



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 239 928**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/76 (2006.01)

A61P 25/04 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03722131 .4**

(96) Fecha de presentación : **07.05.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1505992**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

(54) Título: **Método para reducir el dolor utilizando virus oncolíticos.**

(30) Prioridad: **09.05.2002 US 378675 P**
29.01.2003 US 443177 P

(73) Titular/es: **Oncolytics Biotech Inc.**
Suite 210, 1167 Kensington Crescent N.W.
Calgary, Alberta T2N 1X7, CA

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

(72) Inventor/es: **Morris, Donald;**
Coffey, Matthew, C. y
Thompson, Bradley, G.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Método para reducir el dolor utilizando virus oncolíticos.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a usos médicos para reducir el dolor asociado a enfermedades proliferativas en un mamífero usando virus oncolíticos, particularmente reovirus.

10 Referencias

Patente de EE.UU. 5,023,252.

Patente de EE.UU. 6,110,461.

15 Patente de EE.UU. 6,136,307.

Patente de EE.UU. 6,261,555.

20 Patente de EE.UU. 6,344,195.

Publicación de Solicitud de Patente de EE.UU. Nº 20020037576.

Documento WO 94/18992, publicado el 1 de Septiembre de 1994.

25 **Bar-Eli**, N., et al., "preferential cytotoxic effect of Newcastle disease virus on lymphoma cells", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 122: 409-415 (1996).

30 **Blagoselelonny**, M.V., et al., "in vitro Evaluation of a p53-Expressin g Adenovirus as an Anti-Cancer Drug", *Int. J. Cancer* 67(3):386-392 (1996).

Chandron and **Nibert**, "Protease cleavage of reovirus capsid protein mu1 and mu1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subvirion particle" *J. of Virology* 72(1):467-75 (1998).

35 **Chang** et al., *PNAS* 89:4825-4829 (1992).

Chang, H.W. et al., *Virology* 194:537-547 (1993).

40 **Chang** et al., *J. Virol.* 69:6605-6608 (1995).

Cleary J. "Cancer Pain Management" *Cancer Control* 7: 120-131 (2000).

45 **Cleeland** C., et al. "Pain and its treatment in outpatients with metastatic cancer" *N Engl J Med.* 330: 592-596 (1994).

Cuff et al., "Enteric reovirus infection as a probe to study immunotoxicity of the gastrointestinal tract" *Toxicological Sciences* 42(2):99-108 (1998).

50 **Duncan** et al., "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein" *Virology* 182(2):810-9 (1991).

Fields, B.N. (ed.) *Fundamental Virology* (3rd Edition), *Lippencott-Raven Press* (1996).

55 **Fueyo**, J., et al., "A Mutant Oncolytic Adenovirus Targeting the Rb Pathway Produces Anti-Glioma Effect *in Vivo*", *Oncogene* 19(1):2-12 (2000).

Harlow, E., et al., "Antibodies. A Laboratory Manual". *CSH Laboratories*, New York, 1988.

60 **Kawagishi-Kobayashi**, M., et al., *Mol. Cell. Biology* 17:4146-4158 (1997).

Lesage P. and **Portenoy** R.K. "Trends in Cancer Pain Management" *Cancer Control* 6: 136-145 (1999).

Mah et al., "The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virion-anchoring function" *Virology* 179(1):95-103 (1990).

65 The Merck Manual (17th ed.), particularly Chapter 167. *Merck Research Laboratories*, New Jersey (1999).

- Merskey H, Bogduk N, eds. "Classification of Chronic Pain: Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms," *Prepared by the Task Force on Taxonomy of the International Association for the Study of Pain*. 2nd ed. Seattle, Wash: IASP Press (1994).
- 5 Miguel R. "Interventional Treatment of Cancer Pain: The Fourth Step in the World Health Organization Analgesic Ladder?" *Cancer Control*, 7:149-156 (2000).
- Nemunaitis, J., *Invest. New Drugs* 17:375-386 (1999).
- 10 Nibert, et al. "Reoviruses and their replication", pages 1557-96 in Fundamental Virology (Fields et al., 3rd Edition), *Lippencott-Raven Press* (1996).
- Portenoy R., et al. "Symptom prevalence, characteristics and distress in a cancer population" *Qual Life Res.* 3: 183-189 (1994).
- 15 Reichard, K.W., et al., "Newcastle Disease Virus Selectively Kills Human Tumor Cells", *J. of Surgical Research* 52:448-453 (1992).
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., *Mack Publishing Company*, Pennsylvania, 1990.
- 20 Romano et al., *Mol. and Cell. Bio.* 18:7304-7316 (1998).
- Sharp et al., *Virol.* 250:301-315 (1998).
- Turner and Duncan, "Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma: evidence for 25 a conformation-dependent receptor binding domain" *Virology* 186(1):219-27 (1992).
- World Health Organization. "Cancer Pain Relief: With a Guide to Opioid Availability", *Geneva*, Switzerland: WHO (1996).
- 30 Yoon, S.S., et al., "An Oncolytic Herpes Simplex Virus Type I Selectively Destroys Diffuse Liver Metastases from Colon Carcinoma", *FASEB J.* 14:301-311(2000).
- Zorn, U. et al., "Induction of Cytokines and Cytotoxicity against Tumor Cells by Newcastle Disease Virus", *Cancer Biotherapy* 9(3):22-235 (1994).
- 35 **Antecedentes de la invención**
- El dolor es un síntoma común en los pacientes con cáncer, que afecta hasta al 50% de los pacientes que se someten a tratamiento activo del cáncer y hasta al 90% de aquellos con enfermedad avanzada. (Portenoy, et al., 1994; Cleeland, et al., 1994). La Organización Mundial de la Salud, organizaciones profesionales internacionales y nacionales y agencias gubernamentales de los Estados Unidos y otros países han reconocido la importancia del manejo del dolor como parte de la rutina de cuidado en el cáncer (Miguel, 2000).
- Los métodos actuales de tratamiento del dolor en pacientes con cáncer están basados principalmente en terapia de fármacos que incluyen terapia opioide, no opioide y analgésicos adyuvantes. Sin embargo, narcóticos como la morfina tienen desventajas de adicción y desarrollo de tolerancia. El uso de no opiáceos y analgésicos adyuvantes está limitado por los efectos secundarios y por la toxicidad gastrointestinal y renal. (Cleary, 2000).
- Para los pacientes que no responden adecuadamente a la terapia de fármacos, se consideran terapias analgésicas alternativas. Estas terapias incluyen intervenciones de anestesia, quirúrgicas, y neuroestimuladoras. Por ejemplo, se considera la neurolisis destructiva usando fenol o alcohol cuando fallan o son posibles otros enfoques no destructivos, el dolor está bien localizado, y el bloqueo no comprometerá la fuerza o la función de los esfínteres. Aunque algunas técnicas neuroestimuladoras pueden ser relativamente no invasivas (por ejemplo, estimulación nerviosa transcutánea eléctrica y acupuntura) otras todavía son invasivas (por ejemplo, estimulación de la columna dorsal o estimulación profunda del cerebro). Las técnicas neuroquirúrgicas dirigidas contra estructuras específicas del sistema nervioso central o periférico sólo pueden beneficiar a un grupo sumamente seleccionado con dolor relacionado con cáncer refractario. La cordotomía es lo más usado (Lesage y Portenoy, 1999).
- En vista de los inconvenientes asociados con los medios actuales para tratar el dolor en pacientes con cáncer, todavía existe la necesidad de métodos mejorados, para tratar el dolor, que no tengan efectos secundarios negativos o toxicidad, que no sean invasivos y no estén asociados con desarrollo a tolerancia.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento sorprendente de que virus oncolíticos, en particular reovirus, 65 pueden reducir el dolor asociado a enfermedades proliferativas, particularmente con el crecimiento de una masa tumoral sólida. El reovirus es un agente antitumoral oncolítico altamente selectivo, que se replica selectivamente en células activadas por ras con la posterior salida lítica de las células (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N°s

ES 2 239 928 T3

6,110,461; 6,136,307; 6,261,555; y 6,344,195). En la presente invención, demostramos que la administración del virus da como resultado una disminución de los síntomas del dolor directo asociado al tumor. Esta disminución del dolor ocurría con y sin regresión del tumor actual. Además, no había efectos secundarios significativos o efectos adversos relacionados con la administración del reovirus.

5 Por consiguiente, la presente invención hace posible un método para reducir el dolor asociado a un neoplasma en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de uno o más virus oncolíticos. Preferiblemente, el mamífero sufre de dolor debido al neoplasma, y cuenta con medidas analgésicas para reducir el dolor antes de ser tratado con virus oncolíticos. Sin embargo, con virus oncolíticos, la cantidad de medidas analgésicas requeridas 10 por el mamífero para reducir el dolor es menor que con la ausencia de virus oncolíticos. La medida analgésica puede ser un fármaco analgésico o una medida sin fármaco, como cirugía. El fármaco analgésico puede ser seleccionado del grupo que consiste en analgésicos opiáceos, analgésicos no opiáceos, anestésicos y agonistas alfa-2 adrenérgicos.

