

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 976 989**

51 Int. Cl.:

A61K 35/768 (2015.01)

A61K 35/761 (2015.01)

A61K 35/763 (2015.01)

A61K 31/17 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2019 PCT/KR2019/002376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2019 WO19168346**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2019 E 19761185 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2024 EP 3760213**

54 Título: **Composición farmacéutica para prevenir o tratar el cáncer que comprende virus antineoplásicos e hidroxycarbamida como componentes eficaces**

30 Prioridad:

28.02.2018 KR 20180024461

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

14.08.2024

73 Titular/es:

**BIONOXX INC. (100.0%)
1905-ho, 248 Jeongjail-ro, Bundang-gu
Seongnam-si, Gyeonggi-do 13554, KR**

72 Inventor/es:

**HWANG, TAE-HO y
CHO, MONG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 976 989 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para prevenir o tratar el cáncer que comprende virus antineoplásicos e hidroxycarbamida como componentes eficaces

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica y a un kit para usar en la prevención o el tratamiento del cáncer, que comprende, como principios activos, un virus oncolítico e hidroxycarbamida.

10

Antecedentes de la técnica

Los virus oncolíticos tienen una excelente capacidad para dirigirse específicamente a los tumores, capacidad de proliferación en las células cancerosas y capacidad citotóxica sobre las células cancerosas. Recientemente se han llevado a cabo varios estudios clínicos basados en virus oncolíticos. En 2015 comenzó una era en el campo de los virus oncolíticos en Estados Unidos y Europa, cuando talimogene laherparepvec (T-Vec), que es un virus oncolítico basado en el virus del herpes simple, se comercializó con éxito como agente terapéutico para el melanoma avanzado.

15

Recientemente, la utilidad de los virus oncolíticos supera su propia eficacia y los virus activan la inmunidad tumoral, mostrando así su potencial como agente terapéutico que se utiliza junto con otro agente inmunoterápico. Hasta el año 2000 se encontraba en una fase temprana de desarrollo de los virus oncolíticos, un efecto citotóxico directo de los virus, que era causado por la proliferación específica en las células cancerosas de los mismos, era relativamente más importante. Sin embargo, estudios clínicos posteriores han descubierto que la activación de la inmunidad tumoral es un mecanismo clave más que un efecto citotóxico directo sobre las células cancerosas. Tomando como base este hallazgo, recientemente se están desarrollando agentes terapéuticos que incluyen un virus oncolítico y un agente inmunoterápico tal como un inhibidor del punto de control inmunitario, siendo ambos administrados conjuntamente. Esto se debe a que se sabe que los virus oncolíticos convierten el microambiente tumoral, en el que se suprime la inmunidad, en un microambiente tumoral apropiado para la inmunoterapia.

20

25

Sin embargo, hasta el momento, en muchos estudios clínicos de virus oncolíticos, el microambiente tumoral no se ha tenido en cuenta. En estudios clínicos, el tratamiento con un virus oncolítico puede dar como resultado una necrosis tumoral aguda, una respuesta duradera o una respuesta completa, pero en algunos casos, puede conducir a un resultado difícil de predecir (variabilidad farmacodinámica), tal como una enfermedad progresiva o una muerte prematura. A modo de ilustración, con Pexa-vec, a base de virus de la variolovacuna, existe un caso en el que un paciente murió prematuramente en el plazo de un mes tras el tratamiento con un virus oncolítico en un ensayo clínico de fase 1.

30

35

Por lo tanto, con el fin de mejorar el efecto terapéutico de un virus oncolítico, es necesario comprender las interacciones entre las células cancerosas, el estado inmunitario del paciente y el virus oncolítico; y, tomando como base esta comprensión, es necesario investigar técnicas que puedan aumentar la eficacia clínica del virus oncolítico.

40

El documento WO 2017/205674 A1 se refiere a mutantes oncolíticos del virus de la variolovacuna y a su uso para el tratamiento del cáncer. El documento US 2014/234257 A1 se refiere a virus oncolíticos y a métodos para el tratamiento de trastornos neoplásicos. El documento US 2009/317456 A1 se refiere al uso de virus oncolíticos y agentes antiangiogénicos en el tratamiento del cáncer.

45

Divulgación de la invención

Problema técnico

50

Los presentes inventores estudiaron cómo potenciar el efecto antineoplásico de un virus oncolítico. Como resultado, los presentes inventores han descubierto que en un caso en el que el virus oncolítico y la hidroxycarbamida se administran juntos a un individuo que padece cáncer, se consigue un efecto antineoplásico superior en comparación con un caso convencional en el que se administra únicamente el virus oncolítico, y por lo tanto, se ha completado la presente invención.

55

Solución al problema

Con el fin de resolver el problema técnico anterior, en un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento del cáncer como se define en la reivindicación 1. En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para usar en la prevención o el tratamiento del cáncer como se define en la reivindicación 5.

60

Efectos ventajosos de la invención

65

La composición farmacéutica de la presente invención para usar en la prevención o el tratamiento del cáncer, como

se define en las reivindicaciones adjuntas, tiene un efecto antineoplásico y una seguridad superiores en comparación con un caso convencional en el que se administra únicamente el virus oncolítico, es capaz de suprimir el crecimiento de las células cancerosas resistentes al virus oncolítico, y es capaz de eliminar las células cancerosas en las que el virus oncolítico puede proliferar. Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención para usar en la prevención o el tratamiento del cáncer puede utilizarse eficazmente para tratar el cáncer.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1, 6, 12 y 16-19 no refieren a realizaciones de la invención.

La Fig. 1 ilustra los resultados obtenidos al someter 13 estirpes celulares cancerosas a un tratamiento con un virus oncolítico (OTS-412) y observando a continuación la viabilidad celular de las mismas.

La Fig. 2 ilustra los resultados obtenidos al administrar, a ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino (Renca I), un virus oncolítico (VV^{tk-}), factor estimulante de colonias de granulocitos humano recombinado genéticamente (rhG-CSF) e hidroxycarbamida (HU), y midiendo a continuación el tamaño del tumor de los ratones.

La Fig. 3 ilustra los resultados obtenidos al administrar, a ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino (Renca I), un virus oncolítico (VV^{tk-}), rhG-CSF e HU, y midiendo a continuación el peso corporal de los ratones.

La Fig. 4 ilustra esquemáticamente un esquema experimental para identificar un efecto terapéutico antineoplásico obtenido mediante la administración combinada de un virus oncolítico (VV^{tk-}) e HU en ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino (Renca II).

La Fig. 5 ilustra los resultados obtenidos al administrar un virus oncolítico (VV^{tk-}) e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino (Renca II) y midiendo a continuación el tamaño del tumor de los ratones.

La Fig. 6 ilustra los resultados obtenidos mediante la administración sistémica de un virus oncolítico (WRVV^{tk-}) e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino (Renca III), y midiendo a continuación el tamaño del tumor de los ratones.

La Fig. 7 ilustra los resultados obtenidos al administrar un virus oncolítico (OTS-412) e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino (4T1) y midiendo a continuación el tamaño del tumor de los ratones.

La Fig. 8 ilustra los resultados obtenidos al administrar un virus oncolítico (OTS-412) e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino (4T1) y contando a continuación el número de nódulos que aparecen en la superficie del tumor en los ratones, que fueron sacrificados 18 días después.

La Fig. 9 ilustra los resultados obtenidos al administrar un virus oncolítico (OTS-412) e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino (4T1) y midiendo a continuación los cambios en el peso corporal durante 21 días.

La Fig. 10 ilustra los resultados obtenidos al administrar un virus oncolítico (OTS-412) y una dosis alta de HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino (4T1) y midiendo a continuación el tamaño del tumor.

La Fig. 11 ilustra los resultados obtenidos al administrar un virus oncolítico (OTS-412) y una dosis alta de HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino (4T1) y midiendo a continuación la supervivencia.

La Fig. 12 ilustra los resultados obtenidos al administrar un virus oncolítico (OTS-412) e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer de pulmón humano (NCI-H460) y midiendo a continuación el tamaño del tumor durante 15 días.

La Fig. 13 ilustra los resultados obtenidos al administrar un virus oncolítico (OTS-412) e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer colorrectal humano (HCT-116), y midiendo a continuación el tamaño del tumor durante 28 días.

La Fig. 14 ilustra los resultados obtenidos al administrar un virus oncolítico (OTS-412) e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer colorrectal humano (HCT-116) y comparando a continuación las imágenes tumorales de los ratones de los respectivos grupos el día 17 después de la administración.

La Fig. 15 ilustra los resultados obtenidos al administrar un virus oncolítico (OTS-412) e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer colorrectal humano (HCT-116) y comparando a continuación las imágenes tumorales de los ratones de los respectivos grupos el día 28 después de la administración.

La Fig. 16 ilustra las imágenes obtenidas al administrar un virus oncolítico (OTS-412) e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer colorrectal humano (HT-29) y realizando a continuación una tinción de H&E de la totalidad del tumor del ratón.

5 La Fig. 17 ilustra imágenes obtenidas al administrar un virus oncolítico (OTS-412) e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer colorrectal humano (HT-29) y realizando a continuación la tinción TUNEL del tejido tumoral.

10 La Fig. 18 ilustra los resultados obtenidos al administrar el virus del herpes simple 1 (VHS1) e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino y midiendo a continuación el tamaño del tumor.

La Fig. 19 ilustra los resultados obtenidos al administrar adenovirus e HU a ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino y midiendo a continuación el tamaño del tumor.

15 Mejor modo de llevar a cabo la invención

En lo sucesivo en el presente documento, se describirá con detalle la presente invención.

20 En un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento del cáncer como se define en la reivindicación 1. En otros aspectos, se proporciona un kit para usar en la prevención o el tratamiento del cáncer como se define en la reivindicación 5.

25 El virus oncolítico y la hidroxycarbamida pueden administrarse juntos simultáneamente, secuencialmente o en orden inverso. En algunas realizaciones, el virus oncolítico y la hidroxycarbamida pueden administrarse simultáneamente.

30 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "virus oncolítico" se refiere a un virus recombinante que destruye las células cancerosas, obteniéndose el virus recombinante mediante la manipulación del gen de un virus para que prolifere específica y únicamente en las células cancerosas. El virus oncolítico para usar en la invención deriva de un virus de la variolovacuna.

35 El virus de la variolovacuna puede ser, pero sin limitación, las cepas Western Reserve (WR), virus de la variolovacuna de Nueva York (NYVAC), Wyeth (The New York City Board of Health; NYCBOH), LC16m8, Lister, Copenhagen, Tian Tan, USSR, Tashkent, Evans, International Health Division-J (IHD-J) o International Health Division-White (IHD-W) del virus de la variolovacuna.

40 El virus oncolítico puede ser un virus de la variolovacuna recombinante (VV^{tk-}) en el que no se insertan el gen del factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) ni el gen de la β -galactosidasa y en el que se elimina el gen de la timidina cinasa.

45 Además, el virus oncolítico puede ser un virus de la variolovacuna recombinante en el que se ha eliminado el gen de la timidina cinasa (TK) y en el que se ha insertado el gen del GM-CSF humano o del G-CSF humano.

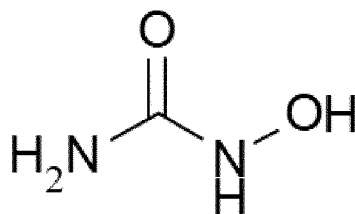
50 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "timidina cinasa (TK)" se refiere a una enzima implicada en la biosíntesis de nucleótidos. La TK es una enzima utilizada para la biosíntesis de nucleótidos tanto en células como en virus. Aquí, para las células, la TK no existe en las células normales porque las células normales ya no se dividen, e incluso en células que se dividen rápidamente, tales como las células de las raíces pilosas, la cantidad de TK no es suficiente para que la utilicen los virus. Utilizando estos hallazgos, hacer que el gen de la TK sea defectuoso en un virus permite que el virus prolifere únicamente en el caso de que haya TK en las células cancerosas, para que el virus pueda eliminar selectivamente únicamente a las células cancerosas.

55 Como se utiliza en el presente documento, el término "GM-CSF" se refiere al factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, una proteína secretada por macrófagos, linfocitos T, mastocitos, linfocitos citolíticos naturales, células endoteliales y fibroblastos. El GM-CSF estimula a las células madre para que produzcan granulocitos (neutrófilos, basófilos, eosinófilos) y monocitos. Además, el GM-CSF aumenta bruscamente el número de macrófagos y, por tanto, induce una respuesta inmunitaria. El GM-CSF puede ser de origen humano y puede ser una proteína que tenga la secuencia del GenBank: AAA52578.1.

60 Como se utiliza en el presente documento, el término "G-CSF" se refiere al factor estimulante de colonias de granulocitos, una citocina producida por macrófagos, fibroblastos, células endoteliales y similares, tras la estimulación provocada por una inflamación o una endotoxina. El G-CSF promueve la producción de neutrófilos. El G-CSF puede ser de origen humano (rhGCSF) y puede ser una proteína que tenga la secuencia del GenBank: AAA03056.1.

65 Como se utiliza en el presente documento, el término "hidroxycarbamida" se refiere a un compuesto que tiene la siguiente fórmula.

[Fórmula 1]



5 Aunque el mecanismo exacto de la hidroxycarbamida no se ha esclarecido, es conocido como un agente antineoplásico que inhibe la síntesis del ADN. Además, la hidroxycarbamida puede estar contenida en una composición farmacéutica en forma de medicamento comercializado que contiene hidroxycarbamida. El medicamento comercializado que contiene hidroxycarbamida puede ser, pero sin limitación, Hydroxyurea®, Hydrea®, Droloxia™, Mylocel™, Siklos® o Hydrine Capsule.

10 Una dosis del virus oncolítico puede variar dependiendo del estado del individuo y su peso corporal, la gravedad de la enfermedad, el tipo de fármaco, la vía y la duración de la administración, y puede seleccionarse apropiadamente por los expertos en la materia. A los pacientes se les puede administrar el virus oncolítico como de 1×10^5 a 1×10^{18} partículas de virus, unidades víricas infecciosas (TCID50) o unidades formadoras de placa (ufp). Específicamente, los virus oncolíticos pueden administrarse a una dosis de 1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 ,
15 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} o más partículas víricas, unidades víricas infecciosas, o unidades formadoras de placa, y pueden incluirse diferentes números e intervalos entre los mismos. Preferentemente, el virus oncolítico puede administrarse a una dosis de 1×10^5 a 1×10^{10} ufp. Más preferentemente, el virus oncolítico puede administrarse a una dosis igual o superior a 1×10^5 e inferior a 1×10^9 ufp. En una realización de la presente invención,
20 el virus oncolítico se administró a 1×10^5 o 1×10^7 ufp.

La hidroxycarbamida de uso en la invención se administra a una dosis de 20 mg/kg/día a 90 mg/kg/día. Específicamente, la hidroxycarbamida puede administrarse a una dosis de 20 mg/kg/día a 50 mg/kg/día. En una realización de la presente invención, la hidroxycarbamida se administró a 20 mg/kg/día, 30 mg/kg/día, 60 mg/kg/día o
25 90 mg/kg/día.

