



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 292 981**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03737795 .9**

86 Fecha de presentación : **25.06.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1520175**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.04.2005**

54 Título: **Virus oncolíticos como agentes para determinar el fenotipo de neoplasias.**

30 Prioridad: **28.06.2002 US 392031 P**
29.01.2003 US 443188 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2008

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

72 Inventor/es: **Thompson, Bradley, G. y**
Coffey, Matthew, C.

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

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

Virus oncolíticos como agentes para determinar el fenotipo de neoplasias.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a métodos para detectar la causa esencial de tumores, particularmente al uso de reovirus en el diagnóstico de tumores con ras activado. Además, también se pueden utilizar otros virus oncolíticos con diferentes selectividades para el diagnóstico tipos particulares de tumores.

10 **Referencias**

- Patente de EE.UU. No. 6136307.

15 - WO 94/18992, publicado el 1 de septiembre de 1994.

- **Bischoff JR et al.**, "An Adenovirus Mutant that Replicates Selectively in p53-Deficient Human Tumor", *Science* 274(5286): 373-376 (1996).

20 - **Bos, J.** "ras oncogenes in human cancer: a review", *Cancer Res.* 49: 4682-4689 (1989).

- **Campbell, S.L. et al.**, "Increasing complexity of Ras signaling", *Oncogene* 17: 1395-1413 (1998).

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

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

- **Chang et al.**, *Proc. Natl. Sci. USA* 89: 4825-4829 (1992).

30 - **Chang et al.**, *Virol.* 194: 537-547 (1993).

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

35 - **Gutkind, J.S.**, "The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinases", *J. Biol. Chem.* 273: 1839-1842 (1998).

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

40 - **Nemunaitis, J.** "Oncolytic viruses", *J. Invest. New Drugs* 17: 375-386 (1999).

- **Nibert, M.L., Schiff, L.A. y Fields, B.N.** "Reoviruses and their replication", páginas 1557-96 en *Virology* (Fields et al., 3ª edición), Lippencott-Raven Press, 1996.

45 - **Romano et al.**, *Mol. Cell. Bio.* 18(12): 7304-7316 (1998).

- **Sharp et al.**, *Virology* 250: 302-315 (1998).

50 - **Smith, R.E. et al.**, "Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3", *Virology* 39: 791-800 (1969).

55 - **Smith, C.A. et al.**, "Correlations among p53, Her-2/neu, and ras overexpression and aneuploidy by multiparameter flow cytometry in human breast cancer: evidence for a common phenotypic evolutionary pattern in infiltrating ductal carcinomas", *Clin Cancer Res.* 6(1): 112-26 (2000).

Antecedentes de la invención

60 Con los recientes progresos en el campo de la oncología y la biología celular, los investigadores han sido capaces de empezar programas de desarrollo de drogas cuyo objetivo es específicamente la causa esencial del cáncer, particularmente si la causa es la deficiencia o mutación de productos de genes específicos. Por lo tanto, si los médicos clínicos tienen las herramientas para determinar la causa del cáncer para cada paciente de cáncer, se puede elegir una pauta de tratamiento que se adapta a la causa específica con eficacia optimizada.

65 El oncogén ras es responsable de un gran número de tumores. Las mutaciones activadoras del gen ras mismo se dan en alrededor del 30% de todos los tumores humanos (Bos, J.L., 1989), principalmente en carcinomas de páncreas (90%), colorrectal esporádico (50%) y de pulmón (40%), así como leucemia mieloide (30%). Además de las mutaciones del gen ras en sí mismo, la activación de los factores anteriores o posteriores a ras en la vía de ras también se asocia

con tumores. Por ejemplo, la sobreexpresión de HER2/Neu/ErbB2 o el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF) es común en cáncer de mama (25-30%), y la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el receptor de EGF es frecuente en gliomas y glioblastomas (40-50%). Se sabe que tanto el receptor de EGF como el receptor de PDGF activan ras tras la unión de sus respectivos ligandos, y v-erbB codifica un receptor constitutivamente activado que carece del dominio extracelular. En conjunto, se cree que la mutación directa del oncogén ras o de un elemento anterior en la vía de ras ocurre aproximadamente en dos tercios de todos los tumores.

Dado el papel significativo de la vía de ras en la oncogénesis, es deseable ser capaz de determinar si un tumor está asociado con la activación de la vía de ras de modo que se pueda desarrollar una pauta de tratamiento específicamente adaptada. Antes de la presente invención, sin embargo, no ha habido un método simple y sensible para diagnosticar la asociación de un cáncer con la vía de ras. Mientras que las mutaciones en el gen estructural de ras se pueden detectar con gran sensibilidad mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), existen otros muchos factores en la vía de ras que pueden ser la causa de una alta actividad de ras, tales como mutaciones en las secuencias flanqueantes del gen ras de llevan a unos niveles de expresión anormalmente altos del producto del gen ras, mutaciones en los genes estructurales de un factor anterior o posterior a ras en la vía de ras, o mutaciones reguladoras que afectan a los niveles de expresión de estos factores anteriores o posteriores. Por lo tanto, la PCR del gen ras no identifica exactamente todos los cánceres asociados con la activación de la vía de ras. Persiste la necesidad para un método simple y preciso para diagnosticar tumores con ras activado.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un método para diagnosticar neoplasias que tienen fenotipos particulares, particularmente neoplasias mediadas por una actividad anormalmente alta de la vía de ras, utilizando dos o más reovirus u otros virus oncolíticos similares. Los reovirus no se replican en células normales. Sin embargo, los reovirus se replican selectivamente en células con una vía de ras activada, lo que lleva a la muerte de estas células. La vía de ras en estas células puede estar activada debido a mutaciones del gen estructural de ras o anormalidades de cualquier otro factor en la vía de ras que produce la activación de la vía. Por lo tanto, se puede diagnosticar una célula que se vuelve neoplásica debido a, al menos en parte, aumentos en las actividades de la vía de ras mediante su susceptibilidad a la replicación de reovirus.

