

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 482**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04	(2006.01)
A61K 31/225	(2006.01)
A61K 35/76	(2015.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07C 69/60	(2006.01)
C12N 5/09	(2010.01)
C12N 7/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.11.2018 PCT/CA2018/051492**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **31.05.2019 WO19100163**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.11.2018 E 18880792 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025 EP 3714044**

54 Título: **Composiciones y métodos para mejorar la producción, el crecimiento, la propagación y la eficacia oncolítica e inmunoterapéutica de virus sensibles al interferón**

30 Prioridad:

24.11.2017 US 201762590456 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2025

73 Titular/es:

**OTTAWA HOSPITAL RESEARCH INSTITUTE
(100.00%)
501 Smyth Road
Ottawa, Ontario K1H 8L6, CA**

72 Inventor/es:

**DIALLO, JEAN-SIMON;
SELMAN, MOHAMMED;
ARULANANDAM, ROZANNE;
FORBES, NICOLE ELISE y
KRISHNAN, RAMYA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 014 482 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para mejorar la producción, el crecimiento, la propagación y la eficacia oncolítica e inmunoterapéutica de virus sensibles al interferón

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos, métodos y composiciones que mejoran la producción, la infección, el crecimiento y/o la propagación de virus sensibles al interferón, y/o potencian la actividad oncolítica e inmunoterapéutica de virus oncolíticos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los virus genéticamente atenuados forman la base de un número cada vez mayor de plataformas de biotecnología y farmacéuticas. Los virus genéticamente atenuados se pueden generar tanto a partir de ingeniería genética directa como indirectamente por selección genética. Por ejemplo, pero no pretende ser limitante, la atenuación puede ser específica de especies, en donde un virus adaptado para el crecimiento en un hospedador por pases sucesivos (por ejemplo, huevos) conduce a la inadaptación y consecuente atenuación en otro hospedador (por ejemplo, seres humanos). Similarmente, la selección genética de virus se puede llevar a cabo en una célula cancerosa, haciendo que el virus se inadapte para la replicación en una célula normal. Dicho virus replicante adaptado o genéticamente manipulado para la atenuación en células normales, pero que crece óptimamente en células cancerosas, se denomina frecuentemente un virus oncolítico. Frecuentemente, la atenuación implicará la incapacidad de los virus seleccionados o manipulados para vencer los mecanismos de defensa antivírica de las células hospedadoras previstas, un mediador clave del cual es la citocina antivírica interferón (IFN). Existe una amplia variedad de virus atenuados y estos se usan para múltiples aplicaciones y fines. Esto incluye cepas víricas que se han vuelto seguras para la producción de vacunas atenuadas vivas o inactivadas (por ejemplo, gripe, variolovacuna modificada ankara). Esto también incluye vectores víricos que se han vuelto incompetentes para la replicación de tanto la retirada parcial (por ejemplo, adenovirus) como completa de genes víricos (por ejemplo, lentivirus o retrovirus), lo que hace que el virus sea dependiente de la suplementación de genes / funciones víricas esenciales en trans (por ejemplo, expresión de proteínas víricas de plásmidos cotransfectados). Estos virus se usan frecuentemente como vectores para genoterapia, donde el vector lleva alguna forma de transgén terapéutico. Un virus no replicante, también denominado un virus incompetente para la replicación o un virus defectuoso en la replicación, se define como un virus que se puede producir a partir de una primera célula, asistido por componentes no víricos, tales como, por ejemplo, pero no se limitan a, plásmidos, que por último lugar conduce a la formación de partículas de virus que pueden infectar una segunda célula, pero que no pueden replicar posteriormente la segunda célula.

15

20

25

30

35

Emergiendo en el campo de los terapéuticos contra el cáncer, la viroterapia oncolítica ha demostrado ser significativamente prometedora durante la última década. Actualmente están siendo evaluados varios virus oncolíticos (VO) basados en una amplia variedad de esqueletos víricos de virus de ARN pequeño (por ejemplo, rabdovirus) a virus de ADN grandes (por ejemplo, poxvirus, virus del herpes) en ensayos clínicos para tratar una variedad de tipos de cáncer. En 2015, la FDA concedió la aprobación del primer VO de su clase basado en el virus del herpes simple 1 (VHS-1) para el tratamiento del melanoma, lo que generó un gran interés por esta forma de terapia contra el cáncer.

40

45

50

Los virus oncolíticos (VO) son agentes bioterapéuticos autoamplificantes que se han seleccionado o manipulado para infectar preferentemente y destruir células cancerosas. Cuando son eficaces, los VO conducen a la erradicación del tumor no solo por lisis directa de células cancerosas, sino también a través de la generación aguas abajo de respuestas inmunitarias antineoplásicas, parada vascular y expresión transgénica terapéutica. Por este motivo, se consideran como inmunoterapéuticos. Como una base para su selectividad por el cáncer, los VO explotan defectos celulares que son inherentes al fenotipo canceroso. Esto incluye respuestas antivíricas disfuncionales, tales como respuesta del interferón de tipo 1, evasión inmune, elevada proliferación y metabolismo celular y vasculatura tumoral permeable. El entorno biológico resultante de la tumorigénesis es muy apto para respaldar el crecimiento de VO genéticamente atenuados que son de otro modo inocuos para las células normales.

55

60

Los VO se perfilan como una atractiva modalidad terapéutica para el cáncer debido a su potencial curativo y a sus efectos secundarios relativamente leves equivalentes a síntomas similares a los de la gripe aguda. Sin embargo, la heterogeneidad en la respuesta clínica a VO sigue siendo un obstáculo significativo a vencer, como se demuestra en varios ensayos clínicos humanos. Esta heterogeneidad en la respuesta se puede atribuir a factores que impiden la administración eficaz de VO y a la propagación dentro de tumores.

60

Aunque los virus atenuados y los virus oncolíticos pueden trabajar y de hecho trabajan como agentes únicos, numerosos estudios han mostrado que la propagación vírica, la eficiencia global y/o la oncólisis se pueden mejorar usando compuestos farmacológicos [1-3]. Más allá de los efectos oncolíticos sobre las células tumorales, los VO también pueden reforzar la inmunidad antitumoral dirigiendo las respuestas inmunitarias al tumor [4-7]. Este efecto inmunoestimulante puede mejorarse además integrando los genes inmunoestimulantes en el genoma vírico [6-9], tal como T-VEC, un VO basado en virus del herpes simple de tipo 1 recientemente autorizado para el tratamiento

65

de melanoma por la Administración Estadounidense de Medicamentos y Alimentos (FDA) [10-12]. Ahora han surgido combinaciones de VO y otras formas de inmunoterapia como un enfoque prometedor en pacientes humanos [5-7].

5 Los ésteres del ácido fumárico (FAE), tales como el dimetilfumarato (DMF), son derivados del éster del ácido fumárico [13]. El ácido fumárico es un producto intermedio en el ciclo del ácido cítrico, que es un proceso celular básico que genera energía en las mitocondrias. Los ésteres del ácido fumárico (FAE) son una clase de compuestos con efectos antiinflamatorios y neuroprotectores conocidos [14, 15, 17]. Los mecanismos implicados tienen que ser todavía elucidados, pero se cree que son mediados por la activación de la vía del factor de transcripción antioxidativo, 2 de tipo factor nuclear (2 derivado de eritroides) (NRF2) [15], la inhibición de NF- κ B [16], así como la reducción funcional de glutatión (GSH) [18-19].

15 Los FAE (comercializados como Fumaderm[®], Psorinovo[®]) fueron autorizados inicialmente como un tratamiento para la psoriasis en Alemania. Recientemente, el dimetilfumarato (DMF), un FAE comercializado como Tecfidera[®], fue autorizado por la Administración Estadounidense de Medicamentos y Alimentos (FDA) y la Agencia Europea del Medicamento para el tratamiento de formas recidivantes de esclerosis múltiple y esclerosis múltiple recidivante-remitente [20]. Estudios clínicos del uso a largo plazo de DMF no relevaron efectos adversos graves a largo plazo [20-22]. Informes recientes sugieren que DMF tiene potencial antineoplásico, mostrado por la supresión del crecimiento tumoral y las metástasis [23-28], además de sensibilizar los tumores a la quimioterapia [26, 29]. Además, el DMF está actualmente en evaluación clínica para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica y linfoma cutáneo de linfocitos T (por ejemplo, NCT02546440, NCT02784834). El documento de EE. UU. US2012230958 desvela el efecto potenciador de Sorafenib, *in vivo*, sobre el efecto oncolítico del virus de la variolovacuna JX-594 y aplicaciones en la terapia del cáncer.

25 Existe una necesidad en la técnica de identificar compuestos y composiciones que potencien el crecimiento y la propagación de virus. También existe una necesidad en la técnica de identificar compuestos y composiciones que potencien la eficacia antineoplásica de la viroterapia. Además, existe una necesidad en la técnica de identificar novedosos métodos de tratamiento de células cancerosas *in vitro* y/o *in vivo*.

30 **SUMARIO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a composiciones y métodos que mejoran la producción, la infección, el crecimiento y/o la propagación de virus sensibles al interferón, y/o potencian la actividad oncolítica y/o inmunoterapéutica de virus oncolíticos.

35 Los resultados descritos en el presente documento observaron uno o más efectos previamente no informados de los ésteres del ácido fumárico y maleico (FMAE): una capacidad para mejorar la producción, la infección, el crecimiento y/o la propagación de virus replicantes y no replicantes sensibles al interferón; y para aumentar la eficacia terapéutica de virus oncolíticos, por ejemplo, en cánceres resistentes de otro modo, que pueden implicar la inhibición de la respuesta antivírica innata de células cancerosas.

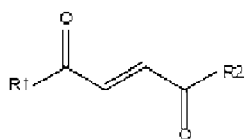
45 En una realización, se proporciona en el presente documento un método de mejora o aumento de la producción, el crecimiento, la infección, la propagación, o el título, de un virus sensible al interferón en una célula inmortalizada, célula cancerosa o célula tumoral, que comprende administrar un compuesto de FMAE de la fórmula III a la célula antes, simultáneamente con o después de la infección de la célula inmortalizada, cancerosa o tumoral con el virus sensible al interferón.

50 En otra realización, se proporciona en el presente documento un método de mejora, aumento o potenciamiento de la producción, la infección, la propagación, el título o la actividad oncolítica de un virus oncolítico en células de cáncer o tumorales, que comprende administrar uno o más compuestos que contienen FMAE de la fórmula III seleccionados del grupo que consiste en:

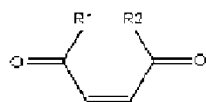
Dimetilfumarato (DMF), dietilfumarato (DEF), monoetilfumarato, monometilfumarato (MMF), y derivados de los mismos.

55 En ciertos aspectos de la divulgación, los compuestos para la mejora vírica pueden incluir los definidos por la fórmula (I), (II), una combinación de los mismos, ésteres del ácido fumárico o ésteres del ácido maleico, sales de adición farmacéuticamente aceptables de los mismos, o formas racémicas o estereoquímicamente isoméricas de los mismos, en donde R1 y R2 pueden ser iguales o diferentes y se pueden seleccionar independientemente de, por ejemplo, OH, O⁻ y alcoxi (C₁₋₆), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

60



(I)



(II)

5 En otro aspecto de la divulgación, los compuestos para la mejora vírica pueden incluir uno o más compuestos definidos por la fórmula (I) y/o (II), en donde R1 y R2 pueden ser iguales o diferentes y se pueden seleccionar independientemente de un alcoxi (C₁₋₂) lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, o alcoxi (C₃₋₂₀), y en donde dichos radicales se pueden sustituir opcionalmente, por ejemplo, con halógeno, hidroxilo, alquilo (C₁₋₄), nitrilo o ciano.

10 En un aspecto de la divulgación, los compuestos de las fórmulas (I) y/o (II) también pueden existir en varias formas tautómeras que incluyen la forma enol, la forma ceto, y mezclas de las mismas. Por consiguiente, las estructuras químicas representadas en el presente documento engloban todas las posibles formas tautómeras.

15 En un aspecto de la divulgación, los compuestos seleccionados de un compuesto de las fórmulas (I) y/o (II) pueden incluir compuestos isotópicamente marcados, donde uno o más átomos tienen una masa atómica diferente de la masa atómica convencionalmente encontrada en la naturaleza. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar en los compuestos desvelados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, 2H, 3H, 11C, 13C, 14C, 15N, 18O, 17O, etc.

20 En otro aspecto de la divulgación, los compuestos de ejemplo pueden incluir compuestos definidos por la fórmula (I) y/o (II), en donde R1 y R2 son ambos OH, u O⁻.

25 En ciertas realizaciones, los compuestos que se describen en el presente documento, o combinaciones de uno o más compuestos que se describen en el presente documento, o composiciones que comprenden al menos un compuesto de la fórmula III como se describe en el presente documento, se pueden administrar a células antes, o simultáneamente con, o tras la infección de las células con el virus. Posteriormente, las células, uno o más compuestos y virus se pueden multiplicar o cultivar.

30 En otra realización adicional de uno cualquiera del método o métodos descritos en el presente documento, el compuesto que contiene FMAE de la fórmula III o la combinación de compuestos puede estar presente en una composición que comprende el (los) compuesto(s) y uno o más de un vehículo, diluyente o excipiente.