El cáncer puede ser un cáncer sólido o una neoplasia hemática. Específicamente, en donde el cáncer sólido puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, melanoma maligno, cáncer tímico, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vejiga, cáncer de recto, cáncer de vesícula biliar, cáncer biliar y cáncer pancreático. Además, la neoplasia hemática puede ser una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en linfoma, leucemia aguda y mieloma múltiple.
30

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además un portador fisiológicamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además los excipientes y diluyentes adecuados utilizados habitualmente en la preparación de composiciones farmacéuticas. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse en forma de una inyección de acuerdo con los métodos y usos convencionales.
35

La composición farmacéutica puede ser un preparado para administración parenteral, e incluir soluciones acuosas estériles, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, preparaciones liofilizadas, supositorios y similares. Como disolventes y suspensiones no acuosos, pueden utilizarse propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, éster inyectable tal como oleato de etilo, y similares. Como bases para los supositorios, pueden utilizarse Witepsol, macrogol, Tween 61, grasa de cacao, grasa de laurina, glicerogelatina, y similares.
40

Con respecto a la vía de administración, la dosis y la frecuencia de administración, la composición farmacéutica puede administrarse a un sujeto en diversos métodos y cantidades dependiendo del estado del paciente y de la presencia o ausencia de efectos secundarios; y el método óptimo de administración, la dosis y la frecuencia de administración pueden ser seleccionados dentro de los intervalos apropiados por los expertos en la materia. Además, la composición farmacéutica puede administrarse junto con otros fármacos o sustancias fisiológicamente activas cuyo efecto terapéutico sea conocido para la enfermedad que se va a tratar, o puede formularse en forma de un preparado combinado con otros fármacos.
45

La composición farmacéutica se puede administrar por vía parenteral, tal como mediante un método apropiado, incluida la administración por vía intratumoral, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, intranodal o intravenosa. Preferentemente, la administración puede ser una administración por vía intratumoral, intraperitoneal o intravenosa. Por otra parte, una dosis de la composición farmacéutica puede determinarse dependiendo del programa de administración, la dosis, el estado salud del paciente y similares.
50

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para prevenir o tratar el cáncer como se define en la reivindicación 5.

5 El virus oncolítico es como se ha descrito anteriormente para la composición farmacéutica.

La segunda composición que comprende hidroxycarbamida como principio activo puede ser un medicamento comercializado. El medicamento comercializado que incluye hidroxycarbamida como principio activo puede ser Hydroxyurea®, Hydrea®, Droloxia™, Mylocel™, Siklos® o Hydrine Capsule.

10 Una dosis del virus oncolítico puede variar dependiendo del estado del individuo y su peso corporal, la gravedad de la enfermedad, el tipo de fármaco, la vía y la duración de la administración, y puede seleccionarse apropiadamente por los expertos en la materia. A los pacientes se les puede administrar el virus oncolítico como de 1×10^5 a 1×10^{18} partículas de virus, unidades víricas infecciosas (TCID₅₀) o unidades formadoras de placa (ufp). Específicamente, los virus oncolíticos pueden administrarse a una dosis de 1×10^5 , 2×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 5×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 5×10^9 , 1×10^{10} , 5×10^{10} , 1×10^{11} , 5×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} , o más partículas víricas, unidades víricas infecciosas, o unidades formadoras de placa, y pueden incluirse diferentes números e intervalos entre los mismos. Preferentemente, el virus oncolítico puede administrarse a una dosis de 1×10^5 a 1×10^{10} ufp. Más preferentemente, el virus oncolítico puede administrarse a una dosis igual o superior a 1×10^5 e inferior a 1×10^9 ufp. En una realización de la presente invención, la primera composición se administró a 1×10^5 o 1×10^7 ufp.

25 Además, la segunda composición que comprende hidroxycarbamida se administra a una dosis de 20 mg/kg/día a 90 mg/kg/día. Específicamente, la segunda composición que comprende hidroxycarbamida puede administrarse a una dosis de 20 mg/kg/día a 50 mg/kg/día. En una realización de la invención, la segunda composición que comprende hidroxycarbamida se administró a 20 mg/kg/día, 25 mg/kg/día, 30 mg/kg/día, 60 mg/kg/día o 90 mg/kg/día.

30 El cáncer puede ser un cáncer sólido o una neoplasia hemática. Específicamente, en donde el cáncer sólido puede ser uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, melanoma maligno, cáncer tímico, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vejiga, cáncer de recto, cáncer de vesícula biliar, cáncer biliar y cáncer pancreático. Además, la neoplasia hemática puede ser una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en linfoma, leucemia aguda y mieloma múltiple.

35 La primera composición y la segunda composición pueden comprender además un portador fisiológicamente aceptable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además los excipientes y diluyentes adecuados utilizados habitualmente en la preparación de composiciones farmacéuticas. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse en forma de una inyección de acuerdo con los métodos y usos convencionales.

40 La primera composición y la segunda pueden ser preparados para administración parenteral, e incluyen soluciones acuosas estériles, disolventes no acuosos, suspensiones, emulsiones, preparaciones liofilizadas, supositorios y similares. Como disolventes y suspensiones no acuosos, pueden utilizarse propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, éster inyectable tal como oleato de etilo, y similares. Como bases para los supositorios, pueden utilizarse Witepsol, macrogol, Tween 61, grasa de cacao, grasa de laurina, glicerogelatina, y similares.

45 Con respecto a la vía de administración, la dosis y la frecuencia de administración, la primera composición y la segunda composición pueden administrarse a un sujeto en diferentes métodos y cantidades dependiendo del estado del paciente y de la presencia o ausencia de efectos secundarios; y el método óptimo de administración, la dosis y la frecuencia de administración pueden ser seleccionados dentro de los intervalos apropiados por los expertos en la materia. Además, la composición farmacéutica puede administrarse junto con otros fármacos o sustancias fisiológicamente activas cuyo efecto terapéutico sea conocido para la enfermedad que se va a tratar, o puede formularse en forma de un preparado combinado con otros fármacos.

55 La primera composición y la segunda composición pueden administrarse por vía parenteral, tal como mediante un método apropiado, incluida la administración por vía intratumoral, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica, intranodal o intravenosa. Preferentemente, la administración puede ser una administración por vía intratumoral, intraperitoneal o intravenosa. Por otra parte, las dosis de la primera composición y de la segunda composición pueden determinarse dependiendo del programa de administración, la dosis, el estado salud del paciente y similares.

60 Además, la primera composición puede administrarse dos veces, y puede administrarse a un individuo a intervalos de 7 a 30 días. Específicamente, la primera composición puede administrarse a intervalos de 7 días, 14 días, 21 días o 30 días.

65 Cuando la primera composición y la segunda composición se administran secuencialmente o en orden inverso, la segunda composición puede administrarse de forma continua una vez al día a partir de 3 a 5 días antes de la

administración de la primera composición, y puede administrarse de forma continua una vez al día durante 9 a 28 días a partir de 24 horas después de la administración de la primera composición.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término "individuo" se refiere a una persona que padece cáncer o que tiene una enfermedad cuya afección puede aliviarse, inhibirse o tratarse mediante la administración de la composición farmacéutica de la presente invención.

10 Como se utiliza en el presente documento, el término "administración" se refiere a la introducción de una cantidad eficaz de una sustancia en un individuo de una forma adecuada, y la administración del virus oncolítico y la hidroxycarbamida puede conseguirse a través de las vías generales que les permitan alcanzar el tejido objetivo.

15 Además, el virus oncolítico y la hidroxycarbamida pueden administrarse junto con otros fármacos o sustancias fisiológicamente activas cuyo efecto terapéutico sea conocido para la enfermedad que se va a tratar, o pueden formularse en forma de un preparado combinado con otros fármacos.

Modo para la invención

20 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle por medio de ejemplos. Sin embargo, los siguientes ejemplos son únicamente para ilustrar la presente invención, y la presente invención no se limita a los mismos. Los ejemplos I, IV, VIII, X, XI y XII no son realizaciones la invención.

Ejemplo de preparación 1. Producción de virus oncolíticos

25 Ejemplo de preparación 1.1. Construcción del vector plasmídico lanzadera

30 Para producir un virus oncolítico en el que se elimine el gen de la timidina cinasa (TK), se adquirieron los virus de la variolovacuna naturales, la especie NYC Department of Health (cepa Wyeth) y la especie Western Reserve, en la American Type Culture Collection (ATCC). Para la recombinación, la sustitución del sitio de la TK en los virus naturales se realizó utilizando, como vectores, un plásmido lanzadera que tiene el gen indicador de la luciferasa de luciérnaga (promotor p7.5), un plásmido lanzadera que tiene los genes indicadores de la luciferasa de luciérnaga y los genes de la timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV1-TK), y un plásmido lanzadera que tiene el gen de la GFP.

Ejemplo de preparación 1.2. Producción de virus de la variolovacuna recombinantes

35 Para obtener virus recombinantes, se sembraron células Hela (ATCC) en una placa de 6 pocillos a 4×10^5 células/pocillo y se cultivaron en medio EMEM que contenía un 10 % de suero bovino fetal. Posteriormente, se realizó un tratamiento con el virus de la variolovacuna natural a una MOI de 0,05. Después de 2 horas, el medio se sustituyó por medio EMEM que contenía un 2 % de suero bovino fetal, y a continuación se realizó la transfección con 4 μ g del vector plasmídico lanzadera, que se construye en el Ejemplo de preparación 1.1., y se linealiza, utilizando el polímero XfectTM (Clontech 631317, EE.UU.). Después de cultivar durante 4 horas, el medio se sustituyó por medio EMEM que contenía un 2 % de suero bovino fetal y, a continuación, las células se cultivaron adicionalmente durante 72 horas. Finalmente, se recogieron las células infectadas y a continuación se repitieron tres veces la congelación y la descongelación. A continuación, las células se lisaron por pulverización ultrasónica y se obtuvieron virus de la variolovacuna recombinantes aislados por el método del cojín de sacarosa. Los virus se denominaron VV^{tk-}, WRVV^{tk-}.

45 Posteriormente, con el fin de obtener virus de la variolovacuna recombinantes que contengan el gen HSV1-TK mutado, se indujo la mutación de HSV1-TK en la estirpe celular TK-osteosarcoma (osteosarcoma 143 TK-), en presencia de BrdU (análogo de timidina, 15 μ g/ml), a través de 10 pases sucesivos en un entorno bioquímico (presión de selección de TK) que permite la selección de células que no tienen función de TK. Se solicitó a Macrogen la secuenciación de los aminoácidos del virus de la variolovacuna mutado.

50 Como resultado, se identificó que el codón (caa) que codifica la glutamina (Gln), un aminoácido en la posición 46 del extremo carboxílico del HSV1-TK del virus de la variolovacuna mutado, tenía una mutación puntual a un codón de parada. Además, se identificó que los residuos de aminoácidos posteriores a la posición 46 en el extremo carboxílico del HSV1-TK del virus de la variolovacuna mutado han sido eliminados. Finalmente, se obtuvo un virus de la variolovacuna mutado (OTS-412) que expresa un fragmento HSV1-TK, cuya estabilidad genética está garantizada.

I. Experimento de citotoxicidad del virus oncolítico (OTS-412)

60 Ejemplo experimental 1. Identificación del efecto citotóxico del virus oncolítico frente a las células tumorales

65 Para identificar la citotoxicidad del virus oncolítico (OTS-412), se evaluó la toxicidad en 10 estirpes celulares de cáncer humano y en 3 estirpes celulares de cáncer murino. Específicamente, se evaluó la toxicidad en las estirpes celulares cancerosas HeLa, PC-3, DU-145, HT-29, HCT-116, A549, NCI-H23, NCI-H460, MCF-7, MDA-MB-231, 4T1, Renca y B16F10. Las células HeLa, A549, 4T1 y B16F10 se obtuvieron en la ATCC (EE.UU.), y las nueve estirpes celulares cancerosas restantes se obtuvieron en el Korea Cell Line Bank (KCLB).

En primer lugar, cada estirpe celular cancerosa se infectó con el virus oncolítico a una MOI de 0,5 (0,5 ufp/célula) y se cultivó durante 72 horas. Posteriormente, se analizó la citotoxicidad utilizando el Cell Counting Kit8 (CCK8).

5 Como resultado, las estirpes celulares cancerosas 4T1, Renca y B16F10, que son estirpes celulares de cáncer murino, mostraron una viabilidad del 80 % o más y mostraron una resistencia relativamente alta. Sin embargo, se identificó que la mayoría de las estirpes celulares cancerosas restantes mostraban una viabilidad del 30 % o menos tras 72 horas, y mostraban una citotoxicidad elevada (Fig. 1). A partir de esto, se identificó que el virus oncolítico apenas proliferaba en las estirpes celulares de cáncer murino.

10 Además, se realizaron experimentos con animales implantando estirpes celulares cancerosas derivadas de humanos o de ratones, que tenían diferente capacidad proliferativa del virus oncolítico, en ratones, respectivamente, de modo que se produjeron ratones a los que se les habían implantado células cancerosas humanas (modelo de xenoinjerto) y ratones a los que se les habían implantado células cancerosas murinas (modelo de aloinjerto). En particular, para los ratones a los que se les implantaron células cancerosas murinas, se diseñó un experimento para identificar si el virus oncolítico tenía un mayor efecto antineoplásico en caso de ser administrado junto con hidroxycarbamida en un estado en el que la proliferación del virus oncolítico era limitada.

15 II. Identificación del efecto terapéutico antineoplásico del virus oncolítico (VV^{tk}) y la hidroxycarbamida en ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino: Renca I

Ejemplo 2.1 Producción de ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino y administración de fármacos

25 Los ratones Balb/c (hembras de 7 semanas) suministrados por Orient Bio (Busan, Corea) se aclimataron durante una semana y a continuación, se les aloinjertó la estirpe celular cancerosa Renca (Korea Cell Line Bank) a 5×10^6 células. Se observaron hasta que el tamaño del tumor alcanzó entre 100 mm³ y 150 mm³, y a continuación comenzó la administración del virus oncolítico. Por otra parte, el virus oncolítico derivado del virus de la variolovacuna (VV^{tk}) apenas proliferó en un modelo de ratón al que se le han implantado células de cáncer renal murino.

30 Los ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino producidos anteriormente se dividieron en 4 grupos (n = 4). El grupo que recibió solución salina por vía intratumoral se estableció como el grupo de control negativo, y el grupo que recibió el virus oncolítico (VV^{tk}, 1×10^7 ufp) se estableció como el grupo de control positivo. Además, el grupo que recibió el virus oncolítico (VV^{tk}, 1×10^7 ufp) y factor estimulante de colonias de granulocitos humanos recombinante (rh-G-CSF, 75 µg/kg), y el grupo que recibió el virus oncolítico (VV^{tk}, 1×10^7 ufp) e hidroxycarbamida (30 mg/kg) se establecieron como grupos experimentales. El virus oncolítico se administró por vía intratumoral, y su segunda administración se realizó 15 días después de la primera administración. Se administró rh-G-CSF o hidroxycarbamida por vía intraperitoneal comenzando 4 días antes de la administración del virus oncolítico, hasta el sacrificio.

40 Ejemplo 2.2. Identificación de cambios en el tamaño del tumor

45 A los ratones de los grupos respectivos del Ejemplo 2.1 se les administraron fármacos. A continuación, los ratones fueron sacrificados el día 16 y se midió el tamaño del tumor. Como resultado, se observó que el grupo que recibió el virus oncolítico y el rh-G-CSF mostraba un tamaño del tumor similar al del grupo de control negativo y al del grupo de control positivo, y que el tamaño del tumor había aumentado 10 veces o más en comparación con el inicial. Por otra parte, se observó que en el grupo que recibió virus oncolítico e hidroxycarbamida juntos, el tamaño del tumor de los ratones era menor en comparación con el grupo de control negativo, el grupo de control positivo y otros grupos experimentales, y que el tamaño del tumor había aumentado aproximadamente 7 veces en comparación con el inicial (Fig. 2). En particular, desde el punto de vista de que el tamaño del tumor era pequeño en comparación con el grupo de control positivo, se identificó que, en un caso en el que la hidroxycarbamida y el virus oncolítico se administraron juntos, se consiguió un mayor efecto antineoplásico.