15 El virus oncolítico es reovirus. El reovirus puede ser un reovirus de mamífero o un reovirus de aves. Preferiblemente, el reovirus es un reovirus humano. El reovirus humano puede ser cualquiera de los tres serotipos: tipo 1 (cepa Lang o TL1), tipo 2 (cepa Jones o T2J) y tipo 3 (cepa Dearing o cepa Abney, T3D). Preferiblemente, el reovirus humano es reovirus serotipo 3. El reovirus puede ser modificado de tal forma que se elimine la cápsida externa, el virión se empaquete en un liposoma o micela, o las proteínas de la cápsida externa hayan sido mutadas. El reovirus puede ser administrado en una sola dosis o en múltiples dosis.

20 El reovirus también puede ser un reovirus recombinante. El reovirus recombinante puede ser generado por co-infección de células de mamíferos con diferentes subtipos de reovirus. El reovirus recombinante puede ser natural o no natural. El reovirus recombinante puede ser de dos o más cepas de reovirus, particularmente dos o más cepas de reovirus seleccionados del grupo que consiste en cepa Dearing, cepa Abney, cepa Jones, y cepa Lang. El reovirus recombinante también puede ser resultado de una variedad de reovirus de diferentes serotipos, como los seleccionados 25 del grupo que consiste en reovirus de serotipo 1, reovirus de serotipo 2 y reovirus de serotipo 3. El reovirus recombinante puede comprender secuencias codificantes de variantes de proteínas de cubierta naturales o de secuencia codificantes de proteínas de cubierta mutadas.

30 El neoplasma puede ser un neoplasma sólido. El neoplasma puede ser metastático y/o terminal. El virus puede ser administrado por inyección dentro o cerca del neoplasma sólido, o por cualquier otro método conocido en la materia, como administración sistémica.

35 Preferiblemente, el mamífero se selecciona de perros, gatos, roedores, ovejas, cabras, ganado, caballos, cerdos, humanos y primates no humanos. Más preferiblemente, el mamífero es un humano. El mamífero puede ser sometido a quimioterapia, inmunoterapia, terapia hormonal o radiación junto con los reovirus.

40 También se proporciona una composición farmacéutica para reducir el dolor en un mamífero, que comprende un reovirus y un analgésico. La composición también puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable. El virus puede ser un virus modificado. El reovirus también puede ser un reovirus recombinante. El reovirus recombinante también puede ser generado por co-infección de células de mamífero con diferentes subtipos de reovirus. El reovirus recombinante puede ser natural o no natural. El reovirus recombinante puede ser de dos o más cepas de reovirus, particularmente dos o más cepas de reovirus seleccionadas del grupo que consiste en cepa Dearing, cepa Abney, cepa Jones, y cepa Lang. El reovirus recombinante también puede ser resultado de una variedad de reovirus de diferentes 45 serotipos, como los seleccionados del grupo que consiste en reovirus de serotipo 1, reovirus de serotipo 2 y reovirus de serotipo 3. El reovirus recombinante puede comprender secuencias codificantes de variantes de proteínas de cubierta naturales o de secuencia codificantes de proteínas de cubierta mutadas.

50 Además se proporciona una composición farmacéutica para reducir el dolor en un mamífero que sufre de neoplasma, que comprende los dos componentes siguientes:

- (a) un primer componente que es una primera composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un reovirus; y
- (b) un segundo componente que es una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un analgésico.

55 Preferiblemente, la cantidad de analgésico es menor que la requerida si el primer componente está ausente.

60 Cada componente también puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, los dos componentes pueden ser administrados de forma separada. El analgésico preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en analgésicos opiáceos y analgésicos no opiáceos. En particular, el virus oncolítico es un reovirus. El reovirus puede ser también un reovirus recombinante.

65 Otro aspecto de la presente invención proporciona un kit que comprende un reovirus y un analgésico. El kit puede, además, comprender cualquier componente que pueda ser usado para practicar la presente invención tal como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, el kit puede comprender al menos un virus oncolítico adicional, un agente quimioterapéutico, un agente inmunosupresor, un medio para suprimir el sistema inmune, un anticuerpo anti-antivirus, un medio para administrar cualquiera de los componentes del kit, y/o una instrucción para usar el kit.

ES 2 239 928 T3

Los métodos, composiciones farmacéuticas y kits de la invención proporcionan un medio eficaz para reducir el dolor asociado a enfermedades proliferativas en un mamífero, sin los efectos secundarios asociados a otras formas de tratamiento del dolor. En el caso de reovirus, debido a que el reovirus no se conoce que esté asociado a la enfermedad, cualquier hecho seguro asociado a la administración intencionada de un virus está minimizado.

5 Estos y otros objetos, características y ventajas precedentes de la invención serán evidentes a partir de la más particular y siguiente descripción de las realizaciones preferidas de la invención.

Breve descripción de los dibujos

10 Figura 1

La Figura 1A muestra la escalera en 3 etapas del analgésico desarrollado por la Organización Mundial de la Salud. La Figura 1B muestra el 4º paso propuesto en Miguel, 2000.

15 Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que virus oncolíticos, en particular reovirus, pueden reducir el dolor asociado a enfermedades proliferativas, particularmente al crecimiento de una masa tumoral 20 sólida. El reovirus es un agente antitumoral oncolítico altamente selectivo, que se replica selectivamente en células activadas por ras con la posterior salida lítica de las células. En la presente invención, demostramos que la administración del virus da como resultado una disminución de los síntomas del dolor directo asociado al tumor. Esta disminución del dolor ocurría con y sin regresión del tumor actual. Además, no había efectos secundarios significativos o efectos 25 adversos relacionados con la administración del reovirus.

25 Previamente a la descripción de la invención en mayor detalle, los términos utilizados en esta solicitud se definen a continuación a menos que se indique lo contrario.

Definiciones

30 “Dolor”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una experiencia sensorial y emocional no placentera que se asocia principalmente a daño tisular o se describe en términos de dicho daño, o ambos (Merskey *et al.*, 1994).

“Dolor reducido”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a dolor aliviado en un mamífero con el fin de 35 aumentar el bienestar y con ello, la calidad de vida del mamífero. Un dolor se reduce cuando, por ejemplo, se requiere una cantidad menor de un analgésico dado, se requiere una etapa menos en la escalera del analgésico (véase abajo), o se requiere una menor frecuencia de uso de los analgésicos. La reducción en la cantidad o frecuencia de los analgésicos es, preferiblemente, al menos, aproximadamente un 10%, más preferiblemente, al menos, aproximadamente el 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90%, y más preferiblemente el 100% (es decir, no se necesita mas el analgésico). 40 La reducción en las etapas del analgésico puede ser una etapa; por ejemplo, un paciente, normalmente, necesita la etapa 4 del tratamiento para el dolor, pero se reduce a la etapa 3. La reducción en las etapas del analgésico es preferiblemente de dos o tres etapas y más preferiblemente cuatro etapas.

45 Un “dolor tumoral” o “dolor canceroso” es un dolor asociado a la enfermedad proliferativa. El dolor se puede deber directamente a la presencia de la enfermedad, o estar asociado indirectamente a la enfermedad, como resultado de una operación realizada para la enfermedad.

El término “nociceptivo” es aplicado a dolores que, se presume, son mantenidos por daño tisular actual. El dolor nociceptivo es llamado somático cuando la activación actual se relaciona con nervios primarios aferentes en tejidos 50 somáticos (por ejemplo, hueso, articulaciones, o músculo) y visceral cuando los aferentes de las vísceras son activados por daño. En general, el dolor visceral está descrito como una sensación difusa de tipo presión, que está poco localizado. El dolor somático tiene una naturaleza de dolor opresivo que el paciente puede localizar de forma exacta. Los dolores que son nociceptivos, como un dolor de hueso, son los de tipo más común asociados al cáncer.

55 “Dolor neuropático” es un dolor que, se cree, está sostenido por procesamiento somatosensorial aberrante en el sistema nervioso periférico o central. El dolor neuropático se puede presentar como una sensación ardiente, de hormigueo, con un componente lacerante. Además puede estar subdividido en dolores no aferentes (como dolor central, dolor fantasma, o neuralgia postherpética), mononeuropatías periféricas y polineuropatías, y los síndromes de dolor regional complejo (distrofia simpática refleja o causalgia). Los síndromes de dolor neuropático responden menos bien 60 a fármacos opiáceos que los síndromes de dolor nociceptivo.

Los síndromes de dolor pueden ser “agudos” o “crónicos”.

65 Los síndromes de “dolor agudo” normalmente están causados por intervenciones diagnósticas o terapéuticas. El dolor agudo también puede estar debido al neoplasma (por ejemplo, colapso vertebral y otras fracturas patológicas, obstrucción aguda del intestino, y hemorragia dentro del tumor) o patologías relacionadas (por ejemplo, dolor agudo asociado a infección, mialgia y artralgia asociada con sepsis, dolor asociado a heridas superficiales o abscesos).