35 En otra realización, se proporciona en el presente documento una composición que comprende uno o más compuestos que contienen FMAE de la fórmula III, y uno o más de a) un virus sensible al interferón, un virus sensible al interferón genéticamente modificado, un virus sensible al interferón atenuado, un virus sensible al interferón oncolítico, una vacuna contra el cáncer basada en virus sensible al interferón o vector de genoterapia para el cáncer, b) una o más células cancerosas, c) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, d) células no cancerosas; e) medio de cultivo celular; f) uno o más terapéuticos antineoplásicos; o cualquier combinación de a)-f). La presente invención también contempla realizaciones en donde uno cualquiera o una combinación de a)-f) se excluyen específicamente de la composición o kit. Se puede excluir cualquier componente o grupo de componentes, si se desea.

45 En otro aspecto más de la divulgación, se proporciona en el presente documento un kit que comprende uno o más compuestos que contienen FMAE, y uno o más de a) un virus sensible al interferón, un virus sensible al interferón genéticamente modificado, un virus sensible al interferón atenuado, un virus sensible al interferón oncolítico, una vacuna contra el cáncer basada en virus sensible al interferón o vector de genoterapia para el cáncer, b) una o más células cancerosas, c) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, d) células no cancerosas; e) medio de cultivo celular; f) uno o más terapéuticos antineoplásicos, g) una placa de cultivo celular o placa multipocillo; h) un aparato para administrar el compuesto a una célula, medio o a un sujeto; i) instrucciones para usar el compuesto o cualquier componente en el kit, de a)-i). La presente divulgación también contempla kits en donde se excluyen específicamente uno cualquiera o una combinación de los mismos de a)-i).

55 En otra realización, las células pueden ser células cancerosas *in vitro*.

En una realización adicional, las células cancerosas pueden ser de un sujeto mamífero.

En todavía una realización adicional, el sujeto mamífero puede ser un sujeto humano.

En otra realización, las células pueden ser células no cancerosas *in vitro*.

En otra realización más, se proporciona en el presente documento un método *in vitro* de aumento de la actividad oncolítica de un virus oncolítico sensible al interferón oncolítico en células cancerosas o tumorales, que comprende administrar un compuesto que contiene FMAE de la fórmula III, o una combinación de dichos compuestos que contienen FMAE, a dichas células cancerosas o tumorales antes, simultáneamente con o después del virus oncolítico.

En otra realización, las células cancerosas o tumorales son *in vitro*.

En otra realización adicional, las células cancerosas o tumorales pueden ser de un sujeto mamífero.

En otra realización más, el sujeto mamífero es un sujeto humano.

En otro aspecto de la divulgación, se proporciona en el presente documento el uso de compuestos que contienen FMAE en la fabricación de un medicamento para mejorar o aumentar la infección, la propagación, el título, la citotoxicidad o la actividad inmunoterapéutica de un virus sensible al interferón oncolítico en células cancerosas o tumorales.

En otra realización más, en cualquiera de las composiciones o los métodos descritos anteriormente o en todo el presente documento, el compuesto que contiene FMAE de la fórmula III mejora o aumenta la infección, el crecimiento, la propagación por el virus sensible al interferón o cualquier combinación de los mismos en células resistentes al interferón.

En otra realización más, en cualquiera de las composiciones o los métodos descritos anteriormente o en todo el presente documento, el compuesto que contiene FMAE de la fórmula III mejora o aumenta la infección, el crecimiento, la propagación por el virus sensible al interferón o cualquier combinación de los mismos en células cancerosas o tumores *in vivo* sin inducir la propagación del virus a órganos mayores.

En una realización adicional, en cualquiera de las composiciones o los métodos descritos anteriormente o en todo el presente documento, el compuesto que contiene FMAE de la fórmula III mejora la muerte de células cancerosas inducida víricamente *in vivo* y/o *in vitro*.

En una realización de cualquiera de los métodos que se describen en el presente documento o a lo largo de todo él, el virus sensible al interferón puede ser cualquier virus adecuado conocido en la técnica que sea sensible al interferón o que se vuelva sensible al interferón, cuyos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, virus replicantes o no replicantes, tales como: virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la poliomielitis, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la gripe, virus de Maraba (tal como MG-1), virus de la rabia, rotavirus, virus de la hepatitis A, virus de la rubeola, virus del dengue, virus Chikungunya, virus respiratorio sincitial, LCMV, lentivirus, retrovirus replicantes, adenovirus, virus del herpes simple o rhabdovirus, o una variante o derivado de los mismos.

En una realización de cualquier método descrito anteriormente o en el presente documento, el virus sensible al interferón es un virus sensible al interferón oncolítico. Un ejemplo representativo puede ser cualquier virus oncolítico adecuado conocido en la técnica que infecta y lisa preferentemente células cancerosas o tumorales en comparación con células no cancerosas o normales. Los ejemplos de virus conocidos en la técnica que se pueden manipular que se van a usar como virus oncolíticos se pueden emplear en el presente documento e incluyen, sin limitación, reovirus, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la poliomielitis, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la gripe, rhabdovirus tales como virus de la estomatitis vesicular, adenovirus, virus del herpes simple y derivados/variantes de los mismos. En una realización preferida, el virus es un virus de la estomatitis vesicular (VSV), o una variante/derivado de rhabdovirus relacionado del mismo, por ejemplo, seleccionado en condiciones de crecimiento específicas, uno que se ha sometido a un intervalo de presiones de selección, uno que se ha modificado genéticamente usando técnicas recombinantes conocidas dentro de la técnica, o una combinación de los mismos. En otra realización preferida, el virus puede ser VSVΔ51 [30]. Otros derivados o variantes se pueden basar en virus tales como, por ejemplo, Maraba (MG-1, por ejemplo), rabia, rotavirus, gripe, hepatitis A, paperas, sarampión, rubeola, reovirus, virus del dengue, virus Chikungunya, virus respiratorio sincitial, LCMV, lentivirus o retrovirus replicantes.

En una realización de cualquier método anterior o descrito en todo el presente documento, el uno o más tipos de células inmortalizadas puede ser células inmortalizadas *in vitro* o *in vivo* de cualquier célula, estirpe celular, tejido u organismo, no limitadas a, humanas, de rata, ratón, gato, perro, cerdo, primate, caballo y similares, por ejemplo, sin limitación: células Vero, HEK-293, células EB-66, células EbX, células PER.C6, AGE1.CR, Age1.CS, Age1.HN, Age1.RO, QOR2/2E11, UMNSAH-DF1, CHO, células de hibridoma, células sf9 o células R4.

En otra realización, el uno o más tipos de células cancerosas o tumorales pueden ser células cancerosas o tumorales *in vitro* o *in vivo* de cualquier célula, estirpe celular, tejido u organismo, por ejemplo, pero no se limitan a, humanas, de rata, ratón, gato, perro, cerdo, primate, caballo y similares, por ejemplo, células formadoras de tumor, tales como, pero no se limitan a, células 293-T, células BHK21 o células MDCK. En una realización preferida, la una o más células cancerosas o tumorales comprenden células cancerosas o tumorales humanas, por ejemplo, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica, leucemia mieloide, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el sida, linfoma relacionado con el sida, cáncer anal, cáncer del apéndice, astrocitoma, tumor teratoide/rabdoide atípico, carcinoma de células basales, carcinoma de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, glioma de tronco encefálico, tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, craneofaringioma, ependimoblastoma, meduloblastoma, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineoblastoma, glioma de la vía óptica e hipotalámico, tumores de médula espinal, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, linfoma del sistema nervioso central, cáncer de cuello uterino, cordoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma cutáneo de linfocitos T, tumores embrionarios, cáncer endometrial, ependimoblastoma, ependimoma, cáncer de esófago, tumor extracraneal de células germinativas, tumor extragonadal de células germinativas, cáncer extrahepático de las vías biliares, cáncer de ojo, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células del estroma gastrointestinal, tumores de células germinativas, extracraneal, extragonadal, ovario, tumor trofoblástico gestacional, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), histiocitosis, cáncer de células de Langerhans, linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, tumores de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia linfocítica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y de cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, histiocitoma fibroso maligno de hueso y osteosarcoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, melanoma intraocular, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, cáncer de fosa nasal y de los senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de boca, cáncer bucofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, tumores del parénquima pineal, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de pituitaria, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células renales (riñón), cáncer de pelvis renal y de uréter, cáncer de células de transición, carcinoma de las vías respiratorias, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma uterino, cáncer de piel, carcinoma de piel de células de Merkel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de linfocitos T, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, tumor trofoblástico, cáncer uretral, cáncer uterino, cáncer endometrial, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar o tumor de Wilms. Sin embargo, los compuestos y composiciones descritos en el presente documento posibles se pueden usar para tratar otros cánceres o tumores *in vivo* o *in vitro*.

La presente divulgación también proporciona una composición que comprende el (los) compuesto(s) que contiene(n) FMAE como se describe(n) en el presente documento, y un vehículo, diluyente o excipiente aceptable. En un aspecto adicional de la divulgación, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se proporciona un método de mejora o aumento de la infección, la propagación y/o el título, y/o la citotoxicidad de un virus en células, comprendiendo el método, administrar el (los) compuesto(s) que contiene(n) FMAE de la fórmula III como se describe(n) en el presente documento a las células antes, después de o simultáneamente con el virus, y cultivar el virus y las células para mejorar o aumentar la infección, la propagación y/o el título, o la citotoxicidad del virus en dichas células. Preferentemente, las células son células cancerosas, células tumorales o células que se han inmortalizado. Más preferentemente, las células son células cancerosas de un mamífero, todavía más preferentemente un sujeto humano y el método se pone en práctica *in vitro*. En otra realización separada, las células son células inmortalizadas *in vitro*.

También se proporciona un método de mejora o aumento de la actividad oncolítica de un virus oncolítico en células cancerosas que comprende administrar el (los) compuesto(s) como se describe(n) en el presente documento a las células cancerosas o sujeto antes de, simultáneamente con o después del virus oncolítico y cultivar el virus oncolítico y las células cancerosas. En un aspecto adicional de la divulgación, las células cancerosas son células cancerosas *in vivo*. En una realización separada, las células cancerosas son células cancerosas *in vitro*. Las células pueden ser de un sujeto mamífero, preferentemente un sujeto humano.

En un aspecto particular de la divulgación, que no pretende ser de ningún modo limitante, se proporciona un kit que comprende un compuesto que contiene FMAE y un medio para multiplicar, cultivar o infectar células con un virus y, opcionalmente, una o más células que son capaces de ser infectadas por el virus, y/o uno o más virus. El kit también puede comprender instrucciones para usar cualquier componente o combinación de componentes y/o poner en práctica cualquier método como se describe en el presente documento.

La presente invención también proporciona un método de mejora o aumento de la infección, la propagación y/o el título, o actividad oncolítica de un virus en células que comprende administrar un compuesto que contiene FMAE de la fórmula III como se describe en el presente documento a las células antes, después de o simultáneamente con el virus. El método se pone en práctica *in vitro*.

La presente invención también proporciona un método de mejora o aumento de la propagación de un virus oncolítico en células tumorales o cancerosas que comprende administrar un compuesto como se ha descrito anteriormente a las células cancerosas o tumorales antes, después de o simultáneamente con el virus oncolítico. Las células cancerosas o tumorales son *in vitro*, preferentemente de un sujeto mamífero tal como, pero no se limitan a, un sujeto humano.

También se proporciona un método de mejora o aumento de la actividad oncolítica de un virus oncolítico en células cancerosas o tumorales que comprende administrar un compuesto como se ha descrito anteriormente a las células cancerosas o tumorales antes, simultáneamente con o después del virus oncolítico. Las células cancerosas o tumorales son *in vitro*, preferentemente de un sujeto mamífero tal como, pero no se limitan a, un sujeto humano.

La presente invención también contempla un método de producción de un virus por multiplicación del virus en un medio apropiado en presencia de un compuesto que contiene FMAE de la fórmula III como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también contempla un método de producción de un virus sensible al interferón atenuado por multiplicación del virus en un medio apropiado en presencia de un compuesto que contiene FMAE de la fórmula III como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también contempla un método de producción de un virus genéticamente modificado por multiplicación del virus en un medio apropiado en presencia de un compuesto que contiene FMAE de la fórmula III como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también contempla un método de producción de un virus oncolítico por multiplicación del virus en un medio apropiado en presencia de un compuesto que contiene FMAE de la fórmula III como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también contempla un método de producción de una vacuna con virus vivos por multiplicación del virus en un medio apropiado en presencia de un compuesto que contiene FMAE de la fórmula III como se ha descrito anteriormente.

La presente invención también contempla un método de producción de un vector de genoterapia basado en virus por multiplicación del virus en un medio apropiado en presencia de un compuesto que contiene FMAE de la fórmula III como se ha descrito anteriormente.

