de NF y oHSV-1 *in vivo*. Se trataron ratones BALB/C con tumor CT26 (cáncer de colon) con una dosis única del virus HrR3 (oHSV-1) (2×10^7 UFP) o vehículo y se les administraron inyecciones peritoneales diarias de 50 mg/kg de NF solo o en combinación con el virus HrR3 (5 ratones en cada grupo). Los tamaños de los tumores se midieron usando calibres (longitud X altura X anchura/2). Los datos son las medias \pm E.E. y las diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con la combinación de NF y oHSV-1, NF solo y oHSV-1 solo se indican mediante el valor de p, * P <0,05.

Las Figuras 21A-B demuestran la seguridad de la combinación de NF y oHSV-1 *in vivo*. Fig. 21A, se extrajo el ADN genómico total de los tumores recolectados y de otros órganos (n=2). El ADN viral (ICP27) se detectó mediante qPCR y se normalizó respecto de β -actina. Las muestras se analizaron por cuadruplicado y los datos son los promedios de 2 ratones \pm E.E. Fig. 21B, ratones BALB/C con tumor CT26 (cáncer de colon) que se trataron con NF o HrR3 solos o en combinación como se describe en el material y método. El peso corporal se midió usando una escala de medición y el peso del tumor se calculó a partir del volumen del tumor ($1 \text{ mm}^3 = 1 \text{ g}$). El peso corporal neto se obtuvo restando el peso del tumor del peso corporal. Los datos representan la media del peso corporal neto de tres ratones seleccionados al azar de cada grupo \pm E.E.

Descripción detallada

La presente invención puede entenderse más fácilmente con referencia a la siguiente descripción detallada de los aspectos preferidos de la invención y los ejemplos incluidos en la presente memoria.

La presente descripción proporciona métodos, composiciones y kits para administrar tanto un HSV oncolítico (oHSV) como un inhibidor de la fosforilación de STAT1/3, como un nitrofurano o C16 o análogos o derivados del mismo, a células cancerosas, típicamente *in vivo* a un sujeto que necesita tratamiento contra el cáncer. El término "cáncer", como se usa en la presente memoria, se refiere a un cáncer de cualquier tipo y origen, incluidas las células formadoras de tumores, los cánceres hematológicos y las células transformadas. El término "célula cancerosa", como se usa en la presente memoria, incluye las células cancerosas o formadoras de tumores, las células transformadas o una célula que es susceptible de convertirse en una célula cancerosa o formadora de tumores. Las formas representativas de cáncer incluyen carcinomas, sarcomas, mielomas, leucemias, linfomas y tipos mixtos de los anteriores. Otros ejemplos incluyen los discutidos con más detalle a continuación.

La administración de oHSV y un inhibidor de la fosforilación de STAT1/3 produce más muerte de células tumorales que la administración de oHSV o un inhibidor de la fosforilación de STAT1/3 solos. Además, el tratamiento combinado es sinérgico, lo que permite dosis más pequeñas tanto del inhibidor como del virus. Las dosis más pequeñas confieren muchas ventajas, como la disminución de la morbilidad asociada con cada agente y la disminución de costes.

A. Inhibidores de la fosforilación de STAT1/3

Las proteínas transductor de señales y activador de la transcripción (STAT) son una familia de factores de transcripción citoplasmáticos que constan de 7 miembros, incluidos STAT1 y STAT3. Desempeñan un papel crucial en la regulación de una serie de funciones biológicas diversas, incluida la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la respuesta inflamatoria, la inmunidad y la angiogénesis. STAT1/3 regula diversas funciones biológicas, incluido el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. Además, STAT1/3 juega un papel clave en la regulación de las respuestas inmunitarias e inflamatorias del huésped y en la patogénesis de muchos tipos de cáncer. La vía de señalización de STAT1/3 se activa constitutivamente en muchos cánceres y ha sido el objetivo del desarrollo de inhibidores de STAT1/3 para tratar cánceres.

En general, las STAT son activadas por tirosina quinasas, incluidas tirosina quinasas asociadas a receptores (p. ej., las quinasas Janus (JAK)), por receptores con actividad intrínseca de tirosina quinasa (p. ej., PDGFR, EGFR, FLT3) y proteínas tirosina quinasas no receptoras (PTK) (p. ej., c-Src Bcr-Abl y Brk (quinasa de tumor de mama)).

Se conocen muchos inhibidores de STAT1/3 diferentes. Se pueden encontrar ejemplos de inhibidores, por ejemplo, en Furqan et al. (J of Hemat. & Oncology, 6:90, 2013). Una variedad de fuentes comerciales venden inhibidores de STAT1/3 (p. ej., R&D Systems, MN, EE. UU.; InvivoGen, CA, EE. UU.). Se pueden identificar inhibidores adicionales usando varios ensayos (p. ej., Szlag et al., PLOSONe, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116688>).

Los ejemplos de dos inhibidores de STAT1/3 particulares que son útiles en las composiciones descritas en la presente memoria son nifuroxazida y C16.

1. Nitrofuranos

Los nitrofuranos son una clase de fármacos caracterizados por tener un anillo de furano y un grupo nitro. Esta clase de medicamentos incluye una amplia variedad de medicamentos antibacterianos (por ejemplo, Difurazona, Furazolidona, Nifurfolina, Nifuroxazida, Nifurquinazol, Nifurtinol, Nifurzida, Nitrofurantol (también conocido como nitrofurazona), Nitrofurantoína y Ranbezolid) y medicamentos antimicrobianos (por ejemplo, Furalfadona, Furazidina, furilfuramida, nifuratel y nifurtimox).

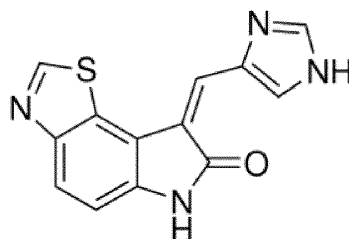
Un fármaco especialmente adecuado para su uso en la presente invención es la nifuroxazida (ácido benzoico, 4-hidroxi-, [(5-nitro-2-furanil)metilén]hidrazida, CAS 965-52-6, Fig. 7), que a menudo se usa como antibiótico oral y se ha usado para tratar la colitis y la diarrea en humanos y animales no humanos.

5 Se ha informado que la nifuroxazida es un potente inhibidor de la vía de señalización de STAT1/3. Como se demuestra en los Ejemplos, la nifuroxazida es activa frente a las células tumorales *in vitro* e *in vivo*, además de potenciar la eficacia de replicación del oHSV en las células tumorales. La nifuroxazida está disponible comercialmente a través de varios proveedores.

10 También se pueden utilizar derivados y análogos de nifuroxazida. Los derivados incluyen compuestos heterocíclicos, como la nifuroxazida 5-nitro-heterocíclica. Los análogos incluyen sustituciones del grupo nitrofurano, p. ej., por benzofuroxano y sus derivados que tienen diferentes sustituciones en el anillo de bencilo (Fraias et al. BMC Cancer 15:807, 2015), ácidos benzoicos sustituidos (Tavares et al. Boll Chim Farm 136:244, 1997; Masunari y Tavales, Bioorganic & Med Chem 15:4229, 2007). Además, pueden usarse varias formas salinas y profármacos.

2. C16 y análogos y derivados

15 C16 es un fármaco que actúa como inhibidor selectivo de la enzima proteína quinasa dependiente de ARN bicatenario (PKR) y también inhibe la fosforilación de STAT 1/3. C16 también se conoce como PKRi. C16 es un derivado de imidazol-oxindol que tiene una fórmula química de 6,8-dihidro-8-(1H-imidazol-5-ilmetilén)-7H-pirrol[2,3-g]benzotiazol-7-ona. La estructura química de C16 se muestra a continuación. Dentro del contexto de la descripción, C16 también incluye formas salinas, profármacos y derivados de los mismos.



20 B. Virus oncolítico

Un virus oncolítico es un virus que lisará las células cancerosas (oncólisis), preferiblemente de forma selectiva. El término "oncolítico", como se usa en la presente memoria, se refiere a un virus de replicación selectivo de tumores, tal como un herpesvirus humano, que induce la muerte celular en la célula y/o el tejido canceroso infectado. Aunque pueden infectarse células normales o no tumorales, las células cancerosas se infectan y experimentan selectivamente la muerte celular, en comparación con las células normales o no cancerosas de un sujeto. "Muerte celular", como se usa en la presente memoria, incluye todas las formas de muerte celular, incluidas, por ejemplo, la lisis celular y/o la apoptosis. Los virus que se replican selectivamente en las células en división en contraposición a las células que no se dividen, a menudo son oncolíticos. Los virus oncolíticos adecuados para el uso en la presente memoria incluyen el virus del herpes simple, adenovirus, coxsackie, virus del sarampión, virus de la enfermedad de Newcastle, parvovirus, poliovirus, reovirus, virus de Seneca Valley, retrovirus, virus vaccinia, tanapoxvirus, virus de la estomatitis vesicular, virus del mixoma y virus de la gripe A.

35 Los virus oncolíticos adecuados para las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender virus de tipo natural, virus replicantes y derivados competentes de replicación modificados de los mismos y virus no replicantes, virus armados con CPG, así como virus o vectores relacionados basados en dichos virus o derivados. Generalmente, se utilizarán virus competentes para la replicación, de modo que el tratamiento de un sujeto pueda lograrse eliminando las células cancerosas, es decir, las células cancerosas son eliminadas por la actividad oncolítica y citotóxica del virus oncolítico. El virus oncolítico incluido en las composiciones y utilizado en los métodos descritos en la presente memoria puede constituir las formas activas de tales virus o, alternativamente, vectores virales que están configurados para codificar y producir el virus oncolítico deseado en una célula cancerosa objetivo. El término "vector viral", como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula de ácido nucleico que se usa como vehículo para administrar una o más moléculas de ácido nucleico en una célula para permitir la recombinación. El vector viral puede ser una construcción de plásmido que codifica y se usa para generar un virus oncolítico (como un virus del herpes humano) en una célula cancerosa, o puede ser un genoma de virus oncolítico (por ejemplo, un genoma del virus del herpes humano no recombinante).

45 Los virus del herpes simple (HSV) 1 y 2 son miembros de la familia Herpesviridae, que infectan a los humanos. El genoma del HSV contiene dos regiones únicas, que se designan regiones únicas largas (UL) y únicas cortas (US). Cada una de estas regiones está flanqueada por un par de secuencias de repeticiones terminales invertidas. Hay alrededor de 75 marcos de lectura abiertos conocidos. El genoma viral se ha diseñado para desarrollar virus oncolíticos para su uso, p. ej., en la terapia del cáncer. La replicación selectiva de tumores del HSV es conferida por la mutación del gen ICP34.5 (también llamado γ 34.5) del HSV. El HSV contiene dos copias de ICP34.5. Se sabe que los mutantes que inactivan una o ambas copias del gen ICP34.5 carecen de neurovirulencia, es decir, son avirulentos/no

neurovirulentos y son oncolíticos.

5 En algunos aspectos, el oHSV tiene uno o ambos genes γ 34.5 modificados de manera que es incapaz de expresar una proteína ICP34.5 funcional. Los genes pueden modificarse por la mutación de uno o más nucleótidos, inserciones, deleciones, sustituciones, etc. La alteración puede estar en la secuencia codificante, en la secuencia no codificante (p. ej., en un promotor) o en ambas. En algunos aspectos, ambas copias de los genes γ 34.5 están mutadas.

10 El oHSV puede tener mutaciones adicionales, que pueden incluir mutaciones incapacitantes, por ejemplo, deleciones, sustituciones, inserciones, que pueden afectar a la virulencia del virus o su capacidad de replicarse. Por ejemplo, se pueden realizar mutaciones en cualquiera o más de ICP6, ICPO, ICP4, ICP27, ICP47, ICP 24, ICP56. Preferiblemente, una mutación en uno de estos genes (opcionalmente en ambas copias del gen cuando corresponda) conduce a una incapacidad (o reducción de la capacidad) del HSV de expresar el polipéptido funcional correspondiente. En algunos aspectos, el promotor de un gen viral puede sustituirse por un promotor que sea selectivamente activo o inducible en células objetivo.

15 El oHSV también puede tener genes y secuencias de nucleótidos que no tienen como origen el HSV. Por ejemplo, el oHSV puede comprender una secuencia que codifica un profármaco, una secuencia que codifica una citocina u otro factor inmunoestimulante, un promotor específico de tumores, un promotor inducible, un potenciador, una secuencia homóloga a una célula huésped, entre otros.

20 El HSV oncolítico adecuado puede derivar de HSV-1 o HSV-2, incluida cualquier cepa de laboratorio o aislado clínico. En algunos aspectos, el oHSV puede ser o puede derivar de una cepa de laboratorio, como la cepa 17 de HSV-1, la cepa F de HSV-1 o la cepa HG52 de HSV-2. En otros aspectos, puede ser o derivar de la cepa JS-1 que no es de laboratorio. Los vectores de HSV adecuados incluyen los enseñados en los documentos US 7.223.593, US 7.537.924, US 7.063.835, US 7.063.851, US 7.118.755, US 8.277.818, y US 8.680.068. Otros virus HSV-1 adecuados se encuentran en la siguiente tabla. En ciertos aspectos de la invención, el virus oncolítico es un HSV-1 con un gen defectuoso de la ribonucleasa reductasa viral y, opcionalmente, un gen ICP34.5 por lo demás intacto. Los mutantes de HSV-1 particularmente preferidos a este respecto incluyen hrR3 (véase Kulu et al, Cancer Gene Therapy (2009) 25 16, 291-297; doi:10.1038/cgt.2008.83; publicado en línea el 7 de noviembre de 2008; véase también Goldstein DJ, Weller SK. Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant. J Virol 1988; 62: 196-205).

Se conocen en la técnica varios virus oncolíticos. Los ejemplos incluyen:

Virus	Nombre	Referencias
HSV-1	HrR3	[1]
	G2O7	[2, 3]
	G47Delta	[4]
	HSV 1716	[5, 6]
	HF10	[7]
	NV1020	[8]
	T-VEC	[9]
	J100	[10]
	M002	[11]
	NV1042	[12]
	G2O7-IL2	[13]
	rQNestin34.5	[14]
	G47 Δ -mIL-18	[15]
Adenovirus	H101	[16]
	Onix-015	[17]
	CV706	[18]
	CG0070	[19]
	Telomelisina	[20]
	Ad5-CD/TKrep	[21]

Virus	Nombre	Referencias
	Ad5-D24-RGD	[22]
	CGTG-102	[23]
	INGN-007	[24]
	ColoAd1	[25]
	CG787	[26]
	H103	[27]
Coxsackie	CAVATAK	[28]
Virus del sarampión	MV-CEA	[29]
	MV-NIS	[30]
	MV-aPD-L1	[31]
	MV-aCTLA-4	[31]
	MV GM-CSF	[32]
Virus de la enfermedad de Newcastle	NDV-HUJ	[33]
	PV701	[34]
	MTH-68/H	[35]
	rNDV/F3aa-GM-CSF	[36]
	rNDV/F3aa-IFN- γ	[36]
	rNDV/F3aa-TNF- α	[36]
	rNDV-IL2	[37]
rNDV/F3aa-IL-2	[36]	
Parvovirus	H-1PV	[38]
Poliovirus	PVS-RIPO	[39]
Reovirus	Reolisina	[40]
Virus de Seneca Valley	NTX-010	[41]
Retrovirus	Toca 511	[42]
Vaccinia	JX-594	[43]
	Dryvax	[44]
	JX-795	[45]
	VVL Δ TK-IL10	[46]
	rV-4-1BBL	[47]
	wCCL19	[48]
	OVV-CXCR4-A-Fc	[49]
	wDD-CDSR	[50]
GL-ONC1	[51]	
Tanapoxvirus	TPV/ Δ 66R/fliC	[52]
	TPV/ Δ 66R/mMCP-1	[52]
Virus de la estomatitis vesicular	rVSV-IL12	[53]
	opt.hIL-15	[54]
	rrVSV	[55]

Virus	Nombre	Referencias
Virus del mixoma	vMyx-GFP	[56]
	vMyx-IL15Ra-tdTr	[57]
Virus de la gripe A	deINS1-IL-15	[58]

C. Composiciones terapéuticas

Se proporcionan composiciones terapéuticas que pueden usarse para prevenir, tratar o mejorar los efectos de un cáncer. Más particularmente, algunas composiciones terapéuticas comprenden un virus oncolítico como se describe en la presente memoria. En los aspectos preferidos, la composición terapéutica puede comprender un virus oncolítico como se describe en la presente memoria. En los aspectos preferidos, la composición terapéutica puede comprender un virus oncolítico y un inhibidor de la fosforilación de STAT 1/3 (como C16 o un nitrofurano) o un inhibidor de PKR (p. ej., C16) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La combinación de un virus oncolítico con un inhibidor de la fosforilación de STAT 1/3 (como C16, un análogo o derivado, o un nitrofurano) o un inhibidor de PKR (p. ej., C16 o un análogo o derivado) es particularmente eficaz para prevenir, tratar y/o mejorar los efectos del cáncer. Más específicamente, y como se demuestra en los ejemplos a continuación, la invención establece que la administración conjunta de un inhibidor de la fosforilación de STAT 1/3 (como C16 y un nitrofurano) junto con un virus oncolítico es eficaz para prevenir la inhibición por los macrófagos y la microglía de la actividad viral oncolítica, mejorando así la eficacia del virus oncolítico coadministrado. El virus oncolítico puede ser cualquiera de una variedad de virus oncolíticos, incluidos los descritos anteriormente, y con frecuencia será un virus del herpes simple I (oHSV-1) descrito en la presente memoria.

En ciertos aspectos, las composiciones comprenderán además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende abarcar cualquier vehículo, diluyente o excipiente que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del virus oncolítico y que no sea tóxico para el sujeto al que se administra (véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21ª edición (1 de mayo de 2005 y en The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 40 - NF 35 y suplementos).

En el caso de un virus oncolítico (o vectores virales que codifican el mismo), los ejemplos no limitantes de los vehículos farmacéuticos adecuados incluyen disoluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones (como emulsiones de aceite/agua), diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, y otras. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen geles, materiales de matriz bioabsorbibles, elementos de implantación que contienen el virus oncolítico o cualquier otro vehículo, medio o material de administración o distribución adecuado. Dichos vehículos se pueden formular mediante métodos convencionales y se pueden administrar al sujeto en una dosis eficaz. Los excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico y etanol. También se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales (tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares) y las sales de ácidos orgánicos (tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares). Dichos vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables (de grado farmacéutico) que pueden usarse para administrar el inhibidor de STAT1/3 a una célula cancerosa objetivo preferiblemente no inducirán una respuesta inmunitaria en el individuo (sujeto) que recibe la composición (y preferiblemente se administrarán sin una toxicidad indebida).

En el caso de C16 o nitrofurano (ambos una molécula pequeña), los ejemplos no limitantes de vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados pueden incluir vehículos, diluyentes y adyuvantes, tales como solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, de pH aproximadamente 7,4; solución salina al 0,9 % (0,9 % p/v de NaCl); y dextrosa al 5% (p/v).

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria se pueden proporcionar en una variedad de concentraciones. Por ejemplo, se pueden proporcionar dosis del virus oncolítico que oscilan de una dosis mayor de aproximadamente 10^9 unidades formadoras de placas ("ufp"), de entre aproximadamente 10^2 a más de 10^9 ufp, entre aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^7 ufp, entre aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^6 ufp, o entre aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^5 ufp. En ciertos aspectos (y utilizando el HSV oncolítico como ejemplo), las formas farmacéuticas para humanos pueden oscilar entre aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 ufp. En otros aspectos, la forma farmacéutica puede oscilar entre aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 ufp/ml, inyectándose hasta 4 ml en pacientes con lesiones grandes (p. ej., >5 cm) y cantidades más pequeñas (p. ej., hasta 0,1 ml) en pacientes con lesiones pequeñas (p. ej., <0,5 cm) cada 2-3 semanas de tratamiento.

De manera similar, se puede proporcionar fácilmente una variedad de formas farmacéuticas para C16 (o análogos o derivados) y nitrofuranos basándose en los regímenes de prescripción habituales (véase, por ejemplo, Physician's Desk Reference, 71ª ed., PDR Staff, 2017; y The Merck Manual, 19ª ed., Robert S. Porter, 2011).

En ciertos aspectos de la invención, debido a la sinergia del virus oncolítico y el C16 (o análogo o derivado) y nitrofurano, se pueden utilizar dosis más bajas que las habituales. Por lo tanto, en ciertos aspectos pueden

administrarse menos de alrededor de 10^6 ufp/ml (inyectándose hasta 4 ml a un paciente cada 2-3 semanas) a un paciente, junto con (ya sea de forma secuencial o simultánea) C16 (o un análogo o derivado del mismo) o un nitrofurano.

- 5 Las composiciones se pueden almacenar a una temperatura que conduzca a una vida útil estable, e incluye la temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C), 4 °C, -20 °C, -80 °C y en N₂ líquido. Debido a que las composiciones destinadas al uso *in vivo* generalmente no tienen conservantes, el almacenamiento será generalmente a temperaturas más frías. Las composiciones se pueden almacenar secas (por ejemplo, liofilizadas) o en forma líquida.

D. Administración

- 10 Además de las composiciones descritas en la presente memoria, se proporcionan varios métodos para usar tales composiciones para tratar o mejorar el cáncer. En los aspectos preferidos de la invención se proporcionan métodos para mejorar la eficacia de una viroterapia oncolítica, que comprende las etapas de (1) administrar un virus oncolítico a un sujeto y (2) administrar un inhibidor de la fosforilación de STAT 1/3 (como C16, o un análogo o derivado del mismo, o un nitrofurano) en una cantidad que sea eficaz para reducir la inhibición mediada por la microglía o los macrófagos de la replicación del virus oncolítico en una célula cancerosa. En tales aspectos, se administra típicamente al sujeto una dosis eficaz del (1) virus oncolítico y (2) el inhibidor de la fosforilación de STAT 1/3. En varios aspectos de la invención, las etapas (1) y (2) pueden completarse en cualquier orden o al mismo tiempo.

- 20 Los términos "dosis eficaz" y "cantidad eficaz" se refieren a las cantidades del virus oncolítico y del inhibidor de la fosforilación de STAT 1/3 o PRK que son suficientes para efectuar el tratamiento de un cáncer específico, por ejemplo, las cantidades que son eficaces para reducir el tamaño o la carga de un tumor objetivo, o dificultar de otro modo la tasa de crecimiento de las células tumorales objetivo. Más particularmente, tales términos se refieren a las cantidades de virus oncolíticos y un inhibidor de la fosforilación de STAT 1/3 o PRK que son eficaces, a las dosis y períodos de tratamiento necesarios, para lograr un resultado deseado. Por ejemplo, en el contexto del tratamiento de un cáncer, una cantidad eficaz de las composiciones descritas en la presente memoria es una cantidad que induce la remisión, reduce la carga tumoral y/o previene la propagación o el crecimiento del tumor en comparación con la respuesta obtenida sin la administración del virus oncolítico e inhibidor de PKR descrito en la presente memoria. Las cantidades eficaces pueden variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del sujeto, así como la formulación farmacéutica, la vía de administración y similares, pero, no obstante, un experto en la técnica puede determinarlas de manera rutinaria.

- 30 Las composiciones terapéuticas se administran a un sujeto diagnosticado de cáncer o que se sospecha que tiene cáncer. Los sujetos pueden ser humanos o animales no humanos.

- 35 Las composiciones se usan para tratar el cáncer. Los términos "tratar" o "tratamiento", tal como se usan en la presente memoria, significan un enfoque para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluidos los resultados clínicos. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir el alivio o la mejora de uno o más síntomas o afecciones, la disminución de la extensión de la enfermedad, el estado estabilizado (es decir, sin empeoramiento) de la enfermedad, la prevención de la propagación de la enfermedad, el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la enfermedad, la disminución de la recurrencia de la enfermedad y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. Los términos "tratar" y "tratamiento" también pueden significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

- 40 Las formas representativas de cáncer incluyen los carcinomas, leucemias, linfomas, mielomas y sarcomas. Otros ejemplos incluyen el cáncer del conducto biliar, cáncer de cerebro (p. ej., glioblastoma), mama, cuello uterino, colorrectal, del SNC (p. ej., neuroma acústico, astrocitoma, craneofaringioma, ependimoma, glioblastoma, hemangioblastoma, meduloblastoma, menangioma, neuroblastoma, oligodendroglioma, pinealoma y retinoblastoma), revestimiento endometrial, células hematopoyéticas (p. ej., leucemia y linfomas), riñón, laringe, pulmón, hígado, cavidad oral, ovarios, páncreas, próstata, piel (p. ej., melanoma y carcinoma de células escamosas) y tiroides. Los cánceres pueden comprender tumores sólidos (p. ej., sarcomas como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma y sarcoma osteogénico), pueden ser difusos (p. ej., leucemia) o alguna combinación de estos (p. ej., un cáncer metastásico que tiene tanto tumores sólidos como células cancerosas diseminadas o difusas).

También pueden tratarse tumores benignos y otras afecciones indeseadas de la proliferación celular.

- 50 En su forma más básica, se coadministran el oHSV y un inhibidor de STAT1/3 a un sujeto. La administración conjunta puede ser simultánea o secuencial. Cuando es secuencial, el oHSV o el inhibidor de STAT1/3 pueden administrarse primero en el tiempo. La forma de administración de cada agente puede ser la misma (p. ej., inyección) o diferente (p. ej., uno por vía oral y el otro por inyección), independientemente de que se administren de forma simultánea o secuencial. Se pueden administrar múltiples administraciones de uno o ambos agentes al sujeto. Por ejemplo, un sujeto puede recibir una dosis inicial de oHSV e inhibidor y una segunda dosis de inhibidor solamente.

- 55 El virus oncolítico y el inhibidor de STAT1/3 pueden administrarse por una vía que es, p. ej., oral, tópica, parenteral, sistémica, intravenosa, intramuscular, intraocular, intratecal, intratumoral, subcutánea o transdérmica. En ciertos aspectos, el virus oncolítico y/o el inhibidor de STAT1/3 pueden administrarse mediante una cánula, un catéter o mediante inyección directa. El sitio de administración puede ser intratumoral o en un sitio distante del tumor. La vía de

administración a menudo dependerá del tipo de cáncer al que se dirige.