ES 2 239 928 T3

El dolor agudo puede estar asociado a procedimientos de diagnóstico que incluyen, por ejemplo, punción lumbar, biopsia de médula ósea, y paracentesis. El dolor agudo puede estar asociado a procedimientos terapéuticos que incluyen, por ejemplo, pleurodesis, embolización tumoral, e inserción nefrostómica. El dolor agudo puede estar asociado a procedimientos analgésicos que incluyen, por ejemplo, síndrome de hiperálgesia opioide espinal, y dolor tras terapia con estroncio-98. El dolor agudo también puede estar asociado a terapias que incluyen quimioterapia (por ejemplo, quimioterapia intraperitoneal, mucositis orofaríngea, y neuropatía periférica), terapia hormonal (por ejemplo, ginecomastia dolorosa, dolor agudo explosivo inducido por hormonas), immunoterapia (por ejemplo, artralgia y mialgia debido al interferón y a la interleuquina), y terapia de radiación (por ejemplo, mucositis orofaríngea, enteritis y proctolitis por radiación aguda, y plexopatía braquial).

Las oleadas agudas de dolor también son altamente prevalentes en aquellos con dolor crónico. De la mitad a dos tercios de los pacientes con dolor crónico bien controlado experimentan dolores progresivos (“breakthrough”) transitorios (Organización Mundial de la Salud, 1996).

Los síndromes de “dolor crónico”, principalmente se dan como resultado a partir de un efecto directo del neoplasmá. También pueden estar relacionados con terapia o representar enfermedades no relacionadas con la enfermedad o su tratamiento.

Un “fármaco analgésico” es una sustancia que puede reducir el dolor en un mamífero. Un “analgésico” es un fármaco analgésico u otra medida (como cirugía) usada para reducir el dolor en un mamífero. Fármacos analgésicos incluyen analgésicos opiáceos y analgésicos no opiáceos.

“Analgésicos opiáceos”, “opioide”, o “analgésicos narcóticos” son sustancias naturales o sintéticas que se unen a receptores opiáceos en el sistema nervioso central, produciendo una acción agonista. Los analgésicos opiáceos son conocidos en la materia (véase, por ejemplo, El Manual Merck, 1999). Ejemplos de analgésicos opiáceos incluyen, pero no se limitan a, codeína, fentanilo, hidromorfona, levorfanol, meperidina, metadona, morfina, oxicodona, oximorfona, propoxifeno, buprenorfina, butorfanol, dezocina, nalbufina, y pentazocina.

“Analgésicos no opiáceos” son sustancias naturales o sintéticas que reducen el dolor pero no son analgésicos opiáceos. Los analgésicos no pioídes son conocidos en la materia (véase, por ejemplo, El Manual Merck, 1999). Ejemplos de analgésicos no opiáceos incluyen, pero no se limitan a, etodolac, indometacina, sulindac, tolmentina, nabumetona, piroxican, acetaminofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, oxaprozina, aspirina, trisalicilato de colina y magnesio, diflunisal, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, y fenilbutazona.

Una “célula neoplásica”, “célula tumoral”, o “célula con un desorden proliferativo”, se refiere a una célula que prolifera a una relación anormalmente alta. Un nuevo crecimiento que comprende células neoplásicas es un “neoplasma”, también conocido como “tumor”. Un tumor es un crecimiento anormal de tejido, generalmente formando una masa distintiva, que crece por proliferación celular más rápidamente que el crecimiento tisular normal. Un tumor puede mostrar falta total o parcial de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. Tal como se utiliza en la presente memoria, está previsto que un tumor abarque tumores hematopoyéticos así como tumores sólidos.

Un tumor puede ser benigno (tumor benigno) o maligno (tumor maligno o cáncer). Los tumores malignos pueden ser ampliamente clasificados en tres tipos principales. Los tumores malignos que surgen de estructuras epiteliales son llamados carcinomas, los tumores malignos que se originan a partir de tejidos conectivos como músculo, cartílago, grasa o hueso, son llamados sarcomas y los tumores malignos que afectan a estructura hematopoyética (estructuras referidas a la formación de células sanguíneas) incluyendo componentes del sistema inmune, son llamados leucemias y linfomas. Otros tumores incluyen, pero no se limitan a, neurofibromatosis.

Una “enfermedad proliferativa”, también llamada un “neoplasma” o “tumor”, es una enfermedad o condición causada por células que crecen más rápidamente que las células normales, es decir, células neoplásicas. Enfermedades proliferativas incluyen tumores benignos y tumores malignos. Cuando se clasifican por estructura del tumor, las enfermedades proliferativas incluyen tumores sólidos y tumores hematopoyéticos.

“Células neoplásicas activadas por ras” o “células neoplásicas mediadas por ras” se refiere a células que proliferan a una relación anormalmente alta debido a, al menos en parte, la activación de la ruta de ras. La ruta de ras puede estar activada por medio de mutación estructural del gen ras, por niveles elevados de expresión génica de ras, por elevada estabilidad del mensaje del gen ras, o por cualquier mutación u otro mecanismo que lleve a la activación de ras o un factor o factores río abajo o río arriba a partir de ras en la ruta de ras, aumentando, de ese modo, la actividad de la ruta de ras. Por ejemplo, la activación del receptor de EGF, receptor de PDGF o sos da como resultado la activación de la ruta de ras. Células neoplásicas mediadas por ras incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas mediadas por ras, que son células que proliferan de una forma maligna debido a la activación de la ruta de ras.

Un “cáncer terminal”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un cáncer que no es operable y donde no es posible un tratamiento.

Un “tumor metastático” es un tumor que ha metastatizado desde un tumor localizado en otro lugar en el mismo animal.

ES 2 239 928 T3

El virus puede ser natural o modificado. El virus es “natural”: cuando puede ser aislado de una fuente en la naturaleza y no ha sido modificado de forma intencionada por humanos en el laboratorio. Por ejemplo, el virus puede ser de una “fuente de campo”, que es, de un animal infectado.

- 5 El virus puede estar pre-tratado químicamente o bioquímicamente (por ejemplo, por tratamiento con una proteasa, como quimotripsina o tripsina) antes de la administración al receptor. El pre-tratamiento con una proteasa elimina la cubierta externa o cápsida del virus y puede aumentar la infectividad del virus. El virus puede ser cubierto en un lisoplasma o micela (Chandron y Nibert, 1998) para reducir o prevenir una respuesta inmune del animal que ha desarrollado inmunidad al virus. Por ejemplo, el virión puede ser tratado con quimotripsina en presencia de concentraciones de detergente de sulfato de alquilo formadores de micelas para generar una nueva partícula subvirión infecciosa.
- 10

Un “virus immunoprotegido” es un virus modificado para reducir o eliminar una reacción inmune al virus.

- 15 “Infección por virus” se refiere a la entrada y replicación de virus en una célula. De forma similar, “infección de un tumor por virus” se refiere a la entrada y replicación de virus en las células del tumor.

- “Reovirus” se refiere a cualquier virus clasificado en el género reovirus, tanto si es natural como si es modificado o recombinante. Los reovirus son virus con un genoma de ARN segmentado de doble cadena. Los viriones miden 60-80 nm de diámetro y poseen dos cubiertas de cápsidas concéntricas, cada una de las cuales es icosaédrica. El genoma 20 consiste en ARN de cadena doble en 10-12 segmentos diferenciados, con un tamaño genómico total de 16-27 kpb. Los segmentos de ARN individual varían en tamaño. Se han recuperado tres tipos de reovirus distintos pero relacionados en muchas especies. Los tres tipos comparten un antígeno común de unión a complemento.

- 25 El reovirus humano consiste de tres serotipos: tipo 1 (cepa Lang o T1L), tipo 2 (cepa Jones, T2J) y tipo 3 (cepa Dearing o cepa Abney, T3D). Los tres serotipos son fácilmente identificables en base a ensayos de desnaturización e inhibición con hemaglutinina (véase, por ejemplo, Fields, B.N. et al., 1996).

- 30 Una “cantidad eficaz” es una cantidad de una sustancia que es suficiente para dar como resultado el efecto pretendido. Para virus usados para reducir el dolor, una cantidad eficaz es una cantidad de virus suficiente para aliviar o eliminar el dolor.

“Administración a una célula neoplásica o neoplasma” indica que el virus es administrado en una manera tal que contacta con las células neoplásicas o las células del neoplasma (es decir, células neoplásicas).

- 35 El término “formas de unidad de dosis” se refiere a unidades físicamente diferenciadas apropiadas, como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, cada unidad contiene una cantidad predeterminada de virus calculada para producir el efecto deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico apropiado.

40 Dolores tumorales

La incidencia y severidad del dolor varía dependiendo del tipo de tumor. Por ejemplo, la Tabla 1 enumera varios tipos de cáncer y su asociación con el dolor. (Miguel, 2000).

45

TABLA 1

Tipo de cáncer y su asociación con el dolor		
	Tipo de cáncer	Pacientes con dolor (%)
50	Hueso	85
55	Cavidad oral	80
	Genitourinario (hombres/mujeres)	75/78
60	Pecho	52
	Pulmón	45
65	Gastrointestinal	40
	Linfoma	20
	Leucemia	5

ES 2 239 928 T3

El dolor puede ser nociceptivo (somático o visceral) o neuropático. Los síndromes de dolor nociceptivo relacionados con tumor pueden ser debidos a invasión neoplásica de hueso, articulación, músculo o tejido conectivo. Los síndromes de dolor de hueso son los más prevalentes. Las metástasis de hueso normalmente son indoloras y los factores que distinguen una lesión dolorosa de una no dolorosa se entienden pobremente. El dolor de huesos multifocal 5 normalmente está causado por extensión de metástasis.