Este Sumario de la invención no describe necesariamente todas las características de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

La **Figura 1** muestra que DMF mejoró la infección vírica y la actividad oncolítica en estirpes celulares de cáncer. **(A)** Estructura de dimetilfumarato. **(B-F)** Estirpes celulares de cáncer renal humano resistentes 786-0, **(B, D)** y diversas estirpes celulares humanas y murinas se pretrataron con DMF durante 4 horas y posteriormente se infectaron con **(B-D)** VSVΔ51 (MOI: 0,01), **(E)** VHS (MOI: 0,01), o **(F)** Sindbis (MOI: 10). **(B)** 24 horas después de la infección, se tomaron imágenes fluorescentes de las células cancerosas infectadas. **(C-F)** El título vírico correspondiente se determinó 48 horas después de la infección de sobrenadantes (N=3-4; las barras de error indican DE (desviación estándar); **(D-F)** prueba de la t bilateral; $p < 0,05$ en comparación con el homólogo no tratado para cada estirpe celular; (C) ANOVA unifactorial; $*p < 0,05$, $***p < 0,001$, en comparación con el homólogo en condición no tratada). **(G)** Estirpe celular humana de tumor A549 pretratado como en **(B)** e infectada con un adenovirus que expresa luciferasa de luciérnaga (Ad5) a una MOI de 1. Se midió la actividad de luciferasa durante el transcurso de 7 días. Los resultados se representan como unidades relativas de luz y el fondo se indica por la línea negra (N=3; las barras de error indican DE; mejora de la significancia para el día 2 a 5, $p < 0,05$ por ANOVA bifactorial). **(H)** Curva de crecimiento multietapa, y de una sola etapa de 786-0 pretratada con DMF e infectada con VSVΔ51 MOI: 0,001, 0,01 o 3; los sobrenadantes se valoraron por ensayo de placa (N=3; las barras de error indican DE). **(I)** 786-0 se pretrató con DMF durante 4 horas y se infectó con VSVΔ51 (MOI: 0,0001), se añadió una superposición de agarosa después de 1 hora de infección. Microscopía de fluorescencia de una placa representativa 48 horas después de la infección. Imagen correspondiente de la tinción con

azul de Coomassie del pocillo completo y diámetro de placa promedio que ilustran la mejora de los diámetros de placa en presencia de DMF (N=20; las barras indican media; ANOVA unifactorial; *p<0,05, *** p<0,001, en comparación con el homólogo en condición simulada). **(J)** Se pretrataron las estirpes celulares 786-0, CT26WT y B16F10 y se infectaron como en **(B)**. La viabilidad celular se ensayó 48 horas después de la infección. Los resultados se normalizaron al promedio de los valores obtenidos para las células sin tratar no infectadas correspondientes (N=8; las barras de error indican DE; ***p<0,001 por ANOVA unifactorial; en comparación con condición de VSVΔ51). **(K)** Las células 786-0 tratadas con 150 μM de DMF en diversos momentos antes o después de la infección con VSVΔ51 (MOI: 0,01) o los sobrenadantes no tratados simulados se recogieron 24 horas después de la infección, y se valoraron por ensayo en placa (N=3; las barras de error indican DE; prueba de la *t* bilateral; * p<0,05, ** p<0,01, en comparación con el homólogo en condición simulada).

La **Figura 2** muestra que DMF mejoró selectivamente la infección de virus oncolítico en muestras clínicas *ex vivo* y humanas. **(A, B)** Se cultivaron tumores CT26WT y B16F10 por vía subcutánea en ratones BALB/c y C57BL/6 respectivamente y se extirparon. También se recogieron el bazo, el músculo, el pulmón y el tejido cerebral de ratones BALB/c y C57BL/6, y se obtuvieron cilindros. Se pretrataron cilindros de tumor y tejido normal con 150 μM de DMF durante 4 horas y posteriormente se infectaron con 1×10⁴ UFP de VSVΔ51 oncolítico que expresa GFP. **(C-D)** Cilindros de tejido tumoral humano, **(F)** cilindros de tejido normal humano o **(E)** estirpes celulares derivadas de paciente se trataron con DMF durante 4 horas, y posteriormente se infectaron con **(C-D, F)** 1×10⁴ UFP o **(E)** a una MOI de 0,01 de VSVΔ51 oncolítico que expresa GFP. **(A, D)** 24 horas después de la infección se adquirieron imágenes fluorescentes de los cilindros de tejido tumoral o normal. Se muestran imágenes representativas de cada conjunto por triplicado. **(B, C, E, F)** Se determinaron los títulos víricos 48 horas después de la infección (N=3-4; las barras de error indican DE; prueba de la *t* bilateral; ns, significación no estadística; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, en comparación con el homólogo no tratado).

La **Figura 3** muestra que diversos ésteres del ácido fumárico y maleico promovieron la infección del virus oncolítico VSVΔ51. **(A)** Se presentan la estructura de ésteres del ácido fumárico (DEF, DMF) y ésteres del ácido maleico (DEM, DMM). **(B)** Metabolismo de DMF. DMF se hidroliza en monometilfumarato (MMF), que a su vez es metabolizado en ácido fumárico (FA). El FA entra posteriormente en el ciclo de TCA. **(C)** Células 786-0 o **(D)** cilindros de tumor *ex vivo* CT26WT se pretrataron con diversos FMAE y análogos durante 4 horas y posteriormente se infectaron con VSVΔ51 oncolítico que expresa GFP a **(C)** una MOI de 0,01 o **(D)** 1×10⁴ UFP. 24 horas después de la infección se tomaron imágenes fluorescentes de las células 786-0 infectadas o cilindros de tumor CT26WT. Se determinó el título vírico correspondiente 48 horas después de la infección de sobrenadantes. (N=3; las barras de error indican DE; ANOVA unifactorial; * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, en comparación con el homólogo no tratado). **(E)** Células 786-0 y células CT26WT se trataron con diversos FMAE, a las concentraciones indicadas, durante 4 horas y posteriormente se infectaron con VSVΔ51 (MOI: 0,01), los sobrenadantes se recogieron 48 horas después de la infección y se valoraron por ensayo en placa (N=3; las barras de error indican DE). **(F)** Se pretrataron 786-0 durante 4 horas con diversos FMAE y posteriormente se infectaron con VSVΔ51 que expresa GFP, se añadió una superposición de agarosa después de 1 hora de infección. Microscopía de fluorescencia de una placa representativa 24 horas después de la infección. Imagen de la tinción con azul de Coomassie correspondiente del pocillo completo y diámetro de placa promedio que ilustran la potenciación de los diámetros de placa en presencia de DMF (N=20; las barras indican media; ANOVA unifactorial; *** p<0,001, en comparación con el homólogo en condición simulada).

La **Figura 4** muestra que el dimetilfumarato mejoró la eficacia terapéutica de VSVΔ51 en modelos de tumor singénico y de xenoinjerto. **(A-C)** Ratones portadores de tumor, CT26WT, B16F10 y HT29, se trataron por vía intratumoral con el vehículo (DMSO) o 50 o 200 mg/kg (como se indica en **A**) de DMF durante 4 horas, y posteriormente se inyectaron con 1×10⁸ UFP de VSVΔ51 oncolítico que expresa luciferasa de luciérnaga o el vehículo (PBS), por vía intratumoral. El tratamiento se administró dos veces o tres veces, como se indica por flechas en el panel **C**. 24 horas después de la infección, se monitorizó la replicación vírica. **(A)** Se presentan imágenes representativas de bioluminiscencia de ratones. **(B)** Cuantificación de la luminiscencia. Escala representada en fotones (N=10-18. Las barras indican media; ns, significación no estadística; **p < 0,01 por prueba de la *t* bilateral; en comparación con la condición infectada por VSVΔ51). **(C)** Volumen del tumor representado (N=9-15. Las barras de error indican EEM; *p < 0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 por ANOVA bifactorial; en comparación con DMF+VSVΔ51 con la condición de solo DMSO). **(D)** La supervivencia se monitorizó con el tiempo. La prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox) indica que el tratamiento combinado es significativamente prolongado con respecto a VSVΔ51 solo (CT26WT N=10-13, p=0,0008; B16F10 N=9-14, p=0,0039; HT29 N=10-15, p=0,0003). **(E)** Se monitorizó el volumen del tumor y la supervivencia después de la reimplantación de CT26WT en ratones curados e intactos de **D** (N=3-5, las barras de error indican DE). **(F)** El volumen del tumor se monitorizó después de la implantación de células 4T1 en ratones curados con CT26WT e intactos (N=3, las barras de error indican DE).

La **Figura 5** muestra que los ésteres del ácido fumárico y maleico inhibieron la producción de citocinas antiviricas y la respuesta de interferón de tipo I. **(A-E)** Lisados celulares de 786-0 tratados con FMAE e infectados con VSVΔ51 que expresa GFP se recogieron 24 hpi y se extrajo ARN o proteína. **(A)** Diagrama de dispersión que muestra los niveles de expresión de genes expresados diferencialmente entre 786-0 infectadas en presencia o ausencia de DMF. **(B)** Resumen de las relaciones de ontología génica y **(C)** lista de los principales GOterm regulados por disminución, por FMAE durante la infección vírica, y **(D)** mapa de calor que muestra los niveles de expresión de los genes GOterm de "respuesta a virus" expresados diferencialmente. **(E)** Se extrajo proteína y se sondó para las proteínas indicadas por transferencia Western. **(F)** Se pretrataron células 786-0 durante 4 horas con DMF o simulación tratada e infectada con VSVΔ51 o wtVSV (MOI: 0,01). Se determinaron los títulos víricos correspondientes 48 horas después de la infección de sobrenadantes (N=3; las barras de error indican DE). **(G)** Se trataron células 786-0 con DMF, MMF o simulación tratada durante 4 horas y se infectaron con VSVΔ51ΔG a MOI 1. Se recogieron sobrenadantes a las 12 o 16 hpi y se usaron para precondicionar células 786-0 durante 4 horas y posteriormente se infectaron con VSVΔ51 o wtVSV. Se determinaron los títulos víricos correspondientes 48 horas después de la infección de sobrenadantes (N=3; las barras de error indican DE). **(H-I)** Se trataron 7860 como en **(A)**, **(H)** 16 hpi el sobrenadante se recogió y posteriormente se ensayó por ELISA para IFNβ (N=3; las barras de error indican DE). **(I)** 36 hpi el sobrenadante se recogió y posteriormente se ensayó por ELISA para IFNα (N=3; las barras de error indican DE). **(J)** Se trataron células 786-0 con FMAE durante 6 h, y con IFNβ o IFNα durante 4 horas, y posteriormente se infectaron con VSVΔ51 a MOI 0,1. Se determinaron los títulos víricos correspondientes 48 horas después de la infección de sobrenadantes (N=3; las barras de error indican DE). **(K)** Se pretrataron células 786-0 con 200 μM de DMF durante 1 o 4 horas y se trataron con IFNβ (250 U/ml) durante 30 minutos. Se extrajeron proteínas, y posteriormente se sondaron para pSTAT1, STAT1 y actina, por transferencia Western.

La **Figura 6** muestra que DMF inhibió la translocalización de NF-κB tras la infección. **(A)** Estructura de DMS, MMS, S. **(B-C)** Se pretrataron 786-0 con los análogos de DMF indicados durante 4 horas y posteriormente se infectaron con VSVΔ51 oncolítico que expresa GFP a una MOI de 0,01. **(B)** 24 horas después de la infección se tomaron imágenes fluorescentes de las células 786-0 infectadas. **(C)** Se determinaron los títulos víricos correspondientes 48 horas después de la infección de sobrenadantes. (N=3; las barras de error indican DE; ANOVA unifactorial; *** p<0,001, en comparación con el homólogo no tratado) **(D)** Se determinaron los niveles de GSH en células 786-0 después de un tratamiento de 4 horas con FMAE (N=4; las barras de error indican DE; ANOVA unifactorial; *** p<0,001, en comparación con el homólogo no tratado). **(E)** Mapa de calor que muestra los niveles de expresión de genes de estrés oxidativo expresados diferencialmente. La expresión de genes se normalizó a valores obtenidos para control no tratado e infectado. **(F)** Niveles de expresión de *hmx1* cuantificada por qPCR de células 786-0 después de un tratamiento de 6 horas con FMAE (N=3; las barras de error indican DE). **(G)** 786-0 crecieron en presencia de BSO (2 mM) durante 7 días y se pretrataron con DMF (200 μM) durante 4 horas y posteriormente se infectaron con VSVΔ51 oncolítico que expresa GFP a una MOI de 0,01. Se determinó el título vírico correspondiente 48 horas después de la infección de sobrenadantes. (N=3; las barras de error indican DE). **(H)** Células 786-0 atenuadas en siNRF2 se trataron con DMF y se infectaron como en **(G)**. Se determinaron los títulos víricos correspondientes 24 horas después de la infección de sobrenadantes. Se extrajo ARN y se cuantificó la expresión de genes *nrf2* y *ifitm1* por qPCR (N=3; las barras de error indican DE). **(I-J)** Se extrajeron fracción de proteína citoplásmica y nuclear de células 786-0 tratadas con DMF (200 μM) durante 4 horas y **(I)** posteriormente se infectó con VSVΔ51 oncolítico que expresa GFP a una MOI de 1 durante 8 horas, o **(J)** se trató con TNFα (30 ng/ml) durante 30 min. Los lisados celulares se sondaron para múltiples proteínas como se indica, por transferencia Western. **(K)** Se pretrataron 786-0 con inhibidores de NF-κB (IKK16 [10 μM], TPCA1 [40 μM]) durante 4 horas y posteriormente se trataron conjuntamente con DMF (150 μM) y VSVΔ51 oncolítico que expresa GFP a una MOI de 0,01. Se determinaron los títulos víricos correspondientes 24 horas después de la infección de sobrenadantes. (N=3; las barras de error indican DE; ANOVA unifactorial; ***p<0,001, en comparación con el homólogo no tratado).