55 Ejemplo 2.3 Identificación de cambios en el peso corporal

Se midió el peso corporal de los ratones antes de la administración de los respectivos fármacos a los grupos de control y a los grupos experimentales del Ejemplo 2.1, el día de la administración, y los días 4, 10 y 15 después de la administración. El peso corporal del ratón se calculó restando el peso de un tumor del peso corporal en el día 18, y el peso del tumor (v) se calculó como $v = x^2y/2$, en donde x e y son los diámetros más corto y más largo, respectivamente.

60 Como resultado, se identificó que el peso corporal de los ratones del grupo de control negativo y del grupo que recibió el virus oncolítico y el rh-G-CSF disminuyó aproximadamente un 20 % o más, mientras que el peso corporal de los ratones de los grupos experimentales se mantuvo estable en un 85 % o más del peso corporal antes de la administración del fármaco (Fig. 3).

65 III. Identificación del efecto terapéutico antineoplásico del virus oncolítico (VV^{tk}) y la hidroxycarbamida en ratones a los

que se les han implantado células de cáncer renal murino: Renca II

Ejemplo 3.1. Producción de ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino y administración de fármacos

Los ratones Balb/c (hembras de 7 semanas) suministrados por Orient Bio (Busan, Corea) se aclimataron durante una semana y a continuación, se les aloinjertó la estirpe celular cancerosa Renca (Korea Cell Line Bank) a 5×10^6 células. Se observaron hasta que el tamaño del tumor alcanzó entre 100 mm^3 y 150 mm^3 , y a continuación comenzó la administración del virus oncolítico. Por otra parte, el virus oncolítico derivado del virus de la variolovacuna ($\text{VV}^{\text{tk-}}$) apenas proliferó en un modelo de ratón al que se le han implantado células de cáncer renal murino.

Los ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino producidos anteriormente se dividieron en 4 grupos ($n = 13$). El grupo que recibió solución salina por vía intratumoral se estableció como el grupo de control negativo, y el grupo que recibió el virus oncolítico ($\text{VV}^{\text{tk-}}$, 1×10^7 ufp) o hidroxycarbamida (30 mg/kg) se estableció como grupo de control positivo. El grupo que recibió el virus oncolítico e hidroxycarbamida juntos se estableció como grupo experimental. El virus oncolítico se administró por vía intratumoral una vez, y su segunda administración se realizó 17 días después de la primera administración. La hidroxycarbamida se administró por vía intraperitoneal una vez al día comenzando 3 días antes de la administración del virus oncolítico, hasta 1 día antes del sacrificio, excepto el día de la administración del virus oncolítico (Fig. 4).

Ejemplo 3.2. Identificación de cambios en el tamaño del tumor

A los ratones de los grupos respectivos del Ejemplo 3.1 se les administraron fármacos. A continuación, los ratones fueron sacrificados el día 17 y se midió el tamaño del tumor. Como resultado, se identificó que el tamaño del tumor de los ratones del grupo de control negativo y del grupo de control positivo había aumentado rápidamente entre 10 y 15 veces, mientras que el tamaño del tumor de los ratones del grupo experimental era casi 3 veces menor que el del grupo de control negativo y el del grupo de control positivo (Fig. 5). A partir de esto, se identificó que, en un caso en el que el virus oncolítico y la hidroxycarbamida se administraron juntos, se consiguió un efecto antineoplásico muy superior incluso en un modelo tumoral en el que el virus oncolítico apenas proliferaba.

IV. Identificación del efecto terapéutico antineoplásico del virus oncolítico ($\text{WRVV}^{\text{tk-}}$) y la hidroxycarbamida en ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino: Renca III

Ejemplo 4.1. Producción de ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino y administración de fármacos

Los ratones Balb/c (hembras de 7 semanas) suministrados por Orient Bio (Busan, Corea) se aclimataron durante una semana y a continuación, se les aloinjertó la estirpe celular cancerosa Renca (Korea Cell Line Bank) a 5×10^6 células. Se observaron hasta que el tamaño del tumor alcanza entre 100 mm^3 y 150 mm^3 , y a continuación comenzó la administración del virus oncolítico. Por otra parte, el virus oncolítico derivado del virus de la variolovacuna de la especie Western reserve ($\text{WRVV}^{\text{tk-}}$) puede proliferar en un modelo de ratón al que se le han implantado células de cáncer renal murino.

Los ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino producidos anteriormente se dividieron en 4 grupos ($n = 6$). El grupo que recibió solución salina por vía intratumoral se estableció como el grupo de control negativo, y el grupo que recibió el virus oncolítico ($\text{WRVV}^{\text{tk-}}$, 1×10^7 ufp) o hidroxycarbamida (60 mg/kg) se estableció como grupo de control positivo. El grupo que recibió el virus oncolítico e hidroxycarbamida juntos se estableció como grupo experimental. El virus oncolítico se administró una vez por vía intraperitoneal. La hidroxycarbamida se administró por vía intraperitoneal una vez al día comenzando 1 día antes de la administración del virus oncolítico, hasta el día 6 después de la administración, excepto el día de la administración del virus oncolítico.

Ejemplo 4.2. Identificación de cambios en el tamaño del tumor

A los ratones de los grupos respectivos del Ejemplo 4.1 se les administraron fármacos. A continuación, se midió el tamaño del tumor durante 14 días. Como resultado, se identificó que el tamaño del tumor de los ratones del grupo de control negativo y del grupo de control positivo había aumentado casi entre 8 y 10 veces, mientras que el tamaño del tumor de los ratones del grupo experimental había aumentado casi 3 veces. A partir de esto, se identificó que el crecimiento tumoral se suprimió notablemente en un caso en el que se administraron el virus oncolítico y la hidroxycarbamida juntos (Fig. 6).

V. Identificación del efecto terapéutico antineoplásico del virus oncolítico (OTS-412) y la hidroxycarbamida en ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino: 4T1 I

Ejemplo 5.1. Producción de ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino y administración de fármacos

Los ratones Balb/c (hembras de 7 semanas) suministrados por Orient Bio (Busan, Corea) se aclimataron durante una semana y a continuación, se les aloinjertó la estirpe celular cancerosa 4T1 (Korea Cell Line Bank) a 2×10^6 células. Se observaron hasta que el tamaño del tumor alcanzó entre 100 mm^3 y 150 mm^3 , y a continuación comenzó la administración del virus oncolítico. Por otra parte, el virus oncolítico derivado del virus de la variolovacuna (OTS-412)) apenas prolifera en un modelo de ratón al que se le han implantado células de cáncer mama murino.

Los ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino producidos anteriormente se dividieron en 4 grupos ($n = 4$). El grupo que recibió solución salina por vía intratumoral se estableció como grupo de control negativo, y el grupo que recibió virus oncolítico (OTS-412, 1×10^7 ufp) o hidroxycarbamida (30 mg/kg) se estableció como grupo de control positivo. El grupo que recibió el virus oncolítico e hidroxycarbamida juntos se estableció como grupo experimental. El virus oncolítico se administró una vez por vía intratumoral. La hidroxycarbamida se administró por vía intraperitoneal una vez al día comenzando 3 días antes de la administración del virus oncolítico, hasta 1 día antes del sacrificio, excepto el día de la administración del virus oncolítico.

Ejemplo 5.2. Identificación de cambios en el tamaño del tumor

A los ratones de los grupos respectivos del Ejemplo 5.1 se les administraron fármacos. A continuación, se midieron los cambios en el tamaño del tumor durante 10 días. Como resultado, se observó que el tamaño del tumor de los ratones del grupo de control negativo y del grupo de control positivo había aumentado casi 5 veces, mientras que el tamaño del tumor de los ratones del grupo experimental había aumentado casi 3 veces (Fig. 7). A partir de esto, se identificó que, en un caso en el que el virus oncolítico y la hidroxycarbamida se administraron juntos, se consiguió un efecto antineoplásico superior en comparación con el caso en el que se administró cada fármaco por separado.

VI. Identificación del efecto terapéutico antineoplásico del virus oncolítico (OTS-412) y la hidroxycarbamida en ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino: 4T1 II

Ejemplo 6.1. Producción de ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino y administración de fármacos

Los ratones Balb/c (hembras de 7 semanas) suministrados por Orient Bio (Busan, Corea) se aclimataron durante una semana y a continuación, se les aloinjertó la estirpe celular cancerosa 4T1 (Korea Cell Line Bank) a 1×10^6 células. Se observaron hasta que el tamaño del tumor alcanzó entre 100 mm^3 y 150 mm^3 , y a continuación comenzó la administración del virus oncolítico. Por otra parte, el virus oncolítico derivado del virus de la variolovacuna (OTS-412) apenas prolifera en un modelo de ratón al que se le ha implantado una estirpe celular de cáncer de mama. Además, los ratones a los que se les ha implantado la estirpe celular 4T1 son un modelo animal en el que la metástasis se extiende por todo el cuerpo, incluyendo el tejido pulmonar; y en general, la metástasis se evalúa por el número de nódulos en la superficie del tumor.

Los ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino producidos anteriormente se dividieron en 4 grupos ($n = 5$). El grupo que recibió solución salina por vía intratumoral se estableció como grupo de control negativo, y el grupo que recibió virus oncolítico (OTS-412, 1×10^7 ufp) o hidroxycarbamida (30 mg/kg) se estableció como grupo de control positivo. El grupo que recibió el virus oncolítico e hidroxycarbamida juntos se estableció como grupo experimental. Para el virus oncolítico, su segunda administración se realizó 7 días después de la primera administración por vía intratumoral. La hidroxycarbamida se administró por vía intraperitoneal una vez al día comenzando 3 días antes de la administración del virus oncolítico, hasta 3 días antes del sacrificio, excepto el día de la administración del virus oncolítico.

Ejemplo 6.2. Identificación de cambios en el tamaño del tumor

A los ratones de los grupos respectivos del Ejemplo 6.1 se les administraron fármacos. A continuación, los ratones fueron sacrificados el día 21 y se contó el número de nódulos tumorales. Como resultado, para los ratones del grupo que recibió únicamente el virus oncolítico, el número de nódulos fue 1,5 veces superior al del grupo de control negativo. Por otra parte, para los ratones del grupo experimental, se identificó que el número de nódulos producidos era de 0,5 veces, lo que era notablemente pequeño (Fig. 8). A partir de esto, se identificó que, en un caso en el que el virus oncolítico y la hidroxycarbamida se administraron juntos, se suprimió la metástasis a otros órganos.

Ejemplo 6.3. Identificación de la seguridad después de la administración repetida

Se produjo un modelo de ratón al que se le implantaron células de cáncer de mama murino como en el Ejemplo 6.1 ($n = 10$) y se le administraron fármacos. A continuación, se midió el peso corporal de los ratones los días 7, 14, 17 y 21 después de la administración del fármaco. Como resultado, el peso corporal de los ratones de todos los grupos tendió a disminuir después de 2 semanas; sin embargo, el peso corporal más elevado se observó el día 21 en los ratones del grupo experimental. Incluso para los ratones de los otros tres grupos, se observó una pérdida de peso corporal de aproximadamente el 10 % el día 21. A partir de esto, se identificó que la seguridad estaba garantizada incluso en un caso en el que el virus oncolítico se administró repetidamente y se administró junto con la hidroxycarbamida (Fig. 9).

VII. Identificación del efecto terapéutico antineoplásico del virus oncolítico (OTS-412) y una dosis alta de hidroxycarbamida en ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino: 4T1 III

5 Ejemplo 7.1. Producción de ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino y administración de fármacos

10 Los ratones Balb/c (hembras de 7 semanas de edad) suministrados por Orient Bio (Busan, Corea) se aclimataron durante una semana y a continuación, se les aloinjertó la estirpe celular cancerosa 4T1 (Korea Cell Fine Bank) a 5×10^6 células. Se observaron hasta que el tamaño del tumor alcanzó entre 50 mm³ y 200 mm³, y a continuación comenzó la administración del virus oncolítico. Por otra parte, el virus oncolítico derivado del virus de la variolovacuna (OTS-412) apenas prolifera en un modelo de ratón al que se le han implantado células de cáncer de mama.

15 Los ratones a los que se les han implantado células de cáncer de mama murino producidos anteriormente se dividieron en 4 grupos. El grupo que recibió solución salina por vía intratumoral se estableció como grupo de control negativo, y el grupo que recibió virus oncolítico (OTS-412, 1×10^7 ufp) o una dosis alta de hidroxycarbamida (90 mg/kg) se estableció como grupo de control positivo. El grupo que recibió el virus oncolítico y la dosis alta de hidroxycarbamida juntos se estableció como grupo experimental. El virus oncolítico se administró una vez por vía intratumoral. La hidroxycarbamida se administró por vía intraperitoneal una vez al día comenzando 3 días antes de la administración del virus oncolítico, hasta 1 día antes del sacrificio, excepto el día de la administración del virus oncolítico.

Ejemplo 7.2. Identificación de cambios en el tamaño del tumor

25 A los ratones de los grupos respectivos del Ejemplo 7.1 se les administraron fármacos. A continuación, se midió el tamaño del tumor durante 17 días. Como resultado, se identificó que el tamaño del tumor de los ratones del grupo de control negativo y del grupo de control positivo había aumentado casi 3,5 veces, mientras que el tamaño del tumor de los ratones del grupo experimental había aumentado 2,5 veces. A partir de esto, se identificó que, en un caso en el que el virus oncolítico y la hidroxycarbamida se administraron juntos, se suprimió el crecimiento tumoral, en comparación con un caso en el que se administró únicamente el virus oncolítico o la hidroxycarbamida (Fig. 10).

30 Además, se comprobó la supervivencia de los ratones de los respectivos grupos hasta el día 28. Como resultado, todos los ratones del grupo que recibió únicamente el virus oncolítico murieron el día 21, y sobrevivió 1 ratón del grupo de control negativo. Por otra parte, se identificó que los ratones habían sobrevivido hasta el final en el grupo que recibió el virus oncolítico y la hidroxycarbamida juntos (Fig. 11). A partir de esto, se confirmaron la seguridad y el efecto antineoplásico de la administración combinada de una dosis alta de hidroxycarbamida y virus oncolítico.

VIII. Identificación del efecto terapéutico antineoplásico del virus oncolítico (OTS-412) y la hidroxycarbamida en ratones a los que se les han implantado células de cáncer de pulmón humano (NCI-H460)

40 Ejemplo 8.1. Producción de ratones a los que se les han implantado células de cáncer de pulmón humano y administración

45 Los ratones Balb/c nu/nu suministrados por Orient Bio (Busan, Corea) se aclimataron durante una semana y a continuación se les aloinjertaron células de cáncer de pulmón NCI-H460 (Korea Cell Line Bank) a 1×10^6 células. Cuando el tamaño del tumor alcanzó de 300 mm³ a 400 mm³, comenzó la administración del virus oncolítico. El virus oncolítico derivado del virus de la variolovacuna (OTS-412) puede proliferar en un modelo de ratón al que se le ha implantado una estirpe celular de cáncer de pulmón.

50 Los ratones a los que se les han implantado células de cáncer pulmón humano producidos anteriormente se dividieron en 4 grupos. El grupo que recibió solución salina por vía intratumoral se estableció como grupo de control negativo, y el grupo que recibió hidroxycarbamida o virus oncolítico (OTS-412, 1×10^5 ufp) se estableció como grupo de control positivo. El grupo que recibió el virus oncolítico e hidroxycarbamida (20 mg/kg) por vía intraperitoneal se estableció como grupo experimental. El virus oncolítico se administró dos veces, y su segunda administración se realizó 5 días después de la primera administración. La hidroxycarbamida se administró una vez al día comenzando el día anterior a la primera administración del virus oncolítico, hasta el día del sacrificio, excepto el día de la administración del virus oncolítico.