La espina es el lugar más común de metástasis de hueso, y el dolor de espalda es un problema extremadamente común en la población con cáncer. Cualquier lesión neoplásica de las vértebras tiene el potencial de dañar la médula espinal o las raíces nerviosas y producir una situación neurológica comprometida devastadora. Patrones específicos de 10 dolor (por ejemplo, dolor en “crescendo”, explosión de dolor en decúbito, o dolor radicular), hallazgos neurológicos específicos (por ejemplo, radiculopatía), y hallazgos radiológicos específicos (por ejemplo, un 50% de colapso de un cuerpo vertebral) son sospechosos de compresión epidural. La compresión de la médula espinal epidural es un ejemplo convincente del valor del reconocimiento del síndrome en la evaluación de dolor por cáncer.

15 Los síndromes de dolor nociceptivo visceral pueden darse como resultado de obstrucción, infiltración, o compresión de estructuras viscerales, incluyendo tejidos conectivos de cavidades, viscerales y de soporte.

20 Los síndromes de dolor neuropático asociados a tumores pueden ser causados por infiltración tumoral o compresión de nervio, plexo, o raíces, o por los efectos remotos de tumores malignos en nervios periféricos. Estos síndromes son altamente variables. El carácter del dolor puede ser aflicción o disestético (sensaciones de dolor anormales, como quemazón), la localización puede ser en cualquier parte en la región dérmica inervada por la estructura neural dañada, y la disfunción puede ser o no motora, sensorial, o autónoma.

25 Los síndromes de dolor relacionados con el tratamiento pueden estar relacionados con terapias antineoplásicas. Los dolores nociceptivos relacionados con quimioterapia, radioterapia, o cirugía parecen no ser comunes. La radiación o los regímenes de quimioterapia basada en corticosteroides pueden inducir osteonecrosis de huesos, y el dolor crónico visceral se puede dar tras quimioterapia intraperitoneal o radioterapia abdominal. Estos síndromes pueden estimular dolores relacionados con el tumor, y la exclusión de la recurrencia constituye el mayor desafío.

30 Muchos síndromes de dolor post-tratamiento son neuropáticos. Los factores de predisposición para dolor neuropático crónico tras daño nervioso son desconocidos. Cualquier incisión quirúrgica, incluso menor, puede inducir un síndrome de dolor neuropático. Por ejemplo, el síndrome post-mastectomía, que puede estar precipitado por daño al nervio intercostobraquial, causa una sensación de quemazón, tirantez, en el aspecto médico, en el brazo superior, la axila, y en el aspecto superior de la pared anterior del pecho. Este dolor no está asociado a recurrencia del tumor. 35 Por el contrario, el dolor persistente o recurrente tras toracotomía puede estar relacionado con el tratamiento, pero normalmente está relacionado al neoplasma.

40 La fibrosis inducida por radiación puede causar daño del nervio periférico. El dolor neuropático crónico resultante normalmente aparece de meses a años después del tratamiento. Al contrario que el daño nervioso relacionado con el neoplasma, generalmente, el dolor es menos prominente y lentamente progresivo. Normalmente está asociado a debilidad, alteraciones sensoriales, cambios de radiación de la piel, y linfedema.

45 Las disestesias dolorosas, parestesias, calambres, y piernas inquietas asociadas con debilidad media, pérdida sensorial, o disfunción autónoma pueden darse tras el tratamiento con quimioterapia neurotóxica (por ejemplo, vincristina, cisplatino, paclitaxel). Aunque muchos de los pacientes describen que la mejoría gradual tras terapia es discontinua, algunos desarrollan una polineuropatía dolorosa persistente.

La escalera analgésica

50 En 1986, la Organización Mundial estableció una escalera de tres etapas como una pauta para el tratamiento del dolor del cáncer (Figura 1A). Por ello, en la etapa 1 se usan no opiáceos con o sin adyuvante analgésico. Si el dolor persiste o aumenta, se usan, en la etapa 2, opiáceos para dolor de medio a moderado, con o sin analgésicos/adyuvantes no opiáceos. Si el dolor todavía persiste o aumenta, se usan, en la etapa 3, opiáceos para dolor de moderado a severo, con o sin analgésicos/adyuvantes no opiáceos.

55 Estas tres etapas son más eficaces para dolores somáticos o viscerales que para dolores neuropáticos. Por tanto, se propuso una cuarta etapa para los casos en los que el dolor persiste o aumenta tras la etapa 3, principalmente con dolores neuropáticos (Miguel, 2000). En la etapa 4, se emplean medidas de intervención, como cirugía (por ejemplo, para inactivar nervios), medicamentos espinales (epidural o subaracnoideo) y bloqueantes nerviosos (Figura 1B). Así, el dolor neuropático puede ser tratado con las siguientes medidas analgésicas:

60 (1) medicinas orales neuroactivas, incluyendo antidepresivos tricíclicos (como amitriptilina y nortriptilina), anti-convulsivantes (como gabapentina, DPH y carbamazepina), y anestésicos locales orales (como mexilitina);

(2) Bloqueantes nerviosos, incluyendo el uso de anestésicos locales cerca de los nervios que transmiten información relacionada con el dolor, o agentes neurolíticos para destruir nervios e interrumpir las rutas del dolor (neurolisis). La neurolisis puede ser química, térmica o quirúrgica. Actualmente, la neurolisis química está generalmente limitada a alcohol o fenol;

ES 2 239 928 T3

(3) medicinas espinales, incluyendo administración de fármacos subaracnoideos y/o epidurales. Esta medida puede también puede ser usada para dolor visceral y somático. Los fármacos que pueden ser administrados de esta manera incluyen:

5 *Para dolor visceral y somático*

Opiáceos:	morfina, hidromorfina, fentanilo, sufentanilo
Anestésicos locales:	lidocaína, bupivacaina, tetracaina

10

Para dolor neuropático

Anestésicos locales:	lidocaína, bupivacaina, tetracaina
Agonistas alfa-2-adrenérgicos:	clonidina, dexmedetomidina, guanabenz
Antiespasmódicos:	baclofeno;

20

(4) Estimulación de la médula espinal, que implica usar electricidad para reducir el dolor. En general, los pacientes controlan la estimulación (encendido/apagado e intensidad) con una pequeño control operado con pilas.

25 *Métodos*

La presente invención proporciona un uso médico tal como se indica en la reivindicación 1 para reducir dolores de cáncer, utilizando virus oncolíticos. Preferiblemente, el dolor se reduce hasta el punto de que se requiere una menor cantidad o frecuencia de medidas analgésicas, o es necesario una etapa menos en la escalera analgésica, en comparación con la cantidad, frecuencia o etapa requeridas en ausencia de virus.

Basado en los recientes descubrimientos de que la inyección intratumoral de reovirus es capaz de causar regresión tumoral en una variedad de modelos animales en células activadas por Ras, se produjo un estudio clínico en Fase 1 para examinar cualquier efecto oncolítico del virus en pacientes humanos con cáncer metastásico que habían fallado en la respuesta a terapias convencionales. El ensayo establece que el virus promueve la regresión tumoral en una variedad de indicaciones tumorales sólidas cuando se administra de forma intratumoral. Sorprendentemente, también se vio que la administración del virus puede dar como resultado disminución de síntomas del dolor directo asociado al tumor en esta población de pacientes. Esta disminución del dolor ocurrió con o sin actual regresión tumoral. En un caso, la reducción del dolor fue suficiente como para permitir al paciente interrumpir la toma narcótica. Además, no hubo descripción de efectos secundarios o efectos adversos significativos en la administración de virus en estos pacientes.

Basado en estos descubrimientos, los Solicitantes han desarrollado métodos para tratar el dolor asociado a enfermedades proliferativas en mamíferos por administración de virus oncolíticos. Mamíferos representativos incluyen perros, gatos, ovejas, cabras, ganado, caballos, cerdos, primates no humanos, y humanos. En una realización preferida, el mamífero es un humano. En una realización preferida, el dolor está asociado a el crecimiento de una masa tumoral sólida.

En los métodos de la invención, el virus es administrado a un mamífero individual. Se usa el reovirus. Tipos de reovirus humanos representativos que puedes ser utilizados incluyen tipo 1 (por ejemplo, cepa Lang o T1L); tipo 2 (por ejemplo, cepa Jones o T2J); y tipo 3 (por ejemplo, cepa Dearing o cepa Abney, T3D o T3A); también se pueden utilizar otras cepas de reovirus. En una realización preferida, el reovirus es reovirus humano serotipo 3, mas preferiblemente el reovirus es reovirus humano serotipo 3, cepa Dearing. De forma alternativa, el reovirus puede ser un reovirus de mamífero no humano (por ejemplo, reovirus de primate no humano, como reovirus de babuino; equino, o reovirus canino), o un reovirus que no es de mamífero ((por ejemplo, reovirus aviar). Se puede usar una combinación de diferentes serotipos y/o diferentes cepas de reovirus, como reovirus de diferentes especies de animales.