De acuerdo con esto, una parte de la invención reivindicada proporciona un método para detectar células neoplásicas con ras activado en una muestra biológica, que comprende poner en contacto la muestra con un reovirus y determinar la capacidad del reovirus para replicarse en la muestra, en donde la capacidad del reovirus para replicarse indica la presencia de células neoplásicas con ras activado en la muestra.

La muestra biológica es preferiblemente de un mamífero, particularmente de un ser humano. En la presente invención se puede utilizar cualquier reovirus capaz de replicarse en células con ras activado, por ejemplo un reovirus de mamífero o un reovirus de aves. El reovirus de mamíferos es preferiblemente un reovirus de serotipo 3 y más preferiblemente un reovirus de la cepa Dearing.

En una forma de realización preferida, la muestra biológica es de un animal que tiene una neoplasia seleccionada del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer suprarrenal, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer hematopoyético y cáncer del sistema nervioso central y periférico.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un método según la reivindicación 1.

El animal es preferiblemente un mamífero, particularmente un ser humano. Cualquier reovirus capaz de replicarse en células con ras activado se puede utilizar en la presente invención, por ejemplo un reovirus de mamífero o un reovirus de aves. El reovirus de mamíferos es preferiblemente un reovirus de serotipo 3 y más preferiblemente un reovirus de la cepa Dearing.

En una forma de realización preferida, la muestra biológica es de un animal que tiene una neoplasia seleccionada del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer suprarrenal, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer hematopoyético y cáncer del sistema nervioso central y periférico.

El virus oncolítico es preferiblemente un reovirus, un adenovirus mutado en la región VA1, un virus de la vacuna mutado en la región K3L y/o E3L, un parapoxvirus virus del ectima contagioso mutado en el gen OV20.0L, un virus de la gripe mutado en el gen NS-1, un virus herpes mutado en el gen $\gamma_134.5$, un virus de la estomatitis vesiculosa (VSV), o un virus Newcastle. Otros agentes terapéuticos que son selectivos para neoplasias con ras activado incluyen, sin ser limitantes, inhibidores de la farnesil transferasa (FTIs) e inhibidores de la quinasa RAF.

En cualquier forma de realización de la presente invención, el reovirus puede ser un reovirus recombinante. El reovirus recombinante se puede generar mediante coinfección de células de mamífero con diferentes subtipos de reovirus. El reovirus recombinante puede existir de forma natural o no existir de forma natural. El reovirus recombinante puede ser de dos o más cepas de reovirus, particularmente de 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 el

resultado del reagrupamiento de reovirus de diferentes serotipos, tales 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 que codifican variantes naturales de la proteína de la cubierta o secuencias que codifican la proteína de la cubierta mutada.

Además de los reovirus, algunos otros virus oncolíticos también son selectivos para neoplasias con ras activado, y por lo tanto se pueden utilizar para practicar la presente invención de la misma manera que los reovirus. Estos virus incluyen, sin estar limitados a, adenovirus mutados en la región VA1, virus de la vacuna mutados en la región K3L y/o E3L, parapoxvirus virus del ectima contagioso mutados en el gen OV20.0L, virus de la gripe mutados en el gen NS-1, o virus herpes mutados en el gen γ_1 34.5. De este modo, por ejemplo, un aspecto de la presente invención proporciona un método para detectar células neoplásicas con ras activado en una muestra biológica, que comprende poner en contacto la muestra con un virus oncolítico que se replica selectivamente en células deficientes en PKR, y determinar la capacidad del virus para replicarse en la muestra, en donde la capacidad del virus de replicarse indica la presencia de células neoplásicas con ras activado en la muestra. Preferiblemente, el virus oncolítico se selecciona del grupo que consiste en adenovirus mutados en la región VA1, virus de la vacuna mutados en la región K3L y/o E3L, parapoxvirus virus del ectima contagioso mutados en el gen OV20.0L, virus de la gripe mutados en el gen NS-1, o virus herpes mutados en el gen γ_1 34.5.

Además, muchos otros virus oncolíticos que son capaces de infectar selectivamente células particulares de tumores también son útiles en la presente invención de la misma manera que los reovirus. Por ejemplo, el virus de la estomatitis vesiculosa (VSV) se puede utilizar para diagnosticar tumores resistentes a interferón, el virus ONYX-015 se puede utilizar para diagnosticar virus deficientes en p53, y el virus Delta24 se puede utilizar para diagnosticar tumores deficientes en Rb. Sin embargo, el virus oncolítico útil en la presente invención preferiblemente no es un adenovirus, particularmente no el virus ONYX-015.