5 El régimen de dosificación óptimo o apropiado del virus oncolítico (y el inhibidor de PKR/inhibidor de la fosforilación de STAT 1/3) es fácilmente determinable dentro de la experiencia en la técnica, por parte del médico que aplica el tratamiento en función de los datos del paciente, las observaciones del paciente y varios factores clínicos, que incluyen, por ejemplo, el tamaño de un sujeto, el área de la superficie corporal, la edad, el sexo y el virus oncolítico particular que se administra, el momento y la vía de administración, el tipo de cáncer que se trata, la salud general del paciente y otras terapias farmacológicas a las que se está sometiendo al paciente. De acuerdo con ciertos aspectos, el tratamiento de un sujeto mediante el uso del virus oncolítico y un inhibidor de PKR y/o un inhibidor de la fosforilación de STAT 1/3 descrito en la presente memoria puede combinarse con tipos adicionales de terapia, como quimioterapia, mediante el uso, por ejemplo, de un agente quimioterapéutico como etopósido, ifosfamida, adriamicina, vincristina, doxiciclina y otros.

10 El oHSV y el inhibidor de STAT1/3 pueden formularse como medicamentos y composiciones farmacéuticas para uso clínico y pueden combinarse con un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La formulación dependerá, al menos en parte, de la vía de administración. Las formulaciones adecuadas pueden comprender el virus y el inhibidor en un medio estéril. Las formulaciones pueden ser formas fluidas, gel, pasta o formas sólidas. Las formulaciones se pueden proporcionar a un sujeto o profesional médico.

15 Preferentemente se administra una cantidad terapéuticamente eficaz. Esta es una cantidad que es suficiente para mostrar beneficio para el sujeto. La cantidad concreta administrada y el curso temporal de la administración dependerán, al menos en parte, de la naturaleza del cáncer, el estado del sujeto, el lugar de administración y otros factores.

Además, en ciertos aspectos, se proporciona un método para mejorar la actividad oncolítica en una célula cancerosa (y para prevenir la inhibición por los macrófagos y la microglía de la actividad viral oncolítica en una célula cancerosa), que comprende las etapas de (a) administrar un virus oncolítico a una célula cancerosa y (b) administrar un inhibidor de la fosforilación de STAT 1/3 en una cantidad que sea eficaz para reducir tal inhibición mediada por la microglía o los macrófagos de la replicación del virus oncolítico en la célula cancerosa objetivo, tal como una célula de glioblastoma.

En los métodos descritos en la presente memoria, el virus oncolítico y el inhibidor de PKR y/o el inhibidor de la fosforilación de STAT 1/3 pueden administrarse a una célula cancerosa (o sujeto) juntos en una única formulación o, alternativamente, en serie como formulaciones separadas.

30 En otros aspectos de la invención, el virus oncolítico y el inhibidor de PKR y/o el inhibidor de la fosforilación de STAT 1/3 pueden administrarse por vía intratumoral o después de la resección quirúrgica de un tumor.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1

35 La nifuroxazida posee un potente efecto antitumoral

En este ejemplo se evalúa el efecto antitumoral de la nifuroxazida en diferentes células tumorales. Las células se trataron con nifuroxazida durante 72 horas (Figura 1A). La concentración inhibitoria al 50 % (CI₅₀) de nifuroxazida contra las células BTUC, 9L, SF126, U87, U373, LnCap y MCF7 fue de aproximadamente 15 μ M, 27 μ M, 20 μ M, 20 μ M, 23 μ M, 5 μ M y 20 μ M, respectivamente. Para verificar la eficacia antitumoral de la nifuroxazida *in vivo*, a los animales con implantes de tumores U87 subcutáneos se les inyectó en el peritoneo vehículo, 1 mg/kg de nifuroxazida y 50 mg/kg de nifuroxazida. Se observó un efecto de regresión tumoral significativo en los animales tratados con nifuroxazida. El volumen del tumor se redujo alrededor de un 25 % y un 60 % después de 7 días de tratamiento con 1 mg/kg de nifuroxazida y 50 mg/kg de nifuroxazida, respectivamente (Figura 1B).

Ejemplo 2

45 La nifuroxazida mejora la eficacia de replicación del oHSV-1 en las células tumorales

En este ejemplo, se evaluó el efecto de la nifuroxazida sobre la eficacia antitumoral de oHSV-1. Las células de glioma tratadas infectadas con oHSV-1 se incubaron con una concentración baja de nifuroxazida. La replicación aumentó 27 y 40 veces con las células U87 tratadas con nifuroxazida 0,5 μ M y nifuroxazida 10 μ M, respectivamente. De manera similar, la replicación del virus aumentó 0,8 y 4,7 veces en las células 9L tratadas con nifuroxazida 0,5 μ M y nifuroxazida 10 μ M, respectivamente (Figura 2A). El título viral mediante PCR también confirma la mejora de la replicación de HrR3 dependiente de la dosis en las células de glioma U87, pero no en las células gliales normales (Figura 2B).

Ejemplo 3

Nifuroxazida y oHSV-1 proporcionan un efecto antitumoral sinérgico

En este ejemplo, se evalúa el efecto antitumoral combinado de nifuroxazida y oHSV-1. HrR3 es un HSV-1 oncolítico [59, 60], con una mutación/delección del gen ICP6 [59]. La ribonucleótido reductasa (RR) es esencial para la síntesis de desoxirribonucleótidos, necesarios para la síntesis y replicación del ADN viral, y está codificada por el gen viral ICP6. La expresión aumentada de RR de mamíferos se encuentra en la mayoría de las células que se dividen rápidamente y los mutantes por delección de RR (HrR3) se replican eficientemente solo en las células que compensan la pérdida de ICP6 expresando el complemento de RR de mamíferos [61].

El efecto citotóxico individual y combinado de nifuroxazida y HrR3 se determinó en células de glioma U87. Las CI_{50} de las dosis individuales de nifuroxazida y de HrR3 frente a las células U87 fueron de alrededor de 20 μ M y 3,12 MOI, respectivamente. Mientras que las CI_{50} de las dosis de combinación son de aproximadamente 4 μ M de nifuroxazida y una MOI de 1 de HrR3 contra las células U87 (Figura 3A). Para preguntar si esta combinación proporciona un efecto antitumoral sinérgico, los datos se analizaron mediante el programa informático Calculusyn (<http://www.biosoft.com/w/calculusyn.htm>). Se demostró que las dosis de 0,78/3,12, 1,56/6,25, 3,12/12,5, 6,25/25 y 25/100 de HrR3/nifuroxazida son sinérgicas (Figura 3B).

Ejemplo 4

La nifuroxazida aumenta la expresión temprana inmediata del gen ICP27 de oHSV-1

En este ejemplo, se examinó el mecanismo subyacente de la potenciación de la replicación de oHSV-1 mediada por nifuroxazida. Se estableció el efecto de la nifuroxazida sobre la expresión del gen temprano inmediato viral, ICP27, e ICP4 mediante análisis de transferencia de Western. La baja concentración de nifuroxazida (0,5 μ M, 1 μ M y 10 μ M) aumenta significativamente la expresión de ICP27, pero no la expresión de ICP4 (Figura 4A). El análisis de qRT-PCR verifica aún más la regulación positiva mediada por nifuroxazida de la expresión del ARNm de ICP27 (Figura 4B).

Ejemplo 5

La nifuroxazida reduce la activación de STAT en las células tumorales infectadas por oHSV-1

En este ejemplo, se evaluó el factor celular responsable del efecto sinérgico. La expresión del regulador clave de la señalización de interferón de tipo 1, STAT1 y STAT3, se determinó en células U87 infectadas con oHSV-1 tratadas con nifuroxazida. Se observó una reducción de la fosforilación de STAT1 y STAT3 dependiente de la dosis mediada por nifuroxazida en células U87 (Figura 5A). Para verificar si el inhibidor específico de STAT3 (Stattic) también proporciona un efecto aditivo similar con oHSV-1, se utilizó un ensayo de MTT para determinar la eficacia antitumoral combinada de Stattic y oHSV-1. Al igual que una combinación de nifuroxazida y HrR3, una combinación de Stattic y HrR3 también mostró un efecto antitumoral aditivo contra las células U87 (Figura 5B).

Ejemplo 6

Amplificación de oHSV-1 dependiente de la dosis en tumores de glioblastoma *in vivo*

En este ejemplo, se evaluó *in vivo* el efecto del aumento de la replicación de oHSV-1. Los tumores U87 implantados subcutáneamente se trataron con HrR3 solo o en combinación con 50 mg/kg de nifuroxazida o 100 mg/kg de nifuroxazida. La amplificación de oHSV-1 dependiente de la dosis se determinó midiendo el ADN viral mediante qPCR en la masa tumoral. Se observó un aumento de HSV-1 de 1,6 y 2,2 veces con 50 mg/kg de nifuroxazida y 100 mg/kg de nifuroxazida, respectivamente (Figura 6A). La amplificación de oHSV-1 mediada por nifuroxazida también se confirmó mediante un ensayo de inmunohistoquímica en los tejidos tumorales recolectados (Figura 6B).

Ejemplo 7

Efecto sinérgico de nifuroxazida y oHSV-1 sobre las células tumorales

En este ejemplo, se evaluó el efecto de nifuroxazida y oHSV-1 sobre las células tumorales. Se trató una variedad de tipos de células cancerosas con nifuroxazida (de 0 a 100 μ M) o virus HrR3 a una MOI de 0 a 12,5 o virus KOS a una MOI de 1 a 12,5. Se midió la supervivencia celular. Como se muestra en la Fig. 7A-7C, el tratamiento con nifuroxazida causó mortalidad celular en todas las líneas celulares a las dosis más altas (CT26 (carcinoma de colon colorrectal), LL2 (carcinoma de pulmón de Lewis murino), U87 (glioma humano; B16, melanoma murino; 4T1, carcinoma mamario murino)). Todas las líneas celulares, excepto B16, se redujeron mediante los virus KOS y HrR3.

Las células tumorales se trataron con nifuroxazida o medio. Después de la incubación, se añadió el virus y se incubó adicionalmente durante 72 h (Fig. 7D) o 48 h (Fig. 7E-7G). La citotoxicidad se midió mediante un ensayo de MTT. Las barras de error representan la D.E. y se indican las diferencias estadísticamente significativas. El tratamiento con nifuroxazida y virus dio como resultado una supervivencia celular significativamente menor.

En las Fig. 7H-7K, las células se trataron con dosis variables de nifuroxazida o los virus indicados (HrR3, KOS o VG12TR) solos o en combinación durante 48 horas (7J, 7K) o 72 horas (7H). La viabilidad celular se midió mediante un ensayo de MTT y se calcularon los valores del índice de combinación (IC) utilizando el análisis de Chour-Talalay.

El IC se representó frente a la fracción afectada (Fa). Un IC de <1 , $IC = 1$ e $IC >1$ representan un efecto sinérgico, aditivo y antagónico, respectivamente. El tratamiento con nifuroxazida y virus tuvo un efecto sinérgico en todas las células.

- 5 La Fig. 7L presenta el índice de reducción de la dosis para una combinación de nifuroxazida y virus HrR3 en varias células tumorales. El IRD (índice de reducción de la dosis) determina la magnitud de la reducción de la dosis permitida para cada fármaco cuando se administra en combinación sinérgica, en comparación con la concentración de un solo agente que se necesita para lograr el mismo nivel de efecto. Como se muestra en la tabla, el IRD varía hasta 12,9.

Ejemplo 8

Aislamiento y cultivo de microglía

- 10 Se obtuvo una rata E18 Sprague Dawley de Charles River Laboratories (Charles River, Wilmington, MA). El aislamiento y cultivo primario de la microglía de rata se realizó de acuerdo con los protocolos habituales. En resumen, se aislaron cortezas del cerebro de rata Sprague Dawley E18 embrionario del día 18. Después de 30 minutos de incubación en tripsina/EDTA (Invitrogen, Canadá), el tejido recolectado se lavó con medio de cultivo y se trituró en presencia de Dnasa I (Invitrogen, Canadá). A continuación, la suspensión celular se centrifugó, se resuspendió en medio de cultivo fresco y se sembró en placas de cultivo de 10 cm en alta confluencia. Las células de microglía se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Sigma, Canadá) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Invitrogen, Canadá), antibióticos al 1 % (penicilina y estreptomycin) y se mantuvieron a 37 °C con CO₂ al 5 %. El medio de cultivo se cambió cada 3-4 días. Después de 7 a 10 días, se recogieron las microglías sacudiendo suavemente la placa con la mano un par de veces. Finalmente, la microglía que flotaba en el sobrenadante se sembró en una placa recubierta de poli-L-lisina. La pureza celular se analizó de forma rutinaria mediante tinción inmunocitoquímica para ITGAM (1:200; ProSci Incorporated, CA), que es una proteína integrina específica de la microglía.

Ejemplo 9

Cultivo de células

- 25 Las células U87 (GBM humano) y las células Vero (riñón de mono verde africano) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Las células BV2 (microglía de ratón) fueron proporcionadas amablemente por la Universidad de Manitoba. Todas las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS) al 10% y antibióticos al 1% (penicilina y estreptomycin). Todos los cultivos se mantuvieron a 37 °C con CO₂ al 5%.

Ejemplo 10

- 30 Ensayo de replicación viral

- El virus G207 se obtuvo de NeuroVir Therapeut Inc. (San Diego, CA). Las células U87 (5×10^4) solas o con el número indicado de células de microglía en cocultivo se incubaron durante la noche con medio de cultivo completo (DMEM con FBS al 10 % y antibiótico al 1 %). Las células se infectaron al día siguiente con el virus G207 a una multiplicidad de infección (MOI) de 1. La infección con el virus y el tratamiento se mantuvieron en medio DMEM sin FBS ni antibiótico. Los virus se recogieron después de 2-4 días después de la infección. Después de tres ciclos de congelación y descongelación, los virus se titularon en células Vero mediante un ensayo de placas estándar en placas de 12 pocillos por triplicado.

Ejemplo 11

Efecto de los fármacos y reactivos sobre la replicación viral

- 40 Se sembraron U87 (5×10^4) solo o U87 + cocultivo con microglía ($5 \times 10^4 + 5 \times 10^4$) o células de microglía BV2 (5×10^4) solas en una placa de 24 pocillos. Después de la incubación durante la noche (para permitir que las células se adhieran), las células se pretrataron con la concentración indicada de inhibidor de NFkB, Bay-11 (Santa Cruz, Canadá) o una concentración indicada de derivado de imidazolo-oxindol C16 (Millipore, Canadá) o vehículo durante 1-2 horas. A continuación, las células se infectaron con el virus oHSV-1 (G207 o HrR3) a una MOI de 1 en presencia de inhibidores químicos durante otros 2 días. Los virus se recogieron y se titularon en células Vero mediante un ensayo de formación de placas en placas de 12 pocillos por triplicado.

Ejemplo 12

Transferencias de Western

- 50 La proteína total se recogió con tampón de muestra (Tris-HCl 125 mM, 50 % de glicerol, 4 % de azul de bromofenol y 5 % de 2-mercaptoetanol) y se hirvió durante 5 minutos. Las muestras de proteína se sometieron a SDS-PAGE (gel al 8 %), se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se bloquearon en leche descremada al 5 % (Bio Rad) en TBS-Tween 20 (TBS-T) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, las membranas se incubaron con anticuerpo primario contra β -actina a 1:1000 (Cell Signaling, Danvers, MA) o anticuerpo anti-STAT1 a 1:1000 (Cell Signaling,

5 Danvers, MA) o anticuerpo anti-STAT3 a 1:1000 (Cell Signaling, Danvers, MA) o anticuerpo anti-fosfo STAT1 (Tyr701) a 1:1000 (Cell Signaling, Danvers, MA) o anticuerpo anti-fosfo STAT3 (Tyr705) a 1:1500 (Cell Signaling, Danvers, MA) o anticuerpo anti-fosfo-eIF2 α (ser51) a 1:1000 (Cell Signaling, Danvers, MA) o anticuerpo anti-ICP27 a 1:1000 (Abcam, Cambridge, MA) o anticuerpo anti-ICP4 a 1:750 (Abcam, Cambridge, MA) durante la noche a 4 °C. Las membranas se lavaron al día siguiente con TBS-T tres veces y se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente a 1:3000 (Perkin Elmer, Boston, MA), durante 1 hora a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron con TBS-T tres veces antes de la visualización usando el reactivo ECL (Perkin Elmer, Boston, MA) y el sistema de formación de imágenes VersaDoc (Bio-Rad). La densidad de las bandas se midió utilizando el programa informático ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

10 Ejemplo 13

Extracción de ARN y RT-PCR

15 Se infectaron células U87 y de microglía BV2 con oHSV-1 a una MOI de 1. Se aisló el ARN total 24 horas después de la infección a partir de las células BV2 o U87 usando un reactivo de Triazol (Invitrogen, Canadá). La RT-PCR se realizó usando PCR en tiempo real de una etapa usando KAPA SYBR[®] FAST One-Step qRT-PCR Universal (D-MARK Biosciences, Canadá) siguiendo el protocolo del fabricante. El ADNc se amplificó utilizando los cebadores enumerados a continuación, los resultados se expresaron como 2- $\Delta\Delta$ CT y se utilizó β -actina para la normalización.

Gen	Cebador	SEQ ID
ICP4	directo	SEQ ID N°:1
ICP4	inverso	SEQ ID N°:2
PCI27	directo	SEQ ID N°:3
PCI27	inverso	SEQ ID N°:4
β -actina	directo	SEQ ID N°:5
β -actina	inverso	SEQ ID N°:6
ICP8	directo	SEQ ID N°:7
ICP8	inverso	SEQ ID N°:8
CG	directo	SEQ ID N°:9
CG	inverso	SEQ ID N°:10
VP5	directo	SEQ ID N°:11
VP5	inverso	SEQ ID N°:12

Ejemplo 14

Tinción de β -galactosidasa

20 Las células sembradas en portaobjetos de cámara de 8 pocillos se infectaron con el virus G207, y las células infectadas de manera simulada se consideraron el control. Después de 24 horas tras la infección, las células se fijaron utilizando una disolución de glutaraldehído al 0,5%. Las células fijadas se lavaron dos veces con PBS y luego se incubaron con 1 mg/ml de disolución de X-gal (Sigma, Canadá) diluida con disolución de tinción de X-gal (K₃Fe(CN)₆ 5 mM, K₄Fe(CN)₆ 5 mM y MgCl₂ 2 mM) a 37 °C durante una hora. A continuación, las células teñidas se visualizaron y se tomaron imágenes utilizando un microscopio óptico.

25 Ejemplo 15

Ensayo de proliferación celular

30 Las células se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de 1 \times 10⁴ (U87). Después de la incubación durante la noche, las células se trataron solo con vehículo o a la MOI indicada de virus o a la concentración indicada de fármacos o reactivos. Después de 2 a 3 días de tratamiento, se midió la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT (Sigma, Canadá) según las instrucciones del fabricante. En resumen, las células se incubaron con disolución de MTT durante 3 horas a 37 °C y luego se incubaron con tampón de lisis. Después de una incubación durante la noche con tampón de lisis, se midió la viabilidad celular a 595 nm usando un lector de placas (lector Envision 2103 Multilabel, Perkin Elmer).

Ejemplo 16

35 Modelo de xenoinjerto de U87.

Se obtuvieron ratones desnudos atímicos hembra de 5 a 6 semanas de edad de Harlon Laboratories. Se implantaron subcutáneamente células U87 de glioma humano en el flanco inferior. Cuando el tamaño del tumor alcanzó ~75 a 100 mm³, se administró vehículo o C16 (5 mg/kg) por vía intraperitoneal (IP). 2 días (Figura 14) o 4 días (Figura 15) después de la administración inicial de C16, se inyectaron intratumoralmente vehículo o oHSV-1. A continuación, se midió el volumen del tumor utilizando un calibre (alto x largo x ancho/2). Al final del experimento, los ratones se sacrificaron usando asfixia con CO₂.

Ejemplo 17

Extracción del ADN de tejidos y qPCR

Se extrajo el ADN de tejidos tumorales fijados con paraformaldehído al 4% utilizando un kit de ADN tisular EZNA (Omega Biotek). Los ADN extraídos se sometieron a análisis mediante qPCR utilizando la mezcla maestra Syber Green (Invitrogen, Canadá) complementada con cebadores de ICP27 representados por SEQ ID N°: 13 (directo) y SEQ ID N°: 14 (inverso); y cebadores de β -actina representados por SEQ ID N°: 15 (directo) y SEQ ID N°: 16 (inverso). La amplificación se realizó con el aparato de qPCR Quanstudio 6 Flex (Applied Biosystems, Canadá).

Ejemplo 18

15 Inmunohistoquímica

Los tumores recolectados se sometieron a corte con un criostato después de fijarlos durante 24 horas con paraformaldehído al 4%. Los tejidos se fijaron durante 24 horas con paraformaldehído al 4%, seguido de 72 horas de incubación con sacarosa al 30%. A continuación, los tejidos se incluyeron en OCT (Sakura fabric tek), se cortaron (20 μ m) con un criostato (Leica CM 3050 S) y se colocaron en portaobjetos de microscopio Fisherbrand™ Superfrost™ Plus (Fisher Scientific, Canadá). Luego, los portaobjetos se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,125% durante 5 minutos y se incubaron con suero de cabra al 5% (SantaCruz, Canadá) durante una hora para bloquear la unión inespecífica. A continuación, las células se incubaron durante la noche con anticuerpo anti-HSV-1 a 1:50 (Abcam, Cambridge, MA) o con anticuerpo anti-f4/80 a 1:50 (Abcam, Cambridge, MA) a 4 °C. Al día siguiente, después de tres lavados con PBS, los cortes se incubaron con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo Alexa Fluor 488 o anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de rata Alexa Fluor 568 a 1:500 (Invitrogen, Canadá) durante una hora a temperatura ambiente. Después de tres etapas de lavado, los cortes se montaron con Dapi fluomount G (Electron Microscopy Sciences) y se visualizaron y se tomaron imágenes usando un microscopio confocal (Olympus, Canadá).

Ejemplo 19

30 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos a los que se hace referencia en la presente memoria se realizaron con SPSS 18 o Microsoft Excel y la significación ($P < 0,05$) se determinó mediante el uso de la prueba T para muestras independientes o se determinó la significación $P < 0,001$, $P < 0,01$ o $P < 0,05$ mediante una prueba t de Student bilateral, respectivamente. Los datos descritos en estos Ejemplos se expresan como la media \pm D.E. o \pm E.E.

35 Ejemplo 20

La presencia de la microglía dificulta la eficacia oncolítica del oHSV-1 frente a las células U87

Se determinó la eficacia de la replicación de G207 en las células U87 usando un ensayo de crecimiento viral de una etapa (Ejemplos 8 y 9). Los resultados se muestran en la Figura 14A. El efecto antiproliferativo de G207 se evaluó mediante un ensayo de MTT. Se observó un efecto antiproliferativo dependiente de la dosis y se observó la CI_{50} para G207 a una MOI = 1 después de 72 horas de infección (Figura 14B). Los resultados confirmaron que G207 puede replicarse efectivamente en las células U87, lo que da como resultado una lisis celular significativa. Luego se midió el crecimiento de G207 en las células U87 en presencia de diferentes cantidades de microglía. La adición de células de la microglía en el cultivo de U87 inhibió la replicación de G207 de manera dependiente de la dosis. La replicación de G207 se redujo en un 50% y casi un 100% mediante la adición de $6,25 \times 10^3$ y 1×10^5 células de la microglía en los cultivos de U87 (5×10^4), respectivamente (Figura 9C). Para confirmar aún más que la inhibición del crecimiento de oHSV-1 mediada por la microglía no es específica de la cepa, se probaron diferentes cepas de HSV-1, incluidas hRr3 (ICP6 mutado), b17-TK (un mutante TK-) y KOS (tipo natural). Se observó una inhibición de la replicación viral similar entre todas las cepas de HSV-1 analizadas (Figura 9D).

Ejemplo 21

50 La microglía forma una barrera de replicación para prevenir la diseminación del oHSV-1

También se consideró si oHSV-1 puede infectar y replicarse en la microglía. Tanto las células microgliales de cultivo primario de roedores como la microglía BV2 infectada con G207 mostraron tinción con LacZ, lo que indica que el virus puede entrar en la célula y expresar el gen indicador portado por el virus (Figura 10A). La cuantificación de LacZ en las células BV2 infectadas con oHSV-1 demostró que la expresión de LacZ dependía de las MOI de la infección por

G207 (Figura 10B). La infección por HSV-1 dependiente de la concentración en las células microgliales también se observó mediante la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) a partir de un HSV-1 deficiente de replicación (datos no mostrados). Sin embargo, el ensayo de crecimiento de G207 en las células de la microglía de rata cultivadas primarias y las células BV2 mostró que G207 no pudo producir su progenie en la microglía (Figura 10C). Estos resultados sugieren que el virus es internalizado por la microglía, pero su replicación no es compatible (es decir, que los oHSV-1 son capaces de internalizarse en la microglía, pero no pueden replicarse en ella).

Ejemplo 22

Perfil de expresión génica de oHSV-1 en las células de la microglía BV2

Para revelar el mecanismo por el cual se previene la replicación de HSV-1 en las células microgliales, se midieron los niveles de transcripción de un panel de genes virales en células de glioma (U87) y de microglía (BV2) (Ejemplo 13). Los genes virales incluyeron ICP4, ICP27, ICP8, VP5 y Glicoproteína C (gC), que representan genes tempranos inmediatos, tempranos y tardíos, respectivamente. Los resultados cuantitativos de RT-PCR mostraron que la transcripción de ICP27, ICP8, VP5 y gC, pero no de ICP4, se inhibió significativamente en las células BV2 en comparación con U87 (Figura 11).

Ejemplo 23

C16 supera la barrera de replicación de oHSV-1 mediada por la microglía.