El reovirus puede ser un reovirus recombinante que resulta de la recombinación/variedad de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente distintos. El reovirus recombinante puede ser de dos o más tipos de reovirus con fenotipos patogénicos diferentes como que contengan diferentes determinantes antigenicos, reduciendo o previniendo, de ese modo, una respuesta inmune en un mamífero expuesto previamente a un subtipo de reovirus. Los reovirus recombinantes también pueden exhibir distintas actividades biológicas (por ejemplo, actividades de replicación en células neoplásicas y biodistribución) comparadas con los reovirus originales. La recombinación/variedad de segmentos genómicos de reovirus puede ocurrir en la naturaleza tras la infección de un organismo huésped con, al menos, dos reovirus genéticamente distintos. Los viriones recombinantes también pueden ser generados en cultivo celular, por ejemplo, por co-infección de células huésped permisivas con reovirus genéticamente distintos (Nibert *et al.*, 1996).

Por consiguiente, la invención contempla el uso de reovirus recombinantes resultantes de una variedad de segmentos de genoma a partir de dos o más reovirus genéticamente distintos, que incluyen, pero no se limitan a, reovirus

ES 2 239 928 T3

humanos, como los de tipo 1 (por ejemplo, cepa Lang), tipo 2 (por ejemplo, cepa Jones), y tipo 3 (por ejemplo, cepa Dearing o cepa Abney), reovirus de mamíferos no humanos, o reovirus de aves. La invención además contempla reovirus recombinantes resultantes de una variedad de segmentos genómicos de dos o mas reovirus genéticamente distintos donde al menos un virus pariente está manipulado genéticamente, comprende uno o mas segmentos genómicos sintetizados químicamente, ha sido tratado con mutágenos químicos o físicos, o él mismo es el resultado de un suceso de recombinación. La invención además contempla el reovirus recombinante que ha experimentado recombinación en presencia de mutágenos químicos, incluyendo, pero no limitándose a, dimetil sulfato y bromuro de etidio, o mutágenos físicos, incluyendo, pero no limitándose a luz ultravioleta y otras formas de radiación.

La invención además contempla reovirus recombinantes que comprenden delecciones y duplicaciones en uno o mas segmentos genómicos, que comprenden información genética adicional como resultado de recombinación con un genoma de célula huésped, o que comprenden genes sintéticos.

El virus puede ser modificado por incorporación de proteínas de cubierta mutadas, como por ejemplo reovirus $\sigma 1$, dentro de la cápsida externa del virión. Las proteínas pueden estar mutadas por sustitución, inserción o delección. La sustitución incluye la inserción de diferentes aminoácidos en lugar de los aminoácidos naturales. Las inserciones incluyen inserción de restos de aminoácido adicionales dentro de la proteína en uno o mas lugares. Las delecciones incluyen delección de uno o mas restos de aminoácido en la proteína. Dichas mutaciones pueden ser generadas por métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, la mutagénesis oligonucleotídica dirigida a un lugar del gen que codifica una de las proteínas de la cubierta, puede dar como resultado la generación de la proteína de cubierta mutada deseada. La expresión de la proteína mutada en células de mamífero infectadas *in vitro* con reovirus, como células COS1 dará como resultado la incorporación de la proteína mutada dentro de la partícula virión del reovirus (Turner y Duncan, (19992); Duncan *et al.*, (1991); Mah *et al.*, (1990)). Preferiblemente, el virus es un virus modificado para reducir o eliminar una reacción inmune al virus ("virus inmunoprotegido"). Dichas modificaciones pueden incluir empaquetamiento del virus en un liposoma, una micela u otro vehículo para enmascarar el virus del sistema inmune del mamífero. De forma alternativa, la cápsida externa de la partícula virión del virus puede ser eliminada ya que las proteínas presentes en la cápsida externa son el principal determinante de las respuestas humorales y celulares del huésped.

Normalmente, cuando el virus entra en una célula, se activa la ARN quinasa de doble cadena (PKR) y se bloquea la síntesis de proteínas, y el virus no se puede replicar en esta célula. Algunos virus han desarrollado un sistema para inhibir PKR y facilitar la síntesis de proteínas virales así como la replicación del virus. Por ejemplo, el adenovirus hace una gran cantidad de ARN pequeño, ARN VA1. El ARN VA1 tiene amplias estructuras secundarias y se une a PKR en competencia con el ARN de doble cadena (dsARN), que normalmente activa PKR. Mientras que se requiere una longitud mínima de dsARN para activar PKR, el ARN VA1 no activa PKR. En su lugar, secuestra PKR en virtud de su amplia cantidad. Por consiguiente, la síntesis de proteínas no se bloquea y el adenovirus se puede replicar en la célula.

Las células neoplásicas activadas por Ras no son objeto de inhibición de síntesis proteica por PKR, debido a que ras inactiva PKR. Por ello, estas células son susceptibles a infección viral incluso si el virus no tiene un sistema de inhibición de PKR. Por consiguiente, los inhibidores de PKR están mutados en adenovirus, virus vaccinia, virus herpes simplex o virus orf parapoxvirus de tal forma que no bloquean nunca más la función de PKR, los virus resultantes no infectan células normales debido a la inhibición de síntesis de proteínas por PKR, pero se replican en células neoplásicas activadas por ras que carecen de actividades de PKR.

Por consiguiente, un virus que está modificado o mutado, de forma que no inhibe la función de PKR, se replica selectivamente en células neoplásicas activadas por ras, mientras que las células normales son resistentes. Preferiblemente, el virus es un adenovirus mutado en la región VA1, un virus vaccinia mutado en la región K3L y/o E3L, un virus herpes simplex mutado en el gen $\gamma 34.5$, un virus orf parapoxvirus mutado en el gen OV20.0L, o un virus influenza mutado en el gen NS-1.

Los virus pueden ser modificados o mutados según la relación estructura-función de los inhibidores de PKR virales. Por ejemplo, mientras que la región amino terminal de la proteína E3 interacciona con el dominio de la región carboxiterminal de PKR, la delección o mutación puntual de este dominio previene la función anti-PKR (Chang *et al.*, 1992, 1993, 1995; Sharp *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 1998). El gen K3L del virus vaccinia codifica pK3, un pseudosustrato de PKR. Hay una mutación de pérdida de función dentro de K3L. Los truncamientos o mutaciones puntuales de lugar dentro de la porción C-terminal de la proteína K3L que son homólogas a los restos 79 a 83 en eIF-2 α suprimen la actividad inhibidora de PKR (Kawagushi-Kobayashi *et al.*, 1997).

Los virus oncolíticos pueden matar selectivamente células neoplásicas llevando un gen supresor de tumores. Por ejemplo, un virus que exprese el gen salvaje p53 mata selectivamente las células neoplásicas que se vuelven neoplásicas debido a la inactivación del producto génico de p53. Dicho virus ha sido construido y se ha mostrado que induce apoptosis en células cancerosas que expresan mutantes de p53 (Blagosklonny *et al.*, 1996).

Un enfoque similar implica a inhibidores virales de supresores de tumores. Por ejemplo, si se deleciona la región E1B que codifica un inhibidor de p53 de 55 kd, como en el virus ONYX-015 (WO 94/18992), el inhibidor no estará nunca más presente. Como resultado, cuando ONYX-015 entra en una célula normal, p53 funciona para suprimir la proliferación celular así como la replicación viral, que depende de la maquinaria de proliferación celular. Por ello,

ES 2 239 928 T3

ONYX-015 no se replica en células normales, Por otro lado, en células neoplásicas con la función p53 interrumpida, ONYX-015 se puede replicar y finalmente causar la muerte de la célula.

- Otro ejemplo es el virus Delta24, que es un adenovirus mutante con una delección de 24 pares de bases en la región E1A (Fueyo *et al.*, 2000). La región es responsable de unirse al supresor tumoral celular Rb e inhibir la función de Rb, permitiendo así que la maquinaria de proliferación de la célula, y con ello la replicación del virus, funcionen de una manera incontrolada. Delta24 tiene una delección en la región de unión de Rb y no une Rb. Por ello, la replicación del virus mutante es inhibida por Rb en una célula normal. Sin embargo, si Rb es inactivado y la célula se vuelve neoplásica, Delta24 no se inhibe. En su lugar, el virus mutante se replica eficazmente y lisa la célula deficiente en Rb.

Además, el virus de la estomatitis vesicular (VSV) mata selectivamente células neoplásicas (y el interferón, puede ser añadido opcionalmente). Se mostró que un virus mutante herpes simplex 1 (HSV-1) que es deficiente en la expresión de la ribonucleótido reductasa, hrR3, se replicaba en células de carcinoma de colon, pero no en células normales de hígado. (Yoon *et al.*, 2000). El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) se replica preferencialmente en células malignas, y la cepa más comúnmente usada es 73-T (Reichard *et al.*, 1992; Zorn *et al.*, 1994; Bar-Eli *et al.*, 1996). El virus vaccinia se propagaba en varias líneas de células tumorales malignas. El virus de la encefalitis se mostró que tenía un efecto oncolítico en un carcinoma de ratón, pero se debía requerir la atenuación para reducir su infectividad en células normales. La regresión tumoral ha sido descrita en pacientes con tumor con herpes zoster, virus de la hepatitis, virus influenza, varicela, y sarampión (para una revisión, véase Nemunaitis, 1999).