Aún otro aspecto podría ser un kit que comprende un reovirus y medios para detectar la replicación del reovirus. Los medios de detección pueden ser un par de cebadores específicos para el ácido nucleico del reovirus, o puede opcionalmente incluir reactivos para PCR. Los medios de detección también pueden ser un anticuerpo específico para una proteína del reovirus, así como reactivos accesorios tal como anticuerpos secundarios. Los medios de detección pueden ser además portaobjetos y colorantes adecuados para observar la morfología de las células infectadas en el microscopio, o medios de cultivo para virus y células que se pueden utilizar para determinar el título del reovirus. Similarmente, la presente invención también proporciona kits que comprenden otros virus capaces de replicarse en células de tumores específicos, así como medios para detectar la replicación del virus. Ejemplos de estos virus incluyen, sin estar limitados a, VSV, virus ONYX-015, y virus Delta24.

Otro aspecto podría ser un kit que comprende al menos dos virus que se pueden utilizar para determinar el fenotipo de tumores según la presente invención. Los virus son preferiblemente selectivos para neoplasias con diferentes fenotipos. Preferiblemente, los virus se seleccionan del grupo que consiste en reovirus, VSV, virus ONYX-015, y virus Delta24.

Aún otro aspecto podría ser un kit que comprende un virus útil para el diagnóstico de una neoplasia de un fenotipo particular.

Además, puesto que los virus oncolíticos se replican selectivamente en células neoplásicas pero no en células normales, otro aspecto podría ser un método para diagnosticar la presencia de una neoplasia en un mamífero, que comprende poner en contacto una muestra de células de dicho mamífero con un virus oncolítico, en donde la capacidad de dicho virus para replicarse en dicha muestra indica la presencia de una neoplasia en dicho mamífero.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un método para diagnosticar neoplasias que tienen fenotipos particulares utilizando dos o más virus oncolíticos. En particular, los tumores mediados por actividad anormalmente alta en la vía de ras se pueden diagnosticar utilizando reovirus. Los reovirus no se replican en células normales. Sin embargo, los reovirus se replican selectivamente en células con una vía de ras activada, lo que lleva a la muerte de estas células. Por lo tanto, un tumor con ras activado se puede diagnosticar mediante su susceptibilidad a la replicación del reovirus. El diagnóstico facilitará entonces el tratamiento o mejora del tumor con mayor eficacia.

Esta invención se puede aplicar además para diagnosticar otros tumores, tales como tumores resistentes a interferón, tumores deficientes en p53 y tumores deficientes en Rb.

Antes de describir la invención con más detalle, se definen los términos utilizados en esta solicitud como sigue a menos que se indique de otra manera.

Definiciones

Como se usa aquí, "células neoplásicas", también conocidas como "células con un trastorno proliferativo", se refiere a las células que proliferan sin las propiedades normales de inhibición del crecimiento. Una masa que comprende células neoplásicas es una "neoplasia" o "tumor". Una neoplasia es un crecimiento anormal de un tejido, generalmen-

te formando una masa inconfundible, que crece mediante proliferación celular más rápidamente de lo que crece el tejido normal. Las neoplasias pueden mostrar falta total o parcial de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. Como se utiliza aquí, se pretende que neoplasia abarque neoplasias hematopoyéticas así como neoplasias sólidas.

Una neoplasia puede ser benigna (tumor benigno) o maligna (tumor maligno o cáncer). Los tumores malignos en pueden clasificar en general en tres tipos principales. Las neoplasias malignas que provienen de estructuras epiteliales se denominan carcinomas, las neoplasias malignas que se originan de tejidos conjuntivos tales como músculo, cartílago, grasa o hueso se denominan sarcomas y los tumores malignos que afectan a estructuras hematopoyéticas (estructuras relacionadas con la formación de las células sanguíneas) incluyendo componentes del sistema inmune, se denominan leucemias y linfomas. Otras neoplasias incluyen, pero no están limitadas a neurofibromatosis.

Una “célula deficiente en PKR” es una célula en la que PKR no se activa como en las células normales. Tal deficiencia en PKR puede ser debida a, por ejemplo, una mutación en el gen de PKR o un nivel reducido en la proteína o actividad de PKR. Por ejemplo, las células neoplásicas con ras activado son deficientes en PKR porque la vía de ras activada bloquea la fosforilación de PKR. Ensayos para los niveles de proteína o actividad de PKR son conocidos en la técnica.

Como se usa aquí, “células neoplásicas con ras activado” o “células neoplásicas mediadas por ras” se refiere a células que proliferan a una tasa anormalmente alta debido a, al menos en parte, activación de la vía de ras. La vía de ras se puede activar mediante mutación en el gen estructural de ras, aumentado en los niveles de la expresión génica de ras, aumento en la estabilidad del mensajero del gen ras, o cualquier mutación u otro mecanismo que lleve a la activación de ras o un factor o factores posteriores o anteriores a ras en la vía de ras, incrementando de ese modo la actividad de la vía de ras. Por ejemplo, la activación del receptor de EGF, el receptor de PDGF, o Sos produce activación de la vía de ras. Las células neoplásicas mediadas por ras incluyen, pero no están limitadas a, células cancerosas mediadas por ras, que son células que proliferan de una manera maligna debido a la activación de la vía de ras.

Un “tumor con ras activado” es un tumor en el que la vía de ras está activada.

Un “tumor resistente a interferón” o “tumor que tiene un fenotipo de resistencia a interferón” es un tumor que no puede ser tratado o mejorado con interferón- α , β o γ .

Un “tumor deficiente en p53” o “un tumor que tiene el fenotipo de deficiencia en p53” es un tumor en el que el nivel celular del supresor de tumores p53 es menor que el de una célula normal.

Un “tumor deficiente en Rb” o “un tumor que tiene el fenotipo de deficiencia en Rb” es un tumor en el que el nivel celular del supresor de tumores Rb es menor que el de una célula normal.