Se ensayaron los efectos de un inhibidor de PKR (C16), un inhibidor de NFkappaB (Bay11) y un inhibidor de iNOS (clorhidrato de aminoguanidina) sobre la replicación de G207 en las células BV2 (Ejemplo 15). El tratamiento con 1 y 10 μ M de C16 mejoró significativamente la replicación 9 veces y 8 veces, respectivamente (Figura 12A). Sin embargo, Bay11 y el clorhidrato de aminoguanidina no tuvieron efecto sobre la replicación de oHSV-1 en las células BV2 (Figura 12A). Además, C16 (pero no Bay11 ni clorhidrato de aminoguanidina) estimuló la expresión de ICP4 e ICP27 en 1,8 y 25 veces, respectivamente (Figura 12B). Para verificar que el aumento transcripcional del gen viral mediado por C16 no se debe a deleciones en ICP34.5 y/o ICP6 en G207, también se examinó el efecto de C16 sobre las células BV2 infectadas con HSV-1 de tipo natural (KOS) y mutado en ICP6 (HrR3). El tratamiento con C16 también aumentó la expresión de ICP27 en las células BV2 infectadas con KOS y HrR3 (Figura 12C). Finalmente, se examinó si C16 puede superar esta inhibición de la replicación viral mediada por la microglía en las células de glioma. Como se muestra en la Figura 12D, la replicación viral de G207 aumentó en un 33 % en los cocultivos de glioma-microglía tratados con C16.

Ejemplo 24

Rescate de oHSV-1 con C16 en células microgliales inhibiendo la activación de STAT 1 y STAT 3

Como se muestra en la Figura 13, también se demostró que C16 inhibe significativamente la estimulación de pSTAT1 (Tyr701) y pSTAT3 (Tyr705) inducida por oHSV-1 en las células de la microglía BV2, independientemente del estado de fosforilación de eIF2 α . En conjunto, se estimuló el nivel de expresión de STAT 1, pero no de STAT 3, en las células microgliales infectadas con G207 y también se redujo después del tratamiento con C16. También se demostró que C16 causa la inhibición de la fosforilación de STAT 1/3, como se confirmó en las células BV2 tratadas con LPS (Figura 16).

Ejemplo 25

C16 facilita selectivamente la replicación de oHSV-1 en un xenoinjerto de glioma al superar las barreras de macrófagos asociados a tumores

Para demostrar que el efecto de C16 puede traducirse en una mayor eficacia de la replicación intratumoral de oHSV-1 *in vivo*, se inyectó C16 en animales que tenían tumores U87 implantados subcutáneamente que recibieron oHSV-1 intratumoralmente (Ejemplo 16). La administración de C16 mejoró significativamente el título de oHSV-1 en la masa tumoral, medido por el número de copias de ADN viral usando qPCR (Figura 14A). El análisis inmunohistoquímico (Ejemplo 18) demostró un mayor número de células HSV-1 replicables en los animales cotratados con oHSV-1 y 5 mg/kg de C16, en comparación con los tratados con oHSV-1 solo. Además, se observaron numerosas células con una localización conjunta de HSV-1 y marcadores de macrófagos en los animales cotratados con oHSV-1 y C16 pero no con oHSV-1 solo, lo que indica una mayor replicación viral en los macrófagos después del tratamiento con C16 (Figura 14B).

Ejemplo 26

C16 mejora significativamente la regresión del xenoinjerto de glioma humano

Finalmente, se examinó si la carga de oHSV-1 mejorada mediada por C16 en el tumor es capaz de aumentar la oncólisis antitumoral. Como se muestra en la Figura 15A, el tamaño del tumor del grupo de tratamiento combinado con C16 (5 mg/kg) y oHSV-1 se redujo 9,3, 8,2 y 6 veces en comparación con el tratamiento con vehículo, C16 solo y oHSV-1 solo, respectivamente, a los 50 días tras la implantación del tumor. Además, el título viral mediante qPCR

(Ejemplo 17) en diferentes órganos de los animales tratados con la combinación de C16 y oHSV-1 demostró que los virus estaban restringidos solo en los tumores sin diseminarse al hígado, cerebro y tracto gastrointestinal (Figura 15B). El análisis de Kaplan-Meier también reveló una mayor supervivencia del tratamiento combinado con C16 y oHSV-1 (Figura 15C).

5 Ejemplo 27

Inhibición de STAT mediante la combinación de NF y oHSV-1

NF es un inhibidor conocido de STAT1 y STAT3. Para evaluar el mecanismo molecular subyacente del efecto antitumoral de la combinación de NF y oHSV-1, se determinó el estado de STAT1 y STAT3 en células U87 (Figura 19A) y células CT26 (Figura 19B) después de un tratamiento nocturno con NF y virus oncolíticos.

- 10 NF provocó una inhibición dependiente de la dosis de la fosforilación de STAT1/3. NF también inhibió eficazmente la estimulación inducida por HrR3 de la fosforilación de STAT1/3 en tanto en células U87 (Figura 19A) como en células CT26 (Figura 19B). Sorprendentemente, a pesar del hecho de que la infección por HrR3 elevó la fosforilación de STAT1/3 en las células U87, una combinación de dosis altas de NF y HrR3 (NF 50 μ M y HrR3 a una MOI de 6,25) redujo la fosforilación de STAT1/3 a un nivel incluso inferior al observado con NF solo (Figura 19A). Sin embargo, se
- 15 encontró que el aumento de la fosforilación de STAT1/3 mediado por la infección por HSV-1 dependía del tiempo, ya que la fosforilación de STAT1/3 se reduce gradualmente con el tiempo (datos no mostrados).

- Para confirmar aún más que NF es capaz de inhibir la activación de STAT *in vivo*, se trataron tumores U87 implantados subcutáneamente con HrR3 solo o en combinación con 50 mg/kg de NF o 100 mg/kg de NF. Los niveles de expresión de STAT1/3 fosforilado en los tejidos tumorales recogidos se midieron mediante transferencia de Western. Aunque no
- 20 se detectó pSTAT1 en el tejido tumoral, fue evidente que la fosforilación de STAT3 aumentó en la masa tumoral tratada con HrR3 solo. De nuevo, la estimulación inducida por el virus de pSTAT3 fue inhibida de una manera dependiente de la dosis por la combinación del virus con NF inyectada i.p. (Figura 19C).

Ejemplo 28

Efecto antitumoral de oHSV-1 y NF *in vivo*

- 25 Se trató a ratones BALB/C con tumores CT26 (cáncer de colon) con una dosis única del virus HrR3 (oHSV-1) (2×10^7 UFP) o vehículo y se les administraron inyecciones peritoneales diarias de 50 mg/kg de NF sola o en combinación con el virus HrR3 (5 ratones en cada grupo). Se midió el tamaño del tumor usando calibres (longitud \times altura \times anchura/2). Los datos son las medias \pm E.E. y las diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento con la combinación de NF y oHSV-1, NF solo y oHSV-1 solo se indican mediante el valor de p, * P <0,05.
- 30 Se observó una mayor regresión tumoral con la combinación en comparación con el tratamiento con NF o HrR3 solos. En el día 23 después de la implantación del tumor, se observó una regresión del tumor 2,2 veces y 1,9 veces mayor en los ratones tratados con NF más oHSV-1 en comparación con los ratones tratados con oHSV-1 solo o NF sola, respectivamente (Figura 20).

Ejemplo 29

- 35 Seguridad de oHSV-1 y NF *in vivo*

Se evaluó la seguridad de la combinación de NF y oHSV-1. Se preparó el ADN total del tumor, cerebro, hígado y tracto gastrointestinal (TG) y se sometió a análisis de qPCR para medir la cantidad de ADN viral.

- Como se esperaba, se detectaron niveles igualmente altos de ADN de HSV-1 en los tumores tratados con HrR3 con o sin NF. Mientras que los niveles de ADN viral fueron casi indetectables en el hígado y TG con o sin NF, se detectó
- 40 un nivel notable en los cerebros de los animales tratados con HrR3 solo, y el nivel fue casi 10 veces menor cuando el virus se combinó con NF (Figura 21A). En los 5 ratones tratados con HrR3 (2×10^7 UFP) solo, se sacrificó un ratón debido a la toxicidad relacionada con el virus. No se observó toxicidad en los ratones tratados con la combinación de NF y HrR3. Además, cuando a dos ratones se les inyectó por vía intratumoral una dosis alta de HrR3 (1×10^8 UFP), ambos ratones mostraron signos de toxicidad grave por HSV-1 (parálisis de la pata trasera o inmovilidad) y fueron sacrificados inmediatamente. Por otro lado, HSV-1 no tuvo ningún efecto tóxico en los ratones tratados con HrR3 a la misma dosis alta cuando se administró en combinación con NF (datos no mostrados).
- 45

- Para confirmar aún más que la seguridad no se ve comprometida por NF en la combinación, se midió el peso corporal de los animales en varios momentos del tratamiento. El peso corporal neto no fue significativamente diferente en los ratones tratados con la combinación de NF y HrR3 en comparación con el tratamiento con vehículo o agente único
- 50 (Figura 21B). Estos datos indican que NF en combinación con HrR3 no comprometió la seguridad e incluso redujo la toxicidad del HSV-1 en el cerebro.

REFERENCIAS

1. Yoon SS, Nakamura H, Carrol NM, Bode BP, Chiocca EA y Tanabe KK. An oncolytic herpes simplex virus type 1 selectively destroys diffuse liver metastases from colon carcinoma. *The FASEB Journal*. 2000; 14(2):301-311.
- 5 2. Mineta T, Rabkin SD, Yazaki T, Hunter WD y Martuza RL. Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nature medicine*. 1995; 1(9):938-943.
3. Kooby DA, Carew JF, Halterman MW, Mack JE, Bertino JR, Blumgart LH, Federoff HJ y Fong Y. Oncolytic viral therapy for human colorectal cancer and liver metastases using a multi-mutated herpes simplex virus type-1 (G207). *The FASEB journal*. 1999; 13(11):1325-1334.
- 10 4. Todo T, Martuza RL, Rabkin SD y Johnson PA. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001; 98(11):6396-6401.
5. Mace A, Ganly I, Soutar DS y Brown SM. Potential for efficacy of the oncolytic Herpes simplex virus 1716 in patients with oral squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2008; 30(8):1045-1051.
- 15 6. Harrow S, Papanastassiou V, Harland J, Mabbs R, Petty R, Fraser M, Hadley D, Patterson J, Brown S y Rampling R. HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival. *Gene therapy*. 2004; 11(22):1648-1658.
7. Nakao A, Kasuya H, Sahin T, Nomura N, Kanzaki A, Misawa M, Shirota T, Yamada S, Fujii T y Sugimoto H. A phase I dose-escalation clinical trial of intraoperative direct intratumoral injection of HF10 oncolytic virus in non-resectable patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer gene therapy*. 2011; 18(3):167-175.
- 20 8. Fong Y, Kim T, Bhargava A, Schwartz L, Brown K, Brody L, Covey A, Karrasch M, Getrajdman G y Mescheder A. A herpes oncolytic virus can be delivered via the vasculature to produce biologic changes in human colorectal cancer. *Molecular Therapy*. 2009; 17(2):389-394.
9. Andtbacka RH, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, Delman KA, Spitler LE, Puzanov I y Agarwala SS. Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;JCO. 2014.2058. 3377.
- 25 10. Gaston DC, Odom CI, Li L, Markert JM, Roth JC, Cassady KA, Whitley RJ y Parker JN. Production of bioactive soluble interleukin-15 in complex with interleukin-15 receptor alpha from a conditionally-replicating oncolytic HSV-1. *PLoS one*. 2013; 8(11):e81768.
11. Parker JN, Gillespie GY, Love CE, Randall S, Whitley RJ y Markert JM. Engineered herpes simplex virus expressing IL-12 in the treatment of experimental murine brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000; 97(5):2208-2213.
- 30 12. Passer BJ, Cheema T, Wu S, Wu C, Rabkin SD y Martuza RL. Combination of vinblastine and oncolytic herpes simplex virus vector expressing IL-12 therapy increases antitumor and antiangiogenic effects in prostate cancer models. *Cancer gene therapy*. 2013; 20(1):17-24.
13. Carew JF, Kooby DA, Halterman MW, Kim S-H, Federoff HJ y Fong Y. A novel approach to cancer therapy using an oncolytic herpes virus to package amplicons containing cytokine genes. *Molecular Therapy*. 2001; 4(3):250-256.
- 35 14. Kambara H, Okano H, Chiocca EA y Saeki Y. An oncolytic HSV-1 mutant expressing ICP34.5 under control of a nestin promoter increases survival of animals even when symptomatic from a brain tumor. *Cancer Research*. 2005; 65(7):2832-2839.
- 40 15. Fukuhara H, Ino Y, Kuroda T, Martuza RL y Todo T. Triple Gene-Deleted Oncolytic Herpes Simplex Virus Vector Double-Armed with Interleukin 18 and Soluble B7-1 Constructed by Bacterial Artificial Chromosome-Mediated System. *Cancer research*. 2005; 65(23):10663-10668.
16. Xu R, Yuan Z, Guan Z, Cao Y, Wang H, Hu X, Feng J, Zhang Y, Li F y Chen Z. [Phase II clinical study of intratumoral H101, an E1B deleted adenovirus, in combination with chemotherapy in patients with cancer]. *Ai zheng=*
- 45 *Aizheng= Chinese journal of cancer*. 2003; 22(12):1307-1310.
17. Nemunaitis J, Cunningham C, Buchanan A, Blackburn A, Edelman G, Maples P, Netto G, Tong A, Randlev B y Olson S. Intravenous infusion of a replicationselective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. *Gene therapy*. 2001; 8(10):746-759.
18. DeWeese TL, van der Poel H, Li S, Mikhak B, Drew R, Goemann M, Hamper U, DeJong R, Detorie N y Rodríguez R. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer research*. 2001; 61(20):7464-7472.
- 50

19. Ramesh N, Ge Y, Ennist DL, Zhu M, Mina M, Ganesh S, Reddy PS y Yu D-C. CG0070, a conditionally replicating granulocyte macrophage colony-stimulating factor-armed oncolytic adenovirus for the treatment of bladder cancer. *Clinical cancer research*. 2006; 12(1):305-313.
- 5 20. Nemunaitis J, Tong AW, Nemunaitis M, Senzer N, Phadke AP, Bedell C, Adams N, Zhang Y-A, Maples PB y Chen S. A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors. *Molecular Therapy*. 2010; 18(2):429-434.
21. Freytag SO, Khil M, Stricker H, Peabody J, Menon M, DePeralta-Venturina M, Nafziger D, Pegg J, Paielli D y Brown S. Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer. *Cancer research*. 2002; 62(17):4968-4976.
- 10 22. Kimball KJ, Preuss MA, Barnes MN, Wang M, Siegal GP, Wan W, Kuo H, Saddekni S, Stockard CR y Grizzle WE. A phase I study of a tropism-modified conditionally replicative adenovirus for recurrent malignant gynecologic diseases. *Clinical cancer research*. 2010; 16(21):5277-5287.
- 15 23. Koski A, Kangasniemi L, Escutenaire S, Pesonen S, Cerullo V, Diaconu I, Nokisalmi P, Raki M, Rajacki M y Guse K. Treatment of cancer patients with a serotype 5/3 chimeric oncolytic adenovirus expressing GMCSF. *Molecular Therapy*. 2010; 18(10):1874-1884.
24. Lichtenstein D, Spencer J, Doronin K, Patra D, Meyer J, Shashkova E, Kuppuswamy M, Dhar D, Thomas M y Tollefson A. An acute toxicology study with INGN 007, an oncolytic adenovirus vector, in mice and permissive Syrian hamsters; comparisons with wild-type Ad5 and a replication-defective adenovirus vector. *Cancer gene therapy*. 2009; 16(8):644-654.
- 20 25. Kuhn I, Harden P, Bauzon M, Chartier C, Nye J, Thorne S, Reid T, Ni S, Lieber A y Fisher K. Directed evolution generates a novel oncolytic virus for the treatment of colon cancer. *PLoS One*. 2008; 3(6):e2409.
26. Yu D-C, Chen Y, Seng M, Dilley J y Henderson DR. The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts. *Cancer research*. 1999; 59(17):4200-4203.
- 25 27. Li J, Liu H, Zhang X, Xu J, Hu W, Liang M, Chen S, Hu F y Chu D. A phase I trial of intratumoral administration of recombinant oncolytic adenovirus overexpressing HSP70 in advanced solid tumor patients. *Gene therapy*. 2009; 16(3):376-382.
28. Yuan M, Wong Y, Au G y Shafren D. Combination of intravenously delivered cavatak (coxsackievirus A21) and immune-checkpoint blockade significantly reduces tumor growth and tumor rechallenge. *Journal for immunotherapy of cancer*. 2015; 3(Suppl 2):P342.
- 30 29. Galanis E, Hartmann LC, Cliby WA, Long HJ, Peethambaram PP, Barrette BA, Kaur JS, Haluska PJ, Aderca I y Zollman PJ. Phase I trial of intraperitoneal administration of an oncolytic measles virus strain engineered to express carcinoembryonic antigen for recurrent ovarian cancer. *Cancer research*. 2010; 70(3):875-882.
- 35 30. Myers R, Greiner S, Harvey M, Griesmann G, Kuffel M, Buhrow S, Reid J, Federspiel M, Ames M y Dingli D. Preclinical pharmacology and toxicology of intravenous MV-NIS, an oncolytic measles virus administered with or without cyclophosphamide. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2007; 82(6):700.
31. Engeland CE, Grossardt C, Veinalde R, Bossow S, Lutz D, Kaufmann JK, Shevchenko I, Umansky V, Nettelbeck DM y Weichert W. CTLA-4 and PD-L1 checkpoint blockade enhances oncolytic measles virus therapy. *Molecular Therapy*. 2014; 22(11):1949-1959.
- 40 32. Grote D, Cattaneo R y Fielding AK. Neutrophils Contribute to the Measles Virus-induced Antitumor Effect Enhancement by Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor Expression. *Cancer research*. 2003; 63(19):6463-6468.
33. Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, Linetsky E, Rasooly L, Greenbaum E, Rozenman-Yair S, Panet A, Libson E e Irving CS. Phase I/II trial of intravenous NDV-HUJ oncolytic virus in recurrent glioblastoma multiforme. *Molecular Therapy*. 2006; 13(1):221-228.
- 45 34. Laurie SA, Bell JC, Atkins HL, Roach J, Bamat MK, O'Neil JD, Roberts MS, Groene WS y Lorence RM. A phase 1 clinical study of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, using two-step desensitization. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12(8):2555-2562.
35. Csatory L, Eckhardt S, Bukosza I, Czeglédi F, Fenyvesi C, Gergely P, Bodey B y Csatory C. Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. *Cancer detection and prevention*. 1992; 17(6):619-627.
- 50 36. Vigil A, Park M-S, Martínez O, Chua MA, Xiao S, Cros JF, Martínez-Sobrido L, Woo SL y García-Sastre A. Use of reverse genetics to enhance the oncolytic properties of Newcastle disease virus. *Cancer research*. 2007; 67(17):8285-8292.

37. Zhao H, Janke M, Fournier P y Schirmacher V. Recombinant Newcastle disease virus expressing human interleukin-2 serves as a potential candidate for tumor therapy. *Virus research*. 2008; 136(1):75-80.
38. Geletneky K, Kiprianova I, Ayache A, Koch R, y Calle MH, Deleu L, Sommer C, Thomas N, Rommelaere J y Schlehofer JR. Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models. *Neuro-oncology*. 2010; 12(8):804-814.
39. Goetz C y Gromeier M. Preparing an oncolytic poliovirus recombinant for clinical application against glioblastoma multiforme. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010; 21(2):197-203.
40. Forsyth P, Roldán G, George D, Wallace C, Palmer CA, Morris D, Cairncross G, Matthews MV, Markert J y Gillespie Y. A phase I trial of intratumoral administration of reovirus in patients with histologically confirmed recurrent malignant gliomas. *Molecular Therapy*. 2008; 16(3):627-632.
41. Reddy PS, Burroughs KD, Hales LM, Ganesh S, Jones BH, Idamakanti N, Hay C, Li SS, Skele KL y Vasko A-J. Seneca Valley virus, a systemically deliverable oncolytic picornavirus, and the treatment of neuroendocrine cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007; 99(21):1623-1633.
42. Tai C-K, Wang WJ, Chen TC y Kasahara N. Single-shot, multicycle suicide gene therapy by replication-competent retrovirus vectors achieves long-term survival benefit in experimental glioma. *Molecular Therapy*. 2005; 12(5):842-851.
43. Park B-H, Hwang T, Liu T-C, Sze DY, Kim J-S, Kwon H-C, Oh SY, Han S-Y, Yoon J-H y Hong S-H. Use of a targeted oncolytic poxvirus, JX-594, in patients with refractory primary or metastatic liver cancer: a phase I trial. *The lancet oncology*. 2008; 9(6):533-542.
44. Gomella LG, Mastrangelo MJ, McCUE PA, Maguire HC, Mulholland SG y Lattime EC. Phase I study of intravesical vaccinia virus as a vector for gene therapy of bladder cancer. *The Journal of urology*. 2001; 166(4):1291-1295.
45. Kirn DH, Wang Y, Le Boeuf F, Bell J y Thorne SH. Targeting of interferonbeta to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS Med*. 2007; 4(12):e353.
46. Chard LS, Maniati E, Wang P, Zhang Z, Gao D, Wang J, Cao F, Ahmed J, El Khouri M y Hughes J. A vaccinia virus armed with interleukin-10 is a promising therapeutic agent for treatment of murine pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015; 21(2):405-416.
47. Kim HS, Kim-Schulze S, Kim DW y Kaufman HL. Host lymphodepletion enhances the therapeutic activity of an oncolytic vaccinia virus expressing 4-1BB ligand. *Cancer research*. 2009; 69(21):8516-8525.
48. Li J, O'Malley M, Sampath P, Kalinski P, Bartlett DL y Thorne SH. Expression of CCL19 from oncolytic vaccinia enhances immunotherapeutic potential while maintaining oncolytic activity. *Neoplasia*. 2012; 14(12):1115-IN1111.
49. Gil M, Komorowski MP, Seshadri M, Rokita H, McGray AR, Opyrchal M, Odunsi KO y Kozbor D. CXCL12/CXCR4 blockade by oncolytic virotherapy inhibits ovarian cancer growth by decreasing immunosuppression and targeting cancer-initiating cells. *The Journal of Immunology*. 2014; 193(10):5327-5337.
50. McCart JA, Mehta N, Scollard D, Reilly RM, Carrasquillo JA, Tang N, Deng H, Miller M, Xu H y Libutti SK. Oncolytic vaccinia virus expressing the human somatostatin receptor SSTR2: molecular imaging after systemic delivery using 111In-pentetreotide. *Molecular Therapy*. 2004; 10(3):553-561.
51. Gentshev I, Müller M, Adelfinger M, Weibel S, Grummt F, Zimmermann M, Bitzer M, Heisig M, Zhang Q y Yong AY. Efficient colonization and therapy of human hepatocellular carcinoma (HCC) using the oncolytic vaccinia virus strain GLV-1h68. *PLoS One*. 2011; 6(7):e22069.
52. Conrad SJ, El-Aswad M, Kurban E, Jeng D, Tripp BC, Nutting C, Eversole R, Mackenzie C y Essani K. Oncolytic tanapoxvirus expressing FliC causes regression of human colorectal cancer xenografts in nude mice. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 2015; 34(1):1.
53. Shin EJ, Wanna GB, Choi B, Aguila D, Ebert O, Genden EM y Woo SL. Interleukin-12 expression enhances vesicular stomatitis virus oncolytic therapy in murine squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope*. 2007; 117(2):210-214.
54. Stephenson K, Barra N, Davies E, Ashkar A y Lichty B. Expressing human interleukin-15 from oncolytic vesicular stomatitis virus improves survival in a murine metastatic colon adenocarcinoma model through the enhancement of anti-tumor immunity. *Cancer gene therapy*. 2012; 19(4):238-246.
55. Bergman I, Griffin JA, Gao Y y Whitaker-Dowling P. Treatment of implanted mammary tumors with recombinant vesicular stomatitis virus targeted to Her2/neu. *International journal of cancer*. 2007; 121(2):425-430.