El virus oncolítico puede ser natural o modificado. El virus puede estar pre-tratado químicamente o bioquímicamente (por ejemplo, por tratamiento con una proteasa, como quimotripsina o tripsina) antes de la administración a las células neoplásicas. El pre-tratamiento con una proteasa elimina la cubierta externa o cápsida del virus y puede incrementar la infectividad del virus. El virus puede estar cubierto en un liposoma o micela (Chandron y Nibert, 1998) para reducir o prevenir una respuesta inmune de un mamífero que ha desarrollado inmunidad al virus. Por ejemplo, el virión puede ser tratado con quimotripsina en presencia de concentraciones formadoras de micelas de detergentes alquil sultato para generar una nueva partícula subvirión infecciosa.

El dolor que es particularmente susceptible de reducirse por métodos de la invención está asociado a cáncer sólido, por ejemplo, sarcoma, melanoma, cáncer de pecho, cáncer del sistema nervioso central (por ejemplo, neuroblastoma y glioblastoma), cáncer del sistema nervioso periférico, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer adrenal, y cáncer de hígado. En particular, los tipos de cáncer que están altamente asociados (por ejemplo en al menos un 50%) con dolor en la Tabla 1 se contempla que sean tratado utilizando los métodos de la invención.

La ruta por la que es administrado el virus, así como la formulación, transportador o vehículo, dependerá de la localización así como del tipo de neoplasia. Se pueden emplear una amplia variedad de rutas de administración. Por ejemplo, para un neoplasma sólido que es accesible, el virus puede ser administrado por inyección directa al neoplasma. Para un neoplasma hematopoyético, por ejemplo, el virus puede ser administrado de forma intravenosa o intravascular. Para neoplasmas que no son fácilmente accesibles dentro del cuerpo, como metástasis de tumores cerebrales, el virus es administrado de una manera tal que pueda ser transportado de forma sistémica a través del cuerpo del mamífero y así alcanzar el neoplasma (por ejemplo, de forma intratecal, intravenosa o intramuscular). De forma alternativa, el virus puede ser administrado directamente a un solo neoplasma sólido, donde luego es llevado de forma sistémica a través del cuerpo a las metástasis. El virus también puede ser administrado de forma subcutánea, intraperitoneal, de forma tópica (por ejemplo, para melanoma), oral (por ejemplo, para neoplasias orales o esofágicos), rectal (por ejemplo, para neoplasma colorrectal), vaginal (por ejemplo, para neoplasma cervical o vaginal), de forma nasal o por spray de inhalación (por ejemplo, para neoplasma de pulmón).

El virus puede ser administrado de forma sistémica, especialmente a mamíferos que están inmunocomprometidos o que no han desarrollado inmunidad al virus. En dichos casos, el virus administrado de forma sistémica, es decir por inyección intravenosa, contactará las células neoplásicas dando como resultado la lisis de las células.

Mamíferos inmunocompetentes previamente expuestos a un subtipo de virus pueden haber desarrollado inmunidad humoral y/o celular a ese subtipo de virus. Cuando el virus es administrado de forma sistémica a mamíferos inmunocompetentes, los mamíferos pueden producir una respuesta inmune al virus. Dicha respuesta inmune puede ser evitada si el virus es de un subtipo tal que el mamífero no haya desarrollado inmunidad, o que el virus haya sido modificado como se ha descrito previamente en la presente memoria de tal forma que está inmunoprotegido, por ejemplo, por digestión con proteasa de la cápsida externa o envuelto en una micela.

De forma alternativa, esta contemplado que la inmunocompetencia del mamífero frente al virus puede estar suprimida tanto por la co-administración de medicamentos conocidos en la materia que suprimen el sistema inmune en general (Cuff *et al.*, 1998) o alternativamente por administración de anticuerpos anti-antivirus. La inmunidad humoral del mamífero frente al virus puede también estar temporalmente reducida o suprimida por plasmaforesis de la sangre para eliminar los anticuerpos anti-virus. La inmunidad humoral del mamífero frente al virus, adicionalmente, puede estar temporalmente reducida o suprimida por administración intravenosa de inmunoglobulina no específica al mamífero.

5 Está contemplado que el virus puede ser administrado a mamíferos inmunocompetentes inmunizados frente al virus junto con la administración de anticuerpos anti-antivirus. Los anticuerpos anti-antivirus usados en esta invención están seleccionados, por ejemplo, de anticuerpos anti-antireovirus, anticuerpos anti-antiadenovirus, anticuerpos anti-antiHSV, anticuerpos anti-antivaccinia virus, anticuerpos anti-antiinfluenza y anticuerpos anti-antiparapoxvirus orf virus. Dichos anticuerpos pueden estar hechos por métodos conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, 1988). Dichos anticuerpos anti-antivirus pueden ser administrados antes de, al mismo tiempo o inmediatamente después de la administración del virus. Preferiblemente, una cantidad eficaz de los anticuerpos anti-antivirus es administrada en el tiempo suficiente para reducir o eliminar una respuesta inmune del mamífero al virus administrado.

10 En una realización de esta invención una ruta de terapia viral es administrada una o más veces. Tras la primera administración de la terapia viral, se eliminan del paciente constituyentes inmunes particulares que pueden interferir con las administraciones posteriores. Estos constituyentes inmunes incluyen células B, células T, anticuerpos, y similares.

15 La eliminación tanto de la población de células B como de células T puede ser llevada a cabo por varios métodos. En un método, la sangre puede ser filtrada y se puede realizar una hemo-diálisis. Otro método es la filtración de la sangre acoplada a compuestos extra corpóreos que pueden eliminar las poblaciones celulares, por ejemplo, con 20 anticuerpos inmovilizados que reconocen receptores específicos sobre la población celular a ser eliminada. Todavía otro método para eliminar una población celular es por supresión inmune. Esto puede hacerse por radioterapia de primera línea o por esteroides cíclicos como ciclosporina.

25 La eliminación selectiva de anticuerpos anti-virus también puede prevenir al sistema inmune del paciente de eliminar los virus administrados terapéuticamente. La prevención de interacción de anticuerpos con el virus administrado también puede ayudar a estrategias de tratamiento sistémico. Los anticuerpos pueden ser eliminados por varios métodos, que incluyen hemodiálisis y hacer pasar la sangre sobre virus inmovilizados (eliminación de anticuerpos 30 selectivos); por eliminación de todos los anticuerpos IgG por hemodiálisis y hacer pasar la sangre sobre proteína A inmovilizada (disponible comercialmente como PROSORBA, Cypress Bioscience, San Diego, CA); o por administración de anticuerpos anti-idiotípicos humanizados, donde el idiotipo es frente al virus a ser administrado.

Otro método de esta invención es permitir actuar al virus de forma sistémica sin afectar la función inmune normal 35 enmascarando o afectando el reconocimiento inmune del virus. Para prevenir que el sistema inmune del paciente reconozca el virus administrado, el virus puede ser cubierto con anticuerpos humanizados no tóxicos, como cubrirlo con la porción Fab del anticuerpo, o cubrirlo con una micela.

40 De forma adicional, el virus puede ser tratado con quimotripsina para producir una partícula subirla infecciosa (ISVP). Una ISVP puede ser usada tanto sola como en combinación con todo el virus para dar un agente que es deficientemente reconocido o no ha sido previamente prevenido por el sistema inmune del paciente.

Otra realización de esta invención incluye la eliminación de virus del paciente tras la administración. Mientras este 45 método pueda ser utilizado en pacientes que están tanto inmunosuprimidos como si son inmunocompetentes, debe ser importante eliminar el virus del torrente sanguíneo tras el curso del tratamiento. El virus puede ser eliminado por chromatografía de afinidad usando anticuerpos anti-virus extracorpóreos asociado a hemo-diálisis, agentes de proliferación de células B, o adyuvantes para estimular la respuesta inmune frente al virus, como virus inactivados UV o adyuvante de Freund.

45 Composiciones y kits

La invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como ingredientes activos, uno o más 50 de los reovirus y al menos un analgésico. De forma alternativa, la composición farmacéutica puede comprender dos componentes, cada uno de los cuales es una composición farmacéutica que comprende un reovirus y un analgésico, respectivamente. Los dos componentes pueden ser administrados juntos o separados.

La composición farmacéutica también puede comprender vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. Para hacer las composiciones de esta invención, los ingredientes activos normalmente son mezclados con un excipiente, diluidos por un excipiente o unidos dentro de dicho vehículo que puede ser en forma de una cápsula, sobrecito, papel u otro contenedor. Cuando el excipiente farmacéuticamente aceptable sirve como un diluyente, puede ser un material sólido, semi-sólido, o líquido, que actúa como un vehículo, transportador o medio para los ingredientes activos. Así, las composiciones pueden ser en forma de tabletas, píldoras, polvos, pastillas, sobrecitos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, 55 hasta el 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda o dura, supositorios, soluciones inyectables estériles, y polvos empaquetados estériles.