Un “virus oncolítico” es un virus que mata selectivamente células neoplásicas. Matar las células neoplásicas se puede detectar mediante cualquier método establecido en la técnica, tal como determinar la cantidad de células viables, efecto citopático, apoptosis de las células neoplásicas, síntesis de proteínas virales en las células neoplásicas (por ejemplo, mediante marcaje metabólico, análisis por inmunotransferencia de proteínas virales, reacción de la transcripción inversa y en cadena de la polimerasa de genes virales necesarios para la replicación), o reducción en tamaño de un tumor.

Como se usa aquí, “reovirus” se refiere a cualquier virus en el género reovirus. El nombre reovirus (Respiratory and enteric orphan virus, virus respiratorio e intestinal huérfano) es un acrónimo descriptivo que sugiere que estos virus, aunque no están asociados a ningún estado de enfermedad en humanos, se pueden aislar tanto de las vías respiratorias como de las intestinales. El término “reovirus” se refiere a todos los virus clasificados en el género reovirus.

Los reovirus humanos consisten en 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 se identifican fácilmente en base a los ensayos de neutralización e inhibición de la hemaglutinina (Ver, por ejemplo, Nibert *et al.*, 1996).

El reovirus se puede dar de forma natural o estar modificado. El reovirus se “da de forma natural” cuando se puede aislar de una fuente en la naturaleza y no se ha modificado intencionadamente por seres humanos en un laboratorio. Por ejemplo, el reovirus puede ser de una “fuente de campo”, esto es, de un ser humano que se ha sido infectado por un reovirus.

El reovirus puede estar modificado pero aún ser capaz de infectar lícitamente una célula de mamífero que tiene una vía de ras activada. El reovirus estar pretratado químicamente o bioquímicamente (por ejemplo, mediante tratamiento con una proteasa, tal como quimotripsina o tripsina) antes de su administración a las células que proliferan. El pretratamiento con una proteasa elimina la cubierta externa o cápsida del virus y puede aumentar la infectividad del virus. El reovirus puede estar recubierto en un liposoma o micela (Chandron y Nibert, 1998) para reducir o prevenir una respuesta inmune de un mamífero que ha desarrollado inmunidad al reovirus. Por ejemplo, el virión se puede tratar con quimotripsina en presencia de concentraciones formadoras de micelas de detergentes de sulfato de alquilo para generar a un nueva partícula de subvirión infecciosa.

El reovirus puede ser un reovirus recombinante proveniente de la recombinación/reagrupamiento de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente diferentes. El reovirus recombinante puede ser de dos o más tipos de reovirus con fenotipos patogénicos diferentes tal que contenga determinantes antigénicos diferentes, reduciendo o previniendo de esta manera una respuesta inmune de un mamífero que ha estado previamente expuesto a un subtipo de reovirus. Los reovirus recombinantes también pueden mostrar actividades biológicas diferentes (por ejemplo, actividades de replicación en células neoplásicas y biodistribución) comparadas con los reovirus originales. La recombinación/reagrupamiento de segmentos genómicos de reovirus puede ocurrir en la naturaleza tras la infección de un huésped con al menos dos reovirus genéticamente distintos. Los viriones recombinantes también se pueden generar en cultivos de células, por ejemplo, mediante coinfección de células huésped permisivas con reovirus genéticamente distintos (Nibert *et al.*, 1996).

De acuerdo con esto, la invención contempla el uso de reovirus recombinantes resultantes del reagrupamiento de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente distintos, incluyendo pero no limitados a, reovirus humanos, tal como 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 contempla además el uso de reovirus recombinantes resultantes del reagrupamiento de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente distintos en donde al menos un virus parental está modificado genéticamente, comprende uno o más segmentos genómicos sintetizados químicamente, se ha tratado con mutágenos químicos o físicos, o es él mismo el resultado de un suceso de recombinación. La invención contempla además el uso de reovirus recombinantes que han sufrido recombinación en presencia de mutágenos químicos, incluyendo pero no limitados a sulfato de dimetilo y bromuro de etidio, o mutágenos físicos, incluyendo pero no limitados a luz ultravioleta y otras formas de radiación.

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

“Determinar el fenotipo” de un tumor significa clasificar un tumor según su fenotipo. Por ejemplo, fenotipos de tumores incluyen activación de la vía de ras, resistencia a interferón, deficiencia en p53, y deficiencia en Rb. Los fenotipos no son mutuamente excluyentes, es decir, un tumor puede tener fenotipo de más de una clase.

Una “muestra biológica” es una muestra recogida de un sujeto biológico, tal como un animal.

Método

La presente invención es útil en la determinación precisa de fenotipos de tumores, facilitando de este modo el desarrollo de una pauta de tratamiento que se adapta a un tumor específico. En una primera parte de las invenciones reivindicadas se utiliza el reovirus para infectar una muestra biológica recogida de un animal que tiene un tumor. Dado que los reovirus infectan selectivamente las células neoplásicas con ras activado pero no las células normales o células tumorales en las que la vía de ras no está activada, el método presente permite al médico determinar con precisión si el tumor está asociado con la activación de la vía de ras. Si se diagnostica que tiene ras activado, el tumor se puede tratar con pautas de tratamiento específicas para ras, tal como la terapia de reovirus (Patente de EE.UU. No. 6136307).

La vía de ras es una vía de transducción de señales compleja que lleva a la proliferación celular. Ras es un transmisor central en esta vía, que recibe señales de elementos anteriores (por ejemplo, receptores de factores de crecimiento) y las transmite a elementos posteriores.