56. Wennier ST, Liu J, Li S, Rahman MM, Mona M y McFadden G. Myxoma virus sensitizes cancer cells to gemcitabine and is an effective oncolytic virotherapeutic in models of disseminated pancreatic cancer. *Molecular Therapy*. 2012; 20(4):759-768.
57. Tomic V, Thomas DL, Kranz DM, Liu J, McFadden G, Shisler JL, MacNeill AL y Roy EJ. Myxoma Virus Expressing a Fusion Protein of Interleukin-15 (IL15) and IL15 Receptor Alpha Has Enhanced Antitumor Activity. *PLoS one*. 2014; 9(10):e109801.
58. Van Rikxoort M, Michaelis M, Wolschek M, Muster T, Egorov A, Seipelt J, Doerr HW y Cinatl Jr J. Oncolytic effects of a novel influenza A virus expressing interleukin-15 from the NS reading frame. *PLoS One*. 2012; 7(5):e36506.
59. Goldstein DJ y Weller SK. Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant. *Journal of virology*. 1988; 62(1):196-205.
60. YOON SS, NAKAMURA H, CARROLL NM, BODE BP, CHIOCCA EA y TANABE KK. An oncolytic herpes simplex virus type 1 selectively destroys diffuse liver metastases from colon carcinoma. *The FASEB Journal*. 2000; 14(2):301-311.
61. Aghi M, Visted T, Depinho R y Chiocca E. Oncolytic herpes virus with defective ICP6 specifically replicates in quiescent cells with homozygous genetic mutations in p16. *Oncogene*. 2008; 27(30):4249-4254.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Jia, Guillermo Delwar, Zahid
- <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DE INHIBIDORES DE STAT1/3 CON VIRUS DEL HERPES ONCOLÍTICOS
- VIRUS DEL HERPES
- <130> VIRO.401PC
- <140> WO
- <141> 18-02-2017
- <150> US 62/399,989
- <151> 26-09-2016
- <150> US 62/297,739
- <151> 19-02-2016
- <160> 16
- <170> PatenteEn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 18
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Cebador PCR
- <400> 1
- ggcctgcttc cggatctc 18
- <210> 2
- <211> 21
- <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador PCR
<400> 2
5 ggtgatgaag gagctgctgt t 21
<210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> Cebador PCR
<400> 3
gtctggcggg cattaaggac a 21
<210> 4
15 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador PCR
20 <400> 4
tgccagaat gacaaacacg 20
<210> 5
<211> 19
<212> ADN
25 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador PCR
<400> 5
acgaggcca gagcaagag 19
30 <210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
35 <223> Cebador PCR
<400> 6
tctcatgtc gtcccagttg 20

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5 <220>
<223> Cebador PCR
<400> 7
gcgccccatg gtcgtgtt 18
<210> 8
10 <211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador PCR
15 <400> 8
ctccgccgcc gaggttc 17
<210> 9
<211> 17
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador PCR
<400> 9
gccgccgcct actacc 17
25 <210> 10
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
30 <223> Cebador PCR
<400> 10
gctgccgcga ctgtgatg 18
<210> 11
<211> 21
35 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

ES 2 930 046 T3

<223> Cebador PCR
<400> 11
tgaaccccag ccccgaaac c 21
<210> 12
5 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador PCR
10 <400> 12
tcgagtaaac catgtaagg acc 23
<210> 13
<211> 21
<212> ADN
15 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador PCR
<400> 13
gtctggcggg cattaaggac a 21
20 <210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <223> Cebador PCR
<400> 14
tgccagaat gacaaacacg 20
<210> 15
<211> 19
30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Cebador PCR
<400> 15
35 acgaggcca gagcaagag 19
<210> 16
<211> 20

ES 2 930 046 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador PCR

5

<400> 16

tctccatgtc gtcccagttg 20

REIVINDICACIONES

1. Un virus oncolítico y un inhibidor de STAT1/3 para el uso en un método de tratamiento del cáncer, que comprende la administración simultánea o secuencial del virus oncolítico y un inhibidor de STAT1/3, en el que dicho inhibidor es nifuroxazida, C16, o un derivado o análogo de los mismos.
- 5 2. Un virus y un inhibidor para el uso según la reivindicación 1, en el que el cáncer es un cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de próstata.
3. El virus y el inhibidor para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el virus oncolítico es el virus del herpes simple y, opcionalmente, el HSV-1,
10 particularmente en el que el virus tiene un gen defectuoso de la ribonucleasa reductasa viral y, opcionalmente, un gen ICP34.5 por lo demás intacto.
4. Un virus y un inhibidor para el uso según la reivindicación 3, en el que el gen ICP6 está modificado de tal manera que el gen ICP6 es incapaz de expresar un producto funcional del gen ICP6,
o en el que el virus del herpes simple oncolítico es la cepa HrR3, la cepa 17 del HSV-1, la cepa F del HSV-1, la cepa JS-1, o la cepa HG52 del HSV-2.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende un virus oncolítico, un inhibidor de STAT1/3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que dicho inhibidor es nifuroxazida, C16, o un derivado o análogo de los mismos.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que el virus oncolítico es un virus del herpes simple oncolítico,
20 particularmente en la que el virus tiene un gen defectuoso de la ribonucleasa reductasa viral y, opcionalmente, un gen ICP34.5 por lo demás intacto,
y/o en la que el gen ICP6 está modificado de manera que el gen ICP6 es incapaz de expresar un producto funcional del gen ICP6.
7. Un kit que comprende una cantidad predeterminada de un virus oncolítico y una cantidad predeterminada de un agente quimioterapéutico, donde el agente quimioterapéutico es un inhibidor de STAT1/3, donde dicho inhibidor es nifuroxazida, C16, o un derivado o análogo de los mismos.
- 25 8. El kit según la reivindicación 7, en el que el kit comprende una cantidad predeterminada de virus del herpes simple oncolítico y una cantidad predeterminada de agente quimioterapéutico, en el que el agente quimioterapéutico es un inhibidor de STAT1/3, en el que dicho inhibidor es nifuroxazida, C16, o un derivado o análogo de los mismos.
9. Un virus oncolítico y un inhibidor de STAT1/3 para el uso en un método para mejorar la eficacia de una viroterapia oncolítica, que comprende las etapas de:
30 (a) administrar el virus oncolítico a un sujeto; y
(b) administrar el inhibidor de STAT1/3 en una cantidad que es eficaz para reducir la inhibición mediada por la microglía o los macrófagos de la replicación del virus oncolítico, en el que dicho inhibidor es nifuroxazida, C16, o un derivado o análogo de los mismos.
- 35 10. El virus y el inhibidor para el uso de la reivindicación 9, en el que el virus oncolítico y el inhibidor de STAT1/3 se administran juntos,
o en el que el virus oncolítico y el inhibidor de STAT1/3 se administran en serie.

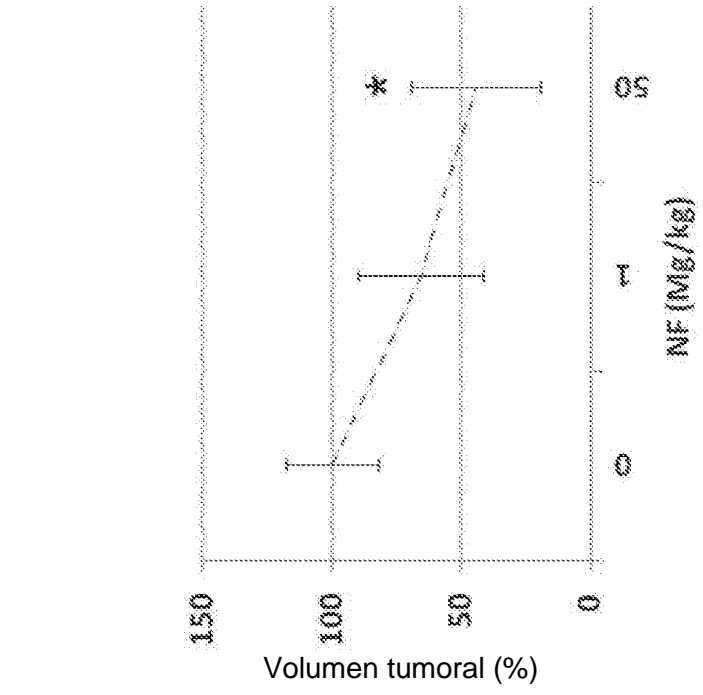


FIG. 1B

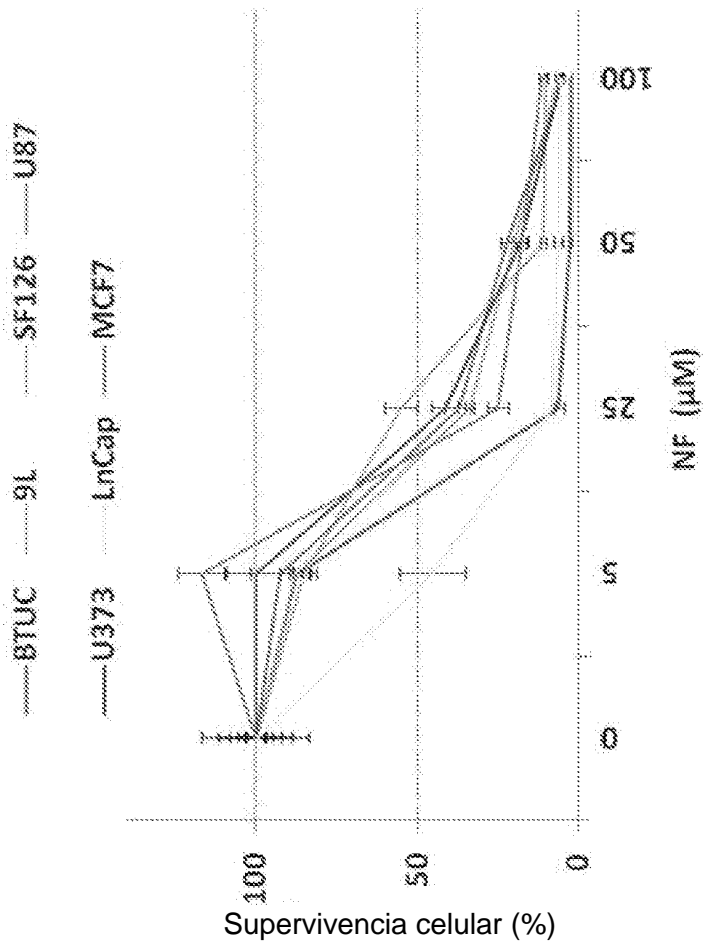


FIG. 1A

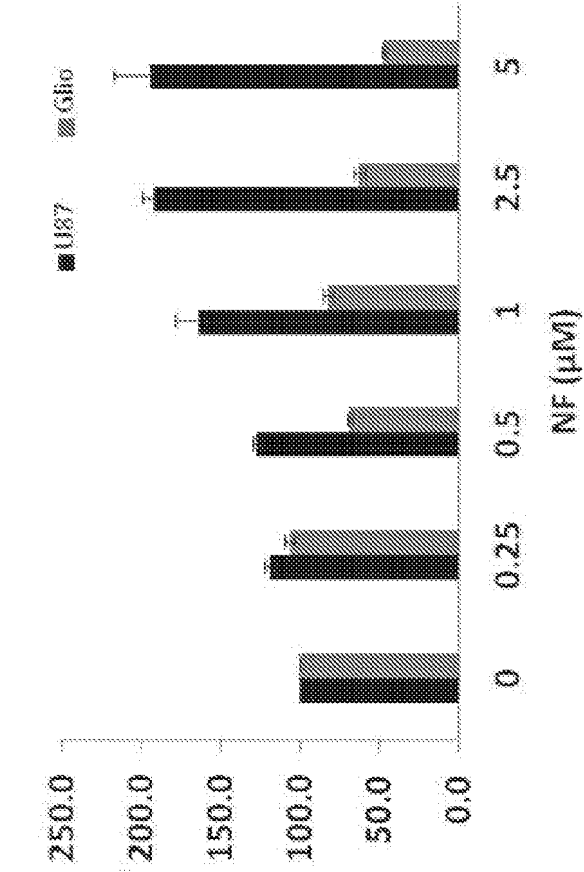


FIG. 2B

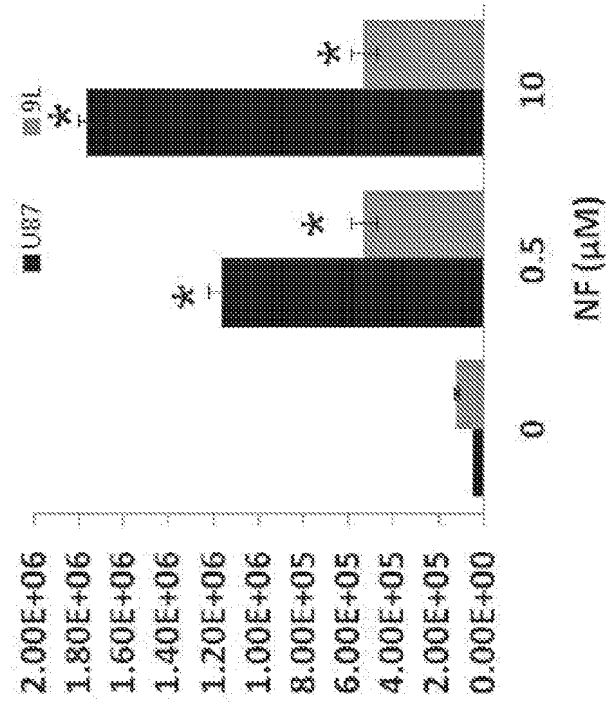


FIG. 2A

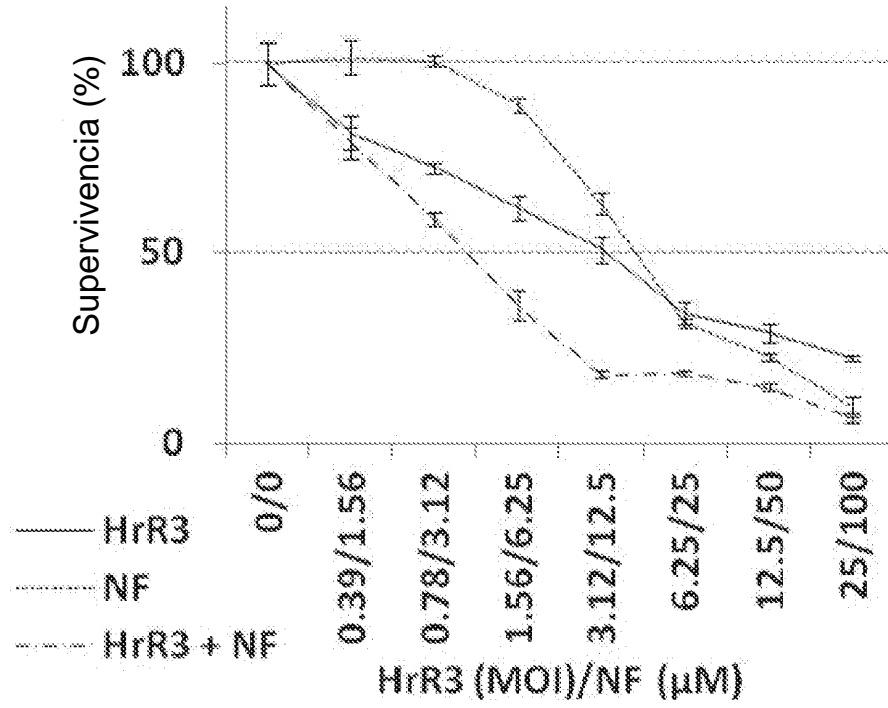


FIG. 3A

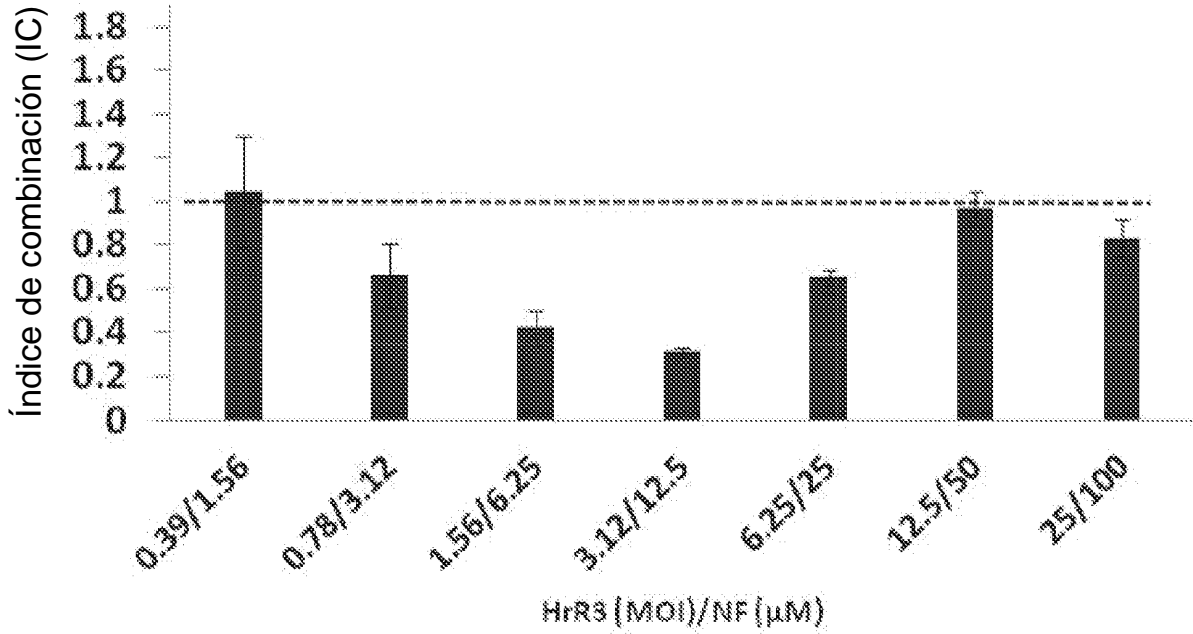


FIG. 3B

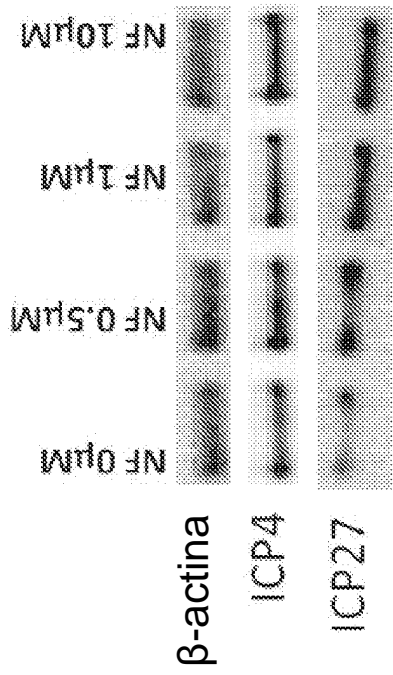
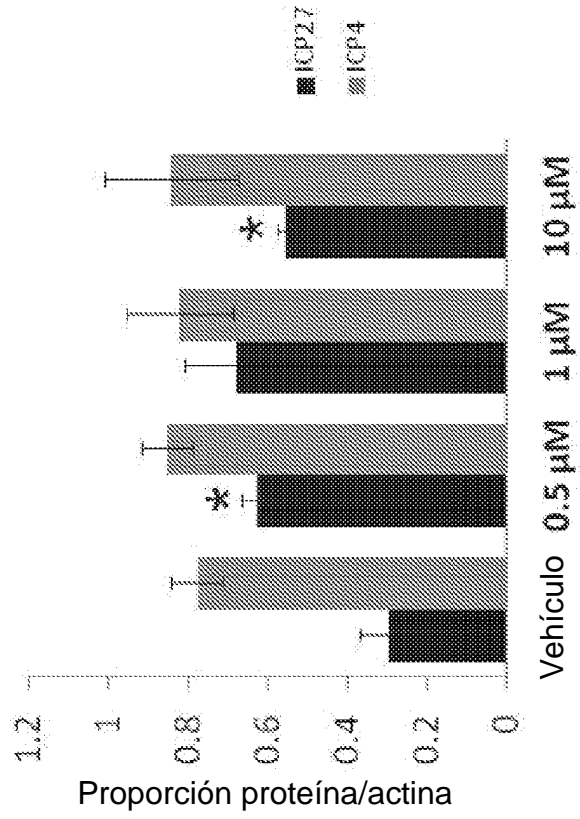
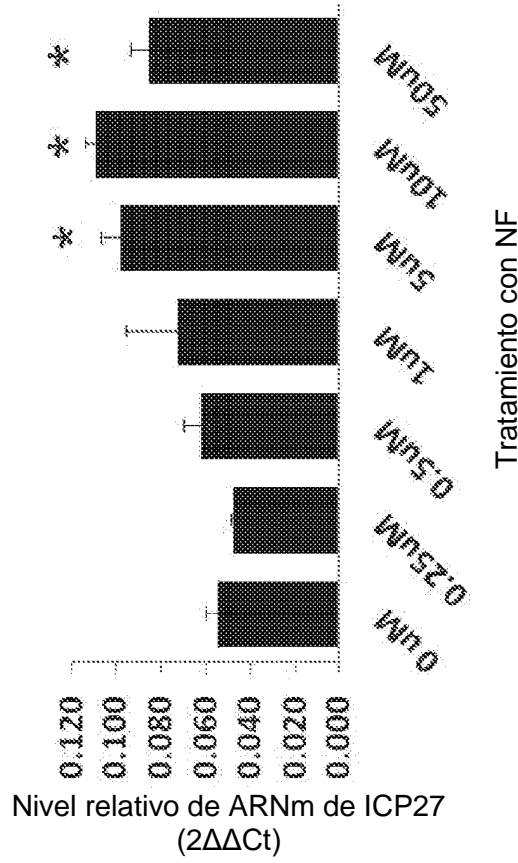