La **Figura 7** muestra que MMF aumentó los lentivirus producidos a partir de células 293-T. Se sembraron células 293-T en placas de 96 pocillos usando DMEM + 10 % de FBS + HEPES 35 mM y se incubaron a 37 °C en 5% de CO₂. Las células se trataron con MMF, vehículo solo (DMSO), o se trataron de forma simulada con medio, en pocillos triplicados y se transfectaron con un sistema de gen indicador de luciferasa de lentivirus de 3.^a generación de 4 plásmidos usando PEIpro (Polyplus Transfection, Francia), luego se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 48 h. Tras la incubación, el sobrenadante se transfirió a una nueva placa de 96 pocillos, que se selló con un sellador adhesivo de placas y se congeló inmediatamente a -80 °C. Para medir la cantidad de LV producido: células HT1080 se sembraron en placas de 96 pocillos a 5e3 células/pocillo en 100 μl de volumen usando DMEM + 10 % de FBS + HEPES 35 mM y se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante la noche. A la mañana siguiente, se retiraron 80 μl de los medios de crecimiento y se sustituyeron con 30 μl de sobrenadante que contenía LV descongelado, por duplicado. La placa se centrifugó a 890 g durante 10 minutos; a continuación, se incubó a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 6 h. A continuación, las células se complementaron con 100 μl de DMEM + 10 % de FBS + HEPES 35 mM y se incubaron a 37 °C en 5 % de CO₂ durante 72 h. La expresión de la luciferasa

se midió usando un lector de placas Biotek tras la adición de luciferina a cada pocillo (2 mg/ml; 25 µl por pocillo). Los datos representan el cambio en veces de las URL medias de seis pocillos por duplicado por condición, frente a tratamiento de simulación. La diferencia entre la condición de simulación y de MMF fue significativa por ANOVA ($p < 0,0001$).

La **Figura 8** muestra el impacto de DMF sobre el título de A/FM/1/47 de gripe en células VERO-SF por ELISA. Se sembraron células VeroSF (células Vero adaptadas a medio sin suero) en placas de 96 pocillos y se trataron con vehículo solo, DMF y se infectaron con A/FM/1/47 de la gripe a MOI 0,01. 3 días después, se recogió sobrenadante infeccioso y se reunió (N=3 pocillos por condición) y se sometió a ELISA (Cat n.º IAV142, Virusys) donde los valores de absorbancia se convirtieron en UFP/ml basándose en una curva patrón generada a partir de disolución madre de FM/1/47 previamente valorada por ensayo en placa. Los datos representan el promedio de 2-4 experimentos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La siguiente descripción es de una o más realizaciones preferidas. En el presente documento se pueden describir varias invenciones con composiciones, y se proporcionaron kits con usos o métodos de uso idénticos, similares o distintos.

En un primer aspecto, se proporciona en el presente documento un método *in vitro* de mejora o aumento de uno o más de la producción, la infección, la propagación o el título, y/o la actividad oncolítica o inmunoterapéutica de un virus sensible al interferón en una célula, comprendiendo el método administrar un compuesto que contiene FMAE de la fórmula III a dichas células antes, después o simultáneamente con la infección de las células con el virus.

En otro aspecto, que no pretende ser limitante, se proporciona en el presente documento un método de mejora o aumento de la producción, la infección, la propagación, el título de un virus sensible al interferón en células inmortalizadas, *in vitro*, comprendiendo el método administrar un compuesto que contiene FMAE de la fórmula III a dichas células antes, después o simultáneamente con la infección de las células con el virus.

En un aspecto adicional, que no pretende ser limitante, la producción, la infección, la propagación, el título del virus sensible al interferón se potencia en comparación con la infección, la propagación, el título del virus en ausencia del compuesto que contiene FMAE de la fórmula III.

En un aspecto, se proporciona además en el presente documento un método de mejora o aumento de la producción, la infección, la propagación, el título, o la actividad oncolítica o inmunoterapéutica de un virus sensible al interferón oncolítico en células cancerosas o células tumorales, comprendiendo el método administrar un compuesto que contiene FMAE de la fórmula III a dichas células antes, después o simultáneamente con la infección de las células con el virus.

En un aspecto adicional, que no pretende ser limitante, la actividad oncolítica del virus oncolítico se potencia en células cancerosas o tumorales en comparación con la actividad oncolítica del virus solo o la actividad terapéutica del compuesto que contiene FMAE solo.

En otra realización más de cualquiera de las composiciones, método o métodos descritos anteriormente, el compuesto que contiene FMAE de la fórmula III mejora la infección, el crecimiento o la propagación del virus sensible al interferón en células resistentes a la infección.

La presente divulgación contempla la mejora vírica viral en el sentido de que el resultado del tratamiento es un aumento en la capacidad del virus para infectar (incluida la transducción), o multiplicarse o duplicarse en una célula, para propagarse dentro de uno o más tejidos, para producir un transgén codificado por virus de una célula, para conducir la muerte de la célula infectada o sus células vecinas no infectadas directamente a partir de un componente codificado víricamente o indirectamente a través de una respuesta inmunitaria. Por mejora vírica también se indica que el tratamiento conduce a un aumento en el rendimiento de virus producido de una célula, ya sea aumentando la capacidad intrínseca del virus para infectar, duplicarse o propagarse, o su capacidad para ser producido con la ayuda de componentes adicionales proporcionados *in trans* (por ejemplo, plásmidos transfectados).

En otra realización más de cualquiera de las composiciones, método o métodos descritos anteriormente, el compuesto que contiene FMAE de la fórmula III mejora o aumenta la infección, el crecimiento o la propagación del virus oncolítico sensible al interferón en células cancerosas y tumores *in vivo* sin inducir la propagación del virus a órganos mayores.

En una realización adicional de cualquiera de las composiciones, método o métodos descritos anteriormente, el compuesto que contiene FMAE de la fórmula III mejora o aumenta la muerte de células cancerosas inducida víricamente *in vivo* e *in vitro*.

En todavía una realización adicional, que no pretende ser limitante, se proporcionan composiciones que comprenden uno o más de los compuestos que contienen FMAE de la fórmula III, y uno o más de a) un virus sensible al interferón, un virus sensible al interferón genéticamente modificado, un virus sensible al interferón atenuado, un virus sensible al interferón oncolítico, una vacuna basada en virus sensible al interferón o vector de genoterapia, b) una o más células cancerosas, c) un vehículo, diluyente o excipiente, d) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, e) células no cancerosas; f) medio de cultivo celular; g) uno o más terapéuticos antineoplásicos; o cualquier combinación de a)-g). La presente invención también contempla realizaciones en donde una cualquiera o una combinación de a-g) se excluyen específicamente de la composición o kit. Se puede excluir cualquier componente o grupo de componentes, si se desea.

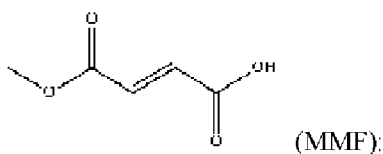
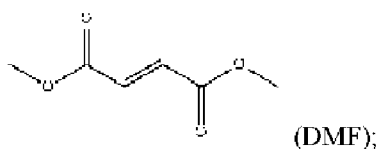
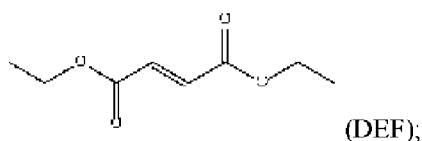
En otro aspecto más de la divulgación, se proporciona en el presente documento un kit que comprende uno o más de los compuestos que contienen FMAE, y uno o más de a) un virus sensible al interferón, un virus sensible al interferón genéticamente modificado, un virus sensible al interferón atenuado, un virus sensible al interferón oncolítico, una vacuna basada en virus sensible al interferón o vector de genoterapia, b) una o más células cancerosas, c) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, d) células no cancerosas; e) medio de cultivo celular; f) uno o más terapéuticos antineoplásicos, g) una placa de cultivo celular o placa multipocillo; h) un aparato para administrar el compuesto a una célula, medio o a un sujeto; i) instrucciones para usar el compuesto o cualquier componente en el kit, j) un vehículo diluyente o excipiente, o cualquier combinación de a)-j). La presente divulgación también contempla kits en donde se excluyen específicamente uno cualquiera o una combinación de los mismos de a)-j).

El experto en la técnica entenderá, teniendo en cuenta las enseñanzas en el presente documento, que la mejora o aumento de la actividad vírica, producción, actividad oncolítica o citotoxicidad pueden incluir la mejora o el aumento de al menos uno de infección vírica y/o tasa de la misma, producción vírica y/o tasa de la misma, título vírico y/o tasa a la que se puede alcanzar el título completo, propagación vírica y/o tasa de la misma, lisis celular y/o tasa de la misma, citotoxicidad vírica y/o tasa de la misma, o cualquier combinación de los mismos, en comparación con cuando no se usan el uno o más compuestos.

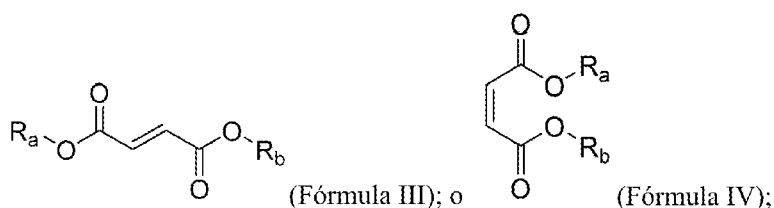
El experto en la técnica entenderá, teniendo en cuenta las enseñanzas en el presente documento, que la mejora o aumento de la actividad inmunoterapéutica de un virus oncolítico puede incluir la mejora o el aumento de la respuesta inmunitaria antitumoral sistémica a través de la regulación por incremento de muchas citocinas, incluido mayor expresión de citocinas inducidas o expresadas por el virus en presencia de los compuestos que contienen FMAE.

Como se entenderá, en ciertas realizaciones, los compuestos que contienen FMAE pueden incluir compuestos orgánicos que pueden ser el isómero cis o trans de los ésteres del ácido metil o etil maleico o fumárico. También se contemplan mezclas de isómeros cis y trans.

En ciertas realizaciones, ejemplos específicos de un compuesto de éster del ácido fumárico y maleico (FMAE) adecuado pueden incluir:



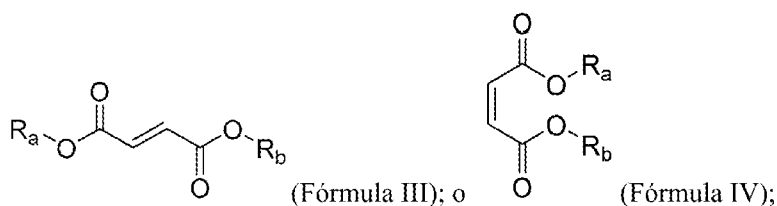
Como se entenderá, en ciertas realizaciones, un compuesto de éster del ácido fumárico y maleico (FMAE) de la fórmula III puede incluir cualquier derivado de ácido fumárico o maleico adecuado que contenga al menos un resto de éster, y un carbono α - β insaturado. En ciertas realizaciones, los compuestos de FMAE pueden incluir los de la fórmula (III) o fórmula (IV):



en donde R_a y R_b pueden ser iguales o diferentes, y en donde al menos uno de R_a y R_b se selecciona para proporcionar una funcionalidad éster que es hidrolizable *in vivo*.

5

En ciertas realizaciones, los compuestos de FMAE pueden incluir los de la fórmula (III) o fórmula (IV):



10

en donde R_a y R_b pueden ser iguales o diferentes, y en donde R_a y R_b se seleccionan cada uno independientemente de: hidrógeno; un alquilo saturado o insaturado, lineal, ramificado o cíclico (tal como, por ejemplo, un alquilo C_1 - C_{10}), que se puede sustituir opcionalmente (con, por ejemplo, uno o más halógeno, hidroxilo, nitro o ciano); o puede estar ausente (es decir, proporcionar un carboxilato en la fórmula III o IV); y

15

en donde cuando uno de R_a y R_b está ausente o es hidrógeno, el otro está presente y no es hidrógeno.

Como se entenderá, en ciertas realizaciones, los compuestos de FMAE también pueden incluir cualquier sal, éster, profármaco, mimético funcional, precursor adecuado, u otro derivado adecuado de los compuestos de FMAE anteriores.

20

Los virus oncolíticos pueden incluir virus que infectan y lisan preferentemente células cancerosas o tumorales en comparación con células no cancerosas o normales, células tumorales que incluyen cualquier célula que pueda formar un tumor. Los ejemplos de virus oncolíticos conocidos en la técnica incluyen, sin limitación, reovirus, virus de la enfermedad de Newcastle, adenovirus, virus del herpes, virus de la poliomielitis, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la gripe, virus de la variolovacuna, rhabdovirus tales como virus de la estomatitis vesicular y derivados/variantes de los mismos. En una realización preferida, el virus en presencia de un compuesto que contiene FMAE, o derivado del mismo, como se describe en el presente documento, infecta y lisa preferentemente células cancerosas o células tumorales en comparación con el virus solo y en comparación con células normales solas o en presencia del compuesto o derivado que contiene FMAE.

30

Se contempla que un virus sensible al interferón puede ser cualquier virus adecuado conocido en la técnica que sea sensible al interferón o que se vuelva sensible al interferón, cuyos ejemplos incluyen, sin limitación, virus replicantes o no replicantes, tales como: virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la poliomielitis, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la gripe, virus de Maraba (tal como MG-1), virus de la rabia, rotavirus, virus de la hepatitis A, virus de la rubeola, virus del dengue, virus Chikungunya, virus respiratorio sincitial, LCMV, lentivirus, retrovirus replicantes, adenovirus, virus del herpes simple o rhabdovirus, o una variante o derivado de los mismos. En una realización preferida, el virus en presencia de un compuesto que contiene FMAE, o derivado del mismo, como se describe en el presente documento.

40

En ciertas realizaciones, los virus sensibles al interferón pueden incluir virus para los que la replicación vírica está controlada o inhibida por la acción de interferón antivírico de tipo I o tipo III en células cancerosas normales o sensibles al interferón.