Muchos receptores de factores de crecimiento tal como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), así como moléculas relacionadas con el receptor de EGF (por ejemplo, Her-2/Neu/ErbB2), poseen una actividad tirosina quinasa intrínseca que se activa mediante la dimerización del receptor inducida por el ligando. Esto produce autofosforilación del receptor en residuos de tirosina y la unión de proteínas que contienen dominios de homología con Src 2 (SH2). Dos de esas proteínas con SH2 son Grb2 y SHC que activan indirectamente la proteína pequeña que une GTP, asociada a la membrana Ras. La activación de Ras también se produce en respuesta a ligandos que se unen a los receptores con siete dominios transmembrana unidos a las proteínas G (por ejemplo, Gutkind, 1998). La activación de Ras y otras vías de señalización reguladas por receptores de factores de crecimiento finalmente lleva a cambios en el citoesqueleto y la expresión génica que son necesarios para la proliferación, diferenciación y transformación celular (revisado en Campbell *et al.*, 1998).

Los tres genes humanos de ras (Ha-Ras, N-Ras y Ki-Ras) codifican 4 proteínas (debido al ajuste alternativo del ARNm de Ki-Ras). En circunstancias normales, las proteínas Ras hacen un ciclo entre un estado activo (unido a GTP) y un estado inactivo (unido a GDP). La activación de Ras se produce mediante intercambio del GDP unido por GTP, que se facilita por una familia de factores de intercambio de nucleótidos. La inactivación de Ras ocurre mediante la hidrólisis del GTP unido a GDP. Esta reacción la facilitan las proteínas activadoras de la GTPasa (GAPs). En muchos cánceres humanos, las proteínas Ras están oncogénicamente activadas mediante mutaciones que destruyen su actividad GTPasa, y por lo tanto desregulan la señalización por Ras (revisado en Campbell *et al.*, 1998).

Existen múltiples candidatos a efectores de Ras que pueden servir después de Ras en la transducción de señales y transformación oncogénica, incluyendo miembros de la familia Rho de GTPasas pequeñas, fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) y proteína serina/treonina quinasa c-Raf-1 (revisado en Campbell *et al.*, 1998). La señalización mediada por Raf

es la vía efectora de Ras mejor caracterizada. Ras activado recluta a Raf a la membrana donde se produce la activación de Raf. Raf activada es el componente inicial de una cascada de quinasas, la cascada de proteínas quinasa activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK). Raf fosforila y activa las proteínas quinasa MEK1 y MEK2 (quinasa de MAPK/ERK) que, a su vez, fosforilan y activan las quinasas reguladas por señales extracelulares ERK1 y ERK2 (Extracellular signal Regulated Kinases, también conocidas como MAPK1 y MAPK2). A diferencia de sus dianas posteriores, ERK1,2, las proteínas MEK1,2 son enzimas altamente específicas cuyo único sustrato conocido son las proteínas ERK1,2. Tras la activación, ERK1 y ERK2 fosforilan (y regulan así) diversas proteínas diana, que incluyen factores de transcripción nuclear, que llevan a la respuesta celular final.

De acuerdo con esto, numerosos sucesos pueden producir la activación de la vía de ras. Por ejemplo, se puede producir una mutación en cualquiera de los tres genes estructurales de ras. Las mutaciones estructurales también pueden tener lugar en los receptores que son anteriores a ras, los transductores de señales posteriores a ras (tal como raf o mek1,2), o los efectores finales MAPK1 y 2. De modo similar, las mutaciones reguladoras que llevan a niveles de expresión anormalmente altos de cualquier proteína en la vía de ras también pueden causar respuestas celulares mitogénicas. Tales mutaciones reguladoras pueden suceder en cualquier parte en las secuencias reguladoras de un miembro de la vía de ras, o incluso en la región estructural o reguladora de un factor que controla la expresión de un miembro de la vía de ras. Por consiguiente, la detección de aberraciones en cualquier miembro específico de la vía de ras no es un modo eficaz de determinar si la vía de ras está activada.

Es posible medir la actividad de la MAPK, el efector final de la vía de ras, ya que la activación constitutiva de MAPK es indicativa de una activación de la vía de ras. Sin embargo, tal aproximación bioquímica requiere una cantidad sustancial de material de muestra, así como procedimientos tediosos como extracción y/o purificación parcial de MAPK.

Detectando el fenotipo de ras activado en lugar de aberraciones en cualquier gen o producto del gen específico, la presente invención es útil si la activación de la vía de ras se debe a una mutación en el gen estructural de ras, secuencias reguladoras del gen de ras, o cualquier otro factor de la vía de ras. Además, el método presente es relativamente sencillo, sin la necesidad de extraer o purificar una enzima de la muestra.

La capacidad de un reovirus para infectar células en una muestra se puede determinar mediante cualquier método en la técnica. Por ejemplo, se puede medir la replicación del ácido nucleico de los reovirus mediante reacción en cadena de la polimerasa con cebadores específicos para el reovirus utilizado; la síntesis de proteínas del reovirus se puede detectar mediante anticuerpos específicos; las células infectadas se pueden observar al microscopio y detectar evidencias de efectos citopáticos inducidos por el reovirus; y los reovirus replicados se pueden recoger de la muestra, y determinar el título del virus, para evaluar si ha tenido lugar la replicación viral. Otros métodos para determinar la presencia de la replicación del reovirus son conocidos o se pueden desarrollar por los expertos en la materia.