FIG. 4A



Tratamiento con NF

FIG. 4C



Tratamiento con NF

FIG. 4B

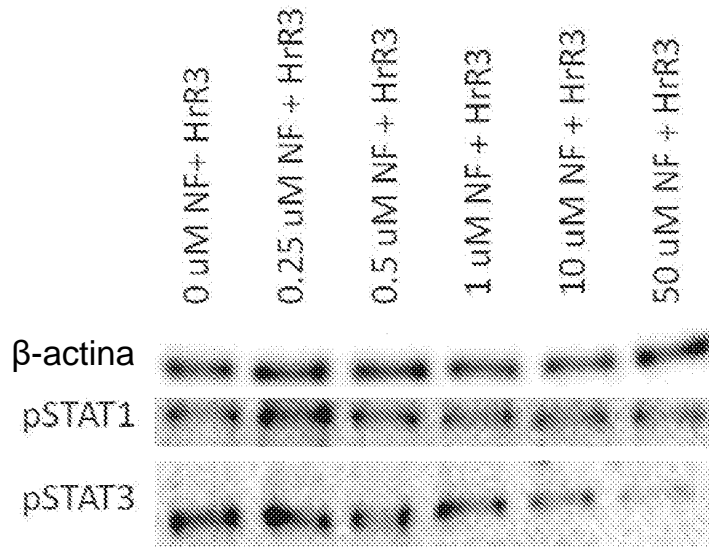


FIG. 5A

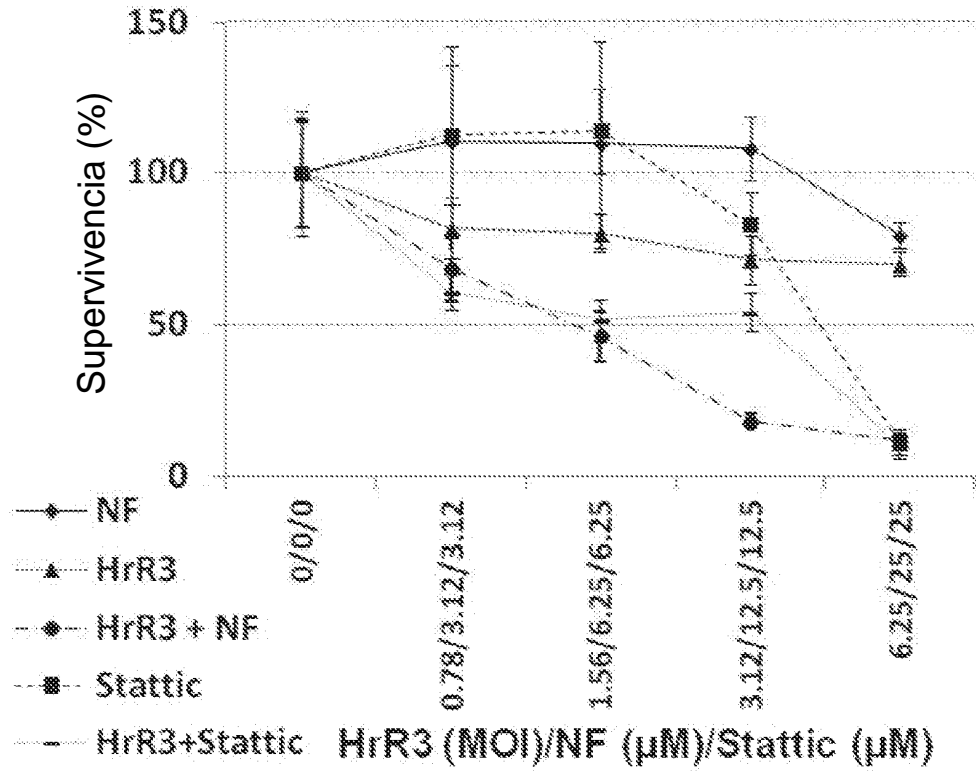


FIG. 5B

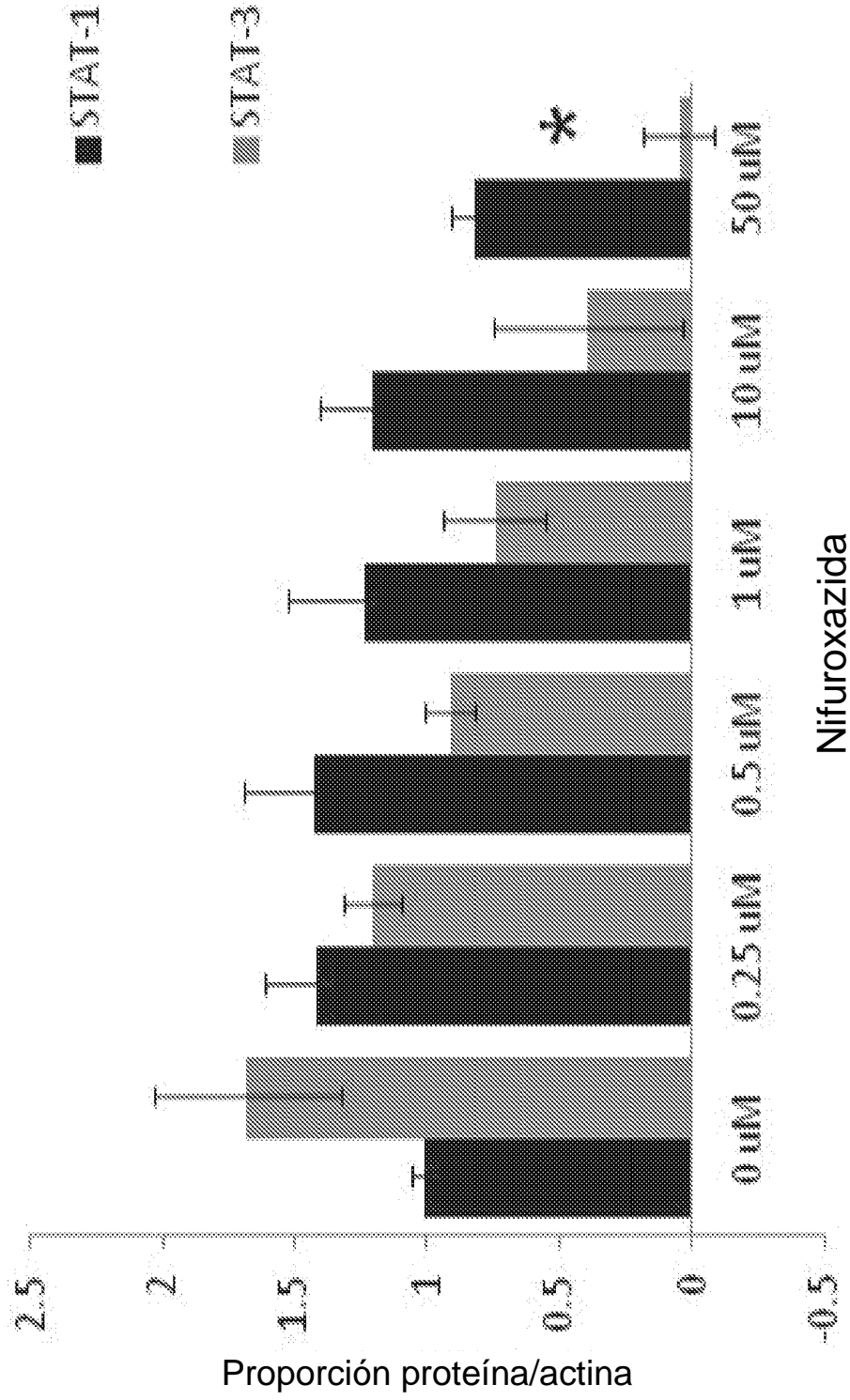


FIG. 5C

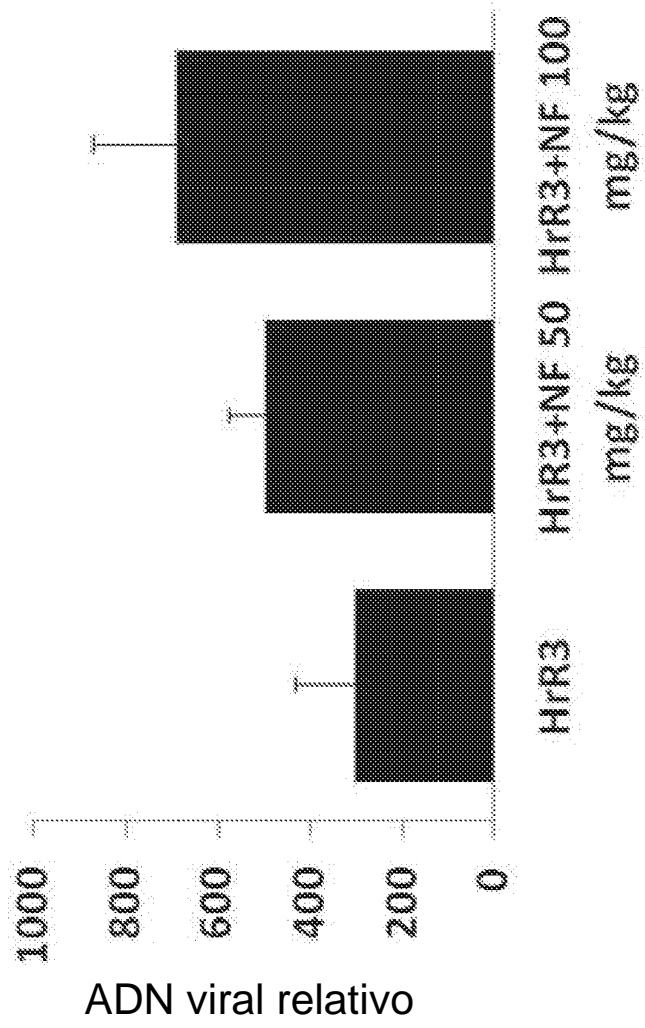


FIG. 6A

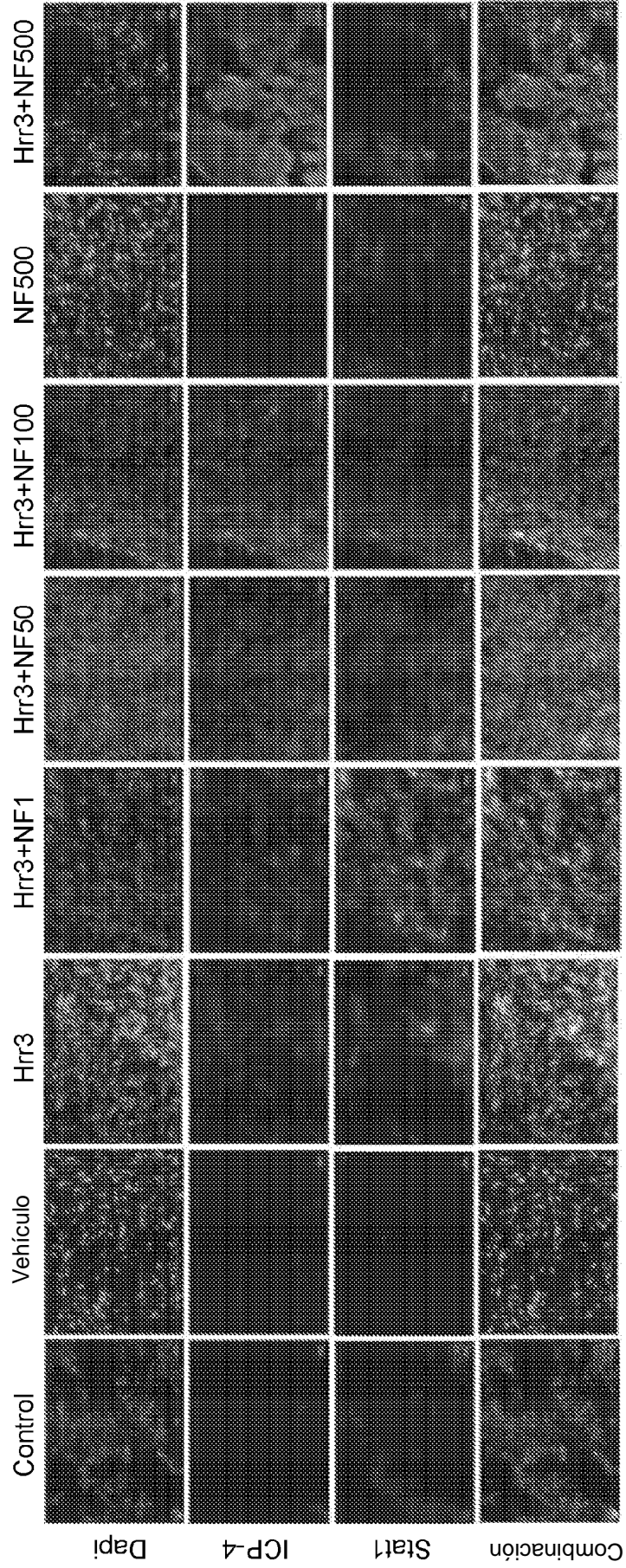


FIG. 6B

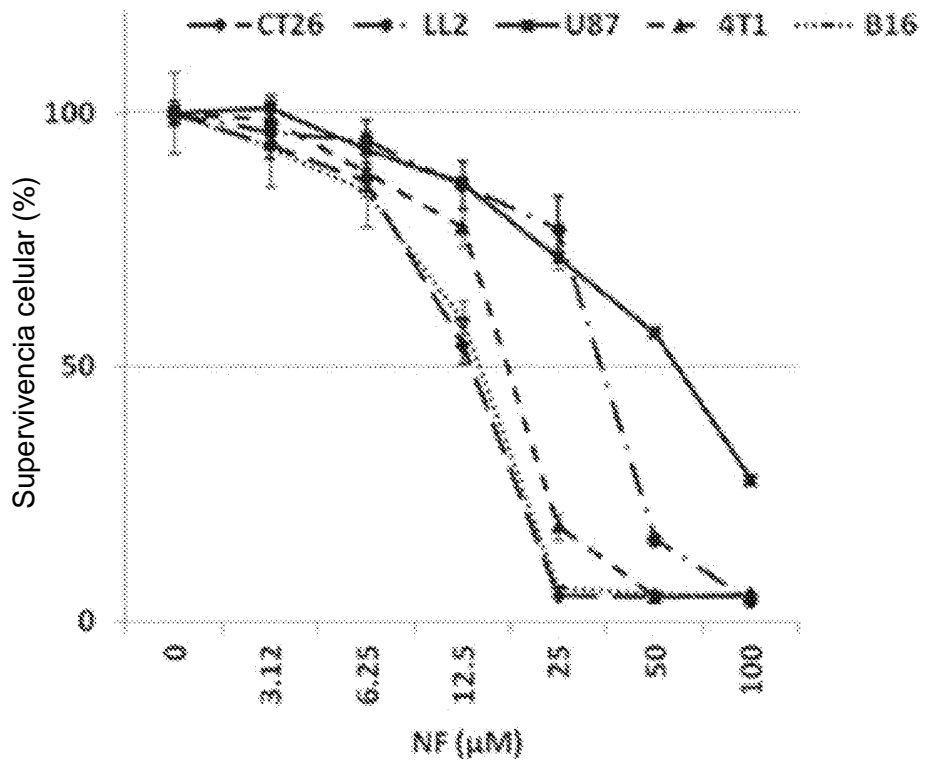


FIG. 7A

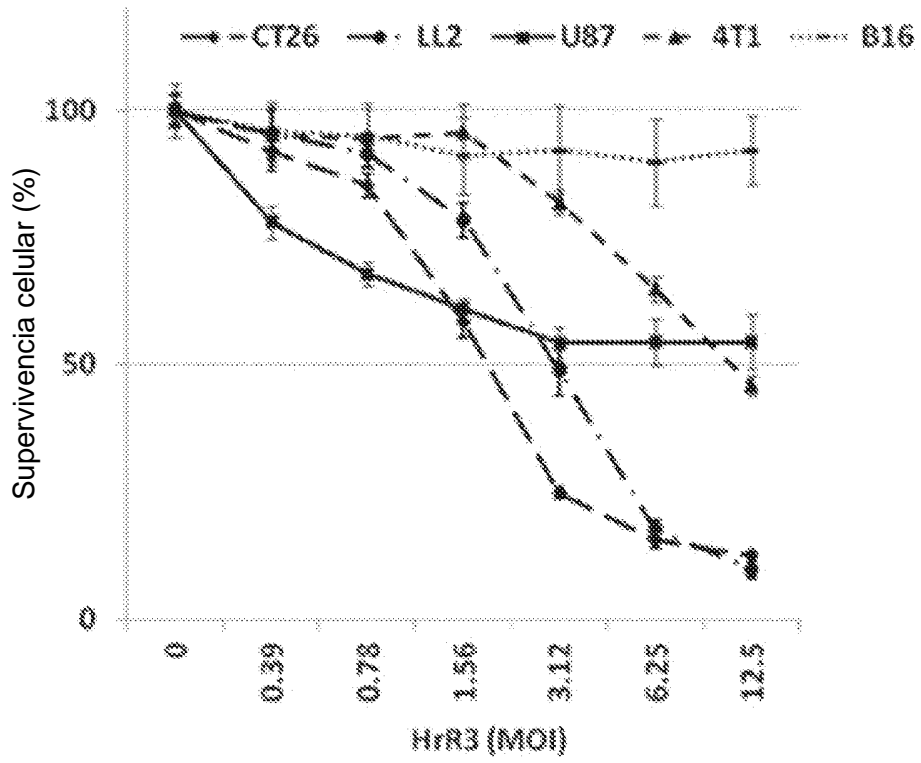


FIG. 7B

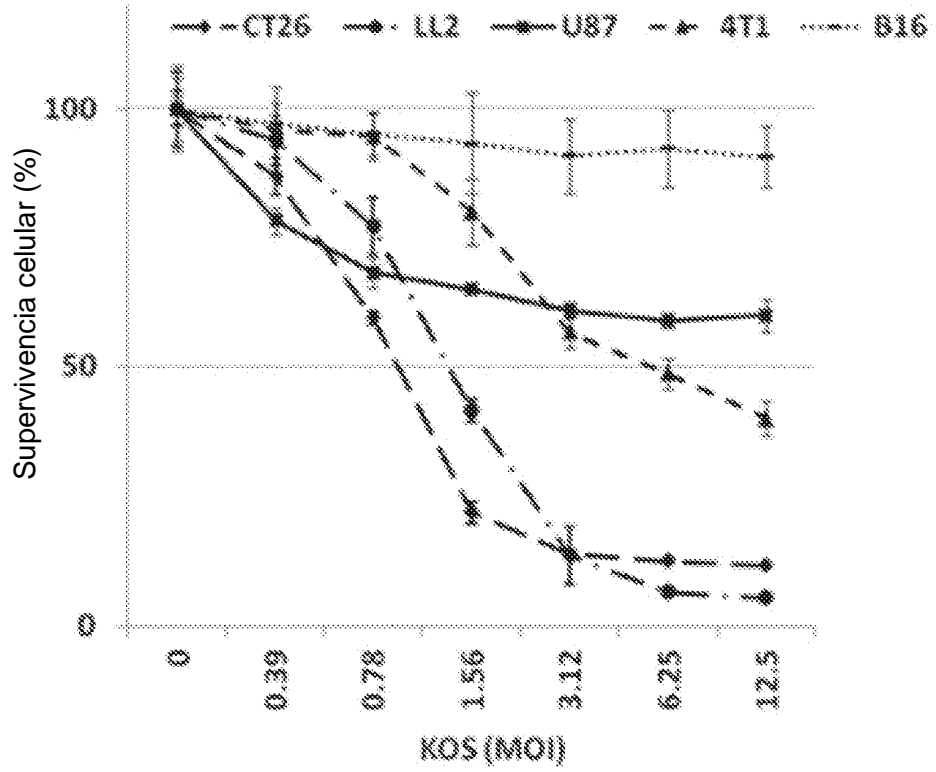


FIG. 7C

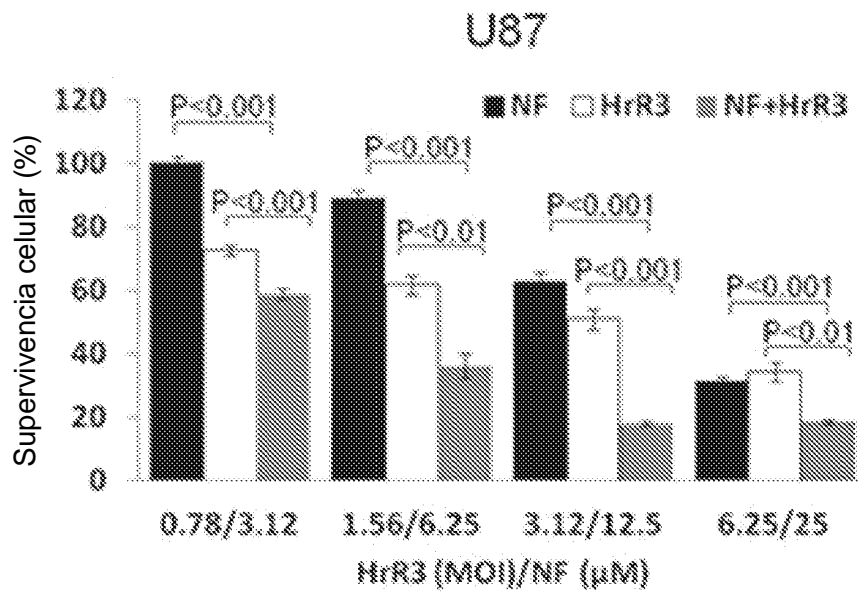


FIG. 7D

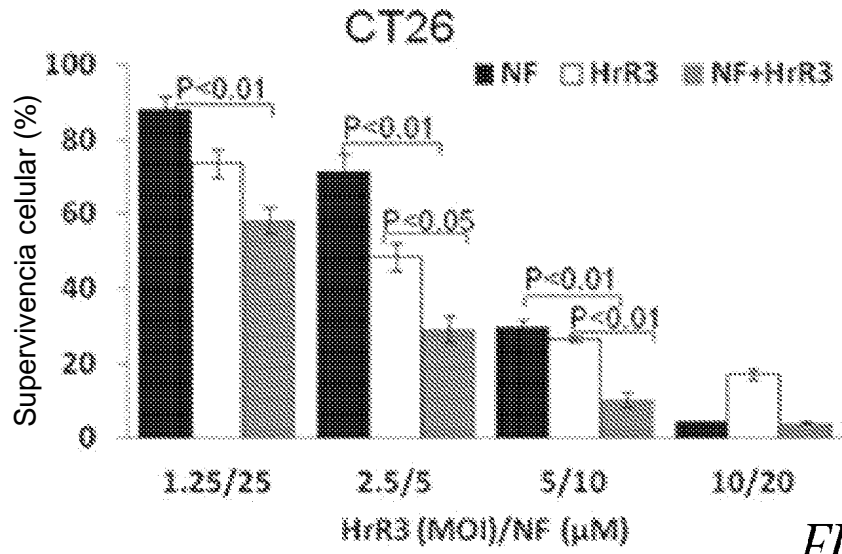


FIG. 7E

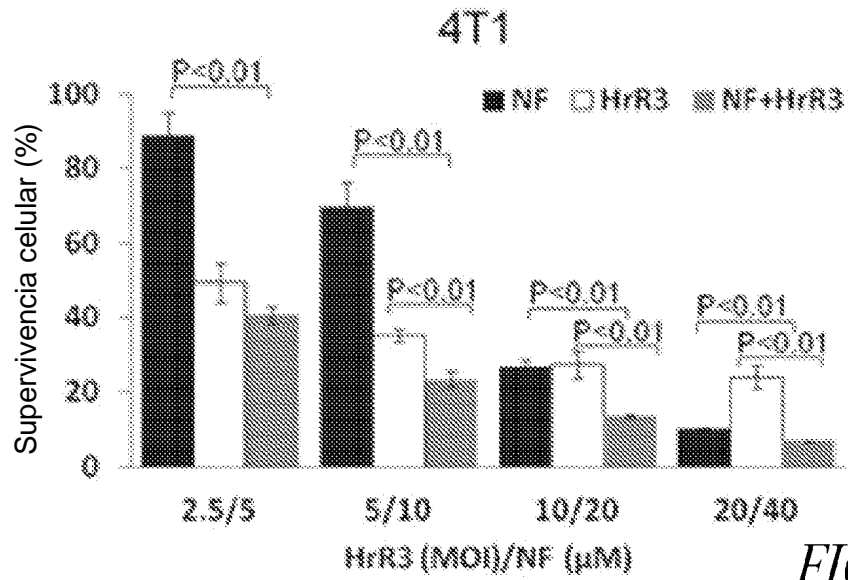


FIG. 7F

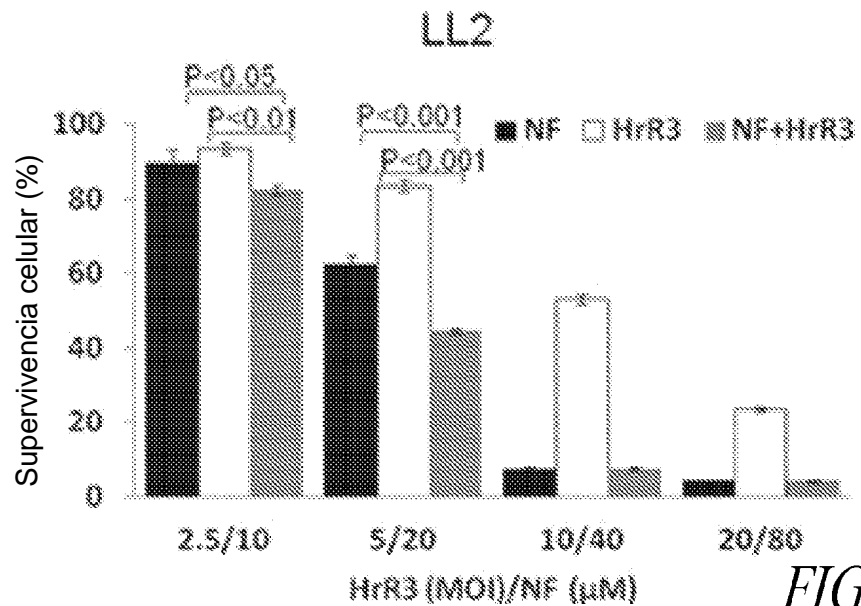


FIG. 7G

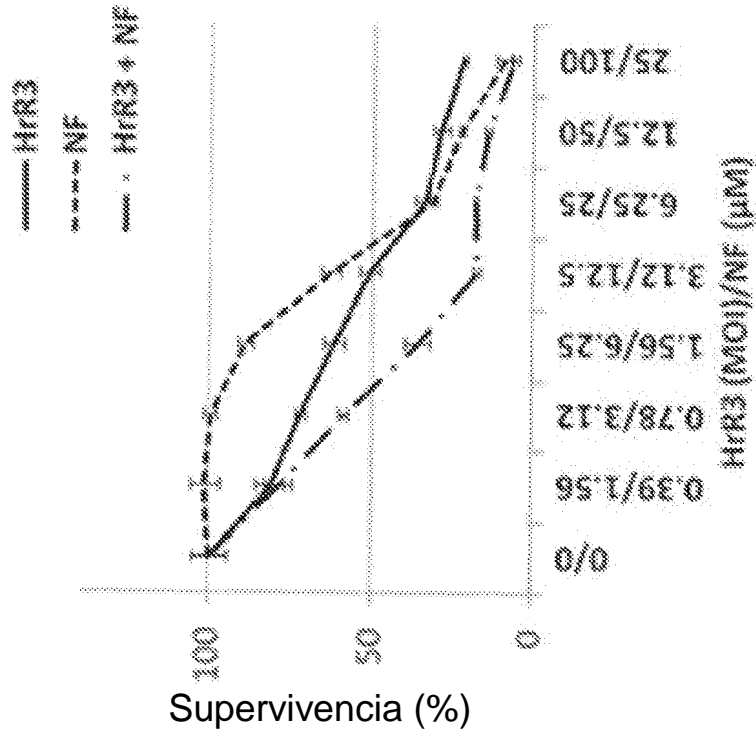
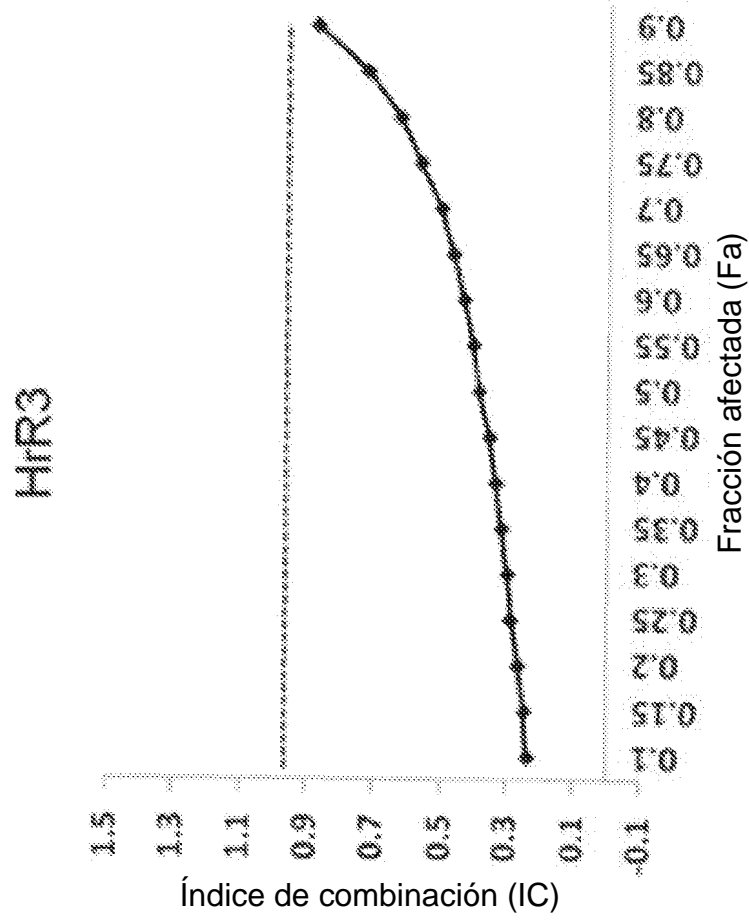