Por sensible al interferón se indica que después del tratamiento con interferón biológicamente relevante de las células que presentan una capacidad normal para responder a dicho tratamiento con interferón y que son de otro modo permisivas para dicho virus, el virus, que puede ser natural o su cepa derivada atenuada obtenida como tal mediante ingeniería genética y/o selección, experimenta una reducción en su capacidad para transducir, infectar, duplicarse en, multiplicarse, propagarse en, expresarse transgén de, producir progenie vírica de, o destruir dichas células. La Figura 5J proporciona un ejemplo de un medio de prueba de la sensibilidad al interferón de un virus, donde el crecimiento del virus vivo en presencia o ausencia de interferón en una célula infectada determina la sensibilidad al interferón del virus. Por ejemplo, un virus que no se multiplica en células pretratadas con cualquier interferón, que incluye, pero no se limitan a, IFN de tipo 1, pero progresa en células sin tratar, se consideraría

50

sensible al interferón. La disminución del crecimiento vírico en células sensibles al interferón tras el tratamiento con el interferón puede ser cualquier disminución detectable, estando disminuciones más pequeñas asociadas a efectos más débiles, y estando disminuciones más grandes asociadas a efectos más fuertes.

- 5 La actividad citotóxica/oncolítica del virus puede estar presente, observarse o demostrarse *in vitro*, *in vivo*, o ambos. En una realización, que no pretende ser limitante de ninguna manera, el virus presenta actividad citotóxica/oncolítica *in vivo*.

10 Por un derivado o variante de un virus se indica un virus obtenido seleccionando el virus en diferentes condiciones de crecimiento, uno que se ha sometido a un intervalo de presiones de selección, que se ha modificado genéticamente usando técnicas recombinantes conocidas en la técnica, o uno que se ha manipulado para ser defectuoso en la replicación y/o expresar transgenes, o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de dichos virus se conocen en la técnica, por ejemplo, de las solicitudes de patente de Estados Unidos 20040115170, 20040170607, 20020037543, documento de patente WO 00/62735; patentes de Estados Unidos 7.052.832, 7.063.835, 7.122.182 y otros. Preferentemente, el virus es un virus de la estomatitis vesicular (VSV), o una variante/derivado de rhabdovirus relacionado del mismo, por ejemplo, seleccionado en condiciones de crecimiento específicas, uno que se ha sometido a un intervalo de presiones de selección, uno que se ha modificado genéticamente usando técnicas recombinantes conocidas dentro de la técnica, o una combinación de los mismos. En una realización preferida, el virus es VSVA51 [30].

20 El uno o más tipos de células cancerosas o tumorales pueden ser cáncer o tumor o células formadoras de tumor *in vitro* o *in vivo* de cualquier célula, estirpe celular, tejido u organismo, por ejemplo, pero no se limitan a, humana, rata, ratón, gato, perro, cerdo, primate, caballo y similares, por ejemplo, pero no se limitan a células formadoras de tumor, tales como células 293-T, células BHK21 o células MDCK. En una realización preferida, la una o más células cancerosas o tumorales comprenden células cancerosas o tumorales humanas, por ejemplo, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica, leucemia mieloide, carcinoma adrenocortical, cánceres relacionados con el sida, linfoma relacionado con el sida, cáncer anal, cáncer del apéndice, astrocitoma, tumor teratoide/rabdoide atípico, carcinoma de células basales, carcinoma de las vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de huesos, osteosarcoma, histiocitoma fibroso maligno, glioma de tronco encefálico, tumor cerebral, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral/glioma maligno, craneofaringioma, endimoblastoma, meduloblastoma, tumores del parénquima pineal de diferenciación intermedia, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineoblastoma, glioma de la vía óptica e hipotalámico, tumores de médula espinal, cáncer de mama, tumores bronquiales, linfoma de Burkitt, tumor carcinoide, linfoma del sistema nervioso central, cáncer de cuello uterino, cordoma, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de colon, linfoma cutáneo de linfocitos T, tumores embrionarios, cáncer endometrial, endimoblastoma, endimoma, cáncer de esófago, tumor extracraneal de células germinativas, tumor extragonadal de células germinativas, cáncer extrahepático de las vías biliares, cáncer de ojo, melanoma intraocular, retinoblastoma, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células del estroma gastrointestinal, tumores de células germinativas, extracraneal, extragonadal, ovario, tumor trofoblástico gestacional, glioma, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), histiocitosis, cáncer de células de Langerhans, linfoma de Hodgkin, cáncer hipofaríngeo, tumores de células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, leucemia linfocítica, leucemia de células pilosas, cáncer de labio y de cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de pulmón de células pequeñas, linfoma de Hodgkin, linfoma no hodgkiniano, histiocitoma fibroso maligno de hueso y osteosarcoma, meduloblastoma, meduloepitelioma, melanoma, melanoma intraocular, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer escamoso metastásico de cuello, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, cáncer de fosa nasal y de los senos paranasales, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer de boca, cáncer bucofaríngeo, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de faringe, feocromocitoma, tumores del parénquima pineal, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de pituitaria, neoplasia de células plasmáticas/mieloma múltiple, blastoma pleuropulmonar, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer de próstata, cáncer de recto, cáncer de células renales (riñón), cáncer de pelvis renal y de uréter, cáncer de células de transición, carcinoma de las vías respiratorias, retinoblastoma, rhabdomiosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, sarcoma uterino, cáncer de piel, carcinoma de piel de células de Merkel, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, carcinoma de células escamosas, cáncer escamoso de cuello, cáncer de estómago (gástrico), tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, linfoma de linfocitos T, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, tumor trofoblástico, cáncer uretral, cáncer uterino, cáncer endometrial, sarcoma uterino, cáncer vaginal, cáncer vulvar o tumor de Wilms. Sin embargo, los compuestos y composiciones descritos en el presente documento posibles se pueden usar para tratar otros cánceres o tumores *in vivo* o *in vitro*.

65 Para aplicaciones terapéuticas *in vivo*, preferentemente se proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos que contienen FMAE de la fórmula III y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente que contiene otros solutos tales como sales disueltas y similares. En una realización preferida, la disolución comprende solución salina, glucosa o similares suficiente para hacer que la disolución sea isotónica. Las composiciones farmacéuticas y los métodos de preparación de las composiciones

farmacéuticas se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (antiguamente "Remingtons Pharmaceutical Sciences"); Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2000).

5 La administración de dichas composiciones puede ser por cualquier número de vías dependiendo de si se desea
tratamiento local y/o sistémico y del área que se va a tratar. En una primera realización, que no pretende ser
limitante, el compuesto es para administración por vía local al área que se va a tratar. La administración puede ser
tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas que incluyen administración vaginal y rectal), pulmonar (por
10 ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, que incluye por nebulizador), intratraqueal, intranasal,
epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa,
intrarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular, o intracraneal, por ejemplo, administración intratecal o
intraventricular. También se contempla inyección intratumoral, perfusión o administración en la proximidad general
del tumor o inyección en la vasculatura que suministra a un tumor. Alternativamente, los compuestos que contienen
15 FMAE se pueden formular en un comprimido o cápsula para administración por vía oral. También se contemplan
formas farmacéuticas alternativas, que incluyen liberación lenta, liberación sostenida, liberación prolongada, como
serían conocidas en la técnica.

Para administración por inhalación o insuflación, los compuestos se pueden formular en una disolución acuosa o
parcialmente acuosa, que entonces se puede utilizar en forma de un aerosol. Para uso tópico, los moduladores se
20 pueden formular como polvos, cremas o lociones para extender sobre la piel en vehículos farmacéuticamente
aceptables, que se aplican a porciones afectadas de la piel.

Sin desear ser limitantes, los requisitos de dosis para los compuestos que contienen FMAE de la presente
invención pueden variar con las composiciones particulares empleadas, la vía de administración y el sujeto
25 particular que está tratándose. Los requisitos de dosis se pueden determinar por técnicas clínicas habituales
conocidas para un experto en la técnica. Normalmente, el tratamiento será generalmente iniciado con pequeñas
dosis inferiores a la dosis óptima del compuesto o compuesto/virus. A partir de aquí, la dosis se aumenta hasta
que se alcance el efecto óptimo o satisfactorio bajo las circunstancias. En general, el compuesto que contiene
FMAE o las composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto que contiene FMAE se administran a
30 una concentración que, en general, dará resultados eficaces sin causar efectos secundarios nocivos o perjudiciales
significativos. La administración puede ser como una dosis unitaria única o, si se desea, la dosis se puede dividir
en subunidades convenientes que se administran en momentos adecuados a lo largo del día.

El compuesto que contiene FMAE puede ser para emplearlo en administración secuencial, por ejemplo, antes,
35 después o tanto antes como después de la administración de un virus sensible al interferón, por ejemplo, pero no
se limita a, un virus atenuado, un virus modificado genéticamente, un virus de vacuna, un vector de terapia génica
o un virus oncolítico. Alternativamente, el compuesto que contiene FMAE puede ser para administración simultánea
o en combinación con un virus como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, en combinación con un virus
oncolítico. Además, el compuesto que contiene FMAE puede ser para su uso con un virus oncolítico como se ha
40 descrito anteriormente y en combinación con uno o más terapéuticos antineoplásicos o terapias contra el cáncer
como conoce un experto en la técnica, por ejemplo, pero no se limita a, terapia con interferón, terapia con
interleucinas, terapia con factores estimulantes de colonias, inmunoterapia, terapia con inhibidores del punto de
control inmunitario, fármacos quimioterapéuticos, por ejemplo, pero no se limitan a, 5-fluorodesoxiuridina
amsacrina, bleomicina, busulfán, capecitabina, carboplatino, cardemustina, clorambucilo, cisplatino, cladribina,
45 clofarabina, crisantaspa, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorubicina, docetaxel,
doxorubicina, epirubicina, etopósido, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, gliadel, hidroxycarbamida, idarubicina,
ifosfamida, irinotecán, leucovorina, lodemustina, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, mitomicina,
mitoxantrona, oxaliplatino, paclitaxel, pemetrexed, pentostatina, procarbazona, raltitrexed, satraplatino,
estreptozocina, tegafur-uracilo, temozolomida, tenipósido, tiotepa, tioguanina, topotecán, treosulfán, vinblastina,
50 vincristina, vindesina, vinorelbina o una combinación de los mismos. Además, también se pueden emplear
biológicos antineoplásicos, por ejemplo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales y similares.

La presente invención también contempla métodos y usos de las composiciones que se describen en el presente
documento para aumentar o mejorar la propagación de un virus sensible al interferón, por ejemplo, un virus
55 modificado genéticamente, un virus atenuado, un virus de vacuna, un vector de terapia génica o un virus oncolítico
en una o más células, por ejemplo, pero no se limitan a, uno o más tipos de células inmortalizadas, cancerosas o
tumORALES, aumentar o mejorar la citotoxicidad/actividad oncolítica de un virus oncolítico contra una o más células
cancerosas o tumorales, aumentar o mejorar la producción, rendimiento o capacidad reproductiva de un virus, por
ejemplo, un virus modificado genéticamente, un virus atenuado, un virus de vacuna, un vector de terapia génica,
60 un virus oncolítico, o cualquier combinación de los anteriores. En una realización, que no pretende ser limitante en
modo alguno, las composiciones reducen la viabilidad de una célula cancerosa o tumoral al destruir la célula
cancerosa o tumoral o limitar su crecimiento durante un periodo de tiempo.

En otra realización, las células pueden ser células cancerosas *in vitro*. En una realización adicional, las células
65 cancerosas pueden ser de un sujeto mamífero. En todavía una realización adicional, el sujeto mamífero puede ser
un sujeto humano. En otra realización, las células son células inmortalizadas *in vitro*.

La presente invención también contempla métodos y usos in vitro de las composiciones que se describen en el presente documento para aumentar o mejorar la producción, la infección, el crecimiento y la propagación de un virus sensible al interferón, por ejemplo, un virus modificado genéticamente, un virus atenuado, un virus de vacuna, un vector de terapia génica o un virus oncolítico en una o más células, por ejemplo, pero no se limitan a, uno o más tipos de células inmortalizadas, cancerosas o tumorales, aumentar o mejorar la producción, el rendimiento o la capacidad reproductiva de un virus, por ejemplo, un virus modificado genéticamente, un virus atenuado, un virus de vacuna, un vector de terapia génica, un virus oncolítico, o cualquier combinación de los anteriores.

En los siguientes ejemplos, se observó que DMF y diversos ésteres del ácido fumárico y maleico (FMAE) mejoraban la infección vírica de varios virus oncolíticos (VO) en estirpes celulares de cáncer, así como en biopsias de tumor humano, mejorando los resultados terapéuticos en modelos tumorales singénicos y de xenoinjerto resistentes. Se observaron respuestas duraderas, que incluyen propagación y oncólisis mejoradas, incluso en los modelos de ejemplo resistentes de otro modo a VO y monoterapias farmacológicas. Sin desear quedar ligado a teoría, la capacidad observada de DMF para potenciar la propagación vírica puede ser debida a su capacidad para inhibir la producción y respuesta de IFN de tipo I, que se puede asociar a su capacidad para bloquear la translocalización nuclear del factor de transcripción NF- κ B, proporcionándose así ayuda en vencer la respuesta inmunitaria de células cancerosas innatas. En ciertas realizaciones no limitantes de los resultados experimentales, los FMAE mejoraron la propagación/crecimiento vírico en células tumorales en comparación con el crecimiento de virus en tejidos normales, que puede ser ventajoso, por ejemplo, en el direccionamiento del cáncer. En los siguientes estudios, se observó que el tratamiento con FMAE reducía la respuesta inmunitaria innata a la infección con virus oncolítico, mejorando así la eficacia vírica.