Ejemplo 8.2. Identificación de cambios en el tamaño del tumor

60 A los ratones de los grupos respectivos del Ejemplo 8.1 se les administraron fármacos. A continuación, los ratones fueron sacrificados el día 15 y se midió el tamaño del tumor. Como resultado, se observó que el tamaño del tumor de los ratones del grupo de control negativo y de los grupos de control positivo había aumentado rápidamente 11, 9 y 7 veces, respectivamente. Por otra parte, el tamaño del tumor de los ratones del grupo experimental aumentó aproximadamente 2,5 veces, y tendió a disminuir a partir del día 12 (Fig. 12). A partir de esto, se identificó que, en un caso en el que el virus oncolítico y la hidroxycarbamida se administraron juntos, se suprimió eficazmente el crecimiento tumoral, en comparación con un caso en el que se administró únicamente el virus oncolítico.

IX. Identificación del efecto terapéutico antineoplásico del virus oncolítico (OTS-412) y la hidroxycarbamida en ratones a los que se les han implantado células de cáncer colorrectal humano (HCT-116)

5 Ejemplo 9.1. Producción de ratones a los que se les han implantado células de cáncer colorrectal humano y administración

10 Los ratones Balb/c nu/nu (hembras de 7 semanas) suministrados por Orient Bio (Busan, Corea) se aclimataron durante una semana y a continuación se les aloinjertó la estirpe celular cancerosa HCT-116 (Korea Cell Line Bank), una estirpe celular de cáncer colorrectal humano, a $2,5 \times 10^6$ células. Se observaron hasta que el tamaño del tumor alcanzó entre 20 mm^3 y 250 mm^3 , y a continuación comenzó la administración del virus oncolítico.

15 Los ratones a los que se les han implantado células de cáncer colorrectal humano producidos anteriormente se dividieron en 4 grupos ($n = 5$). El grupo que recibió solución salina por vía intratumoral se estableció como grupo de control negativo, y el grupo que recibió hidroxycarbamida o virus oncolítico (OTS-412, 1×10^7 ufp) se estableció como grupo de control positivo. El grupo que recibió el virus oncolítico e hidroxycarbamida (30 mg/kg) por vía intraperitoneal se estableció como grupo experimental. El virus oncolítico se administró una vez, y la hidroxycarbamida se administró una vez al día comenzando 3 días antes de la administración del virus oncolítico, hasta el día del sacrificio, excepto el día de la administración del virus oncolítico. El virus oncolítico derivado del virus de la variolovacuna (OTS-412) puede proliferar en un modelo de ratón al que se le ha implantado una estirpe celular de cáncer de colorrectal.

Ejemplo 9.2. Identificación de cambios en el tamaño del tumor

25 A los ratones de los grupos respectivos del Ejemplo 9.1 se les administraron fármacos. A continuación, los ratones fueron sacrificados el día 28 y se midió el tamaño del tumor. Como resultado, se observó que el tamaño del tumor de los ratones del grupo de control negativo y del grupo que recibió únicamente la hidroxycarbamida había aumentado bruscamente 11 veces. Se identificó que en el grupo que recibió únicamente el virus oncolítico, el tamaño del tumor disminuyó gradualmente comenzando 3 días después de la administración del virus oncolítico, y se mantuvo en el tamaño inicial del tumor. Por otra parte, para el grupo experimental, se identificó que el tamaño del tumor que disminuía gradualmente a partir del día de la administración del virus oncolítico, comenzó a disminuir en comparación con el tamaño inicial del tumor, el día 14 después de la administración del virus oncolítico, y prácticamente había desaparecido el día 28 (Fig. 13). En particular, el día 28 se observó una remisión completa en 2 animales del grupo experimental (Figs. 14 y 15).

35 X. Identificación del efecto terapéutico antineoplásico del virus oncolítico (VV^{tk-}) y la hidroxycarbamida en ratones a los que se les han implantado células de cáncer colorrectal humano (HT-29)

Ejemplo 10.1 Producción de ratones a los que se les han implantado células de cáncer colorrectal humano (HT-29) y administración

40 Los ratones Balb/c nu/nu (hembras de 7 semanas) suministrados por Orient Bio (Busan, Corea) se aclimataron durante una semana y a continuación se les aloinjertó la estirpe celular cancerosa HT-29 (Korea Cell Line Bank), una estirpe celular de cáncer colorrectal humano, a 5×10^6 células. Se observaron hasta que el tamaño del tumor alcanzó entre 150 mm^3 y 200 mm^3 , y a continuación comenzó la administración del virus oncolítico.

45 Los ratones a los que se les han implantado células de cáncer colorrectal humano producidos anteriormente se dividieron en los 2 grupos siguientes, y se realizaron experimentos durante 8 semanas: el grupo que recibió únicamente el virus oncolítico (OTS-412, 1×10^7 ufp) y el grupo que recibió además hidroxycarbamida (25 mg/kg) por vía intraperitoneal. Desde la semana 1 hasta la semana 4, el virus oncolítico se administró a cada grupo dos veces por semana. En la semana 5 y la semana 7, el virus oncolítico se administró una vez por semana; y en la semana 6 y la semana 8, no se administró virus oncolítico a ninguno de los grupos. La hidroxycarbamida se administró una vez al día desde la semana 6 hasta la semana 8. Por otra parte, el virus oncolítico derivado del virus de la variolovacuna (VV^{tk-}) puede proliferar en un modelo de ratón al que se le ha implantado una estirpe celular de cáncer de colorrectal.

55 Ejemplo 10.2. Identificación del tamaño del tumor y apoptosis del tejido tumoral

60 El último día de la semana 8, los ratones de los respectivos grupos fueron sacrificados y se midió el tamaño del tumor. Como resultado, se identificó que en el grupo que recibió virus oncolítico e hidroxycarbamida, el tamaño del tumor disminuyó y el estado del tejido tumoral mejoró, en comparación con el grupo que recibió únicamente el virus oncolítico (Fig. 16).

65 Además, se realizó la tinción con H&E del tejido tumoral recogido utilizando hematoxilina y eosina. Aquí, una porción teñida de oscuro con H&E indica células viables. Como resultado, se identificó que el grupo que recibió el virus oncolítico e hidroxycarbamida mostraba un tamaño del tumor global menor y una porción teñida de oscuro menor que el grupo que recibió únicamente el virus oncolítico (Fig. 16). Es decir, se identificó que el grupo experimental que recibió el virus oncolítico y la hidroxycarbamida juntos mostró un efecto apoptótico superior, en comparación con el

grupo de control que recibió únicamente el virus oncolítico.

Además, el tejido tumoral recogido se analizó mediante una tinción con H&E y una tinción TUNEL. Aquí, una porción teñida de oscuro con H&E indica células viables; y en la tinción de fluorescencia, el virus oncolítico tiene fluorescencia roja y la célula muerta tiene fluorescencia verde.

Como resultado, en el tejido tumoral del grupo que recibió el virus oncolítico y la hidroxycarbamida juntos, se observaron más células muertas que en el grupo que recibió únicamente el virus oncolítico. Además, para el grupo de control, las células muertas coincidían con los virus oncolíticos en cuanto a la porción teñida, lo que identificó la muerte de las células cancerosas causada por el virus oncolítico. Por otra parte, se identificó que en el grupo que recibió virus oncolítico e hidroxycarbamida juntos, la porción de células muertas era diferente de la porción teñida de los virus oncolíticos. Esto identifica que en el grupo que recibió virus oncolítico e hidroxycarbamida juntos, se produjo apoptosis incluso en las células cancerosas que no estaban infectadas con el virus oncolítico (Fig. 17).

XI. Identificación del efecto terapéutico antineoplásico del virus del herpes simple (VHS1) y la hidroxycarbamida en ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino

Ejemplo 11.1 Producción de ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino (Renca) y administración

Los ratones Balb/c (hembras de 7 semanas) suministrados por Orient Bio (Busan, Corea) se aclimataron durante una semana y a continuación se les aloinjertó la estirpe celular cancerosa Renca (Korea Cell Line Bank), una estirpe celular de cáncer renal murina, a 5×10^6 células. Se observaron hasta que el tamaño del tumor alcanza entre 50 mm^3 y 200 mm^3 , y a continuación comenzó la administración del virus oncolítico.

Los ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino producidos anteriormente se dividieron en 4 grupos. El grupo que recibió solución salina por vía intratumoral se estableció como grupo de control, y el grupo que recibió hidroxycarbamida o virus del herpes simple (HSV1, 1×10^6 ufp) se estableció como grupo de control positivo. El grupo que recibió HSV1 e hidroxycarbamida (30 mg/kg) se estableció como grupo experimental. El VHS1 se administró por vía intratumoral una vez 3 días después de la administración de la hidroxycarbamida, y la hidroxycarbamida se administró por vía intraperitoneal 6 veces por semana durante 20 días después de la administración del virus oncolítico.

Ejemplo 11.2. Identificación de cambios en el tamaño del tumor

A los ratones de los grupos respectivos del Ejemplo 11.1 se les administraron fármacos. Los cambios en el tamaño del tumor se midieron el día de la administración del fármaco y los días 3, 7, 10, 14 y 17 después de la administración. Como resultado, se identificó que el grupo experimental mostraba el menor tamaño del tumor. A partir de esto, se identificó que, en un caso en el que se administró HSV1 e hidroxycarbamida juntos, el crecimiento tumoral se suprimió con mayor eficacia que en el caso en el que se administró únicamente el virus oncolítico (Fig. 18).

XII. Identificación del efecto terapéutico antineoplásico de adenovirus e hidroxycarbamida en ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino

Ejemplo 12.1. Producción de ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino (Renca) y administración

Los ratones Balb/c (hembras de 7 semanas) suministrados por Orient Bio (Busan, Corea) se aclimataron durante una semana y a continuación se les aloinjertó la estirpe celular cancerosa Renca (Korea Cell Fine Bank), una estirpe celular de cáncer renal murina, a 5×10^6 células. Se observaron hasta que el tamaño del tumor alcanzó entre 50 mm^3 y 200 mm^3 , y a continuación comenzó la administración del virus oncolítico.

Los ratones a los que se les han implantado células de cáncer renal murino producidos anteriormente se dividieron en 3 grupos. El grupo que recibió solución salina por vía intratumoral se estableció como grupo de control negativo, y el grupo que recibió únicamente virus oncolítico (adenovirus, 1×10^7 ufp) se estableció como grupo de control positivo. El grupo que recibió adenovirus (1×10^7 ufp) e hidroxycarbamida (30 mg/kg) se estableció como grupo experimental. El adenovirus se administró por vía intratumoral una vez 3 días después de la administración de la hidroxycarbamida, y la hidroxycarbamida se administró por vía intraperitoneal 6 veces por semana durante 16 días después de la administración del virus oncolítico.

Ejemplo 12.2. Identificación de cambios en el tamaño del tumor

A los ratones de los grupos respectivos del Ejemplo 12.1 se les administraron fármacos.

Los cambios en el tamaño del tumor se midieron el día de la administración del fármaco y los días 3, 7, 10, 14 y 17 después de la administración. Como resultado, se identificó que el grupo que recibió el virus oncolítico y la

hidroxicarbamida juntos mostró el menor tamaño del tumor. A partir de esto, se identificó que, en un caso en el que se administraron adenovirus e hidroxicarbamida juntos, el crecimiento tumoral se suprimió con mayor eficacia que en el caso en el que se administró únicamente el virus oncolítico (Fig. 19).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para usar en la prevención o el tratamiento del cáncer, que comprende, como principios activos:
- un virus oncolítico, en donde el virus oncolítico es un virus de la variolovacuna en el que se ha eliminado el gen de la timidina cinasa,
e hidroxycarbamida,
- 10 en donde el virus oncolítico se administra a una dosis de 1×10^5 ufp o más ufp, y
en donde la hidroxycarbamida se administra a una dosis de 20 mg/kg/día a 90 mg/kg/día.
- 15 2. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el virus oncolítico se administra a una dosis de 1×10^5 ufp a 1×10^{10} ufp.
- 20 3. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el cáncer es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de tiroides, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, melanoma maligno, presión tímica, cáncer gástrico, cáncer de colon, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer de útero, cáncer de vejiga, cáncer de recto, cáncer de vesícula biliar, cáncer biliar y cáncer pancreático.
- 25 4. La composición farmacéutica para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición farmacéutica se administra por vía intratumoral, intraperitoneal o intravenosa.
- 30 5. Un kit para usar en la prevención o el tratamiento del cáncer, que comprende:
una primera composición que comprende un virus oncolítico como principio activo, en donde el virus oncolítico es un virus de la variolovacuna en el que se ha eliminado el gen de la timidina cinasa, y
una segunda composición que comprende hidroxycarbamida como principio activo,
- 35 en donde la primera composición y la segunda composición se administran simultáneamente, secuencialmente o en orden inverso,
en donde el virus oncolítico se administra a una dosis de 1×10^5 ufp o más ufp,
en donde la hidroxycarbamida se administra a una dosis de 20 mg/kg/día a 90 mg/kg/día,
en donde, cuando la primera composición y la segunda composición se administran secuencialmente o en orden
40 inverso, la hidroxycarbamida se administra de forma continua una vez al día comenzando de 3 a 5 días antes de la administración del virus oncolítico, y de forma continua una vez al día durante de 9 a 28 días comenzando 24 horas después de la administración del virus oncolítico.
6. El kit para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el virus oncolítico se administra al individuo a intervalos de 7 a 30 días.
7. El kit para usar de acuerdo con la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en donde la primera composición y la segunda composición se administran por vía intratumoral, intraperitoneal o intravenosa.