FIG. 7H

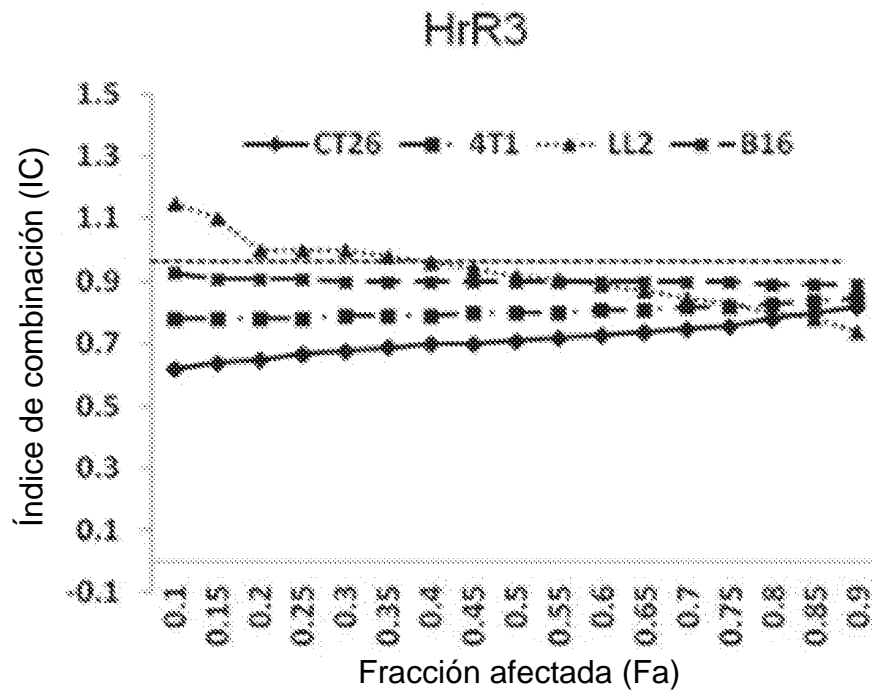


FIG. 7I

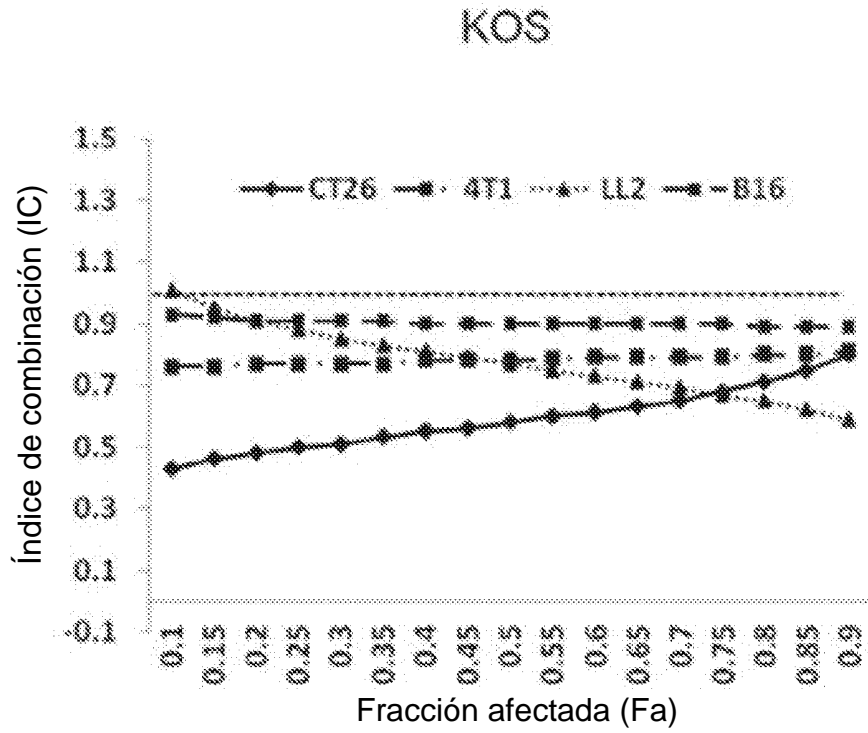


FIG. 7J

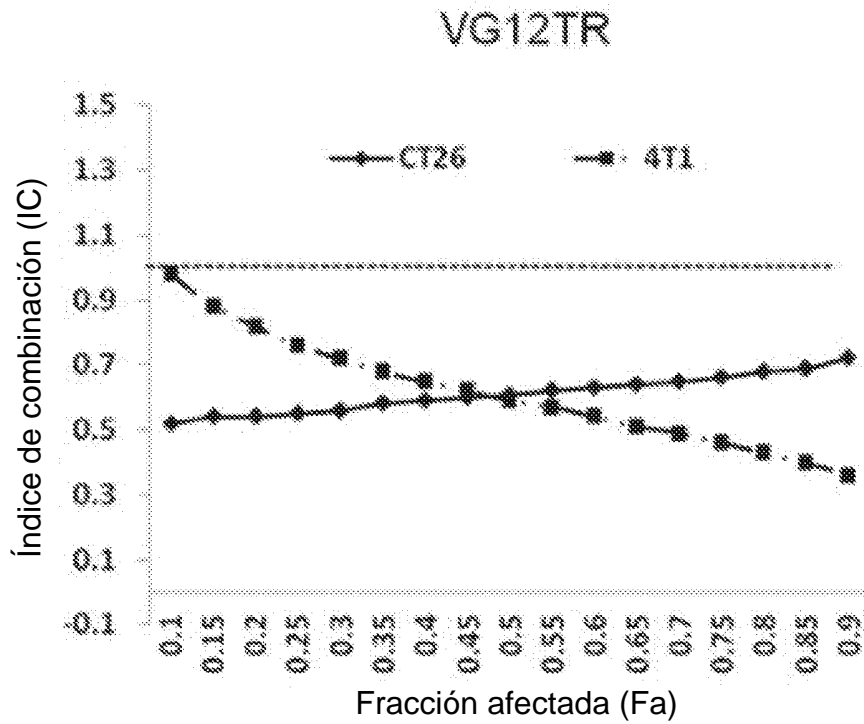


FIG. 7K

Índice de reducción de la dosis (IRD)						
Líneas celulares	Tratamiento	Fracción afectada (Fa)				
		10%	25%	50%	75%	90%
U87	NF	9.79058	5.84153	3.48533	2.07952	1.24074
	HrR3	7.22698	8.35938	9.66922	11.1843	12.9368
CT26	NF	3.23603	2.84872	2.50776	2.20761	1.94339
	HrR3	3.30837	3.79045	4.34278	4.97558	5.70060
4T1	NF	7.36522	5.25826	3.75404	2.68013	1.91343
	HrR3	1.03615	1.88983	3.44685	6.28667	11.4662
LL2	NF	1.53103	1.47209	1.41542	1.36094	1.30855
	HrR3	7.57187	8.30038	9.09899	9.97443	10.9341