Ejemplos adicionales muestran que DMF y diversos ésteres del ácido fumárico y maleico (FMAE) que incluyen MMF pueden aumentar o mejorar la producción, el rendimiento o la capacidad reproductiva del virus en células no cancerosas inmortalizadas. En una realización, se descubrió que el tratamiento con DMF mejoraba la productividad del virus de la gripe A H1N1 FM/1/47 atenuado sensible al interferón competente en la replicación en células Vero de riñón de mono verde africano no cancerosas inmortalizadas. En otra realización, se observó que MMF potenciaba la producción de un lentivirus defectuoso en la replicación tras la transfección de células 293T con plásmidos que codifican proteínas de la encapsidación vírica.

La presente invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1 *El dimetilfumarato mejora la propagación vírica específica de tumor y la oncólisis in vitro.*

Los presentes inventores examinaron en primer lugar el impacto del DMF (estructura presentada en la Fig. 1A) sobre el crecimiento del virus oncolítico de la estomatitis vesicular (VSV Δ 51). En particular, el VSV y el Maraba estrechamente relacionado están sometiéndose actualmente a evaluación clínica, pero se enfrentan a resistencia a la infección en aproximadamente un tercio de los cánceres [30-31]. Las células del carcinoma renal 786-0 son muy resistentes a la infección por VSV Δ 51; sin embargo, un pretratamiento de 4 horas con DMF a dosis entre 50 y 200 μ m aumentó el crecimiento del virus VSV Δ 51 a una baja multiplicidad de infección (MOI) en más de 100 veces (Fig. 1C). También mejoró enormemente la expresión de GFP codificada por virus, como se visualizó por microscopía (Fig. 1B). Este efecto se observó con tiempos de pretratamiento de hasta 24 horas antes de la infección, y después de la infección hasta 8 horas (Fig. 1K). Más ampliamente, el DMF mejoró fuertemente la infección en un panel de estirpes celulares humanas y murinas de cáncer (sarcoma, osteosarcoma, mama, colon, melanoma, ovario) con un amplio intervalo de sensibilidad a VSV Δ 51 (Fig. 1D). El DMF también mejoró la salida vírica del virus oncolítico del herpes (VHS-1 mutante N212) y el virus de Sindbis tras el tratamiento en células 786-0 (Fig. 1, E y F). Además, los presentes inventores también probaron el efecto del DMF sobre adenovirus, que además de en la viroterapia oncolítica también se han usado ampliamente como vectores de genoterapia [32]. El pretratamiento de células A549 de adenocarcinoma de pulmón humano con DMF aumentó la expresión transgénica en luciferasa de adenovirus no replicantes, Ad5 delecionado en E1A durante el transcurso de 7 días en hasta 20 veces (Fig. 1G). Las curvas de crecimiento simples y multietapa realizadas en células 786-0 revelaron que DMF mejoró la salida vírica de VSV Δ 51 cuando se usa una baja MOI, pero no cuando se usa una alta MOI (Fig. 1H), que indica que DMF inhibe los mecanismos que inciden sobre la propagación vírica en vez de la salida de virus salida por célula infectada. Para explotar aún más el efecto de DMF sobre la propagación de virus, se infectaron monocapas de células 786-0 con VSV Δ 51 y se superpusieron con agarosa para generar placas definidas de focos de replicación de virus. El DMF aumentó sustancialmente el diámetro de placas promedio de VSV Δ 51 en las imágenes fluorescentes y la tinción con azul de Coomassie de monocapas de células infectadas (Fig. 1I). Para evaluar aún más el efecto oncolítico de VSV Δ 51 en presencia de DMF, los presentes inventores pretrataron células cancerosas con DMF antes de la infección con una baja MOI de VSV Δ 51, y se evaluó la viabilidad celular con el colorante metabólico alamarBlue[®], 48 horas después de la infección. El tratamiento combinado con DMF y VSV Δ 51 condujo a lo que parece ser una disminución sinérgica en la viabilidad celular en células 786-0 humanas, así como en CT26WT y B16F10 murinas (Fig. 1J).

Ejemplo 2 El dimetilfumarato mejora la infección específica de tumor ex vivo y en muestras clínicas humanas.

Los presentes inventores evaluaron adicionalmente la capacidad de DMF para potenciar la infección por VSVΔ51 ex vivo en tejidos derivados de ratón. Se recogieron cilindros tumorales de ratones implantados por vía subcutánea con células de cáncer de colon murinas CT26WT o células cancerosas de melanoma murino B16F10, así como cilindros de pulmón, músculo y bazo normal y posteriormente se infectaron con VSVΔ51-GFP en presencia o ausencia de DMF 150 μM. El DMF aumentó fuertemente el crecimiento del virus en cilindros de tumor CT26WT y B16F10 en 31 veces y 13 veces, respectivamente, pero no aumentó el crecimiento del virus en cilindros de tejido normal (Fig. 2, A y B). Además, el DMF aumentó la infección por VSVΔ51 en > 10 veces ex vivo en muestras tumorales de melanoma humano primario, pulmón, próstata y ovario como se observó por el ensayo en placa y la microscopía (Fig. 2, C y D), así como en diversas estirpes celulares de melanoma y de cáncer de ovario derivadas de paciente (Fig. 2E). Similar a los cilindros de tejido normal murino, el DMF no mejoró el crecimiento del virus en pulmón normal humano y tejidos musculares de diversos pacientes (Fig. 2F).

Ejemplo 3

Además del DMF, se ha descubierto que diversos ésteres del ácido fumárico y maleico (FMAE) presentaban propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras [33]. Por lo tanto, los presentes inventores probaron si otros FAE, y sus isoformas cis y trans (ésteres del ácido maleico) (Fig. 3, A y B), tenían un impacto similar al DMF sobre la infección vírica de células cancerosas. De hecho, los FAE permeables a las células, tales como el dietilfumarato (DEF), y los ésteres del ácido maleico dimetilmaleato (DMM) y dietilmaleato (DEM), mejoraron fuertemente la infección, la propagación y la oncólisis de VSVΔ51 en células 786-0 y CT26WT *in vitro* (Fig. 3C, E, F). También se observó infección mejorada con FMAE en cilindros de tumor CT26WT infectados ex vivo (Fig. 3D). El DMF es rápidamente hidrolizado en monometilfumarato (MMF) por estererasas *in vivo*, y posteriormente en ácido fumárico (FA) (como se presenta en la Fig. 3B) [34]. De hecho, se cree que el MMF es el metabolito activo del DMF en el tratamiento de la esclerosis múltiple [34]. En células 786-0, el MMF también mejoró sustancialmente la infección de VSVΔ51 a un grado similar al DMF, aunque a dosis eficaces más altas. El ácido fumárico (FA), a diferencia con los ésteres permeables a las células MMF y DMF, no tuvo impacto sobre el crecimiento vírico (Fig. 3C, E). Tomados conjuntamente, los datos de los presentes inventores indican que el DMF y otros FMAE permeables a las células pueden mejorar espectacularmente la propagación de VO en tanto estirpes celulares de ratón y humanas como en explantes de tejido canceroso.

Ejemplo 4 El dimetilfumarato mejora la eficacia terapéutica de rabdovirus oncolíticos en modelos preclínicos de ratón.

Puesto que el DMF es un fármaco clínicamente autorizado y puesto que mejoró amplia y fuertemente el crecimiento y la actividad de VSVΔ51 *in vitro* en explantes de tumor tanto humano como de ratón en los estudios descritos en el presente documento, y lo hizo así preferentemente en tumores frente a tejidos normales, los presentes inventores evaluaron a continuación el potencial beneficio terapéutico de combinar DMF con VSVΔ51 oncolítico *in vivo*. Para este fin, los presentes inventores usaron tanto modelos de tumor de ratón singénico como de xenoinjerto, en los que los presentes inventores han mostrado previamente que VSVΔ51 es ineficaz como monoterapia [35-38]. Se cultivaron células CT26WT, B16F10 de ratón y HT29 de cáncer de colon humano por vía subcutánea en ratones Balb/c, C57BL/6 o atímicos, respectivamente. A los ratones se les inyectó por vía intratumoral DMF durante 4 horas, y posteriormente se les infectó VSVΔ51 que expresa luciferasa. Con la excepción del modelo de B16F10, el DMF mejoró la expresión génica de luciferasa asociada al virus específicamente en tumores 24 horas después de la primera inyección de virus, como se evaluó usando un sistema de obtención de imágenes *in vivo* (IVIS) (Fig. 4A, B). Sin embargo, en los tres modelos, la terapia de combinación condujo a un retraso considerable en la progresión tumoral (Fig. 4C), así como prolongó significativamente la supervivencia en comparación con cualquier monoterapia (Fig. 4D). La terapia de combinación condujo a remisión completa en aproximadamente el 20 % de los ratones en tanto los modelos CT26WT como B16F10. Los ratones portadores de CT26WT curados que habían recibido la pauta de combinación se volvieron posteriormente inmunes a la reexposición a las mismas células cancerosas (Fig. 4E). Sin embargo, cuando los ratones portadores de CT26WT curados se expusieron a un tumor extraño (cáncer de mama 4T1 murino), los ratones CT26WT curados desarrollaron tumores 4T1 a una tasa similar a los ratones intactos (Fig. 3F). Todo ello indica la generación eficaz de una inmunidad antitumoral específica y de larga duración.

Ejemplo 5 Ésteres del ácido fumárico y maleico inhiben la respuesta antivírica

Para obtener una visión adicional del posible mecanismo que media en la mejora de VO por DMF y otros FMAE, se realizó el análisis de expresión génica de micromatrices en células 786-0 24 horas después de la infección con VSVΔ51 en presencia o ausencia de DMF, DEM, DEF, DMM. Tras la infección con VSVΔ51, se regularon por incremento múltiples genes antivíricos como era de esperar; sin embargo, el DMF condujo a la inhibición de muchos de estos (*ifit1*, *mx2*, *gbp4*, *ifi27*, *ifna*, *cxcl10*), y reguló por incremento diversos genes, que incluyen varios genes de respuesta redox (*cyp4f11*, *cdk5rap2*, *anxa10*, *hmox1*, *osgin1*, *txnrd1*, *akr1b10*, *akr1b15*, *akr1c1*, *akr1c2*) (Fig. 5A, D). El análisis GOterm reveló que el tratamiento con FMAE de células 786-0 infectadas condujo

a la inhibición de la respuesta al virus, así como a la señalización de IFN de tipo I (Fig. 5B, C y D). De acuerdo con la represión de la respuesta de IFN de tipo I, el DMF disminuyó la activación (fosforilación) de tanto STAT1 como STAT2, 24 horas después de la infección (Fig. 5E). Además, los niveles de expresión de la proteína antivírica IFITM1 se reprimieron potentemente por DMF, mientras que aumentaron las proteínas víricas del VSV (Fig. 5E). Además, el DMF mejoró la infección de VSVΔ51, sin embargo, no tuvo impacto sobre la infección de células 786-0 por VSV natural (wtVSV) (Fig. 5F). A diferencia de VSVΔ51, se sabe que wtVSV inhibe fuertemente la producción de IFN de tipo I, y por lo tanto cabe esperar que el efecto de DMF sea redundante en el contexto de wtVSV si una respuesta de IFN de tipo I está de hecho implicada en provocar los efectos províricos de DMF. Para obtener una visión mecanicista del efecto de FMAE sobre la respuesta antivírica, los presentes inventores examinaron su capacidad para proteger de la exposición al virus y la señalización antivírica mediada por IFN. Tras el tratamiento con FMAE (o simulación), los presentes inventores infectaron células con una versión deficiente en la propagación de VSVΔ51 que no codifica la proteína G vírica (glucoproteína responsable de la gemación de virus, unión a células hospedadoras y entrada de virus; VSVΔ51ΔG) para suprimir la formación de viriones *de novo* [39]. Se recogieron sobrenadantes de células 12 o 16 hpi, y usaron para pretratar células diana antes de la infección con VSVΔ51 o wtVSV. Los resultados de los presentes inventores muestran que mientras que el sobrenadante de células infectado con VSVΔ51ΔG podría proteger de la posterior infección vírica con VSVΔ51 o wtVSV, la adición de DMF o MMF fue capaz de vencer completamente este efecto supresor para tanto VSVΔ51 como wtVSV (Fig. 5G). De hecho, los presentes inventores observaron a través de ELISA una disminución en la producción de IFN β e IFN α tras la infección en presencia de FMAE (Fig. 5H, I). Además, el tratamiento de células con DMF y otros FMAE antagonizó los efectos antivíricos del pretratamiento con IFN de tipo I con respecto a la infección por VSVΔ51 (Fig. 5J). Tomados conjuntamente, estos datos sugieren que los FMAE afectan la señalización antivírica, que reprime la producción de IFN de tipo I y la señalización aguas abajo a través de la vía JAK-STAT. De acuerdo con esto, los experimentos de transferencia Western revelan que en células acondicionadas con IFN β a las dosis que mejoraron la infección por VSVΔ51, DMF y DEM inhibieron la fosforilación de STAT1, que participa en la transcripción y respuesta a IFN de tipo I tras la infección vírica (Fig. 5K).