Fig. 1

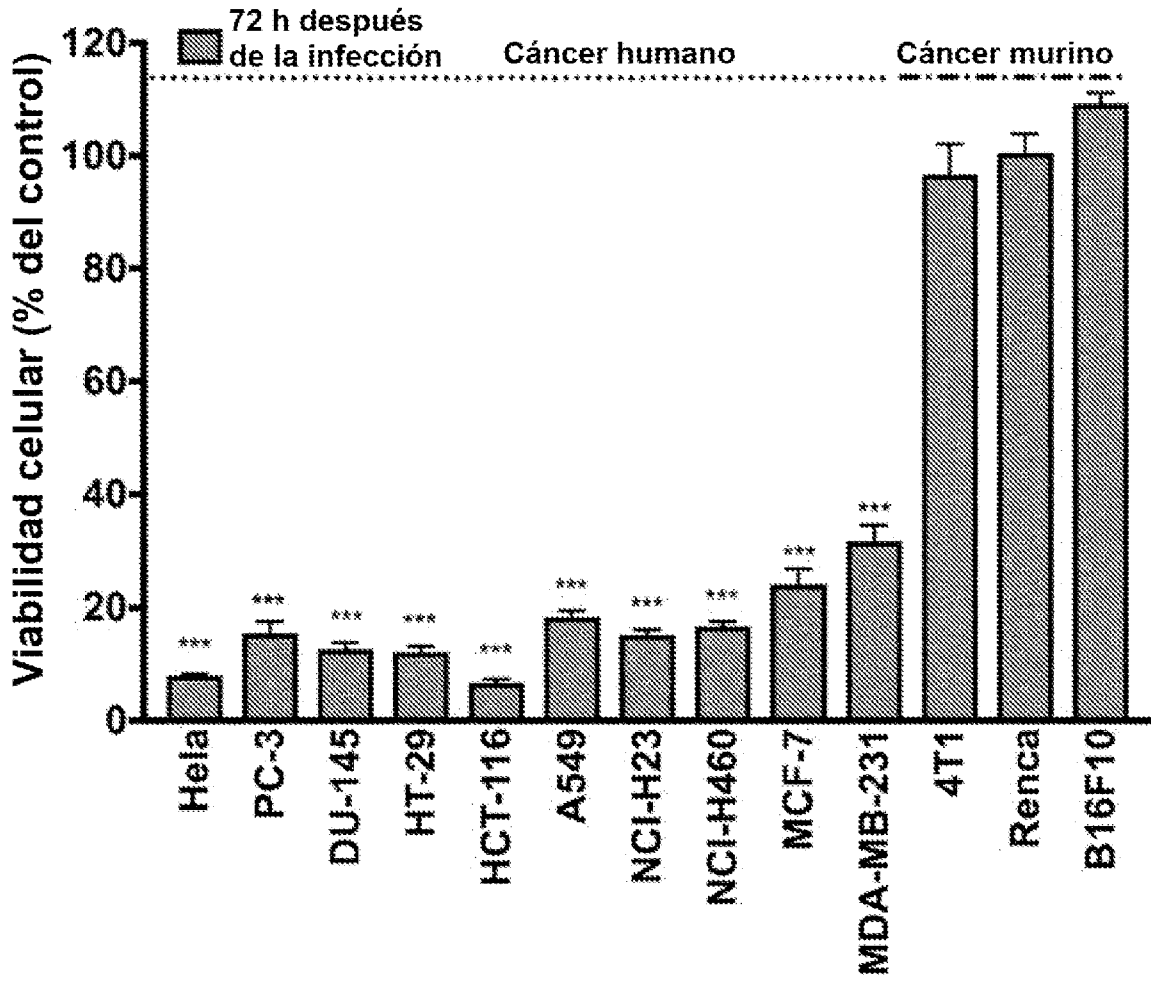


Fig. 2

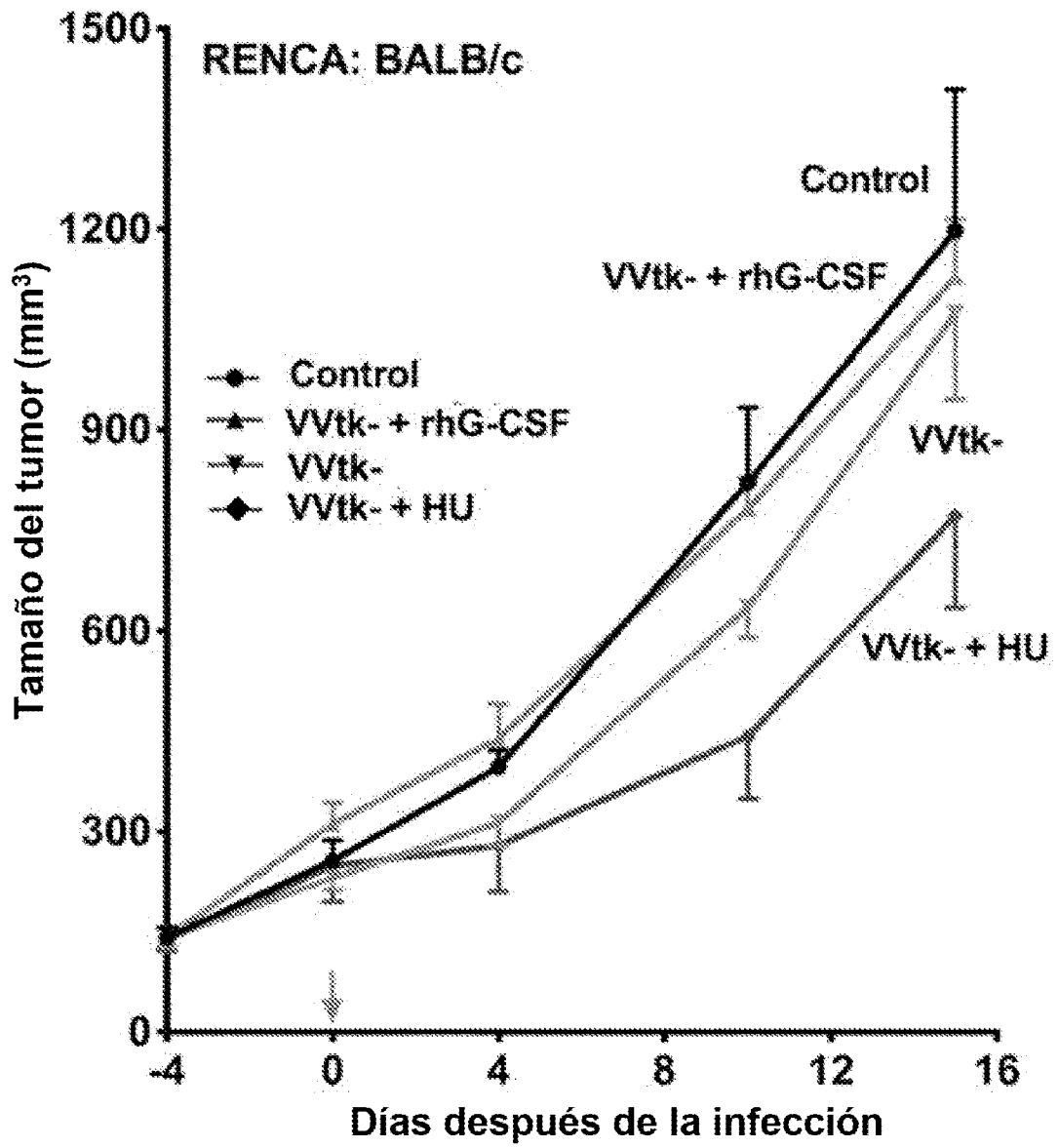


Fig. 3

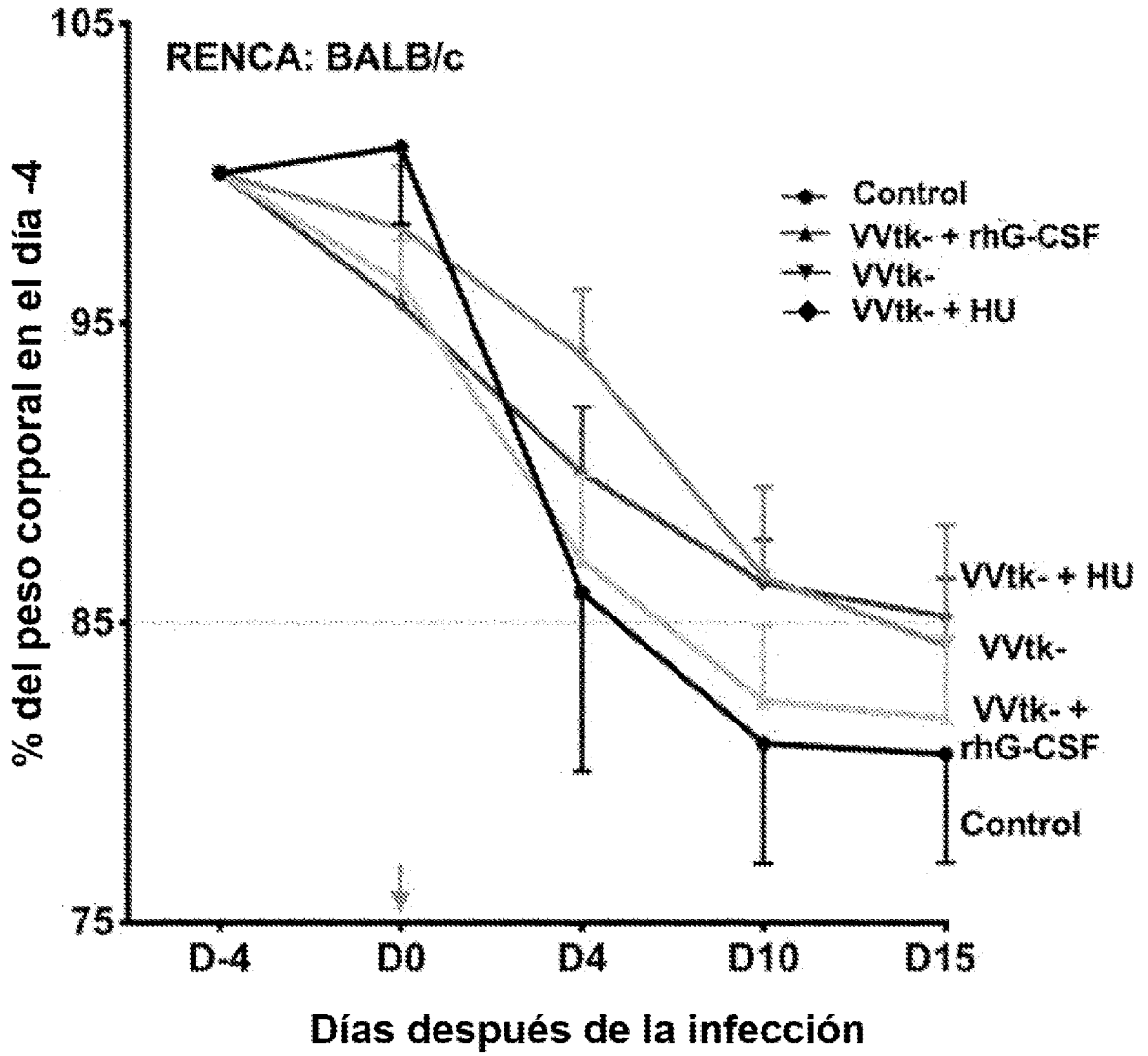


Fig. 4

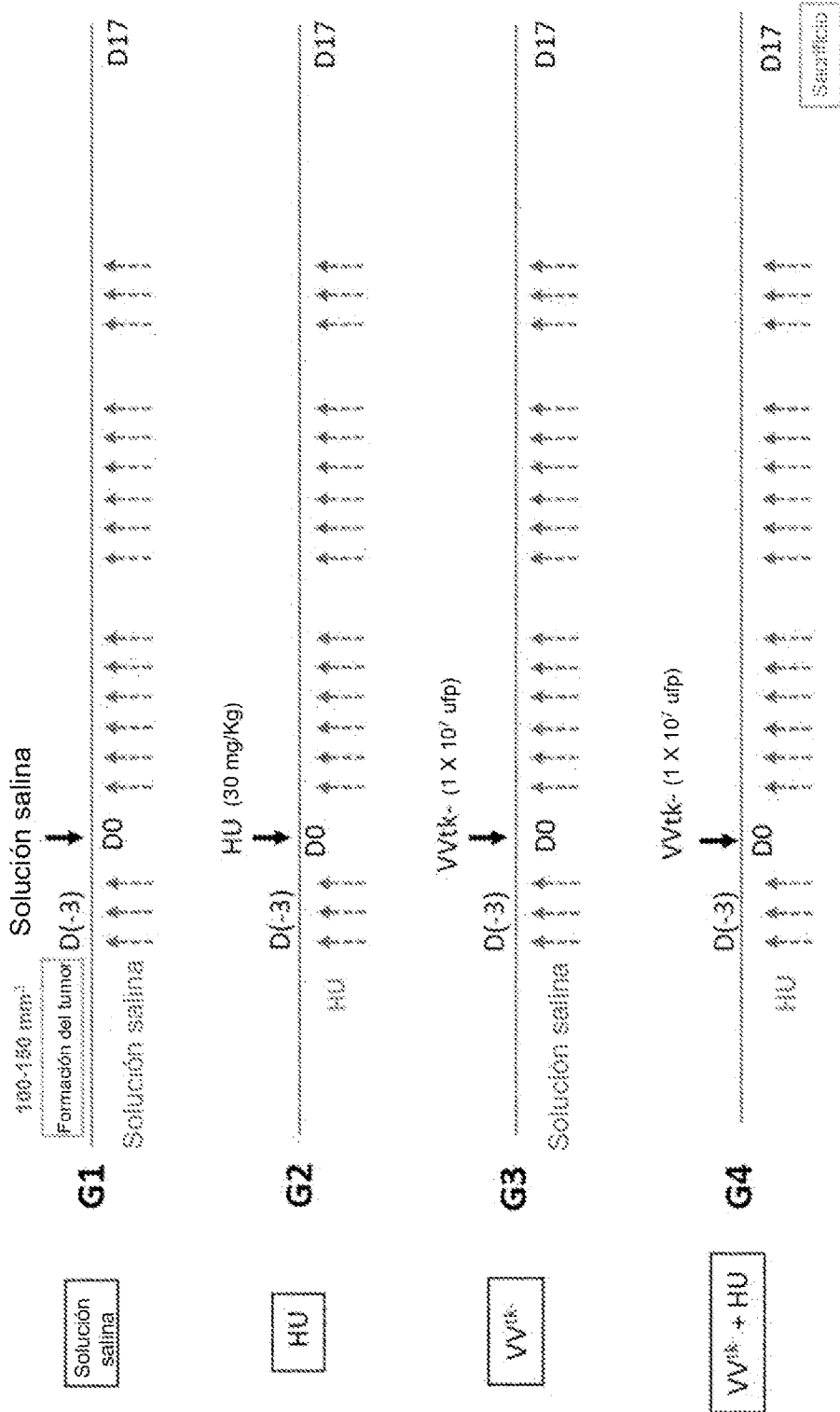


Fig. 5

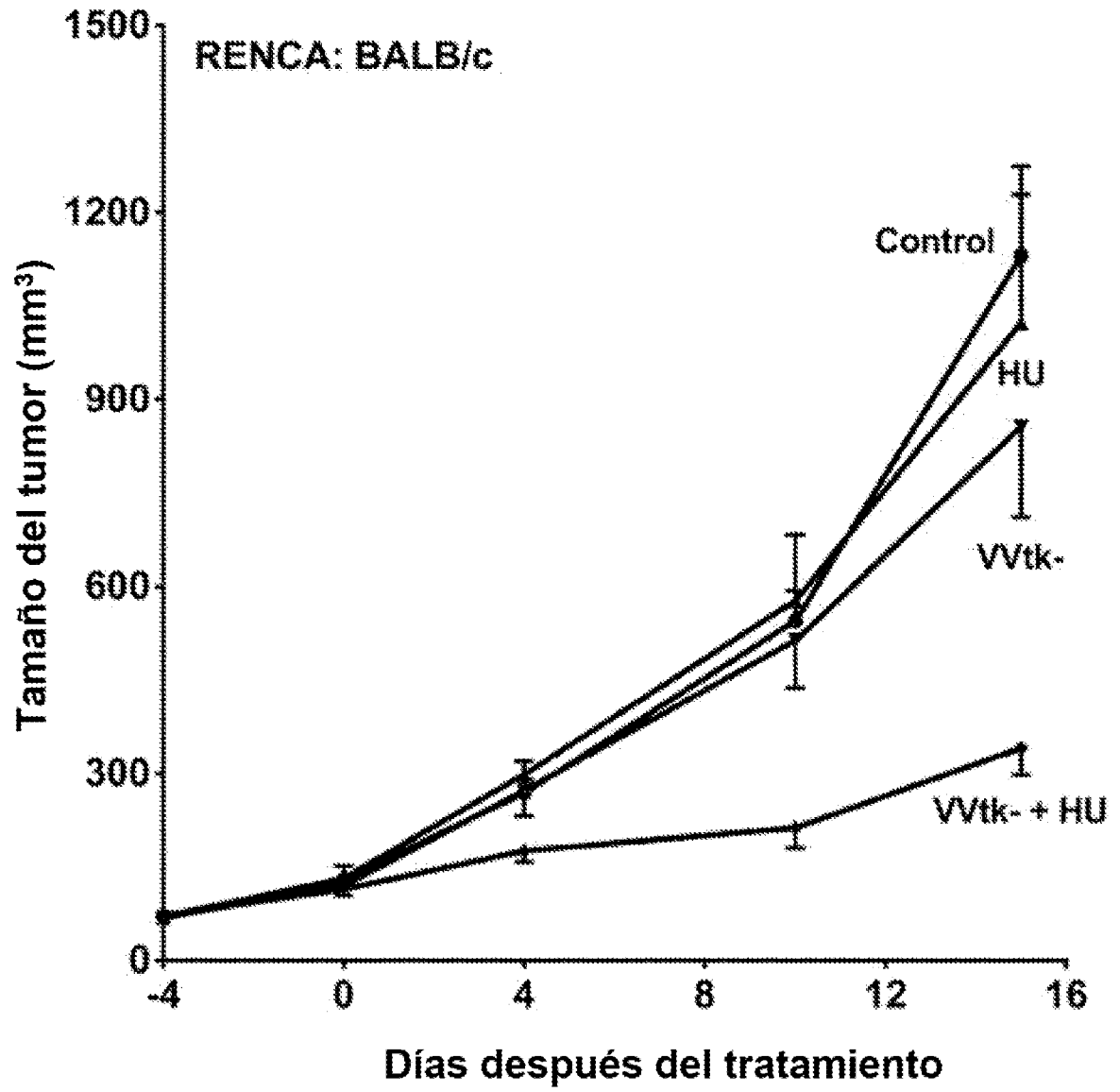