FIG. 7L

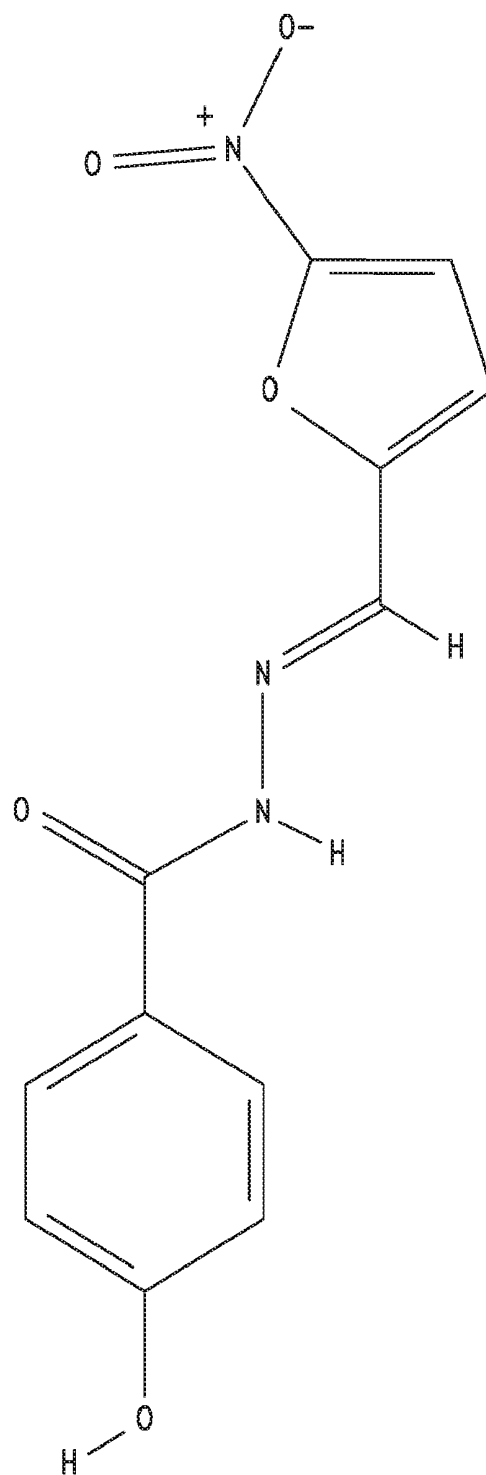


FIG. 8

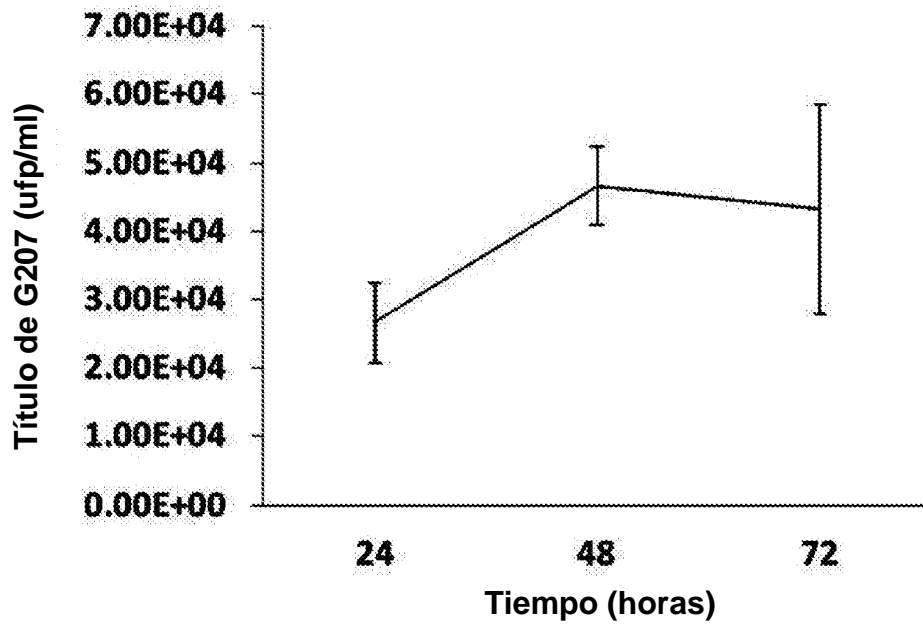


FIG. 9A

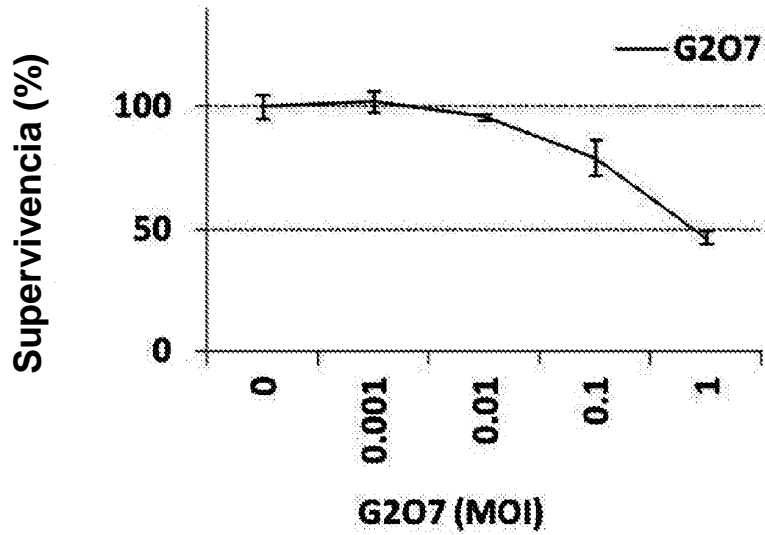


FIG. 9B

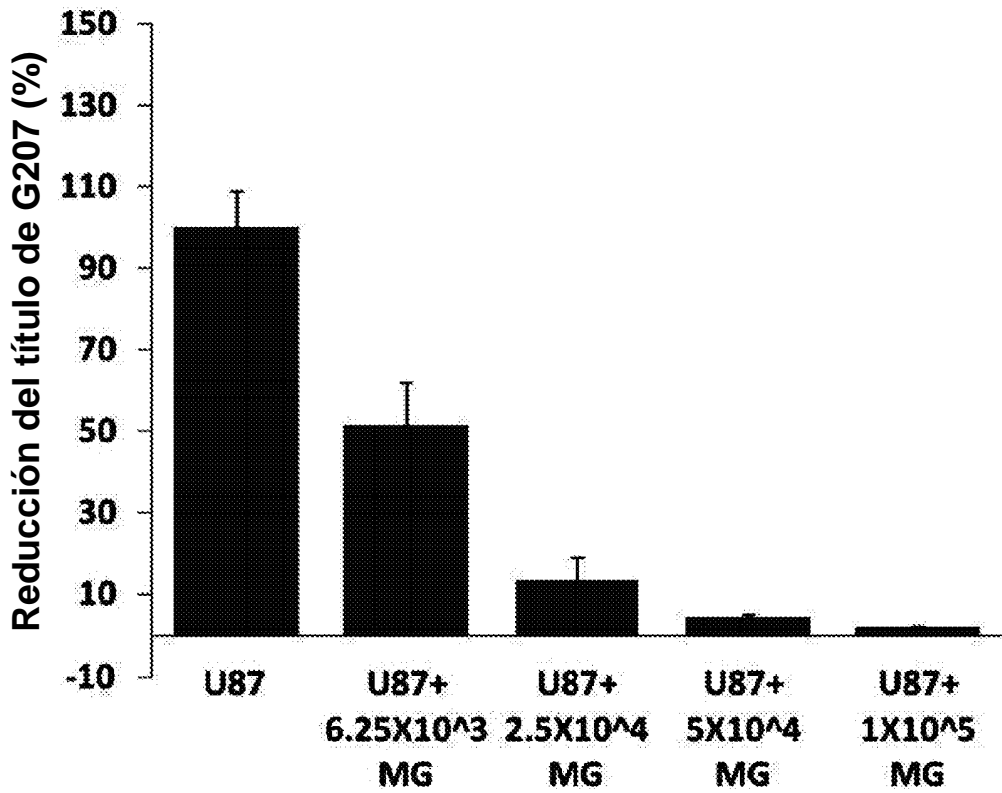


FIG. 9C

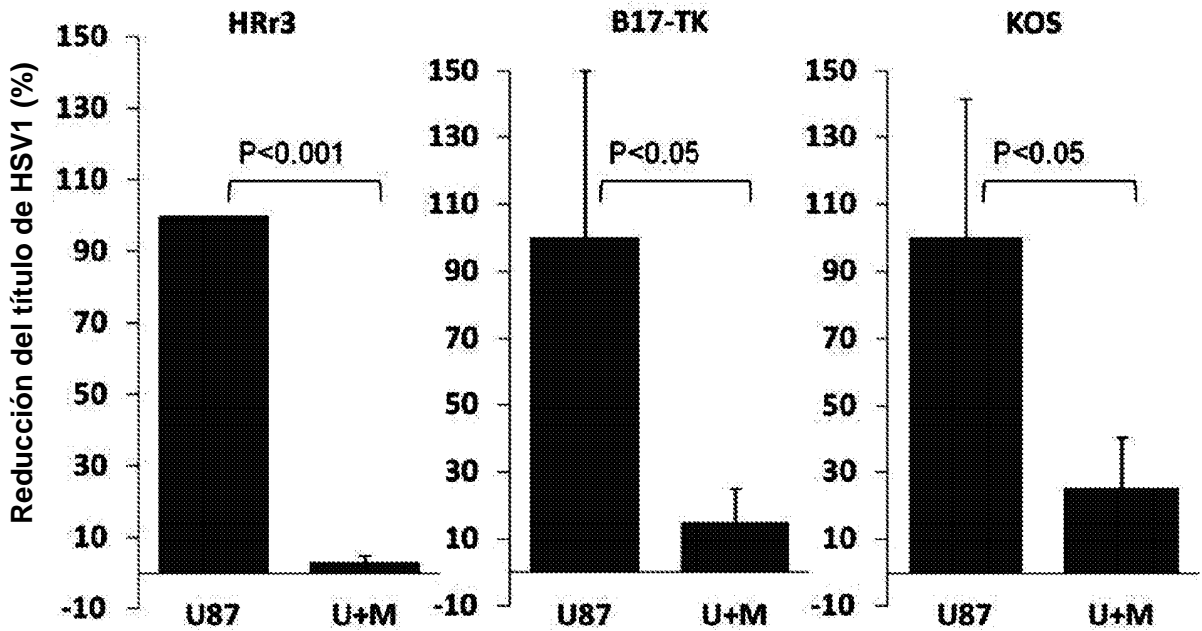


FIG. 9D

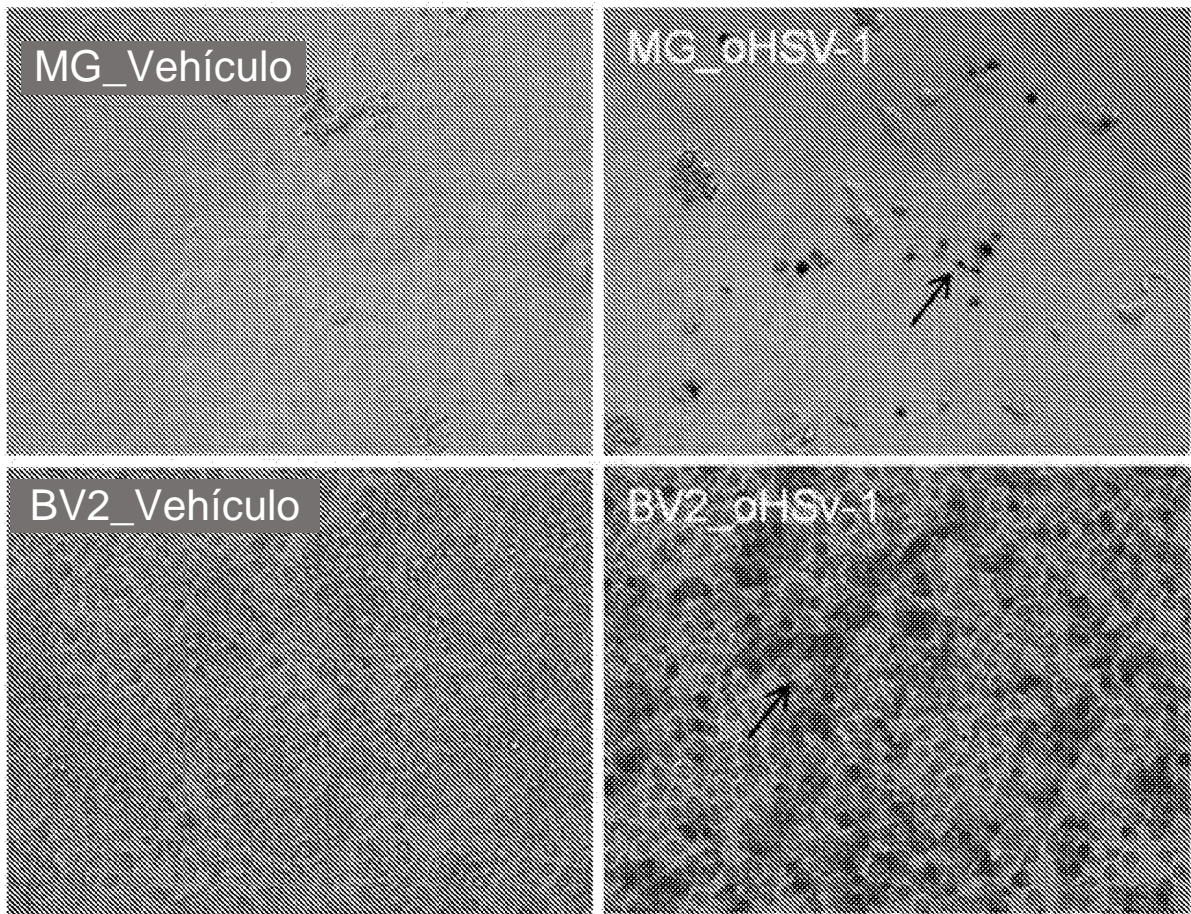


FIG. 10A

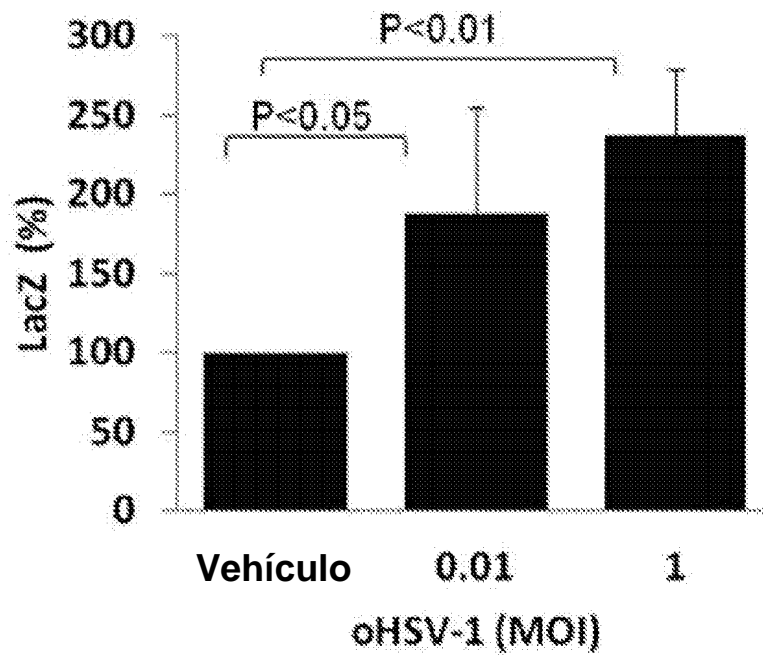


FIG. 10B

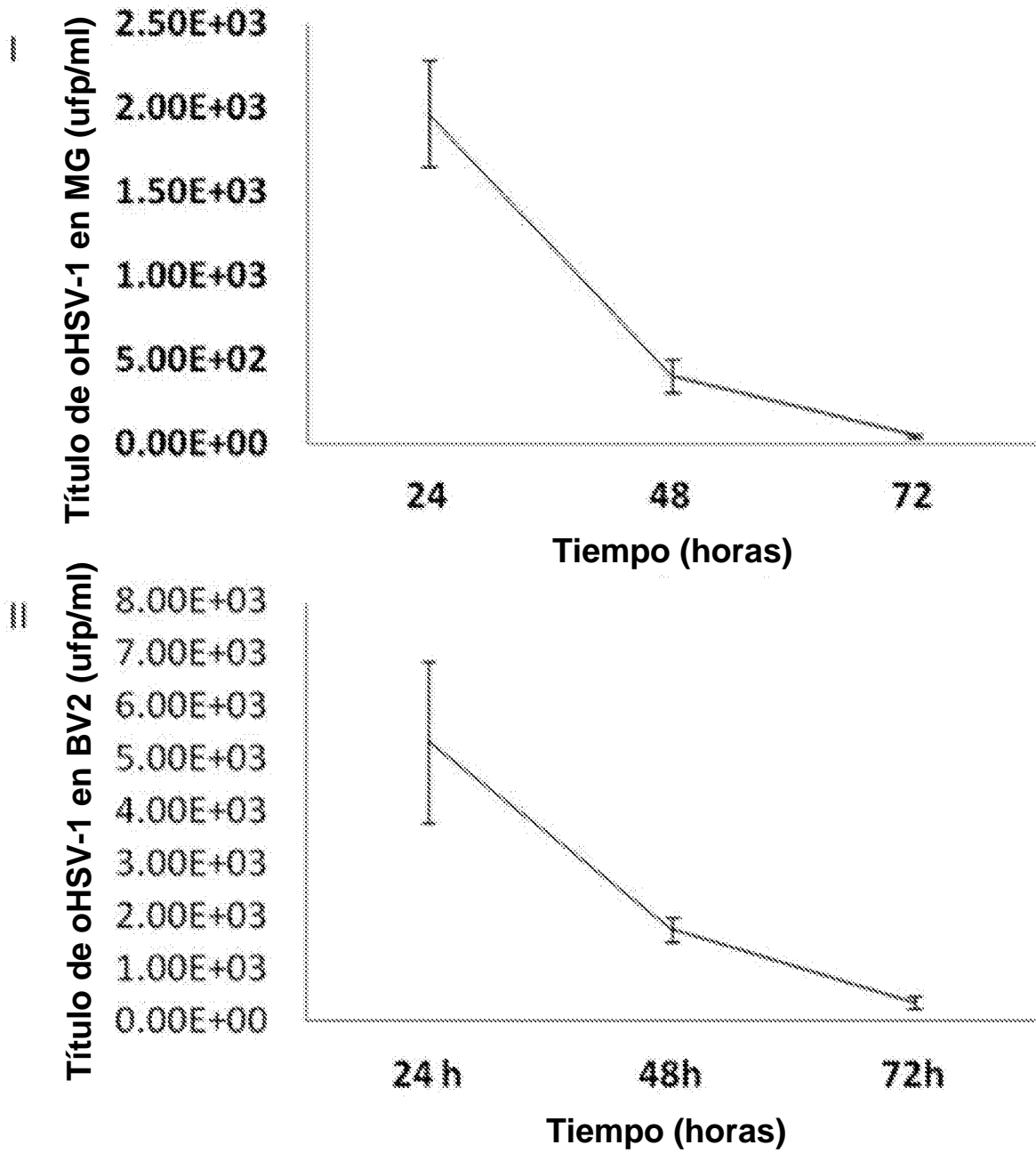


FIG. 10C

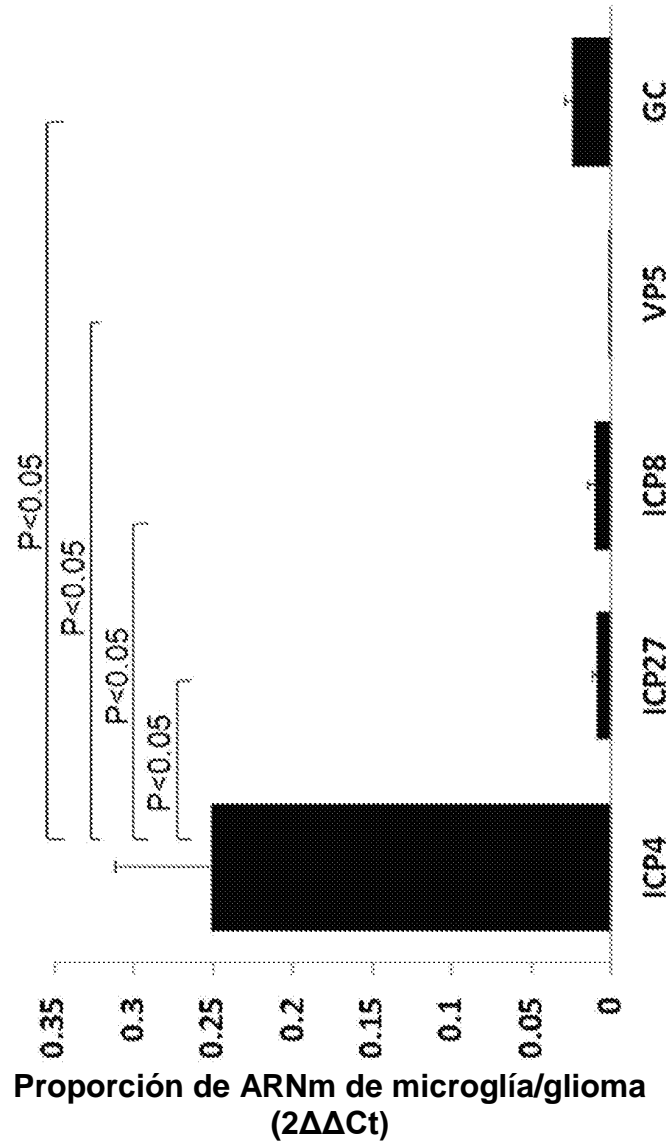


FIG. 11

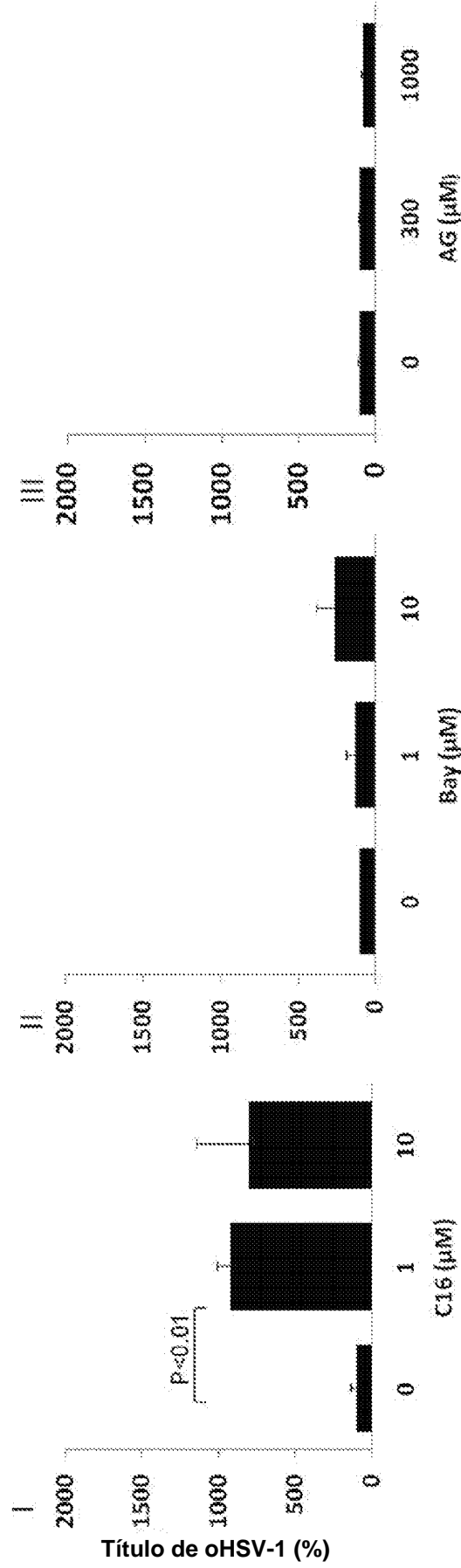


FIG. 12A

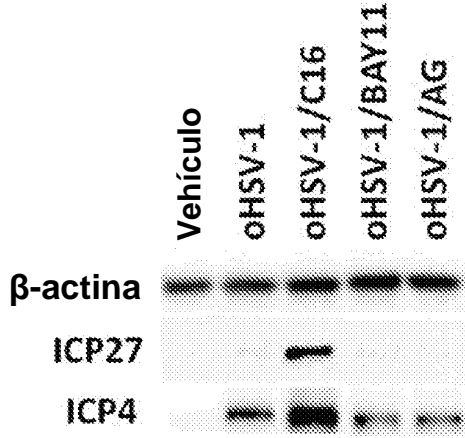


FIG. 12B

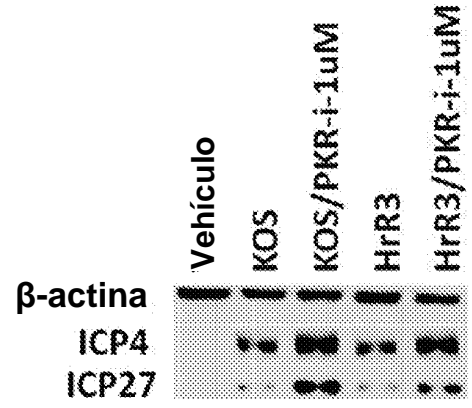


FIG. 12C

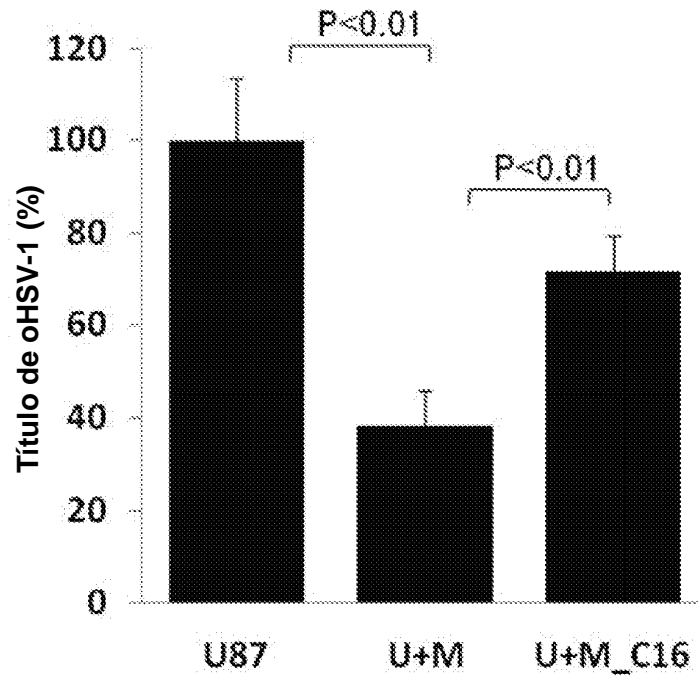


FIG. 12D

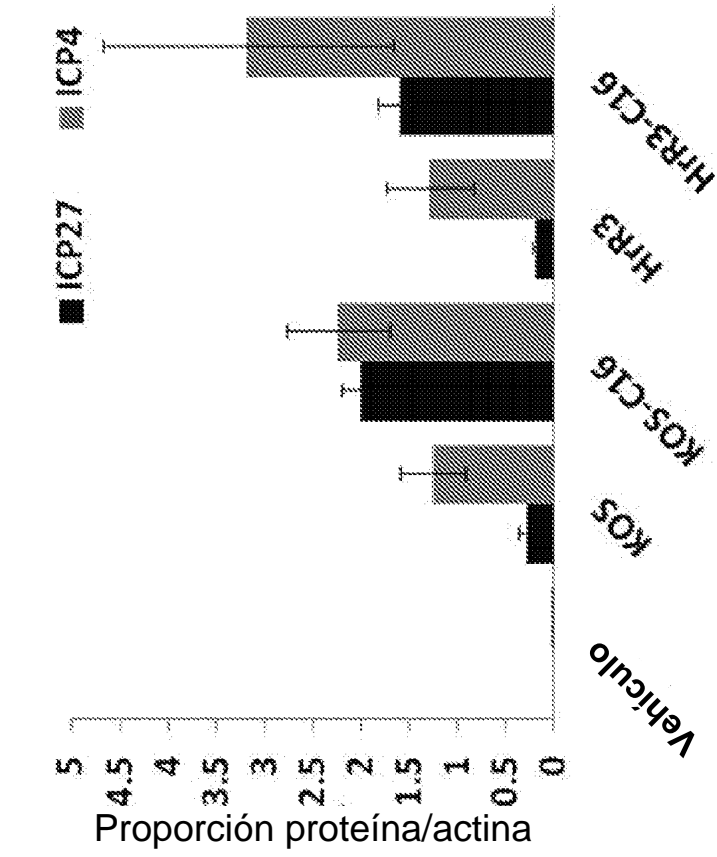


FIG. 12F

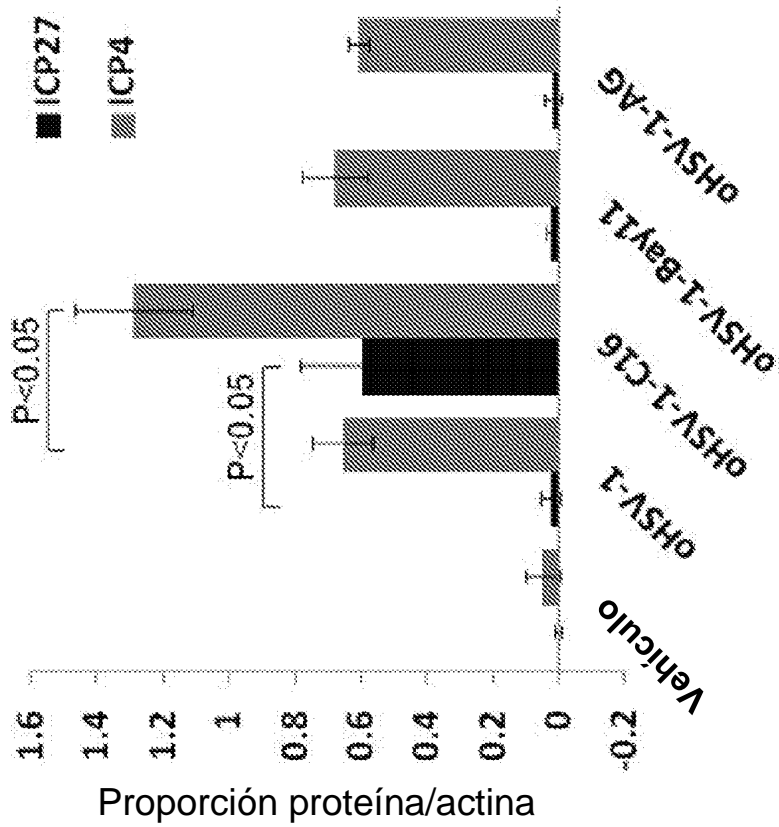


FIG. 12E