Ejemplo 6 Ésteres del ácido fumárico y maleico promueven la infección a través de la inhibición de NF- κ B independientemente de la reducción de GSH

Los datos de los presentes inventores implican claramente un efecto de múltiples FMAE sobre la respuesta antivírica, y así los presentes inventores investigaron adicionalmente la cadena molecular de eventos que conduce a estos efectos. DMF, DEM, DEF y MMF comparten un carbono α,β -insaturado común, que es atacado por GSH en una reacción de adición de Michael y que participa en la capacidad de estos compuestos para reducir el GSH celular y activar la respuesta antioxidante [40]. Por lo tanto, los presentes inventores probaron el efecto del dimetilsuccinato (DMS) (Fig. 6A), que carece de este resto funcional. Los presentes inventores descubrieron que el DMS no tenía efecto sobre la salida vírica (Fig. 6, B y C), ni la forma hidrolizada de DMS, succinato (S). A diferencia de FA, DMS y S, todos los FMAE fueron capaces de reducir el GSH (Fig. 6D). Sin embargo, la actividad provírica de DMF fue todavía evidente tras la reducción previa de niveles celulares de GSH cultivando células durante 10 días en presencia de butionina sulfoximina (BSO), un inhibidor de la glutamato cisteína ligasa (GCL) requerida para la síntesis de GSH (Fig. 6G). En paralelo con su efecto sobre la expresión génica antivírica por micromatriz, los FMAE también indujeron una robusta expresión de múltiples genes implicados en la respuesta antioxidante (Fig. 6E). En particular, la expresión de *hmx1* como se ha determinado por PCR en tiempo real fue coherentemente regulada por incremento muy por encima de 100 veces por FMAE (Fig. 6F), pero no mediante el tratamiento con FA, DMS o S (Fig. 6F). Se ha mostrado que DMF y otros FMAE inducen la translocalización nuclear de NRF2 a través de la modificación covalente de KEAP1, que conduce a la inducción de genes antioxidantes [41]. Esto está de acuerdo con la observación de los presentes inventores de la inducción de *hmx1* y otros genes diana NRF2 por FMAE, pero no FA, DMS o S (Fig. 6 E y F). Para determinar si el efecto provírico de DMF depende de la actividad de NRF2, se realizó la inactivación del ARNip contra NRF2. Los presentes inventores descubrieron que la atenuación contra NRF2 no bloqueó la capacidad de DMF para potenciar la infección por VSVΔ51, ni para inhibir el factor antivírico *ifitm1* (Fig. 6H). Además, el DMF fue capaz de mejorar la infección en varias estirpes celulares que alojaban mutaciones KEAP1 (A549 [42], CT26WT [43]) (Fig. 1D). En conjunto, estos datos sugieren que la capacidad de FMAE para potenciar la infección requiere el carbono α,β -insaturado implicado en la reducción de GSH, pero no es probable que la reducción de GSH, ni la actividad NRF2, sea un mediador clave de este fenómeno. Dado que se mostró previamente que DMF inhibía la producción de citocinas cuando se estimuló con LPS a través de la inhibición de la entrada nuclear de NF- κ B [44-45], los presentes inventores miraron los fraccionamientos nucleares y citoplásmicos de células infectadas. Las pruebas para la subunidad p65 de NF- κ B revelaron que, tras la infección o la estimulación con TFN α , el DMF inhibe la fosforilación y translocalización de este factor de transcripción, implicado en la transcripción de IFN β particularmente pero también en la respuesta a IFN de tipo I (Fig. 6I, J).

Ejemplo 7 MMF aumenta el lentivirus producido de células 293-T

La Figura 7 muestra el tratamiento con MMF de células 293T que se transfectaron con un sistema de lentivirus incompetente en la replicación de 4 plásmidos de 3.^a generación, en donde el lentivirus resultante codifica luciferasa, produjo un aumento de 2,4 veces en el rendimiento del virus en comparación con medio o vehículo (DMSO) solo. El título de virus se determinó por expresión de luciferasa tras la transferencia de los sobrenadantes

que contienen el lentivirus a células HT1080 permisivas. Esto indica que MMF aumenta significativamente la producción de lentivirus incompetentes en la replicación producidos por cotransfección de plásmidos en células inmortalizadas.

5 **Ejemplo 8 DMF aumenta el título de virus de la gripe en células VeroSF**

La Figura 8 muestra que el tratamiento con DMF de células VeroSF, que son células Vero adaptadas para crecer en medio libre de suero, condujo a un aumento de 3,0-3,8 veces (en comparación con vehículo de DMSO y medio solo, respectivamente) del rendimiento de la gripe A H1N1 FM/1/47. En este ejemplo, se cuantificó por ELISA antígeno de nucleoproteína del virus en comparación con un control habitual y estos datos se usaron para estimar el título de virus. Estos datos indican directamente que DMF potenció la producción de antígeno de proteína del virus de la gripe, e indirectamente que el rendimiento del virus de la gripe mejoró similarmente.

15 **Materiales y métodos**

Fármacos, sustancias químicas y citocinas. A continuación, están los fármacos, sustancias químicas y citocinas, y su proveedor y disolvente respectivo usados en este estudio.

Nombre	Abreviatura	Disolvente	Proveedor
Dietilmaleato	DEM	DMSO	Sigma-Aldrich
Dietilfumarato	DEF	DMSO	Sigma-Aldrich
Dimetilmaleato	DMM	DMSO	Sigma-Aldrich
Dietilfumarato	DMF	DMSO	Sigma-Aldrich
Monometilfumarato	MMF	Agua	Sigma-Aldrich
Ácido fumárico	FA	DMSO	Sigma-Aldrich
Dimetilsuccinato	DMS	DMSO	Sigma-Aldrich
Succinato sódico dibásico hexahidratado	S	Agua	Sigma-Aldrich
IKK16	IKK16	DMSO	Cayman Chemical
TPCA1	TPCA1	DMSO	Abeam
L-Glutatión, reducido	GSH	Agua	Cayman Chemical
N-acetil-L-cisteína	NAC	Agua	Sigma-Aldrich
L-Butionina-sulfoximina	BSO	Agua	Sigma-Aldrich
D-Luciferina, sal de potasio	Luciferina	PBS	Biotium
IFN 2a alfa humano	IFN α	PBS	Sigma-Aldrich
IFN beta humano	IFN β	PBS	PBL
TNF alfa humano	TNF α	PBS	R&D Systems

20 **Estirpes celulares.** Se cultivaron estirpes celulares de cáncer de ratón B16F10 (melanoma), CT26WT (colon), 76-9 (sarcoma), células 293-T, EMT6 (mama), K7M2 (osteosarcoma); células de riñón de mono Vero (y células Vero adaptadas a medio sin suero); y células cancerosas humanas 786-0(colon), A549 (pulmón), HT29 (colon), M14 (melanoma), OVCA433 (ovario), SKOV3 (ovario), EKVX (pulmón), HT1080 (sarcoma) en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) de alta glucosa HyQ (Hyclone) o medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (Corning) complementado con 10 % de suero de ternero fetal (CanSera), penicilina/estreptomina (Gibco). Todas las estirpes celulares se incubaron a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂. Todas las células se probaron para garantizar que estaban libres de contaminación por micoplasmas.

30 **Estirpes celulares derivadas de humano.** Se obtuvieron cultivos primarios de cáncer de ovario de la ascitis de individuos con cáncer de ovario durante una paracentesis rutinaria según el protocolo número 20140075-01H del comité de ética de investigación de la Ottawa Health Science Network (OHSN-REB). Estas células se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco completo complementado con 10 % de suero bovino fetal. Estos cultivos se han caracterizado y criopreservado para su uso como modelos experimentales. Los cultivos primarios de melanoma derivaron de especímenes quirúrgicos extirpados. Las cirugías se realizaron en el Hospital de Ottawa y los especímenes se tomaron después de la recepción del consentimiento del paciente según OHSN-REB n.º 20120559-01. Los cultivos primarios se mantuvieron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640

complementado con 10 % de suero bovino fetal. Los cultivos primarios se establecieron tras la homogenización mediada por bisturí de especímenes tumorales y filtrado del homogeneizado a través de un filtro de células de nailon de 70 μm de malla (ThermoFisher Scientific). El homogeneizado se mantuvo en cultivo con medios renovados periódicamente hasta que ocurrió la proliferación celular suficiente para fines experimentales. Ambos cultivos primarios de melanoma se han caracterizado y crioconservado para su uso como modelos experimentales.

Virus y cuantificación. *Rabdo*virus. Se usó el serotipo Indiana de VSV (VSV Δ 51 o natural) en todo este estudio y se propagó en células Vero. VSV Δ 51 que expresa GFP o luciferasa de luciérnaga son derivados recombinantes de VSV Δ 51 descritos previamente [30]. Todos los virus fueron propagados en células Vero y se purificaron en un gradiente del 5-50 % de Optiprep (Sigma, St Louis, MO) y todos los títulos de virus se cuantificaron por el ensayo en placa habitual en células Vero como se ha descrito previamente [46]. El número de partículas víricas infecciosas se expresó como unidad formadora de placas (UFP) por mililitro (ml). *Adenovirus*. Se usaron la Ad5-luciferasa (serotipo 5 de adenovirus que expresa luciferasa de luciérnaga) en estos estudios. *Virus del herpes simple*. VHS-1 N212 que expresa GFP. Los títulos de virus VHS se cuantificaron por el ensayo en placa habitual en células Vero como se ha descrito previamente. *Virus de Sindbis*. El virus de Sindbis se cuantificó por el ensayo en placa habitual en células Vero. Las placas se contaron 3 días después de la infección. *Lentivirus*. El lentivirus con el sistema de gen indicador de luciferasa se cuantificó usando un lector de placas Biotek tras la adición de luciferina a sobrenadantes. *Gripe*. Se usaron el virus de la gripe A/FM/1/47, y se obtuvieron valores de absorbancia por ELISA.

Ensayo de viabilidad celular. Se evaluó la actividad metabólica de las células usando alamarBlue® (Bio-Rad) según el protocolo del fabricante. La fluorescencia se midió a 590 nm tras la excitación a 530 nm usando un Fluoroskan Ascent FL (Thermo LabSystems).

Micromatriz y análisis. Se sembraron células 786-0 a una densidad de 1×10^6 en placas de 6 pocillos y se dejó que se adhirieran durante la noche. Al día siguiente, las células se pretrataron durante 4 horas con DEM (350 μM), DEF (350 μM), DMM (300 μM), DMF (200 μM) o el vehículo. Tras el pretratamiento, las células se infectaron con VSV Δ 51 a una MOI de 0,01 o se infectaron de forma simulada. 24 horas después de la infección, se recogió ARN usando un kit RNA-easy (Qiagen). Posteriormente, se reunieron triplicados biológicos y se midió la calidad del ARN usando Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies) antes de la hibridación con Affymetrix Human PrimeView Array (The Centre for Applied Genomics, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canadá). Se procesaron los datos de micromatrices usando Transcriptome Analysis Console (TAC) 3.0 con parámetros por defecto del análisis de expresión diferencial al nivel génico. Se calculó el cambio en veces en la expresión génica para cada gen en relación con el control no tratado y no infectado. Se generaron mapas de calor de los valores de expresión normalizada usando pheatmap en el paquete R. Se generaron gráficos de volcán de valores de expresión génica usando R. Se evaluó el análisis de enriquecimiento de ontología génica usando GOrilla [47] tras la corrección de las pruebas de hipótesis múltiples (Benjamini-Hochberg). Los datos brutos y procesados de micromatrices se han depositado en la base de datos NCBI-Gene Expression Omnibus (GSE97328).

Modelo de tumor de ratón. *Modelo CT26WT.* A ratones BALB/c hembra de seis semanas obtenidos de Charles River Laboratories se les administró tumores subcutáneos inyectando 5×10^5 células CT26WT singénicas suspendidas en 100 μl de PBS. 11 días después de la implantación, los tumores se trataron por vía intratumoral (i.t.) una vez con 200 mg/kg de DMF (disuelto en DMSO) o el vehículo solo. 4 horas después, los tumores se inyectaron por vía intratumoral con 1×10^8 UFP (en 25 μl de PBS) de VSV Δ 51 que expresa luciferasa de luciérnaga. *Modelo HT29.* A ratones sin pelo BALB/c hembra de seis semanas se les administró tumores subcutáneos inyectando 5×10^6 células HT29 singénicas suspendidas en 100 μl de DMEM sin suero y 100 μl de Geltrex (Thermo Fisher). Cuando los tumores crecieron hasta aproximadamente 5 mm \times 5 mm (11 días después de la implantación), a los ratones se les trató por vía intratumoral una vez con 200 mg/kg de DMF (disuelto en DMSO) o el vehículo como se indica. Cuatro horas después, los tumores se inyectaron por vía intratumoral con 1×10^8 UFP de VSV Δ 51 que expresa luciferasa de luciérnaga. *Modelo B16F10.* A ratones C57BL/6 hembra de seis semanas obtenidos de Charles River Laboratories se les administró tumores subcutáneos inyectando 5×10^5 células B16F10 singénicas suspendidas en 100 μl de PBS. 11 días después de la implantación, los tumores se trataron por vía intratumoral (i.t.) una vez con 50 mg/kg de DMF (disuelto en DMSO) o el vehículo solo. 4 horas después, los tumores se inyectaron por vía intratumoral con 1×10^8 UFP (en 25 μl de PBS) de VSV Δ 51 que expresa luciferasa de luciérnaga. Los tamaños de los tumores se midieron cada dos días usando un compás calibrador electrónico. El volumen del tumor se calculó como $(\text{longitud}^2 \times \text{anchura})/2$. Para los estudios de supervivencia, los ratones fueron sacrificados cuando los tumores habían alcanzado 1.500 mm³. Para la obtención de imágenes *in vivo*, se usó un IVIS (Perkin Elmer) como se ha descrito previamente [36]. Las intensidades de señal bioluminiscente en cada ratón se cuantificaron usando el software Living Imagen® v2.50.1. El tamaño de muestra en todos los experimentos animales fue superior a $n \geq 5$. Los ratones se aleatorizaron a los diferentes grupos de tratamiento según el tamaño del tumor en todos los experimentos. Los ratones con tumores no palpables en el día de tratamiento inicial se excluyeron del estudio. Los investigadores no se cegaron a la asignación durante los experimentos y la evaluación de resultados. Todos los experimentos se realizaron según las pautas de los servicios veterinarios y de cuidado animal de la Universidad de Ottawa para el cuidado de animales según el protocolo OHRI-2265 y OHRI-2264.