Fig. 6

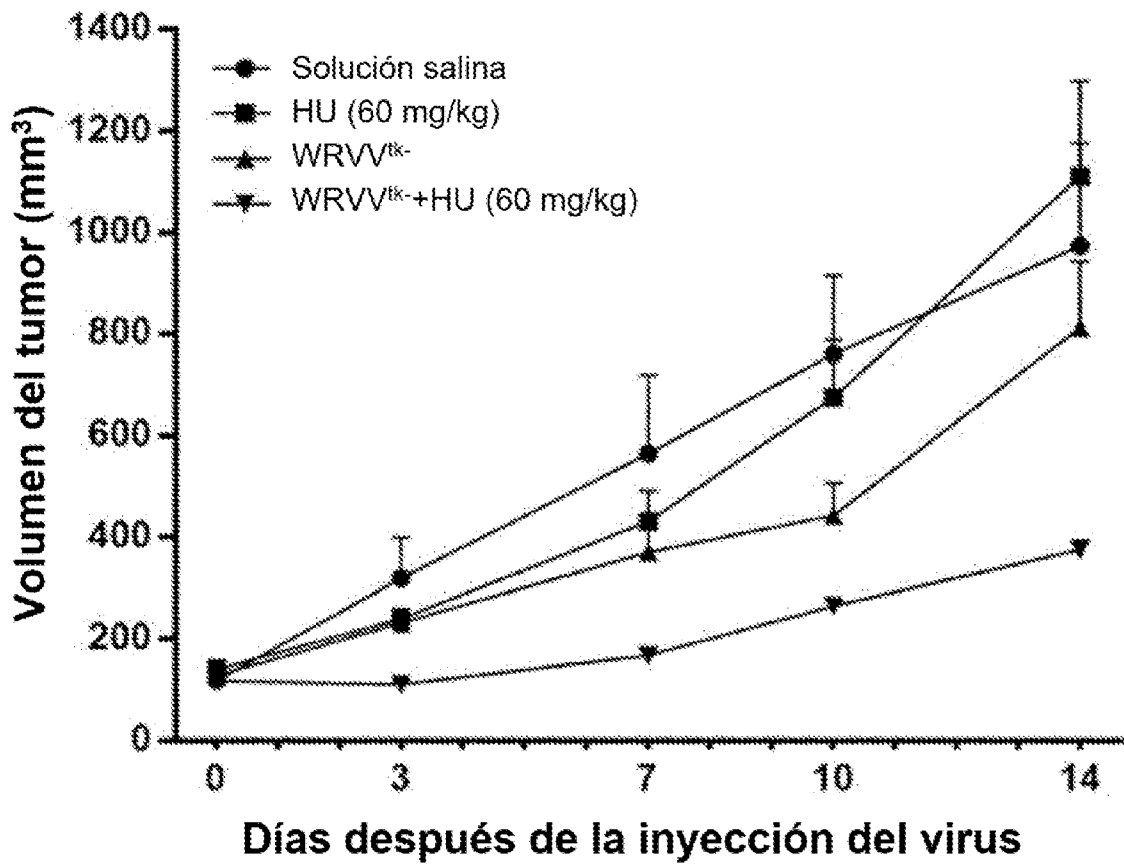


Fig. 7

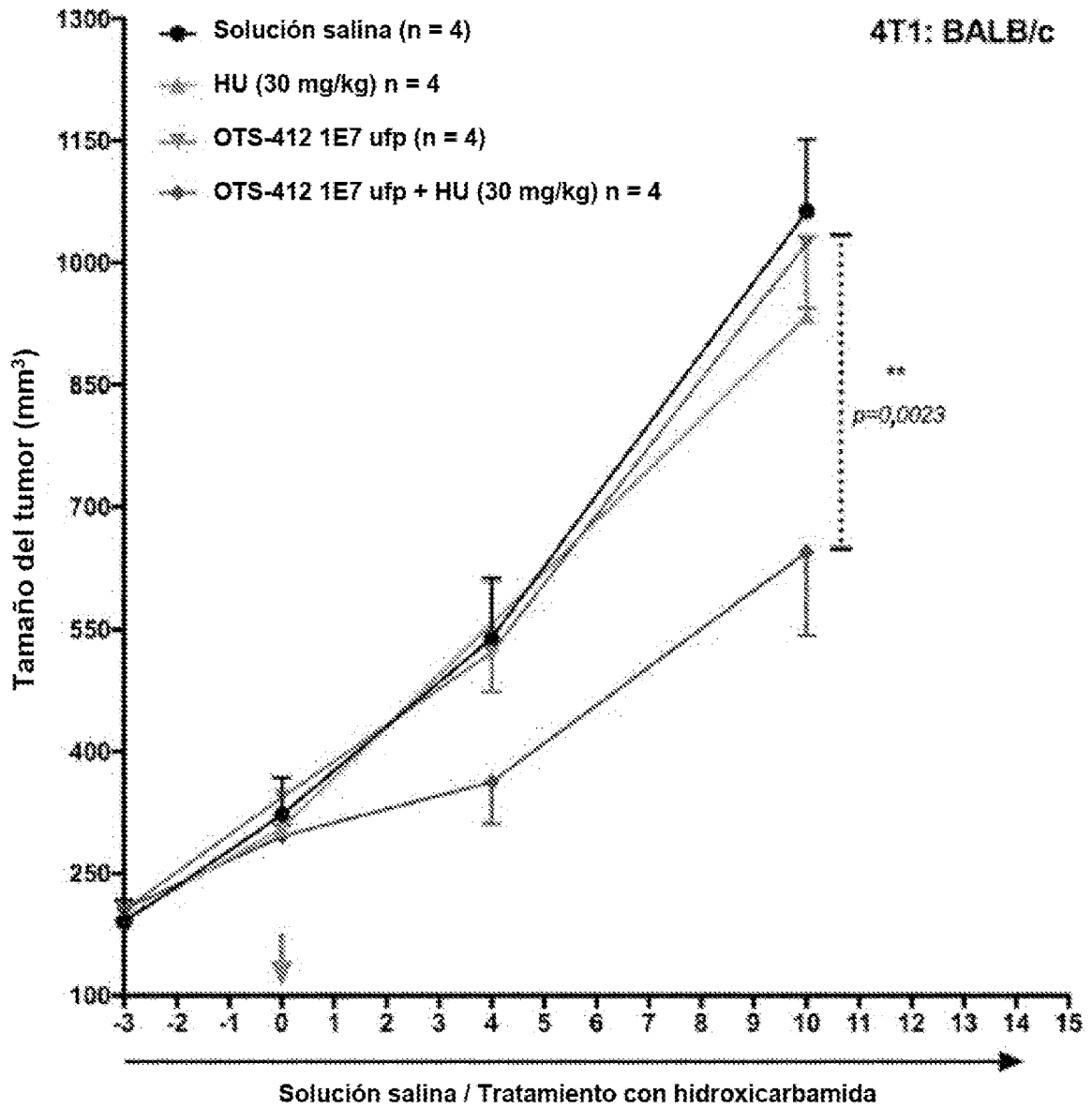


Fig. 8

PARTE A

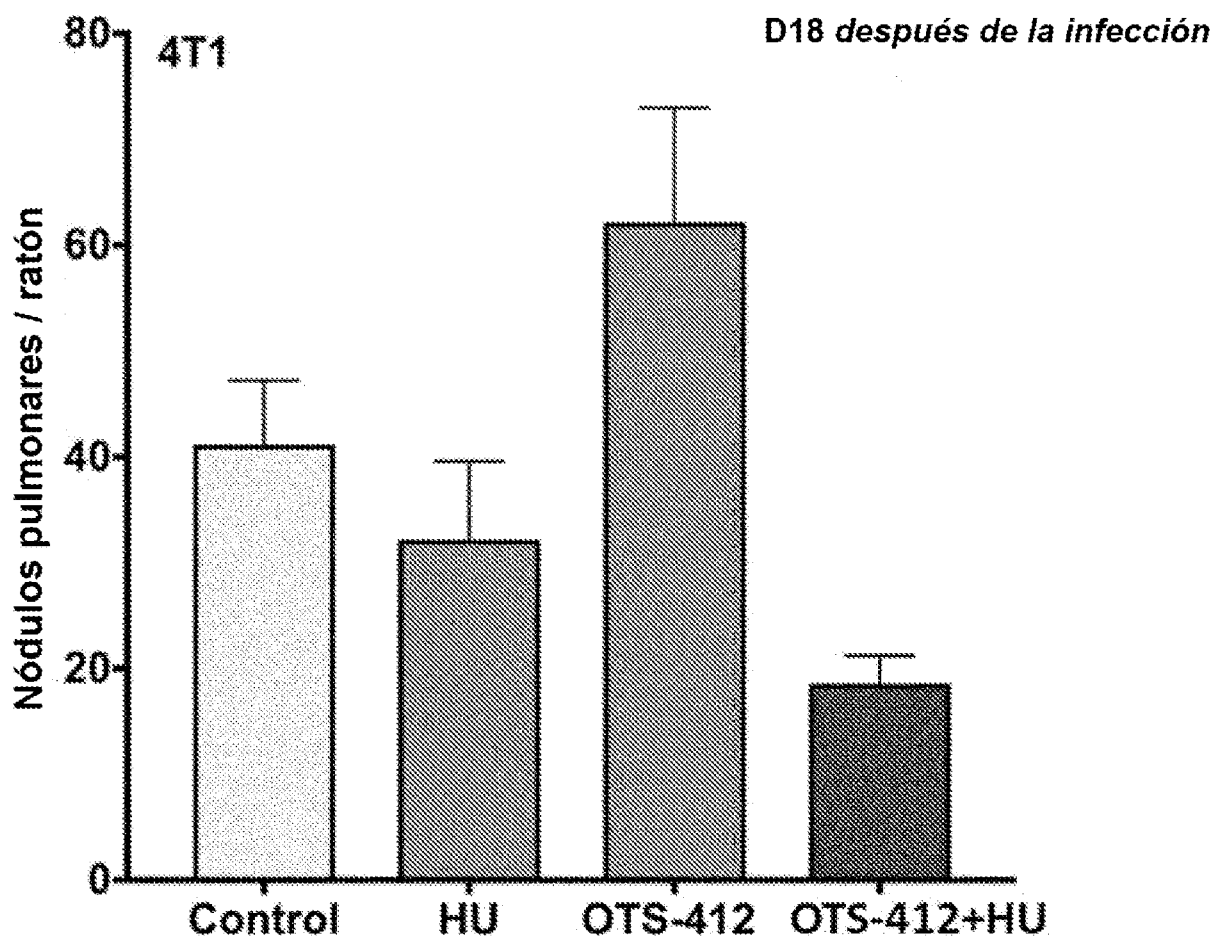


Fig. 9

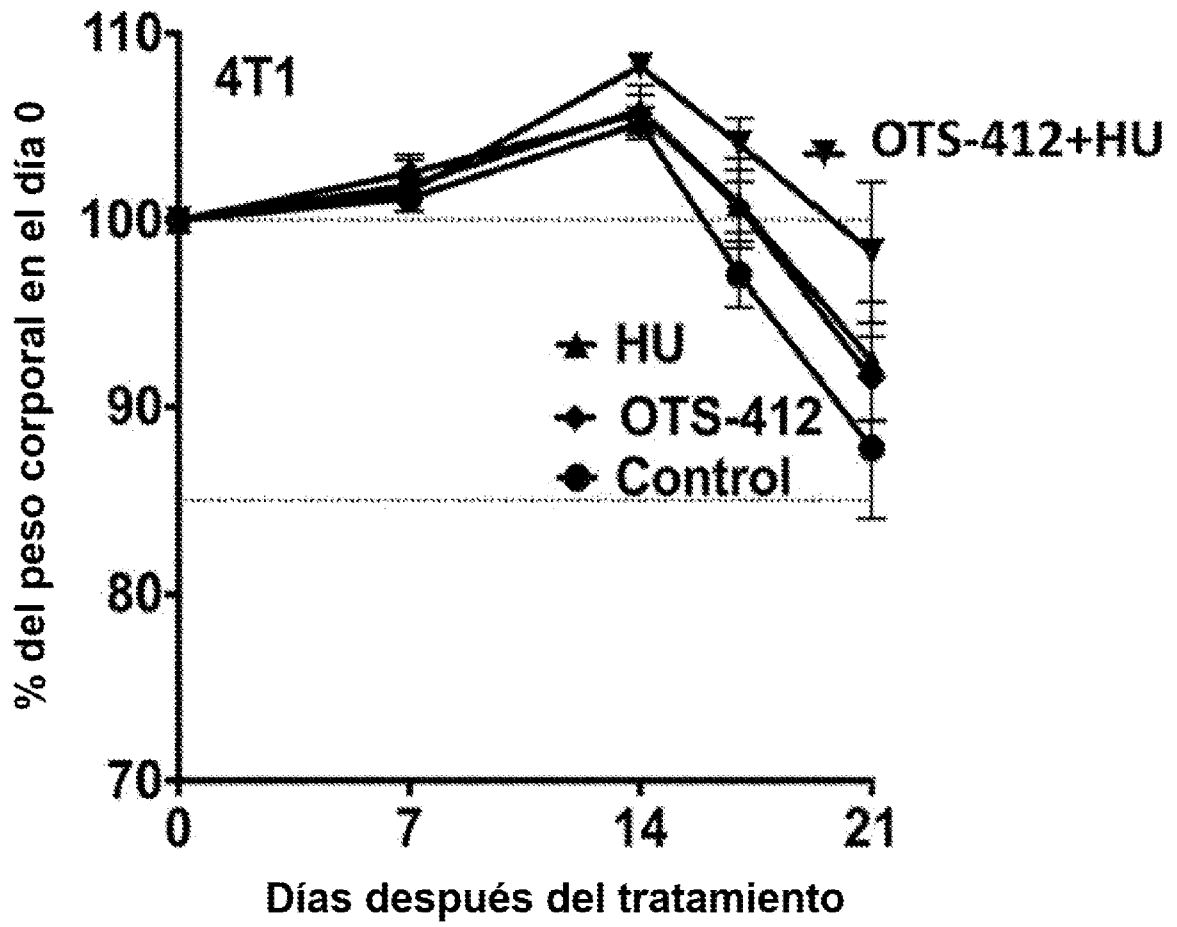