Se debe advertir que un tumor puede contener anomalías oncogénicas múltiples. En particular, se ha descrito que la activación de ras está normalmente precedida por la sobreexpresión de p53 en cáncer de mama (Smith *et al.*, 2000). La presencia de otras anomalías oncogénicas además de la activación de la vía de ras, sin embargo, no dificulta la capacidad de una pauta de terapia específicamente adaptada para tumores con ras activados. Por ejemplo, los reovirus aún pueden matar selectivamente células neoplásicas con ras activado incluso si las células también contienen niveles anormalmente elevados de p53.

Además, puesto que los reovirus se replican selectivamente en células neoplásicas con ras activado pero no en células normales, otro aspecto de la presente invención proporciona un método para diagnosticar la presencia de una neoplasia en un mamífero, que comprende poner en contacto una muestra de células de dicho mamífero con un reovirus en condiciones que permitan que el reovirus se replique en las células con ras activado, en donde la capacidad de dicho reovirus de replicarse en dicha muestra indica la presencia de una neoplasia en dicho mamífero.

Similar al reovirus, algunos otros virus oncolíticos también se replican selectivamente en células con ras activado. Se contempla que se pueden emplear estos virus oncolíticos para practicar la presente invención de la misma manera que los reovirus. Estos virus son típicamente mutantes que son sensibles a la quinasa de ARN de cadena doble (PKR), mientras que sus equivalentes salvajes no son sensibles a la PKR.

Normalmente, cuando un virus entra en una célula, se activa la PKR y bloquea la síntesis de proteínas, y el virus no se puede replicar en esta célula. Algunos virus han desarrollado un sistema para inhibir la PKR y facilitar la síntesis de proteínas virales así como la replicación viral. Por ejemplo, los adenovirus fabrican una gran cantidad de un ARN pequeño, ARN VA1. El ARN VA1 tiene estructuras secundarias frecuentes y se une a la PKR en competición con el ARN de cadena doble (ARNcd) que normalmente activa la PKR. Puesto que se requiere una longitud mínima de ARNcd para activar la PKR, el ARN VA1 no activa la PKR. En lugar de eso, secuestra la PKR en virtud de su gran cantidad. Por consiguiente, la síntesis de proteínas no se bloquea y los adenovirus se pueden replicar en la célula.

Las células neoplásicas con ras activado no están sometidas a inhibición de la síntesis de proteínas por la PKR, porque ras inactiva la PKR. Estas células son por lo tanto susceptibles a la infección viral incluso si el virus no tiene un sistema inhibidor de la PKR. De acuerdo con esto, si se muta el inhibidor de la PKR en adenovirus de modo que no bloquee más la función de la PKR, el virus resultante no infecta células normales debido a la inhibición de la síntesis de proteínas por PKR, pero se replica en células neoplásicas con ras activado que carecen de actividad PKR.

De acuerdo con esto, un virus que está modificado o mutado de modo que no inhibe la función de PKR se replica selectivamente en células neoplásicas con ras activado mientras que las células normales son resistentes. Preferiblemente, el virus es un adenovirus mutado en la región VA1, un virus de la vacuna mutado en la región K3L y/o E3L, parapoxvirus virus del ectima contagioso mutado en el gen OV20.0L, un virus de la gripe mutado en el gen NS-1, o un virus herpes mutado en el gen γ_1 34.5.

Los virus se pueden modificar o mutar según la relación estructura-función conocida de los inhibidores virales de PKR. Por ejemplo, dado que la región amino terminal de la proteína E3 interacciona con el dominio de la región carboxi-terminal 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 de la vacuna codifica pK3, un pseudosustrato de PKR. Hay una mutación de pérdida de la función dentro de K3L. Los truncamientos o mutaciones puntuales en la parte C-terminal de la proteína K3L que es homóloga a los residuos 79 a 83 en eIF-2 anulan la actividad inhibidora de PKR (Kawagishi-Kobayashi *et al.*, 1997).

En una segunda parte de la invención reivindicada se puede utilizar el virus de la estomatitis vesiculosa (VSV) para diagnosticar tumores resistentes a interferón. Los interferones son factores circulantes que se unen a receptores en la superficie celular y finalmente producen tanto una respuesta antiviral como una inducción de señales para la inhibición del crecimiento y/o apoptóticas en las células diana. Aunque los interferones se pueden utilizar teóricamente para inhibir la proliferación de células tumorales, este intento no ha tenido mucho éxito debido a las mutaciones específicas de tumor de miembros de vía del interferón.

Sin embargo, interrumpiendo la vía del interferón para evitar la inhibición del crecimiento ejercida por el interferón, las células tumorales pueden comprometer simultáneamente su respuesta antiviral. En efecto, se ha mostrado que el VSV, un virus envuelto, ARN de sentido negativo, se replicó rápidamente y mató varias líneas celulares tumorales en presencia de interferón, mientras que los cultivos de células primarias humanas normales estaban aparentemente protegidos por el interferón. El VSV se puede utilizar así para diagnosticar tumores resistentes a interferón aunque sensibles a VSV. Como la forma de realización de reovirus, el diagnóstico basado en VSV es una evaluación del fenotipo y no depende de los mecanismos de resistencia a interferón.