Algunos ejemplos de excipientes apropiados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma acacia, fosfato cálcico, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe y metilcelulosa. Adicionalmente, las formulaciones pueden incluir: agentes lubricantes como talco, estearato magnésico, y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes como metil- y propilhidroxi-benzoatos; agentes endulzantes; y agentes de condimento. Las composiciones de la invención pueden ser formuladas de tal forma que proporcionen liberación rápida, sostenida 60

o retrasada de los ingredientes activos tras la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la materia.

Para preparar composiciones sólidas como tabletas, los principales ingredientes activos son mezclados con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se refiere a estas composiciones de preformulación como homogéneas, se refiere a que los ingredientes activos están dispersos uniformemente a lo largo de la composición de tal forma que la composición puede estar fácilmente subdividida en formas de unidades de dosis igualmente eficaces como comprimidos, píldoras y cápsulas.

Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden estar cubiertos o, por el contrario, compuestos para proporcionar una unidad de dosis que proporcione la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosis interno y un componente de dosis externo, el último en forma de un sobre sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto dentro del duodeno o que se retrase en la liberación. Se pueden usar una variedad de materiales para dichas capas entéricas o cubiertas, como materiales que incluyen un número de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con dichos materiales como goma shellac, alcohol cetílico, y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que las nuevas composiciones de la invención pueden estar incorporadas para administración oral o por inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes con sabor adecuado, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones con sabor con aceites comestibles como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco, o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes orgánicos u acuosos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes apropiados farmacéuticamente aceptables tal como se describen en la presente memoria. Preferiblemente, las composiciones son administradas por la ruta respiratoria oral o nasal para efecto local o sistémico. Las composiciones, en solventes preferidos farmacéuticamente aceptables pueden ser nebulizados por uso de gases inertes. Soluciones nebulizadas pueden ser inhaladas directamente desde el aparato nebulizador o el aparato nebulizador puede estar unido a máscara facial en tienda, o una máquina de respiración de presión positiva intermitente. Las composiciones de soluciones, suspensiones, o polvos pueden ser administradas, preferiblemente de forma oral o nasal, a partir de aparatos que liberan la formulación de una forma apropiada.

Otra formulación preferida empleada en los métodos de la presente invención emplea aparatos de liberación transdérmica ("parches"). Dichos parches transdérmicos pueden ser usados para proporcionar infusión continua o discontinua del virus en cantidades controladas. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. 5.023.252, incorporada en la presente memoria por referencia. Dichos parches pueden estar construidos para liberación continua, pulsátil, o a demanda de los agentes farmacéuticos.

Otras formulaciones apropiadas para uso en la presente invención se pueden encontrar en *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

Los virus o la composición farmacéutica que comprende el virus pueden ser empaquetados dentro de kits convenientes que proporcionen los materiales necesarios empaquetados dentro de recipientes apropiados. Se contempla que los kits también pueden incluir agentes quimioterapéuticos y/o anticuerpos anti-antivirus.

El virus es administrado en una cantidad que es suficiente para reducir el dolor (por ejemplo, una "cantidad eficaz"). La reducción del dolor puede ocurrir con o sin regresión del tumor actual. La reducción del dolor puede ser concomitante con reducción en el tamaño del neoplasma, o eliminación del neoplasma. La reducción en tamaño del neoplasma, o en una completa eliminación del neoplasma, está causada generalmente por lisis de las células neoplásicas ("oncolisis") por el virus (Patentes de EE.UU. 60110.461; 6.136.307; 6.261.555; y 6.344.195).

Preferiblemente, la cantidad eficaz es esa cantidad capaz de suprimir el dolor completamente. Preferiblemente, la cantidad eficaz es desde aproximadamente 1 unidad formadora de colonias (pfu) a aproximadamente 10^{15} pfu, mas preferiblemente desde aproximadamente 10^2 pfu a aproximadamente 10^{13} pfu. Por ejemplo, para el tratamiento de un humano, se pueden usar aproximadamente de 10^2 a 10^{17} pfu de reovirus, dependiendo del tipo, tamaño y número de tumores presentes. La cantidad eficaz será determinada en una base individual y puede estar basada, al menos en parte, en la consideración del tipo de virus; la ruta de administración elegida; el tamaño del individuo, edad, género; la severidad de los síntomas del paciente; el tamaño y otras características del neoplasma; y similares. El curso de la terapia puede durar desde varios días a varios meses o hasta que se logre la disminución del dolor, y/o la enfermedad.

El virus puede ser administrado en una sola dosis, o múltiples dosis (es decir, mas de una dosis). Las dosis múltiples pueden ser administradas al mismo tiempo, o consecutivamente (por ejemplo, durante un periodo de días o semanas). El virus también puede ser administrado a mas de un neoplasma en el mismo individuo. Las composiciones están preferiblemente formuladas en una forma de dosis unitaria, cada dosis contiene desde aproximadamente 10^2 pfu a aproximadamente 10^{13} pfu del virus.

ES 2 239 928 T3

Está contemplado que el virus puede ser administrado junto con o en adición a terapia opioide o en adición a la administración de analgésicos no opiáceos y adyuvantes. También está contemplado que el virus puede ser administrado junto con o en adición a terapia hormonal o inmunoterapia.

- 5 También está contemplado que el virus de la presente invención puede ser administrado junto con o en adición a radioterapia. La radioterapia, también llamada radioterapia, es el tratamiento, con radiación, del cáncer y otras enfermedades, típicamente con radiación ionizante. Los agentes de irradiación pueden ser agentes de irradiación conocidos en la materia, incluyendo, pero no limitándose a, rayos X, rayos gamma (por ejemplo, rayos gamma producidos por radio, uranio, o cobalto 60), y transmisión de partículas (por ejemplo, electrones, neutrones, piones, e iones pesados).
- 10 La irradiación puede ser en forma de radioterapia externa o radioterapia interna (incluyendo braquiterapia, irradiación intestinal, e irradiación intracavitaria). Los agentes de irradiación pueden estar unidos a un anticuerpo, como en radioinmunoterapia, o ser empleados durante una cirugía, como en radioterapia intraoperatoria.

15 Todavía está contemplado que el virus de la presente invención pueda ser administrado junto con o en adición a compuestos anticancerosos o agentes quimioterapéuticos conocidos. Agentes quimioterapéuticos son compuestos que pueden inhibir el crecimiento de tumores. Dichos agentes, incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, mitomicina C, metotraxato, hidroxiurea, ciclofosfamida, dacarbazine, mitoxantrona, antraciclinas (Epirubicina y Doxurubicina), anticuerpos de receptores, como herceptina, etópsido, pregnesoma, compuestos de platino como carboplatino y cisplatino, taxanos como taxol y taxoteno, terapias de hormonas como tamoxifeno y anti-estrógenos, interferones, 20 inhibidores de aromatasa, agentes progestacionales y análogos de LHRH.

Se ofrecen los siguientes Ejemplos para ilustrar esta invención y no deben ser interpretados de ninguna forma como limitantes del alcance de la presente invención.

25 Ejemplos

En esta solicitud, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Las abreviaturas no definidas tienen sus significados generalmente aceptados.

30	°C =	Grados Celsius
	hr =	hora
35	min =	minuto
	µM =	micromolar
	mM =	milimolar
40	M =	molar
	ml =	mililitro
45	µl =	microlitro
	mg =	miligramo
	µg =	microgramo
50	PBS =	solución salina tampón fosfatada
	EGF =	Factor de crecimiento epidérmico
55	PDGF =	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
	PKR =	ARN quinasa de doble cadena

Ejemplo 1

60 Estudio clínico en Fase I: Uso del reovirus para reducir el dolor asociado a melanoma maligno

Una paciente hembra de 54 años de edad sufría de melanoma maligno, que formó múltiples lesiones (mas de 10) en todo el cuerpo y no respondía a los tratamientos anticancerosos convencionales. La paciente estaba permanentemente narcotizada debido al dolor asociado a la lesión de la parte posterior izquierda del cuello.

65 La paciente recibió tres inyecciones intratumorales de 10^9 pfu de la cepa Dearing del reovirus serotipo 3 dentro de la lesión en la parte posterior izquierda del cuello. La cepa Dearing del reovirus serotipo 3 usada en estos estudios se obtuvo por un método descrito en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20020037576.

ES 2 239 928 T3

Sorprendentemente, una semana después de la inyección, la paciente mostró disminución del dolor en el lugar del tratamiento y se le quitaron los narcóticos. No hubo dolor en el lugar del tratamiento durante un periodo de 8-10 semanas tras la inyección. Tal como se muestra en una punción de biopsia dirigida desde el hombre izquierdo tras dos semanas tras la inyección, no hubo efectos secundarios o efectos adversos significativos relacionados con la administración del virus en la paciente. Los resultados histológicos mostraron sólo algo de fibrosis dérmica y ligera inflamación perivascular crónica.