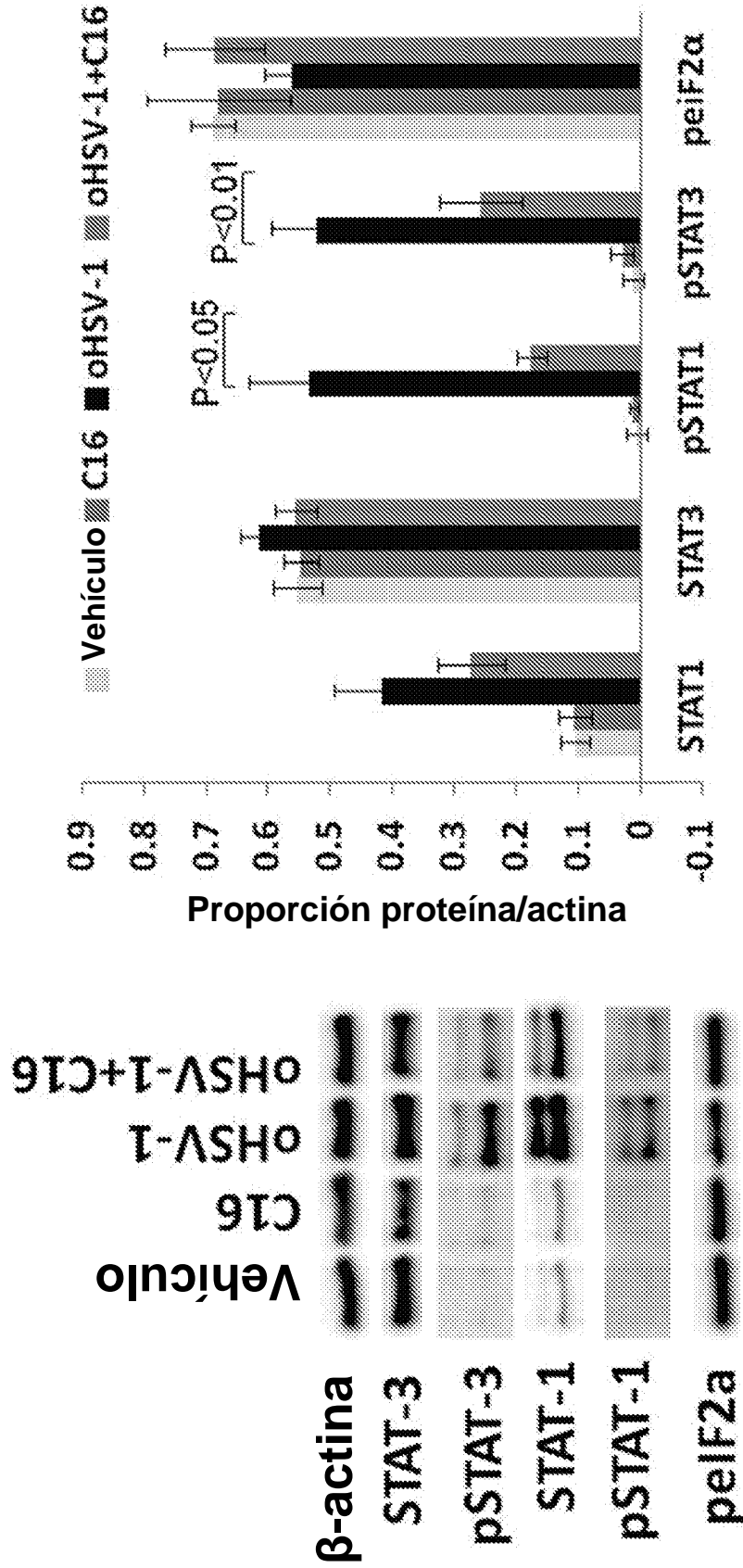


FIG. 13B

FIG. 13A

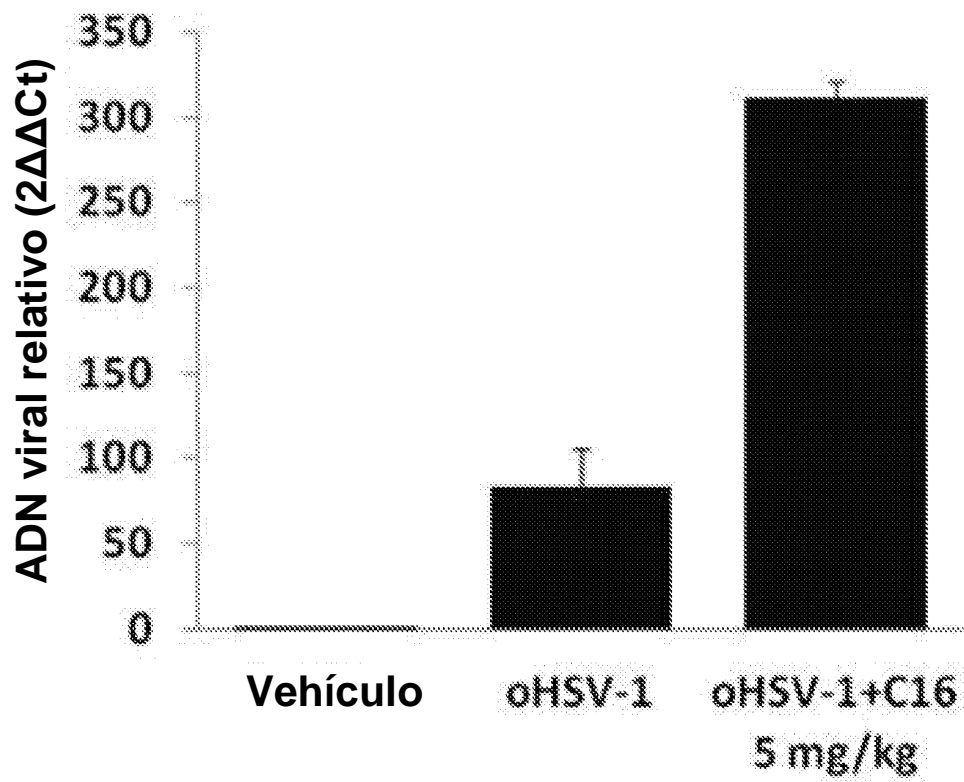


FIG. 14A

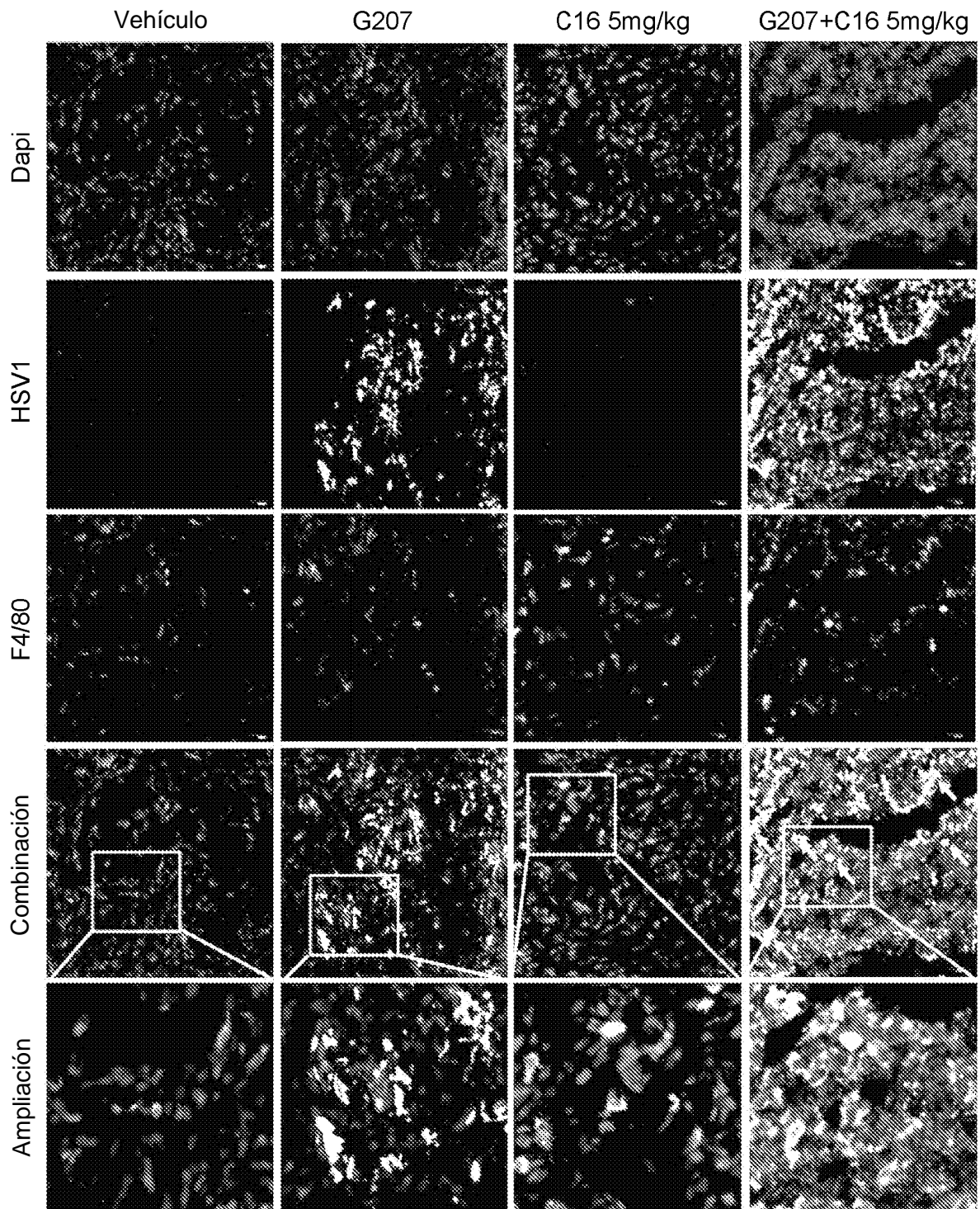


FIG. 14B

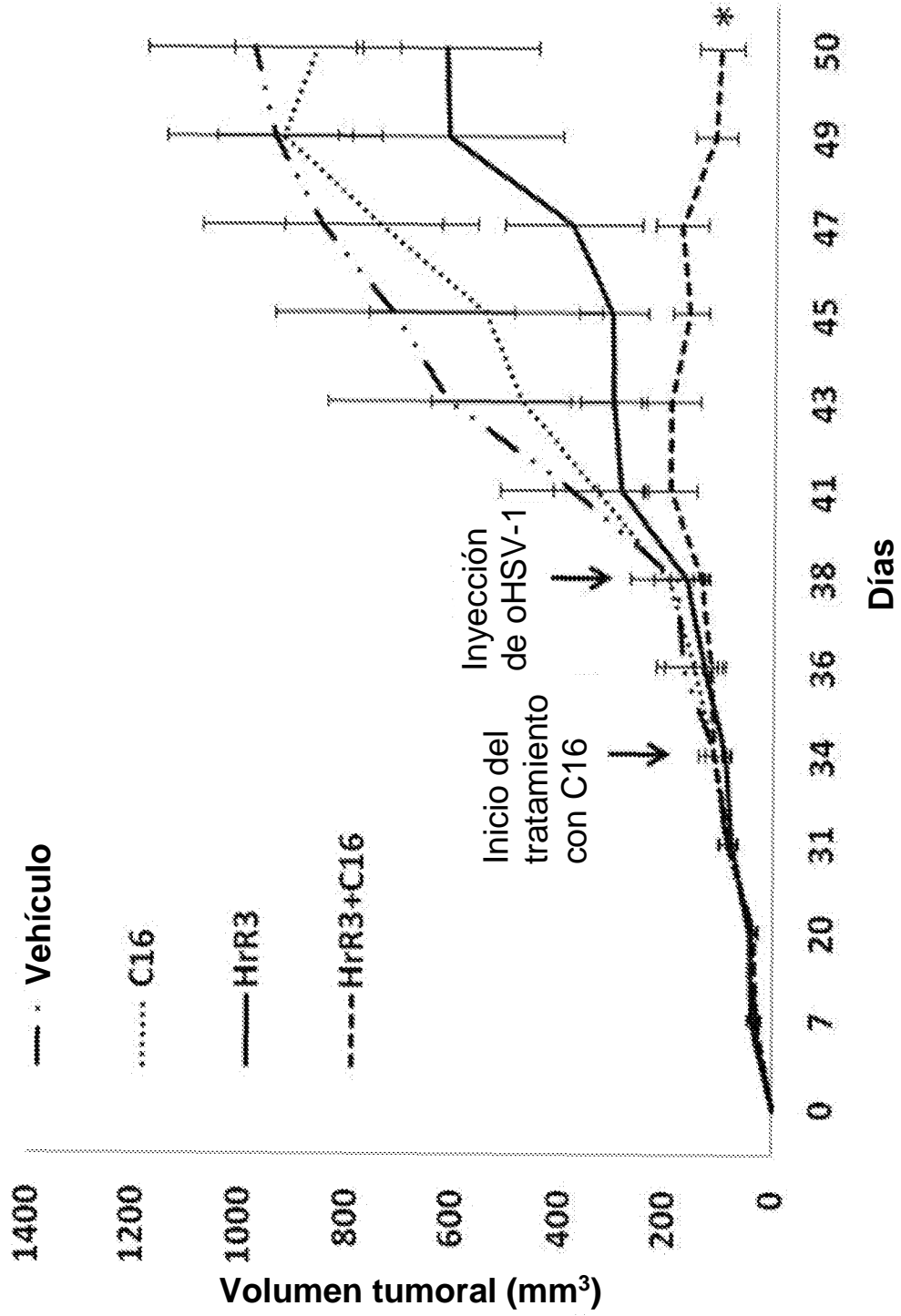


FIG. 15A

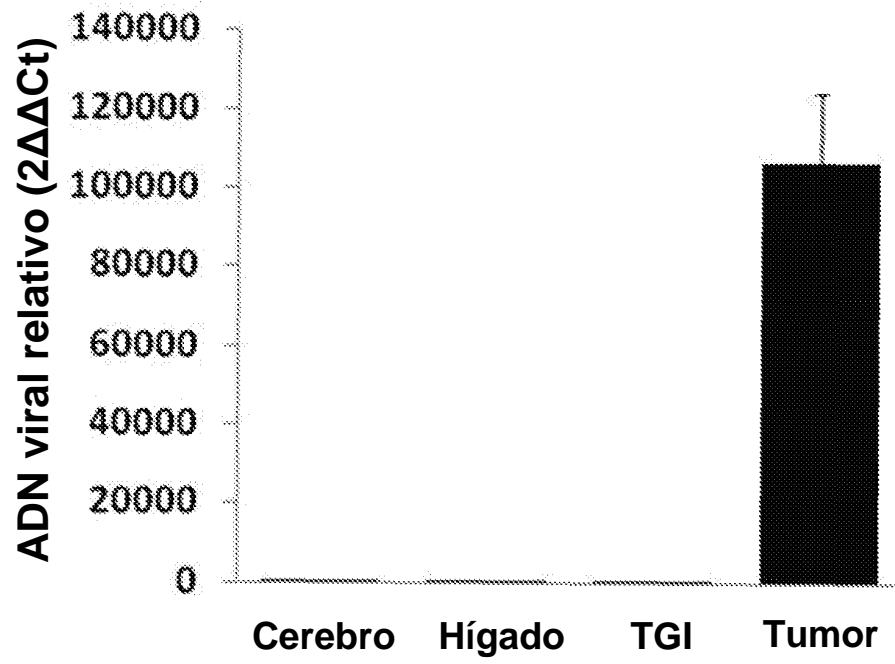


FIG. 15B

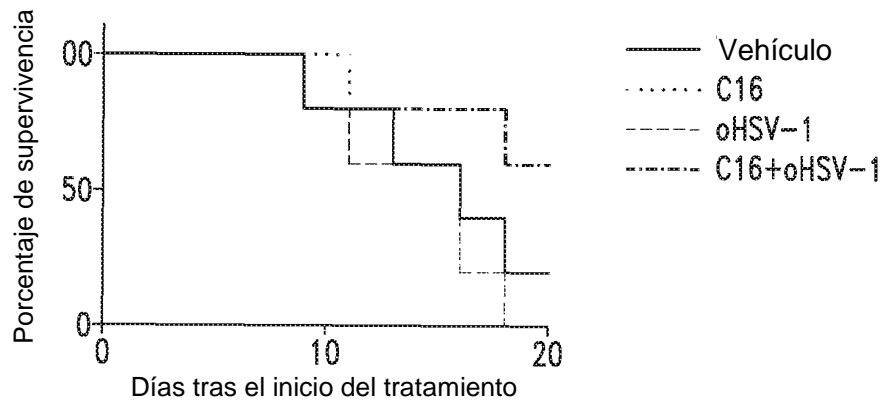


FIG. 15C

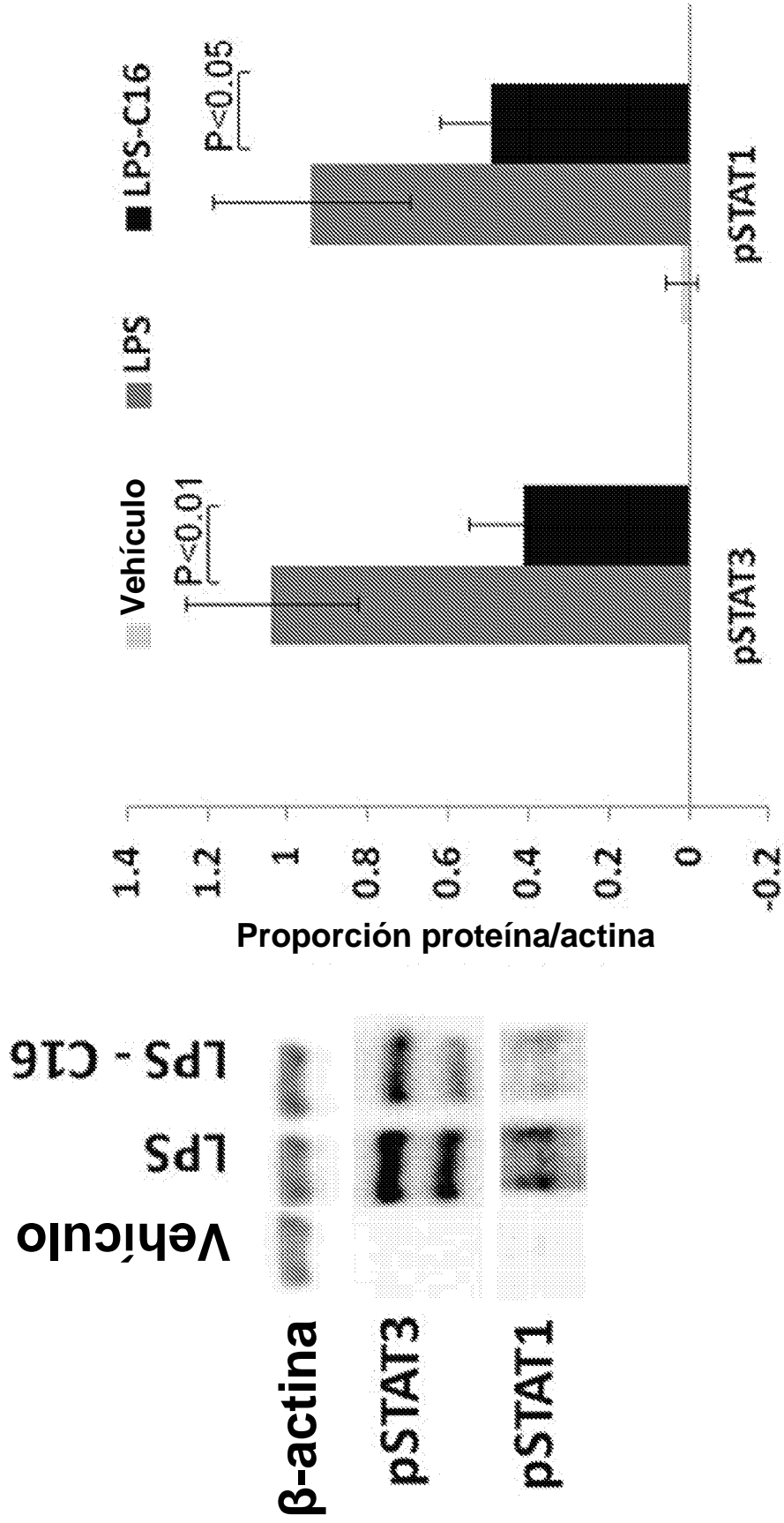


FIG. 16

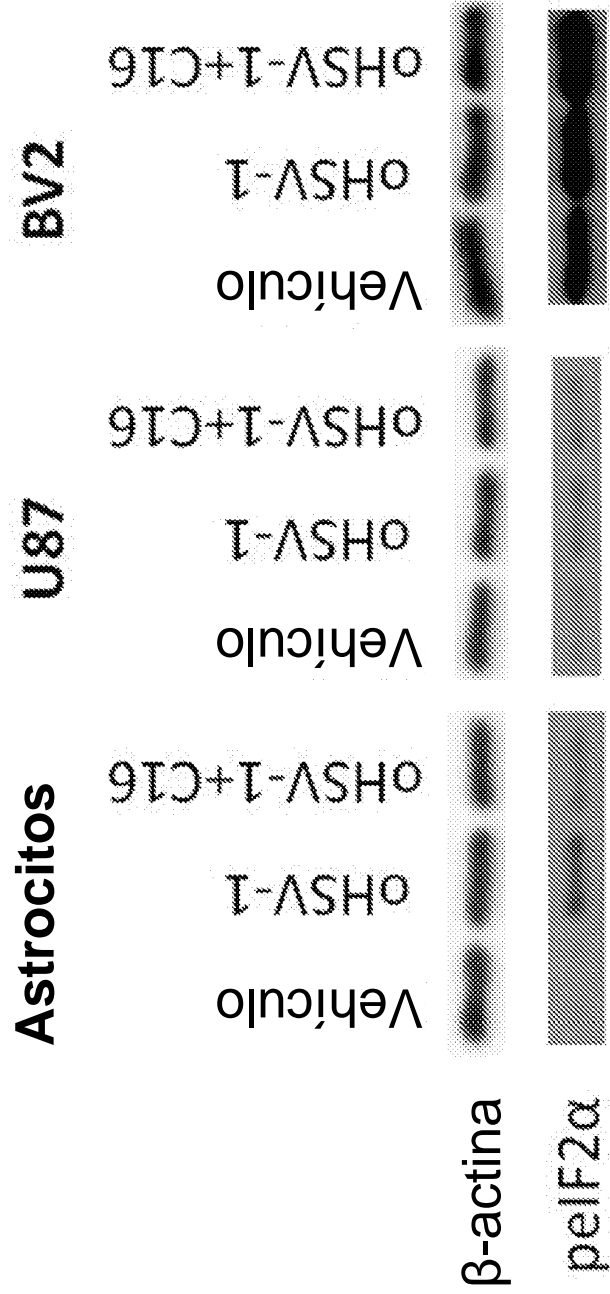


FIG. 17

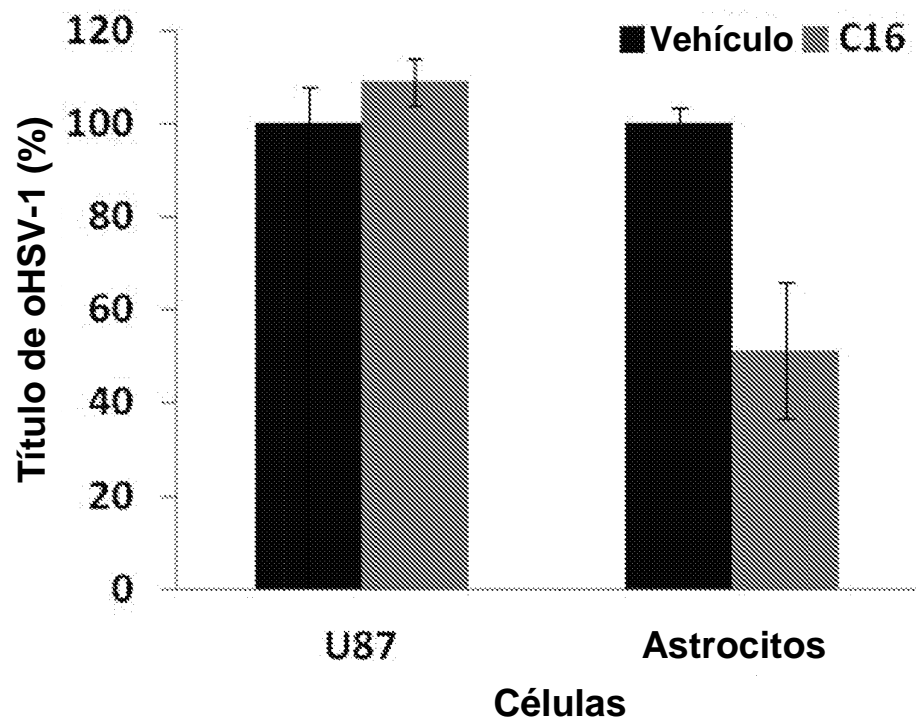


FIG. 18

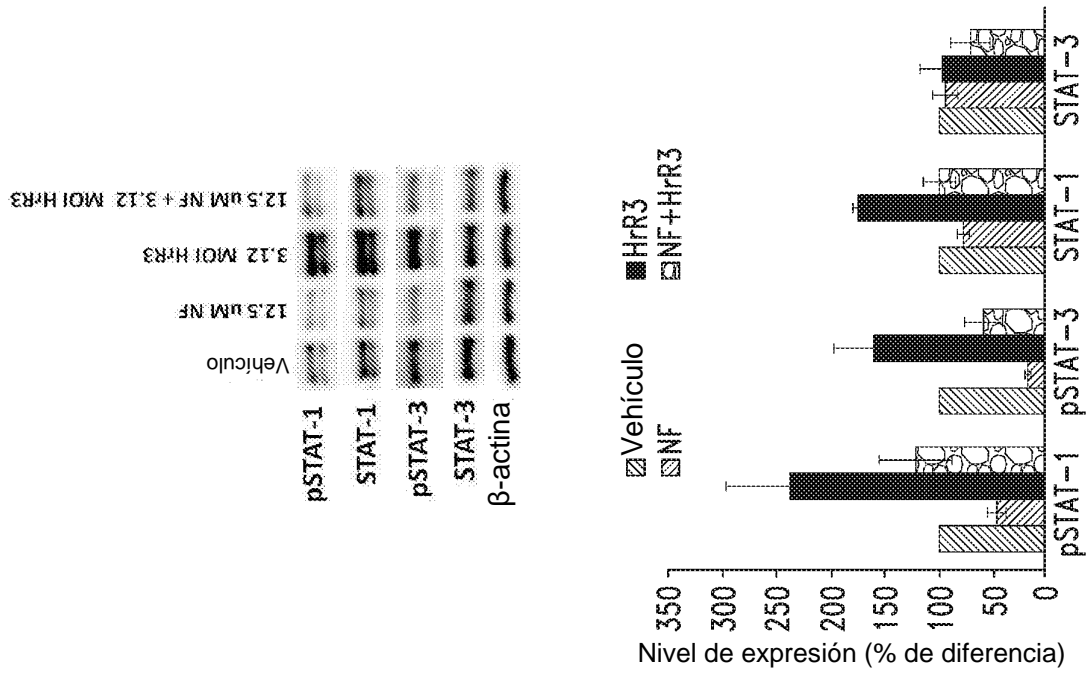


FIG. 19B

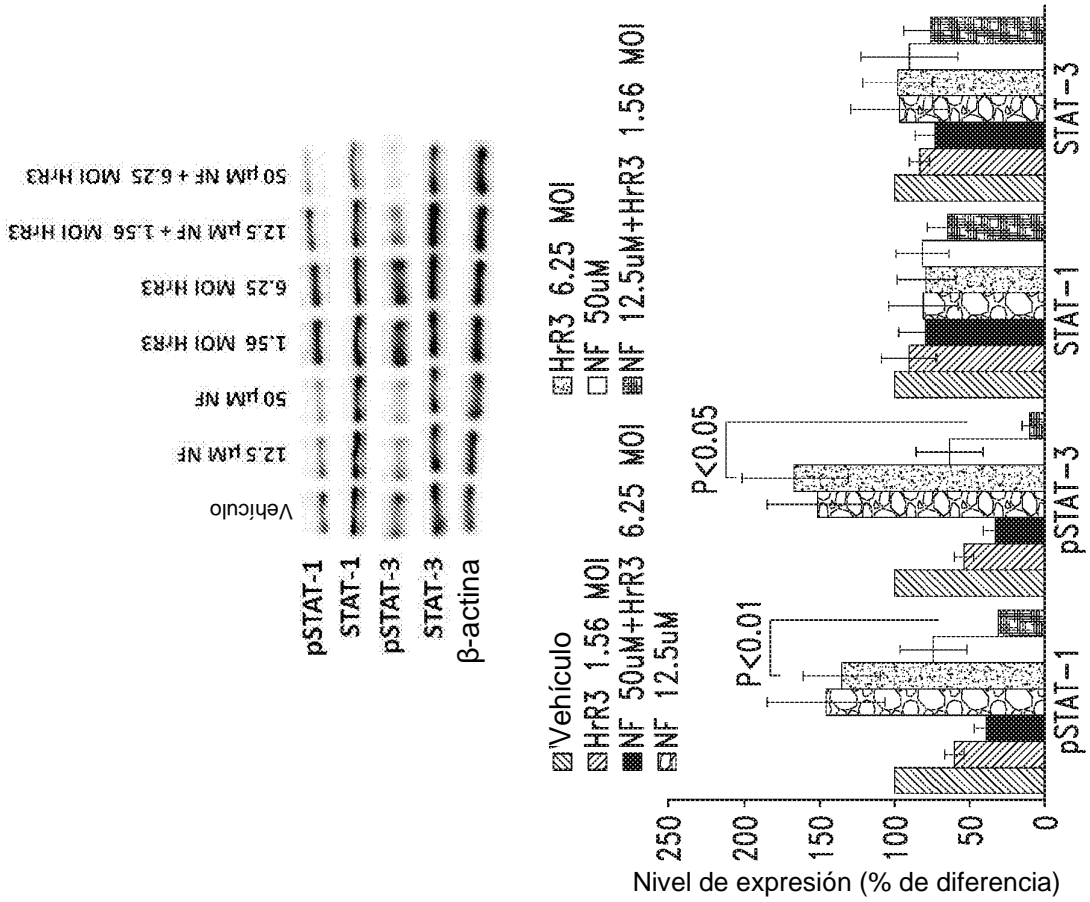


FIG. 19A

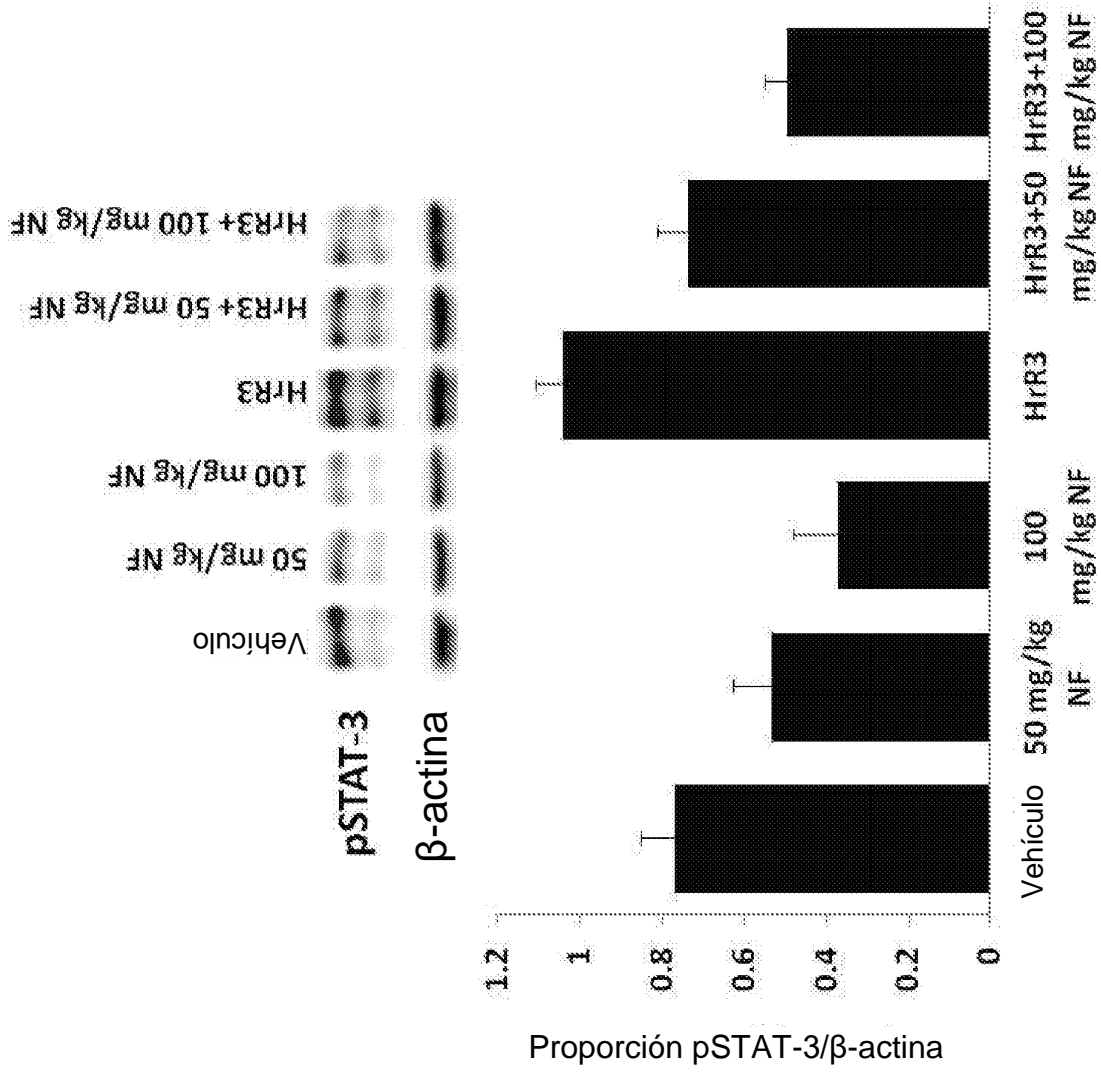


FIG. 19C

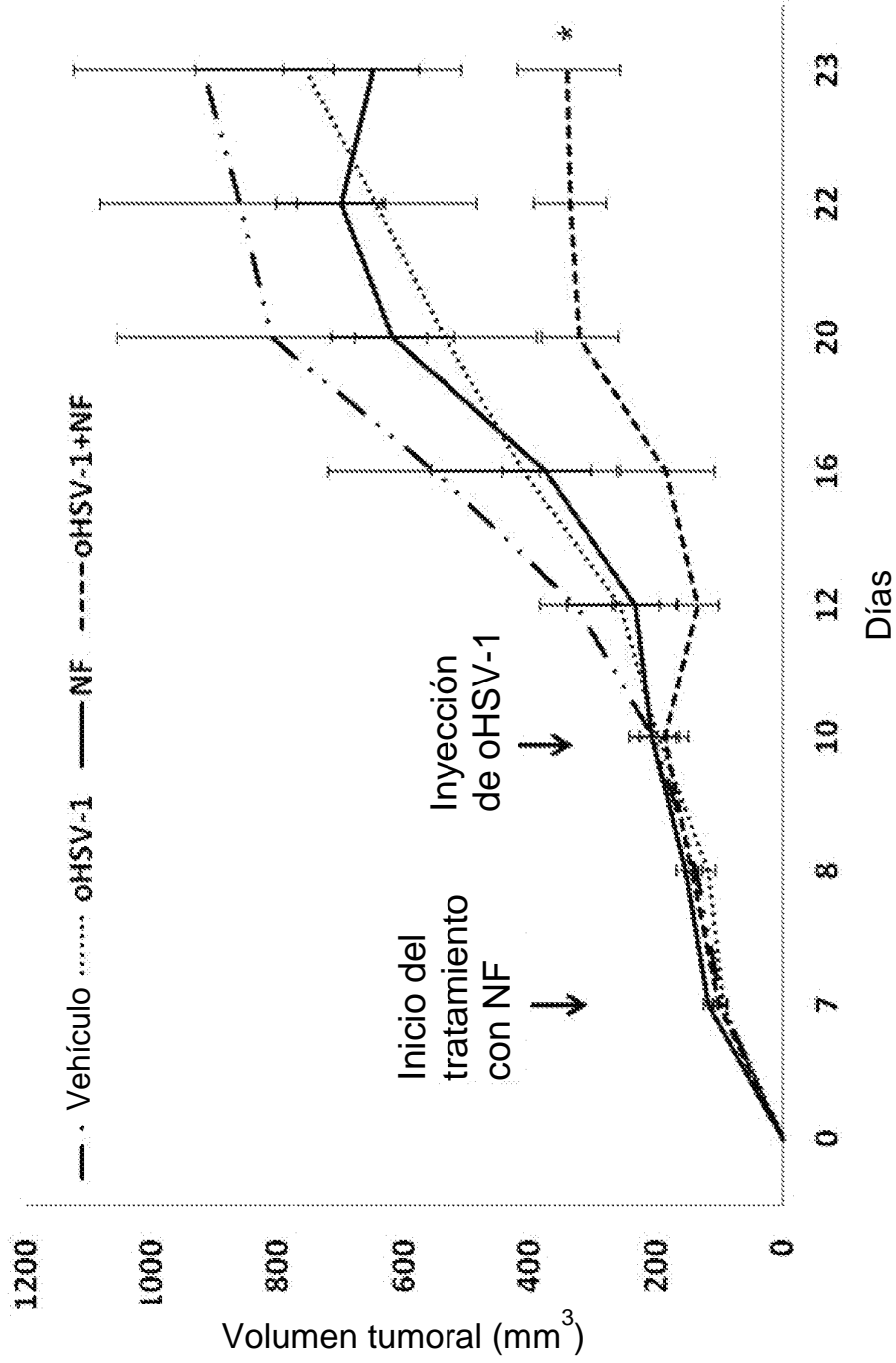


FIG. 20

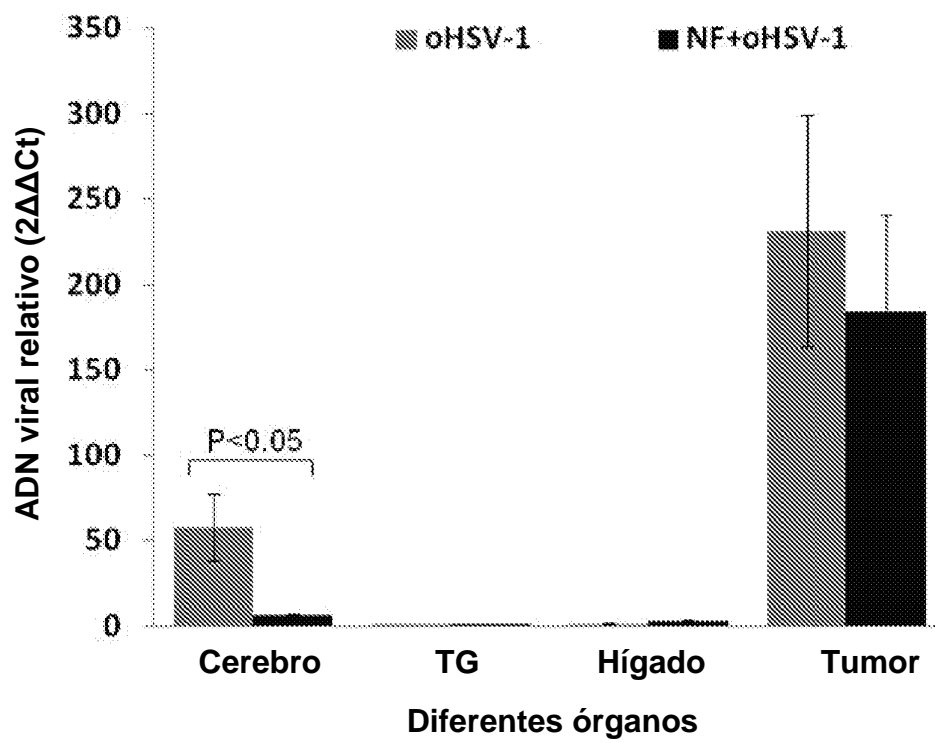


FIG. 21A

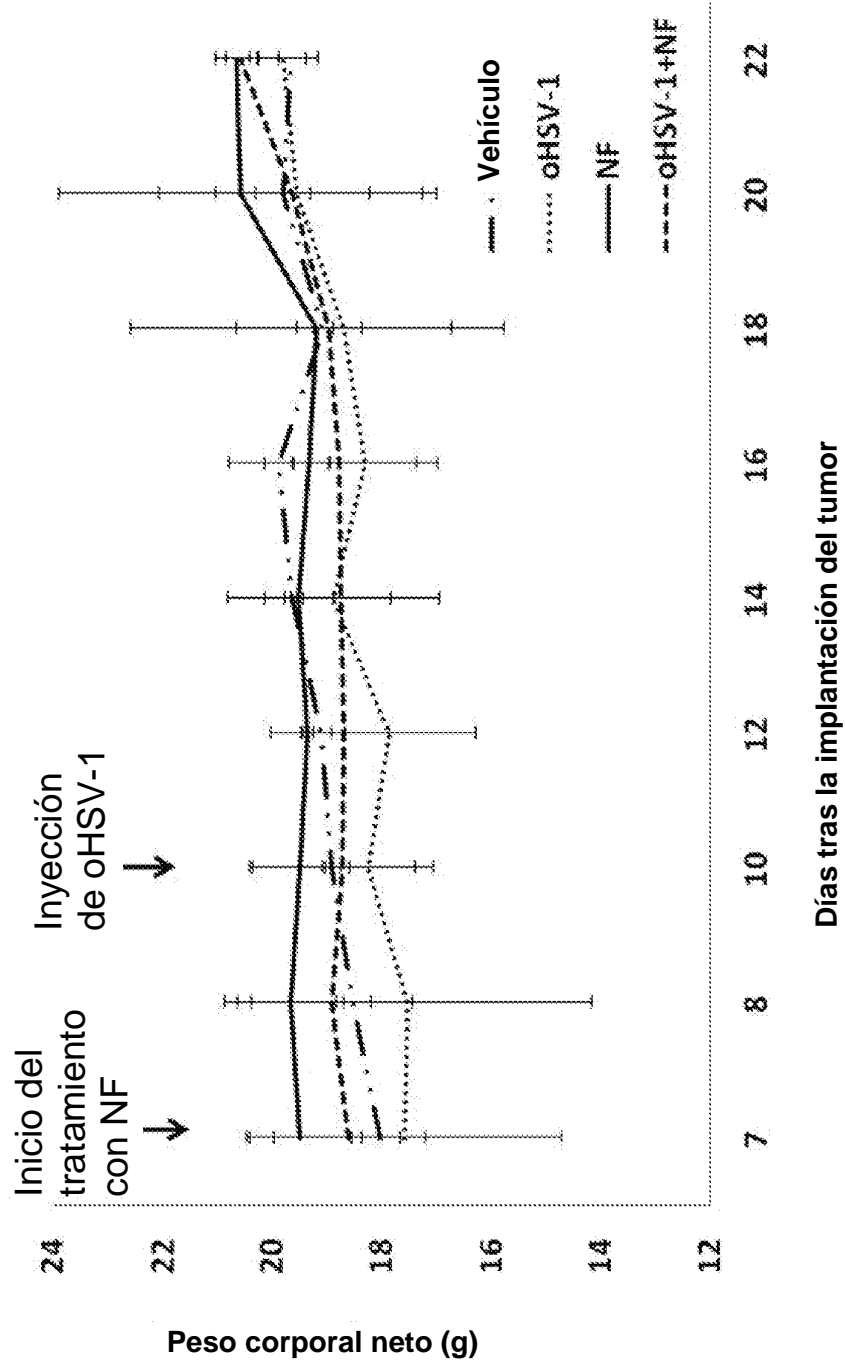


FIG. 21B