En una alternativa segunda o tercera parte de la invención reivindicada, el virus ONYX-015 se puede utilizar para diagnosticar tumores deficientes en p53. p53 es un potente supresor de tumores, que está presente en cualquier célula y controla el crecimiento celular. Puesto que los virus dependen de la maquinaria de proliferación celular para replicarse, están sujetos a la regulación por p53 y no se pueden sobrerreplicar. Ciertos adenovirus, SV40 y virus del papiloma humano, sin embargo, incluyen proteínas que inactivan p53, permitiendo de esta manera su propia replicación (Nemunaitis 1999).

Para los adenovirus de serotipo 5 esta proteína es una proteína de 55 Kd codificada por la región E1B. Si se deleciona la región E1B que codifica esta proteína de 55 Kd, como en el virus ONYX-015 (Bischoff *et al.*, 1996; WO 94/18992), el inhibidor de p53 de 55 Kd no está ya presente. Como resultado, cuando el ONYX-015 entra en una célula normal, p53 funciona para suprimir la proliferación celular así como la replicación viral. Por lo tanto, ONYX-015 no se replica en células normales. Por otra parte, en células neoplásicas que tienen la función de p53 interrumpida, ONYX-015 se puede replicar y finalmente causar que la célula muera. De acuerdo con esto, este virus se puede utilizar para detectar células neoplásicas deficientes en p53 en una muestra. El experto en la materia también puede mutar e interrumpir el gen inhibidor de p53 en adenovirus 5 u otros virus utilizando técnicas establecidas, y los virus resultantes son útiles en el método presente para diagnosticar tumores deficientes en p53.

De forma similar, el virus Delta24 se puede utilizar para diagnosticar tumores deficientes en Rb, en cualquier parte alternativa de las invenciones reivindicadas. El virus Delta24 es un adenovirus mutante que tiene una delección de 24 pares de bases en la región E1A (Fueyo *et al.*, 2000). Esta región es responsable de la unión al supresor de tumores celular Rb e inhibir la función de Rb, dejando de esta forma que prosiga de forma incontrolada la maquinaria de proliferación celular, y por lo tanto la replicación del virus. Delta24 tiene una delección en la región de unión a Rb y no se une a Rb. Por lo tanto, la replicación del virus mutante se inhibe por Rb en una célula normal. Sin embargo, si se inactiva Rb y la célula se transforma en neoplásica, Delta24 no está ya inhibido. Por el contrario, el virus mutante se replica eficazmente y lisa la célula deficiente en Rb. De acuerdo con esto, el virus Delta24 se puede utilizar para determinar si una muestra contiene células tumorales deficientes en Rb.

Como en el caso de las células tumorales con ras activado, las células deficientes en p53 o deficientes en Rb pueden ser el resultado de diversas razones. Por ejemplo, una mutación en el gen estructural de p53 o Rb puede producir un producto génico que funciona mal o una baja traducción, una mutación en las secuencias reguladoras del gen p53 o Rb puede producir una cantidad reducida de transcripción, una mutación en un factor de transcripción para el gen p53 o Rb puede resultar en la producción deficiente de p53 o Rb, o una mutación en un cofactor necesario para la función de p53 o Rb también puede ser la razón de la deficiencia en p53 o Rb. Puesto que la presente invención detecta el fenotipo, más que aberraciones estructurales en el gen/proteína p53 o Rb solo, tiene más poder que los métodos basados en la estructura, tal como la PCR.

Una vez que se ha determinado el fenotipo de un tumor, el tumor se puede tratar según su fenotipo. Por ejemplo, un tumor con ras activado se puede tratar mediante reovirus, o inhibidores de la vía de ras. La terapia con reovirus se ha divulgado, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. No. 6136307.

Se debe advertir que Delta24 y ONYX-015 son meramente ejemplos para aclarar la solicitud, mientras que el experto en la materia será capaz de identificar o desarrollar otros virus útiles en el diagnóstico y tratamiento de tumores según la presente divulgación.

Como con los reovirus, la presente invención también comprende el uso de virus inmunoprotegidos o reagrupados de otros virus oncolíticos. Además, aparte de los virus específicamente discutidos en la presente solicitud, el experto en la materia puede practicar la presente invención utilizando virus oncolíticos adicionales según lo divulgado aquí y los conocimientos disponibles en la técnica. El virus oncolítico puede ser un miembro en la familia de myoviridae, siphoviridae, podoviridae, tecoviridae, corticoviridae, plasmaviridae, lipothrixviridae, fuselloviridae, poxviridae, iridoviridae, phycodnaviridae, baculoviridae, herpesviridae, adenoviridae, papovaviridae, polydnviridae, inoviridae, microviridae, geminiviridae, circoviridae, parvoviridae, hepadnaviridae, retroviridae, cyctoviridae, reoviridae, birnaviridae, paramyxoviridae, rhabdoviridae, filoviridae, orthomyxoviridae, bunyaviridae, arenaviridae, leviviridae, picornaviridae, sequiviridae, comoviridae, potyviridae, caliciviridae, astroviridae, nodaviridae, tetraviridae, tombusviridae, coronaviridae, glaviviridae, togaviridae, o barnaviridae.