Ejemplo 2

10 *Estudio clínico en Fase I: Uso del reovirus para reducir el dolor asociado al sarcoma de Ewig*

Un paciente varón terminal de 27 años de edad con sarcoma de Ewig recibió una sola inyección intratumoral de 10^9 pfu de la cepa Dearing del reovirus serotipo 3 dentro del lugar sacroilíaco. La cepa Dearing del reovirus serotipo 3 usada en estos estudios se obtuvo por un método descrito en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° 20020037576. Una semana después de la inyección, el paciente mostró disminución del dolor en el lugar de la inyección. No hubo dolor en el lugar del tratamiento durante las varias semanas siguientes tras la inyección.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente, y patentes arriba descritas, están incorporadas en la presente memoria por referencia en su totalidad en la misma extensión que en cada publicación, solicitud de patente o patente individual estaba indicada de forma específica e individual para ser incorporada por referencia en su totalidad.

Mientras que esta invención ha sido particularmente mostrada y escrita con referencias para realizaciones preferidas, se entenderá por aquellos expertos en la materia que se pueden hacer varios cambios en la forma y los detalles en la misma sin salirse del espíritu y alcance de la invención tal y como se definen en las reivindicaciones añadidas.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de una cantidad eficaz de, al menos, un reovirus para la preparación de una composición farmacéutica para reducir el dolor en un mamífero que sufre de un neoplasma.
2. El uso de la reivindicación 1, donde al menos adicionalmente se va a administrar un analgésico en una cantidad que es menor que la cantidad del analgésico requerida para reducir el dolor en ausencia del reovirus en el mamífero.
3. El uso de la reivindicación 2, donde el analgésico es seleccionado del grupo que consiste en analgésicos opiáceos, analgésicos no opiáceos, codeína, fentanilo, hidromorfona, levorfanol, meperidina, metadona, morfina, oxicodona, oximorfona, propoxifeno, buprenorfina, butorfanol, dezocina, nalbufina, y pentazocina.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el neoplasma es un neoplasma sólido, es metastático o es terminal.
5. El uso de la reivindicación 4, donde el reovirus se va a administrar por inyección dentro o cerca del neoplasma sólido.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde se van a administrar más de una cepa del reovirus.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el reovirus se va a administrar en una sola dosis o en mas de una dosis.
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el reovirus es seleccionado del grupo que consiste en reovirus de mamíferos y reovirus de aves.
9. El uso de la reivindicación 8, donde el reovirus es un reovirus humano.
10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el reovirus es seleccionado del grupo que consiste en reovirus serotipo 1, reovirus serotipo 2 y reovirus serotipo 3.
11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el reovirus es un reovirus recombinante.
12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde se van a administrar aproximadamente 1 a 10^{15} unidades formadoras de colonias de reovirus.
13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el mamífero es un ser humano.
14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde además se va a administrar una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico.
15. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el reovirus se va a administrar junto con radioterapia, junto con terapia hormonal o junto con inmunoterapia.
16. Una composición farmacéutica que comprende dos componentes como sigue:
 - a) un primer componente que es una primera composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un adenovirus tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 6 a 11; y
 - b) un segundo componente que es una segunda composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un analgésico.
17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16, donde el analgésico es seleccionado del grupo que consiste en analgésicos opiáceos y analgésicos no opiáceos.
18. Al menos un reovirus para uso en la reducción del dolor en un mamífero que padece un neoplasma.
19. El al menos un reovirus de la reivindicación 18, en combinación con al menos un analgésico en una cantidad que es menor que la cantidad de analgésico requerida para reducir el dolor en ausencia del reovirus.
20. El al menos un reovirus de la reivindicación 19, donde el analgésico es seleccionado del grupo que consiste en analgésicos opiáceos, analgésicos no opiáceos, codeína, fentanilo, hidromorfona, levorfanol, meperidina, metadona, morfina, oxicodona, oximorfona, propoxifeno, buprenorfina, butorfanol, dezocina, nalbufina, y pentazocina.
21. El al menos un reovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, donde el neoplasma es un neoplasma sólido, es metastático o es terminal.

ES 2 239 928 T3

22. El al menos un reovirus de la reivindicación 21, donde el reovirus se va a administrar por inyección dentro o cerca del neoplasma sólido.
23. El al menos un reovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 22, donde mas de una cepa del reovirus se va a administrar.
24. El al menos un reovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, donde el reovirus se va a administrar en una sola dosis o en mas de una dosis.
- 10 25. El al menos un reovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, donde el reovirus es seleccionado del grupo que consiste en reovirus de mamífero o reovirus de aves.
26. El al menos un reovirus de la reivindicación 25, donde el reovirus es un reovirus humano.
- 15 27. El al menos un reovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 26, donde el reovirus es seleccionado del grupo que consiste en reovirus serotipo 1, reovirus serotipo 2 y reovirus serotipo 3.
28. El al menos un reovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 27, donde el reovirus es un reovirus recombinante.
- 20 29. El al menos un reovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 28, donde se van a administrar aproximadamente 1 a 10^{15} unidades formadoras de colonias de reovirus.
30. El al menos un reovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 29, donde el mamífero es un ser humano.
- 25 31. El al menos un reovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 30, donde además se va a administrar una cantidad eficaz de un agente quimioterapéutico.
32. El al menos un reovirus de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 31, donde el reovirus se va a administrar junto con radioterapia, junto con terapia hormonal o junto con inmunoterapia.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 239 928 T3

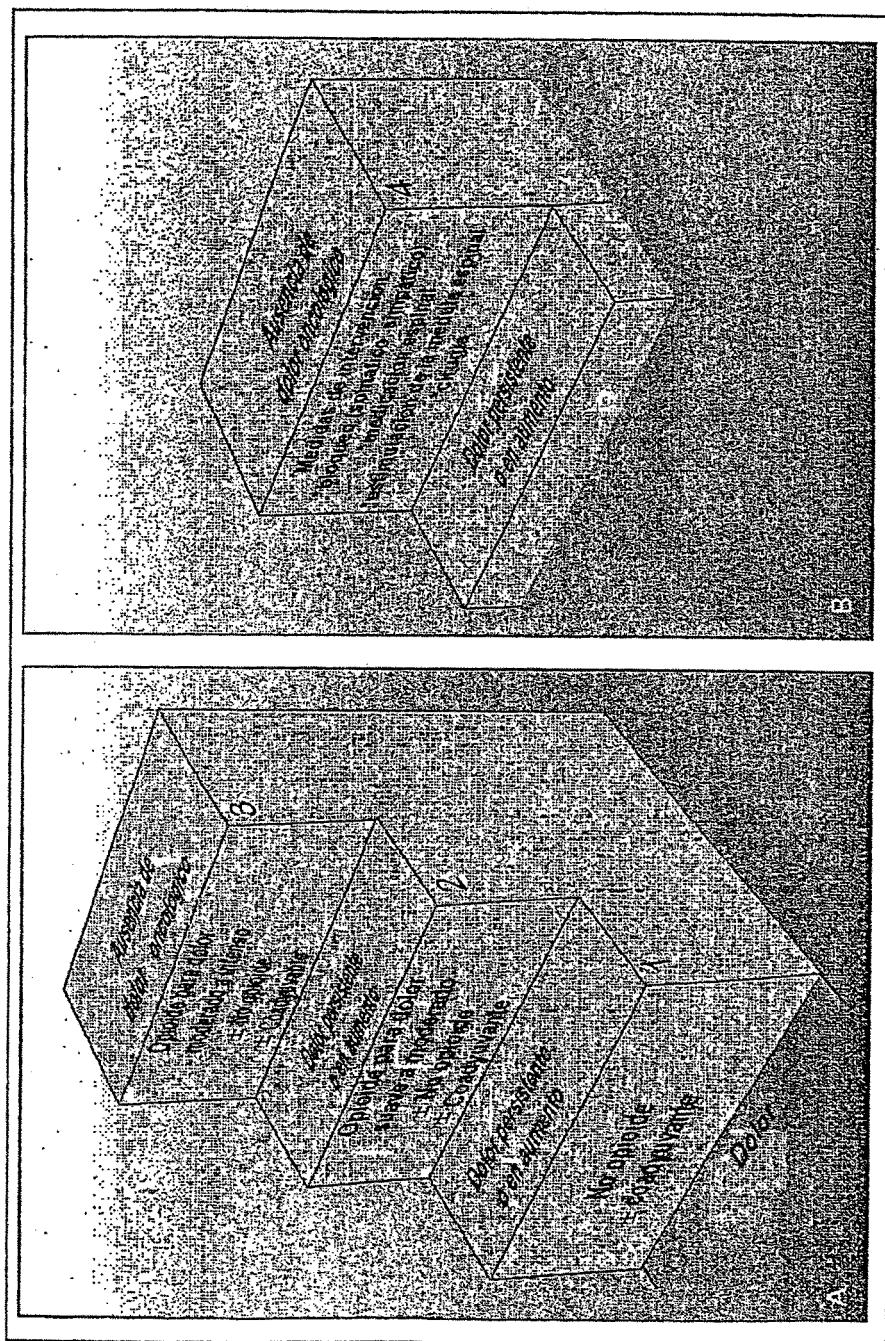


Figura 1