Fig. 10

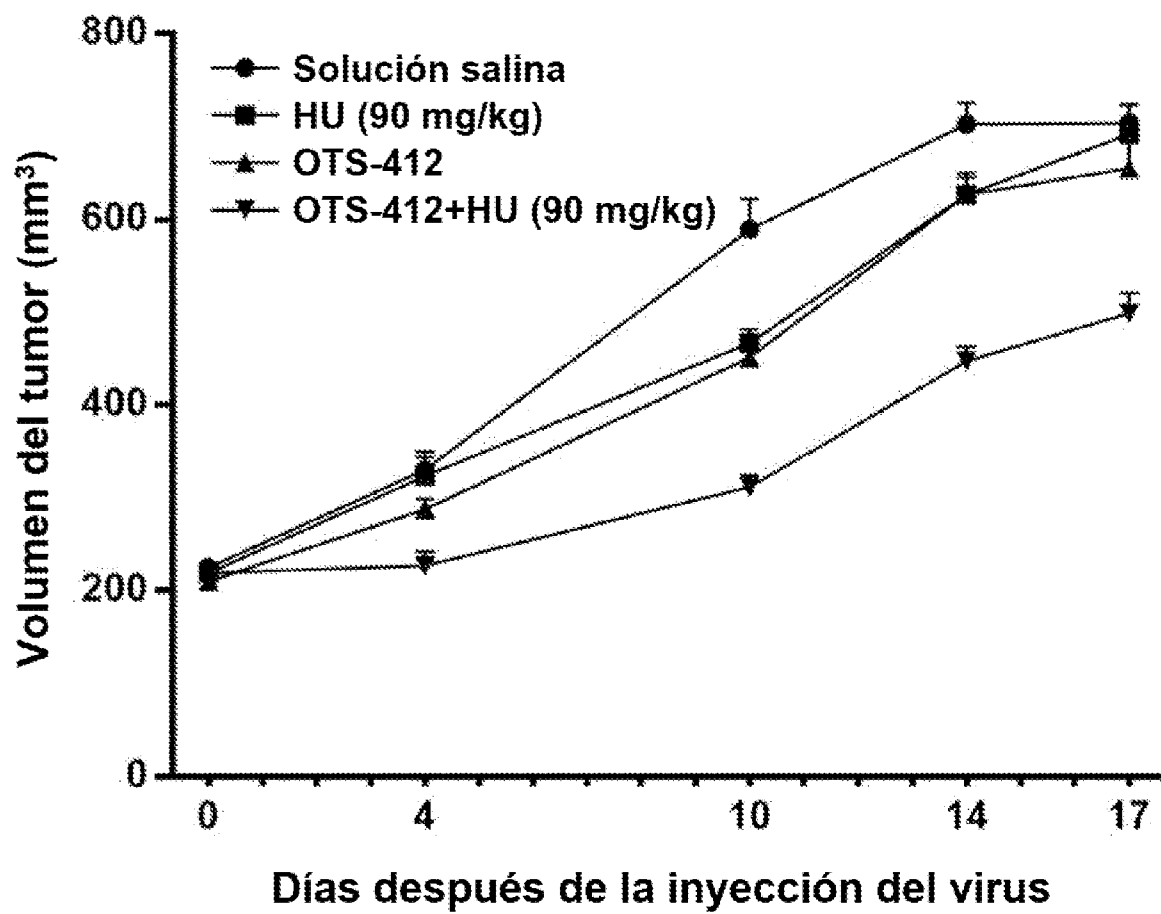


Fig. 11

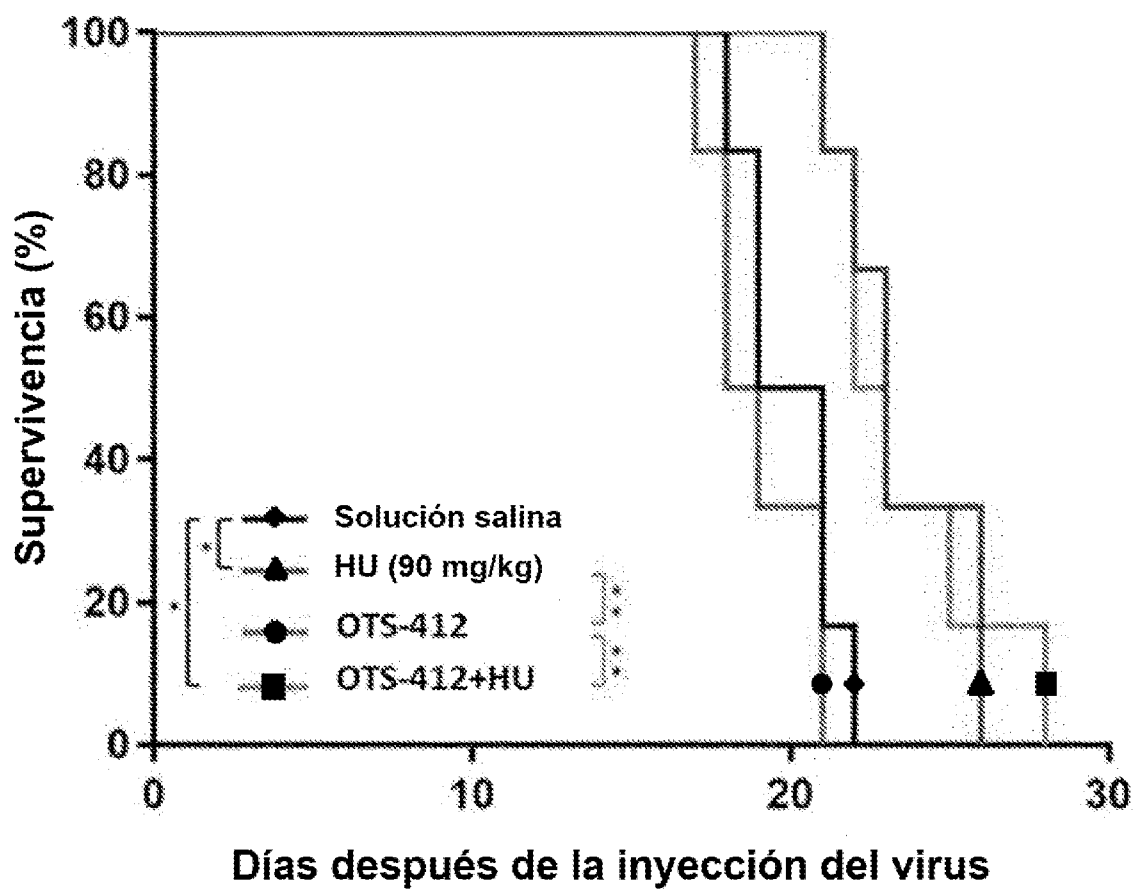


Fig. 12

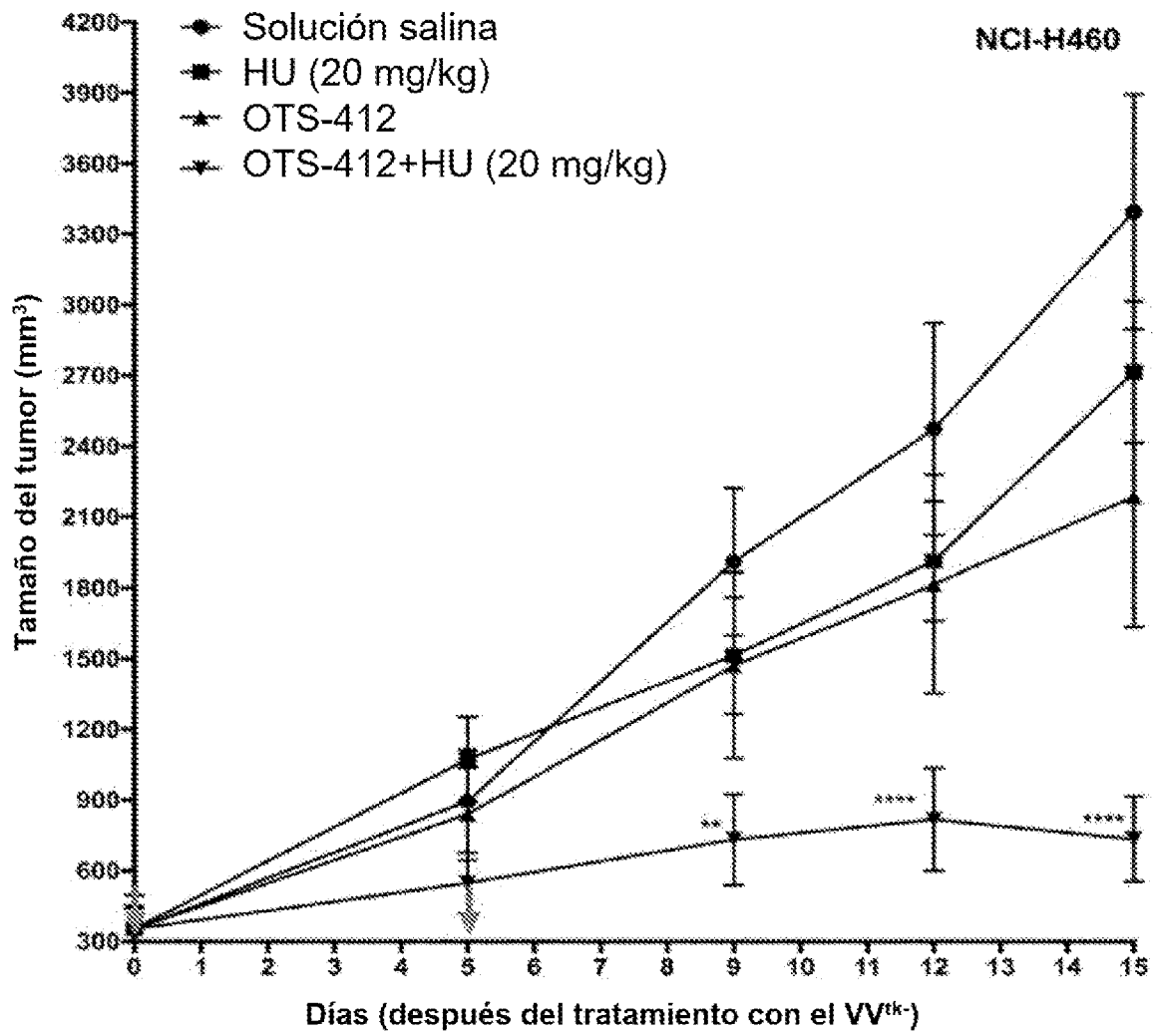


Fig. 13

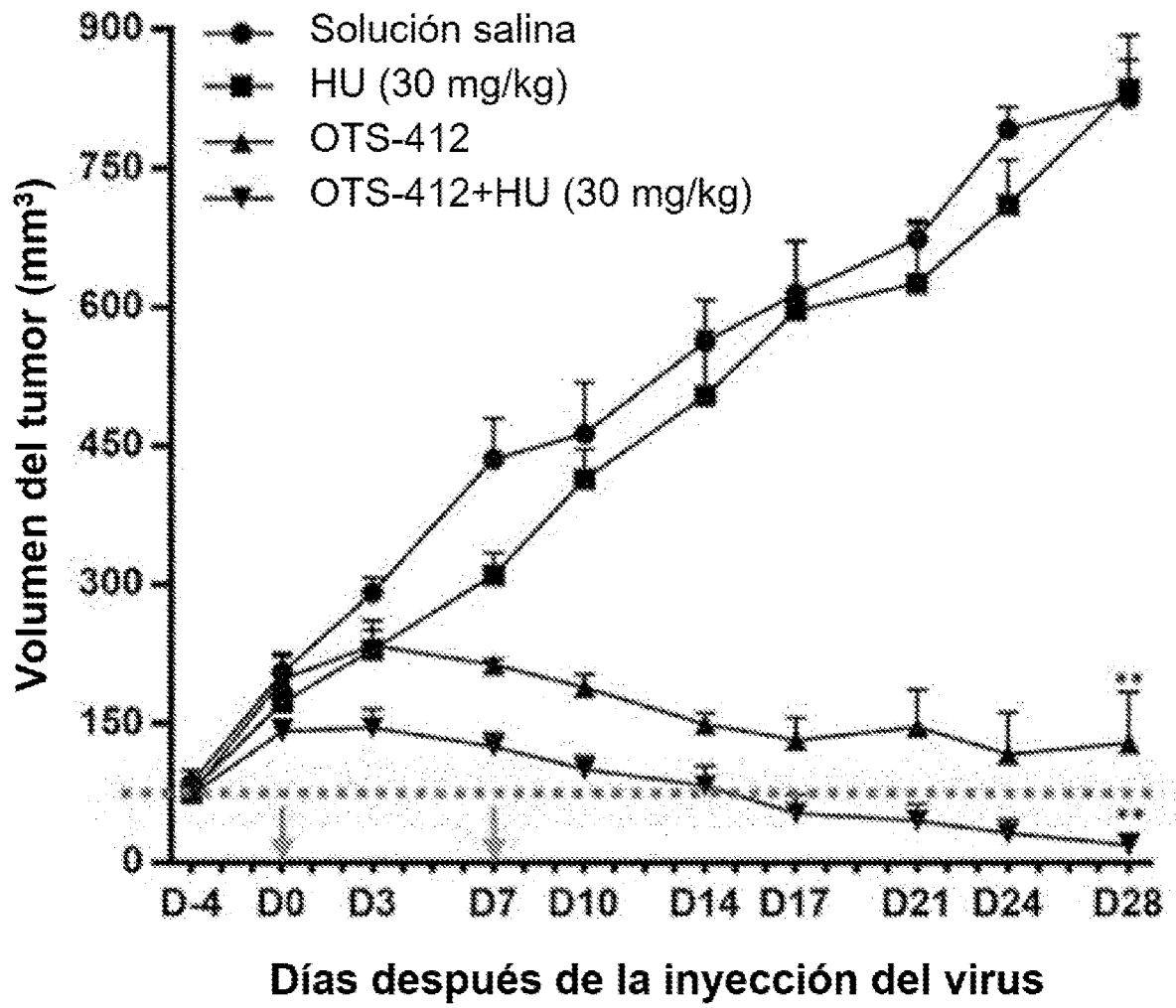


Fig. 14

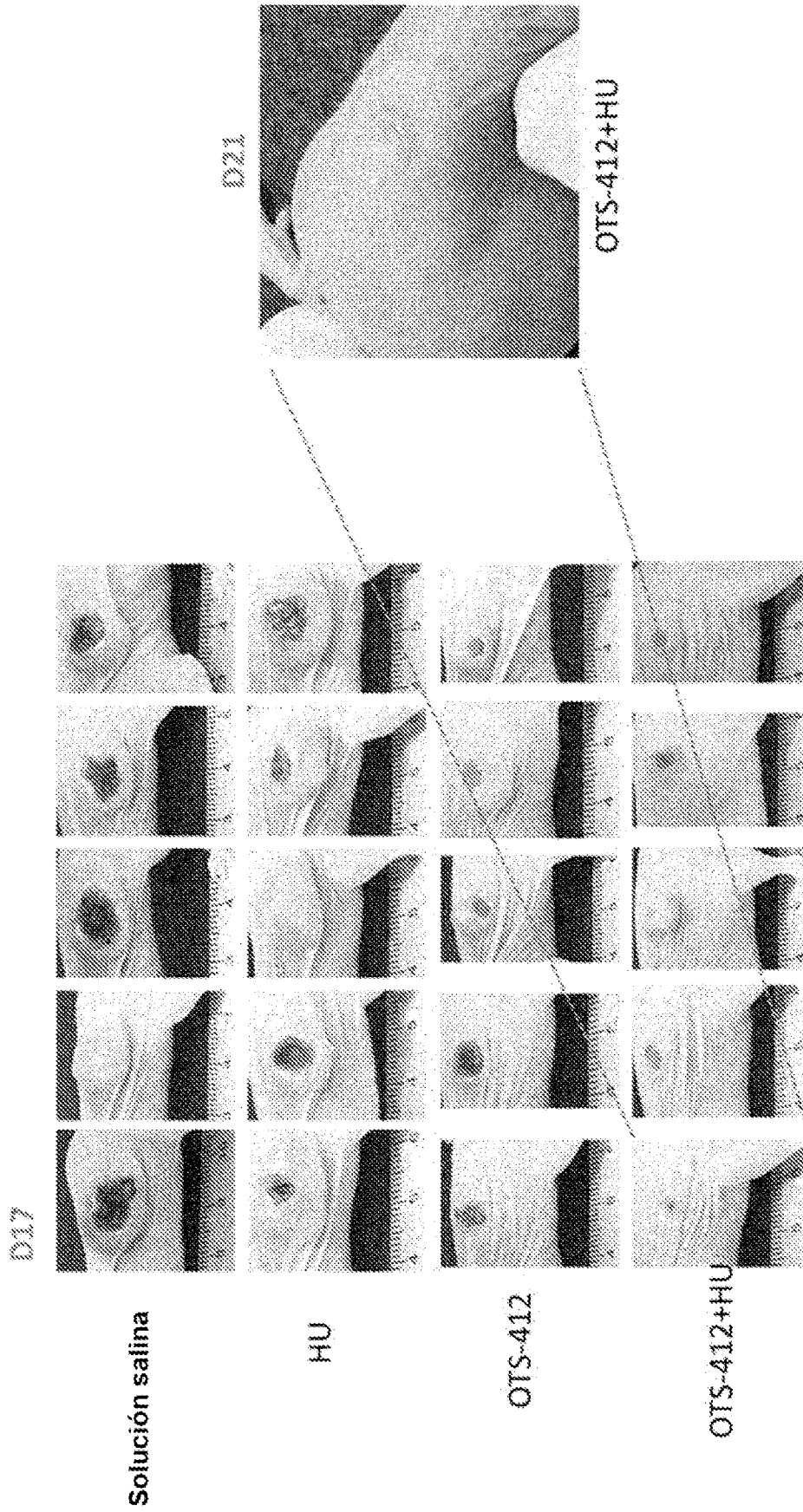