La presente invención se puede aplicar a cualquier animal, particularmente mamíferos. Los mamíferos preferidos incluyen perros, gatos, ovejas, cabras, vacas, caballos, cerdos, seres humanos y primates no humanos. Lo más preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Kits

Un aspecto adicional podrían ser kits útiles para el diagnóstico de tumores. Un aspecto podría ser un kit que comprende un reovirus y medios para detectar la replicación del reovirus. Los medios de detección pueden ser un par de cebadores específicos para el ácido nucleico del reovirus, y puede opcionalmente incluir reactivos para PCR. Los medios de detección también pueden ser un anticuerpo específico para una proteína del reovirus, y puede contener opcionalmente los reactivos accesorios tales como anticuerpos secundarios. Los medios de detección pueden ser además portaobjetos y colorantes adecuados para observar la morfología de las células infectadas en el microscopio, o medios de cultivo de virus y células que se pueden utilizar para determinar el título del reovirus. De forma similar, se podrían utilizar kits que comprenden otro virus capaz de replicarse en células de tumores específicos, así como medios para detectar la replicación del virus. Ejemplos de estos virus incluyen, sin estar limitados a, VSV, el virus ONYX-015 y el Delta24.

Se podría utilizar preferiblemente un kit que comprende al menos dos virus que se pueden utilizar para determinar el fenotipo de tumores según la presente invención. Preferiblemente, los virus se seleccionan del grupo que consiste en reovirus, VSV, el virus ONYX-015, y el virus Delta24.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar la invención y no se deben interpretar de ninguna manera como limitantes del ámbito de la presente invención.

Ejemplos

En los ejemplos posteriores, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Las abreviaturas no definidas tienen sus significados generalmente aceptados.

°C = grados Celsius

hr = hora

min = minuto

μ M = micromolar

mM = milimolar

M = molar

ml = mililitro

μ l = microlitro

mg = miligramo

μ g = microgramo

PAGE = electroforesis en gel de poliacrilamida

rpm = revoluciones por minuto

ES 2 292 981 T3

	SBF	= suero bovino fetal
	DTT	= ditioneitol
5	SDS	= dodecil sulfato sódico
	PBS	= solución salina tamponada con fosfato
	DMEM	= medio de Eagle modificado por Dulbecco
10	α -MEM	= medio de Eagle α modificado
	β -ME	= β -mercaptoetanol
15	MOI	= multiplicidad de infección
	PFU	= unidades formadoras de placas
	EGF	= factor de crecimiento epidérmico
20	PDGF	= factor de crecimiento derivado de plaquetas
	CPE	= efecto citopático
25	VSV	= virus de la estomatitis vesiculosa
	PCR	= reacción en cadena de la polimerasa
	SH2	= homología con src 2.

30

Ejemplo 1

Determinación del fenotipo de un tumor con reovirus

35 Se encontró un tumor en una mujer de 65 años de edad cuando se hacía su mamografía regular. Se recogió una muestra del tumor durante la biopsia y parece que es un tumor maligno. Para determinar si el tumor contiene células con ras activado, la muestra se pone en cultivo celular y se incuba con reovirus.

40 La cepa Dearing del serotipo 3 de reovirus se propaga en cultivos en suspensión de células L-929 purificadas según Smith (Smith *et al.*, 1969) con la excepción de que se omite el β -mercaptoetanol (β -ME) del tampón de extracción. La proporción partícula/PFU para el reovirus purificado es normalmente de 100/1. La muestra de la biopsia se trocea en DMEM, se incuba con el reovirus durante 2 horas a 37°C, se cambia a DMEM fresco más SBF al 20%, y se cultiva durante 48 horas. Después de esto, se recoge el sobrenadante del cultivo y se determina el título del reovirus. El resultado indica que el reovirus se ha replicado en la muestra. Por lo tanto, el tumor de mama contiene células tumorales con ras activado.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar una neoplasia en un animal mediante el fenotipo, que comprende:

- (a) proporcionar una muestra biológica del animal, en donde la muestra comprende células neoplásicas;
- (b) proporcionar al menos dos virus oncolíticos, en donde cada virus oncolítico se replica selectivamente en células neoplásicas que tienen un fenotipo seleccionado del grupo que consiste en activación de la vía de ras, resistencia a interferón, deficiencia en p53 y deficiencia en Rb; y en donde cada uno de los al menos dos virus oncolíticos se replica en células neoplásicas que tienen un fenotipo diferente;
- (c) poner en contacto las células neoplásicas en la muestra con cada uno de los al menos dos virus oncolíticos en condiciones que permitan a cada virus oncolítico replicarse en las células neoplásicas que tienen el fenotipo para el que cada virus oncolítico es específico;
- (d) determinar si cada uno de los virus oncolíticos se puede replicar selectivamente en las células neoplásicas; y
- (e) diagnosticar una neoplasia en el animal de un fenotipo específico según la capacidad de cada uno de los virus oncolíticos de replicarse selectivamente en las células neoplásicas.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el animal es un mamífero.

3. El método de la reivindicación 2, en donde el mamífero es un ser humano.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el virus oncolítico es un reovirus de mamíferos o es un reovirus de aves.

5. El método de la reivindicación 4, en donde el reovirus de mamífero es un reovirus de serotipo 3.

6. El método de la reivindicación 5, en donde el reovirus de serotipo 3 es un reovirus de la cepa Dearing.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la muestra biológica es de un animal que tiene una neoplasia seleccionada del grupo que consiste en cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer suprarrenal, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer hematopoyético y cáncer del sistema nervioso central y periférico.

8. El método de la reivindicación 7, en donde los al menos dos virus oncolíticos se seleccionan del grupo que consiste en reovirus, adenovirus mutados en la región VA1, virus de la vacuna mutados en la región K3L y/o E3L, parapoxvirus virus del ectima contagioso mutados en el gen OV20.0L, virus de la gripe mutados el gen κ 134.5, virus de la estomatitis vesiculosa, virus ONYX-015, y virus Delta 24.