Fig. 15

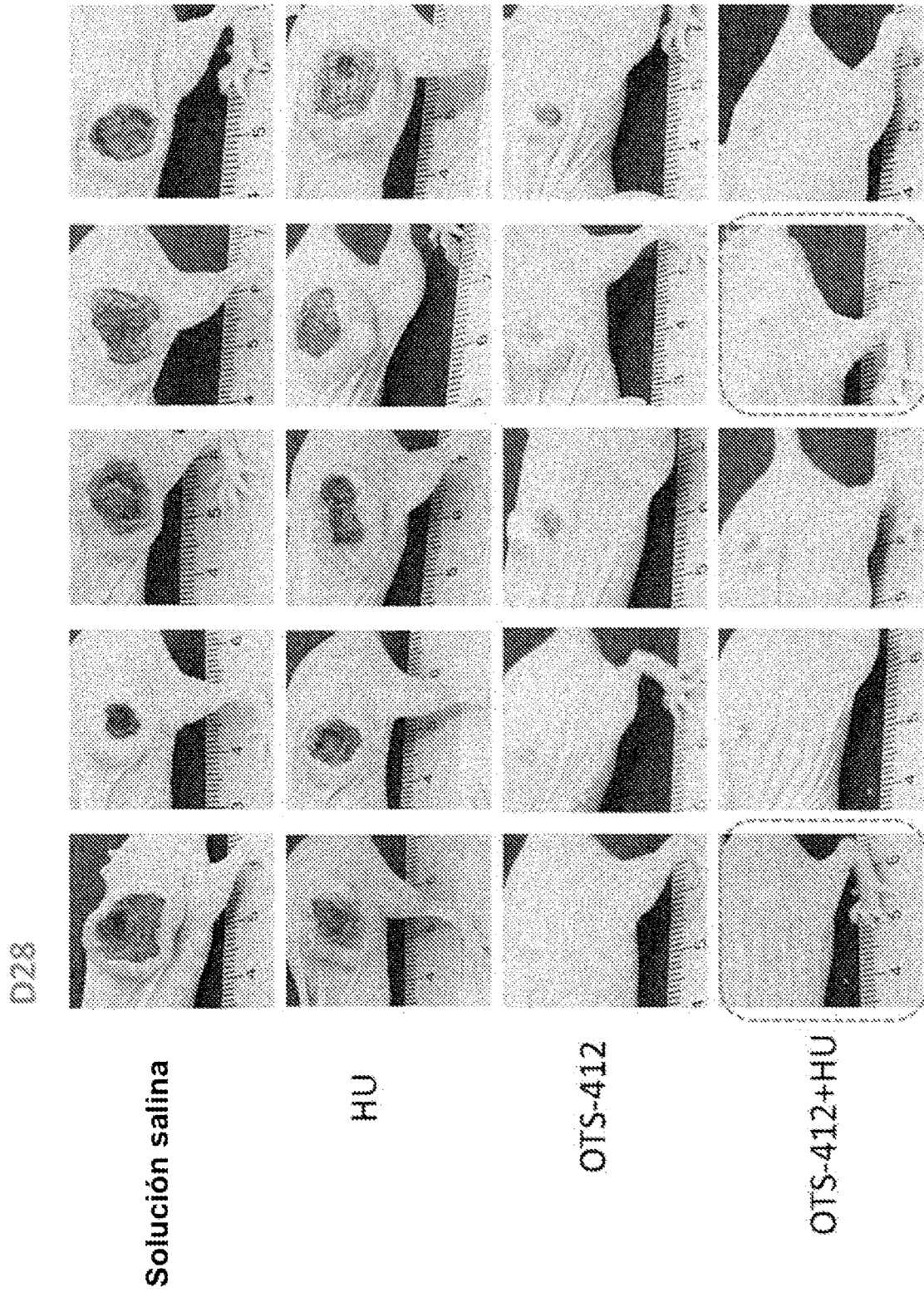


Fig. 16

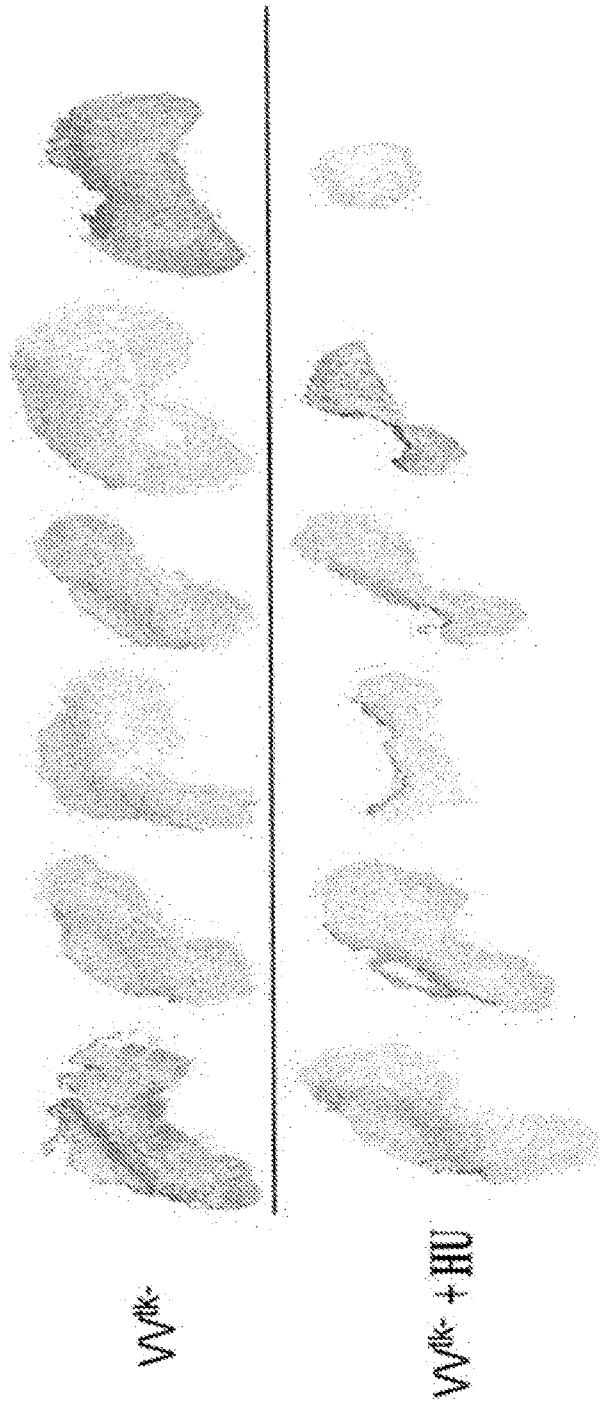


Fig. 17

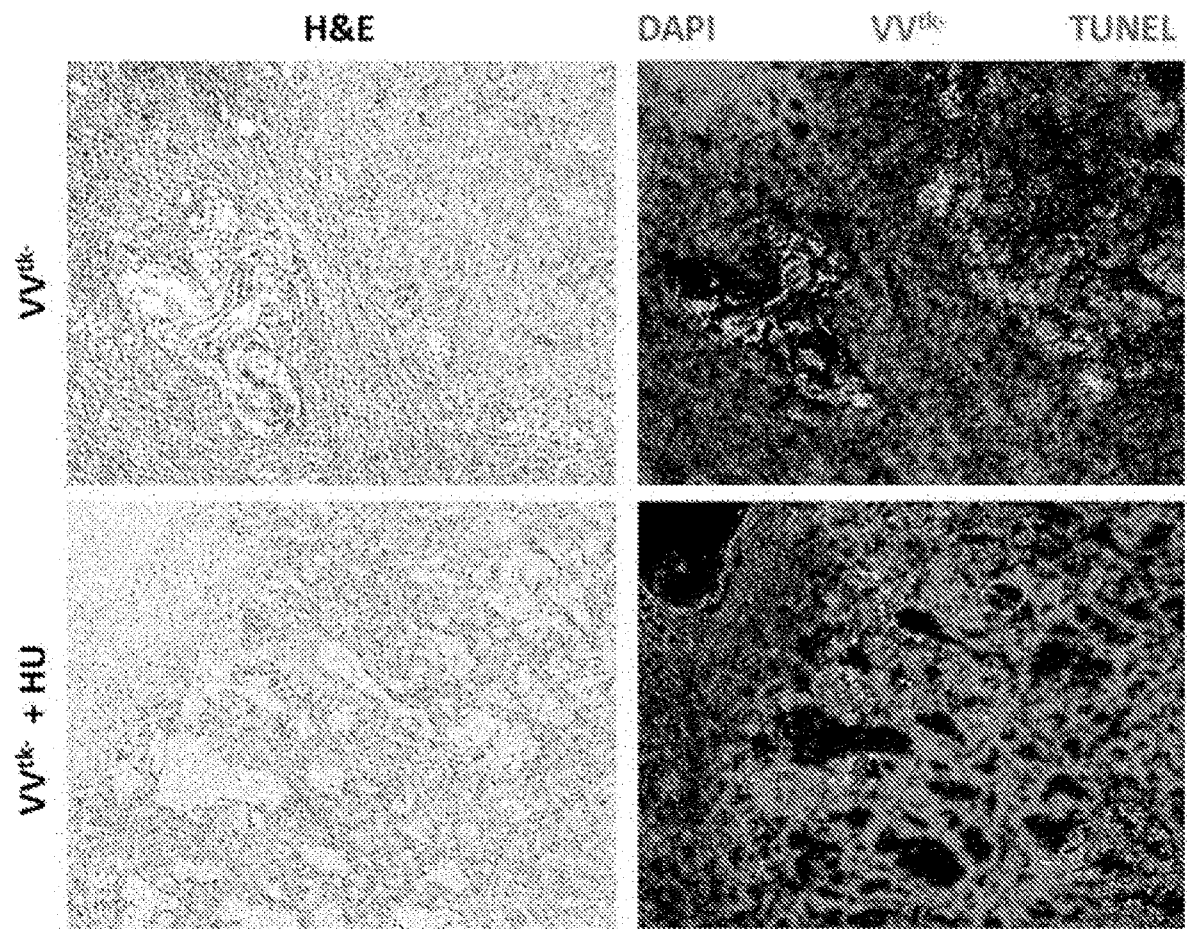


Fig. 18

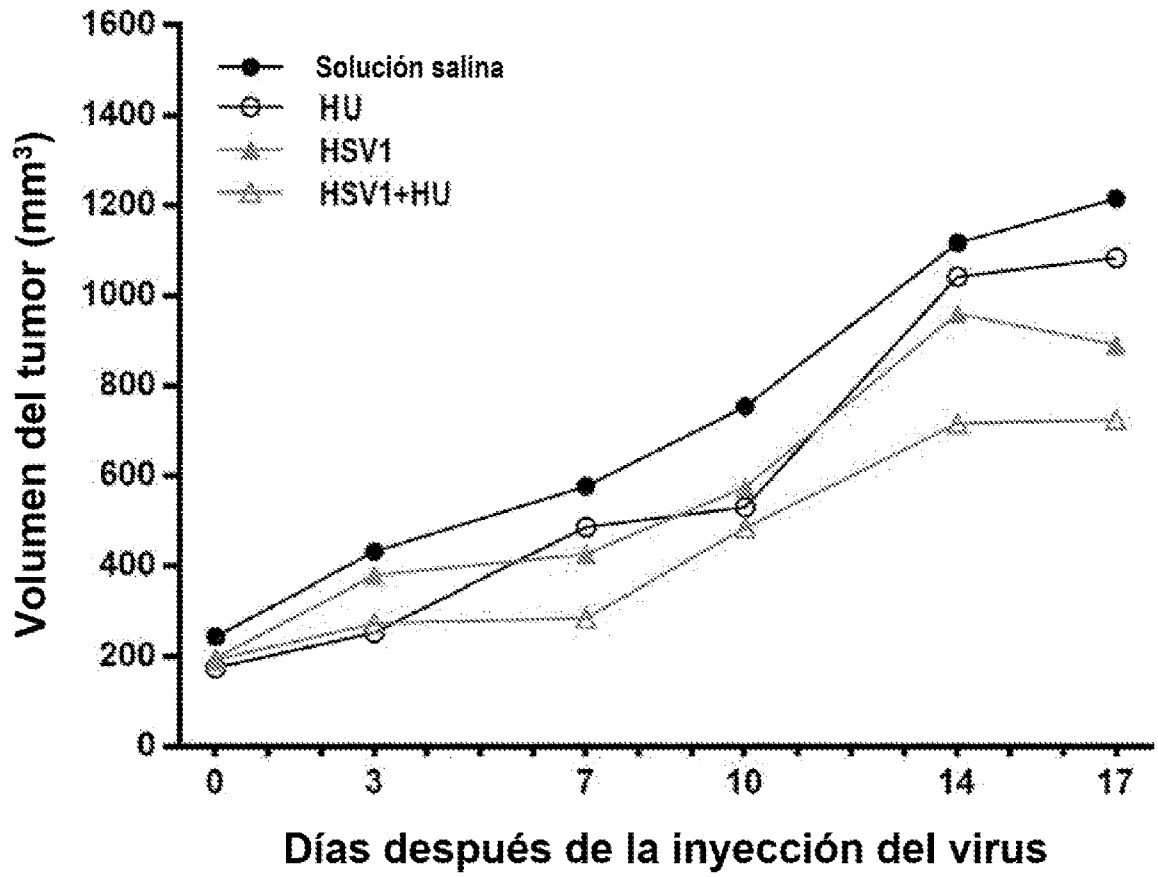


Fig. 19