Modelo de ratón *ex vivo*. Se implantó a ratones BALB/c con CT26WT subcutáneo. Se sacrificó a los ratones después de que los tumores hubieran alcanzado al menos 10 mm \times 10 mm de tamaño. Se extrajeron el tumor, el

pulmón, el bazo y el tejido cerebral de los ratones, se cortaron en secciones de 2 mm de espesor y se cortaron en trozos cilíndricos de 2 mm × 2 mm usando una biopsia en sacabocados. Cada cilindro de tejido se incubó en 1 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 10 % de suero bovino fetal, HEPES 30 mM y se incubó a 37 °C en una estufa de incubación humidificada con 5 % de CO₂. Los cilindros se trataron durante 4 horas con las concentraciones indicadas de compuestos químicos. Posteriormente, los cilindros se infectaron a continuación con VSVΔ51-GFP. Se tomaron imágenes de GFP para cada cilindro 24 horas después de la infección.

Muestras humanas ex vivo. Se adquirieron muestras tumorales de individuos que dan su consentimiento durante la cirugía y los especímenes se manipularon como se ha presentado previamente [48]. El comité de ética de investigación de la Ottawa Health Science Network concedió la autorización para todos los estudios que requerían muestras de tejido humano (OHSN-REB n.º 2003109-01H y OHSN-REB n.º 20120559-01). El paciente proporcionó su consentimiento informado por escrito según las pautas de la Declaración de Helsinki.

Inmunotransferencia. Se sedimentaron y lisaron células sobre hielo durante 30 minutos usando HEPES 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 10 mM, Na₄P₂O₇ 10 mM, NaF 100 mM, Na₃VO₄ 2 mM, mezcla de inhibidores de la proteasa (Roche) y 1 % de Triton X-100. Para los extractos nucleares y citoplásmicos, se usó el kit de extracción nuclear y citoplásmico NE-PER™ (ThermoFisher Scientific, Rockford IL) según el protocolo proporcionado. Tras la determinación de proteínas por el ensayo de Bradford (disolución del ensayo de proteínas Bio-Rad), 20 µg de lisados celulares clarificados se sometieron a electroforesis en geles precolados al 4-12 % de Bis-Tris NuPAGE® Novex® (ThermoFisher Scientific) usando el sistema de microcélulas XCell SureLock® (ThermoFisher Scientific) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C, Bio-Rad). Las transferencias se bloquearon con 5 % de BSA o leche y se sondaron con anticuerpos específicos para phospho-Stat1 (Tyr701, n.º 9171, Cell Signalling Technology, se usó a 1:1000) y Stat1 (n.º 9172, Cell Signalling Technology, se usó a 1:1000), Stat2 (n.º 72604, Cell Signalling Technology, se usó a 1:1000), phospho-Stat2 (n.º 88410S, Cell Signalling Technology, se usó a 1:1000), IFITM1 (n.º 60074-1-Ig, Proteintech Group, se usó a 1:1000, en 5 % de leche), VSV (una donación de Dr. Earl Brown, se usó a 1:2000), HMOX1 (n.º 70081, Cell Signalling Technology, se usó a 1:2000) o β-actina (n.º 4970, Cell Signalling Technology, se usó a 1:1000). A continuación, las transferencias se sondaron con un anti-conejo de cabra o anticuerpos conjugados con peroxidasa de ratón (Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, PA). Las bandas se visualizaron usando el sustrato de quimioluminiscencia Supersignal West Pico (ThermoFisher Scientific).

ELISA. Se pretrataron células 786-0 sembradas en placas de 12 pocillos con compuesto o vehículo durante 4 h, y posteriormente se infectaron con VSVΔ51-GFP a MOI indicada o se dejaron sin infectar. Los sobrenadantes de las células se recogieron en diferentes momentos después de la infección como se indica. Las cuantificaciones de IFN alfa y IFN beta se realizaron usando el kit de ELISA de IFN alfa humano Verikine o de IFN beta (PBL Assay Science) según las instrucciones del fabricante. Los valores de absorbancia a 450 nM se midieron en un lector de microplacas Multiskan Ascent (MXT Lab Systems).

PCR cuantitativa en tiempo real. Se trataron células 786-0 durante 6 h con el compuesto químico o el vehículo indicado. Las células se recogieron y la extracción de ARN se realizó usando el kit Qiagen RNeasy (Qiagen). Se evaluó la cantidad y pureza de ARN usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). El ARN se convirtió en ADNc con el kit de síntesis de la primera cadena de ADNc RevertAid H Minus (Thermo Scientific). Las reacciones de PCR en tiempo real se realizaron según el protocolo del fabricante con el kit de PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen) en un sistema de PCR en tiempo real 7500 Fast (Applied Biosystems). Expresión génica con respecto a GAPDH o b-actina. Se calculó la inducción en veces con respecto a las muestras no tratadas/no infectadas para cada gen. Lista de cebadores de qPCR usada:

gapdh (For -ACAGTCAGCCGCATCTTCTT (SEQ ID NO:1); Rev-GTTAAAAGCAGCCCTGGTGA) (SEQ ID NO:2)

hmox1 (For-ACTGCGTTCCTGCTCAACAT (SEQ ID NO:3); Rev-GGGCAGAATCTTGCACTTT) (SEQ ID NO:4)

nrf2 (For-CAACTACTCCAGTTGCC (SEQ ID NO:5); Rev-AGTGACTGAAACGTAGCCGA) (SEQ ID NO:6)

ifitm1 (For-CCGTGAAGTCTAGGGACAGG (SEQ ID NO:7); Rev-GGTAGACTGTACAGAGCCG) (SEQ ID NO:8)

Experimento de transferencia de sobrenadante. Se pretrataron células 786-0 sembradas en placas de 12 pocillos con FMAE o vehículo durante 4 h, y posteriormente se infectaron con VSVΔ51ΔG-GFP a una MOI de 1. Este virus puede infectar a las células y multiplicar su genoma, pero no se gema ni propaga adicionalmente debido a la falta de la proteína G vírica, previniéndose así la liberación de partículas víricas en el sobrenadante. 1 hora después de la infección se retiró el sobrenadante, para retirar el fármaco y virus residual, y se repuso con medio de crecimiento complementado con 10 % de suero bovino fetal. 12 o 16 horas después de la infección, los sobrenadantes se recogieron antes de ser transferidos a células 786-0 recién recogidas y se procesaron para un análisis adicional.

ARNip. Se transfectaron células 786-0, sembradas en placas de 12 pocillos, con ARN interferente pequeño (100 nM) contra NRF2 (ARNip ON-TARGETplus NFE2L2 n.º L-003755-00-0005, GE Dharmacon) o con un ARNip de control negativo inespecífico (GE Dharmacon). Las transfecciones se llevaron a cabo según el protocolo del fabricante (Oligofectamine, Life Technologies).

Ensayo de glutatión. Se pretrataron células 786-0 sembradas en una placa de 96 pocillos con FMAE o el vehículo durante 4 h, y los niveles de glutatión se determinaron usando el kit de ensayo de glutatión GSH-Glo™ (Promega) según las instrucciones del fabricante. El ensayo basado en luminiscencia se basa en la conversión de un derivado de luciferina en luciferina en presencia de glutatión, catalizada por glutatión S-transferasa (GST). La señal generada en una reacción acoplada con luciferasa de luciérnaga es proporcional a la cantidad de glutatión presente en la muestra. El resultado del ensayo se normaliza usando disolución patrón de GSH proporcionada con el kit. A continuación, se midió la expresión de la luciferasa en un lector de microplacas SynergyMx (BioTek).

Estadística. Se calculó la significación estadística usando la prueba de la *t* de Student con corrección de Welch, se realizó la prueba de ANOVA unifactorial o bifactorial como se indica en las leyendas de las figuras. Para todos los análisis estadísticos, las diferencias se consideraron significativas cuando un valor de *p* fue inferior o igual a 0,05. Las barras de error representan el error estándar de la media. Se usó la prueba del orden logarítmico (Mantel-Cox) para determinar diferencias significativas en los gráficos para los estudios de supervivencia. Los análisis estadísticos se realizaron usando GraphPad Prism 6.0 y Microsoft Excel.

Referencias

[1] Arulanandam, R., et al., Microtubule disruption synergizes with oncolytic virotherapy by inhibiting interferon translation and potentiating bystander killing. *Nat Commun*, 2015. 6: p. 6410.

[2] Forbes, N.E., R. Krishnan y J.S. Diallo, Pharmacological modulation of anti-tumor immunity induced by oncolytic viruses. *Front Oncol*, 2014. 4: p. 191.

[3] Liu, T.C. y D. Kirn, Gene therapy progress and prospects cancer: oncolytic viruses. *Gene Ther*, 2008. 15(12): p. 877-84.

[4] Zamarin, D., et al., Localized oncolytic virotherapy overcomes systemic tumor resistance to immune checkpoint blockade immunotherapy. *Sci Transl Med*, 2014. 6(226): p. 226ra32.

[5] Russell, S.J., K.W. Peng y J.C. Bell, Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*, 2012. 30(7): p. 658-70.

[6] Coffin, R.S., From virotherapy to oncolytic immunotherapy: where are we now? *Curr Opin Virol*, 2015. 13: p. 93-100.

[7] Lichty, B.D., et al., Going viral with cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 2014. 14(8): p. 559-67.

[8] Zhang, J., et al., Maraba MG1 virus enhances natural killer cell function via conventional dendritic cells to reduce postoperative metastatic disease. *Mol Ther*, 2014. 22(7): p. 1320-32.

[9] Workenhe, S.T. y K.L. Mossman, Oncolytic virotherapy and immunogenic cancer cell death: sharpening the sword for improved cancer treatment strategies. *Mol Ther*, 2014. 22(2): p. 251-6.

[10] Andtbacka, R.H., et al., Talimogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*, 2015. 33(25): p. 2780-8.

[11] Lawler, S.E. y E.A. Chiocca, Oncolytic Virus-Mediated Immunotherapy: A Combinatorial Approach for Cancer Treatment. *J Clin Oncol*, 2015. 33(25): p. 2812-4.

[12] Hu, J.C., et al., A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res*, 2006. 12(22): p. 6737-47.

[13] Fumaric Acid Esters in the management of psoriasis, Balak, *Psoriasis: Targets and Therapy*, 2015, 5, 9-23

[14] L. Kappos, et al., BG-12 Phase IIb Study Investigators, Efficacy and safety of oral fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a multi-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb study, *Lancet* 372, 1463-1472 (2008).

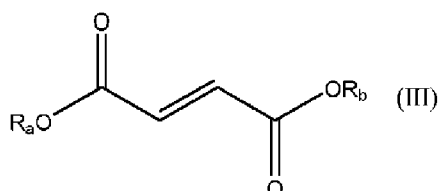
- 5
- [15] R. A. Linker, D.-H. Lee, S. Ryan, A. M. van Dam, R. Conrad, P. Bista, W. Zeng, X. Hronowsky, A. Buko, S. Chollate, G. Ellrichmann, W. Brück, K. Dawson, S. Goelz, S. Wiese, R. H. Scannevin, M. Lukashov, R. Gold, Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway, *Brain* 134, 678-692 (2011).
- [16a] R. Loewe, W. Holthöner, M. Gröger, M. Pillinger, F. Gruber, D. Mechtcheriakova, E. Hofer, K. Wolff, P. Petzelbauer, Dimethylfumarate Inhibits TNF-Induced Nuclear Entry of NF- κ B/p65 in Human Endothelial Cells, *The Journal of Immunology* 168, 4781-4787 (2002).
- 10 [17] P. Albrecht, et al., Effects of dimethyl fumarate on neuroprotection and immunomodulation, *J. Neuroinflammation* 9, 163 (2012)
- [18] J. C. U. Lehmann, J. J. Listopad, C. U. Rentzsch, F. H. Igney, A. von Bonin, H. H. Hennekes, K. Asadullah, W.-D. F. Docke, Dimethylfumarate induces immunosuppression via glutathione depletion and subsequent induction of heme oxygenase 1, *J. Invest. Dermatol.* 127, 835-845 (2007).
- 15 [19] S. X. Lin, L. Lisi, C. Dello Russo, P. E. Polak, A. Sharp, G. Weinberg, S. Kalinin, D. L. Feinstein, The anti-inflammatory effects of dimethyl fumarate in astrocytes involve glutathione and haem oxygenase-1, *ASN Neuro* 3 (2011), doi:10.1042/AN20100033.
- 20 [20] C. B. Burness, E. D. Deeks, Dimethyl fumarate: a review of its use in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis, *CNS Drugs* 28, 373-387 (2014).
- [21] J. J. Hoefnagel, H. B. Thio, R. Willemze, Long- term safety aspects of systemic therapy with fumaric acid esters in severe psoriasis, *British Journal of* (2003) (available at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2133.2003.05433.x/full>).
- 25 [22] A. Atwan, J. R. Ingram, R. Abbott, M. J. Kelson, T. Pickles, A. Bauer, V. Piguet, in *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2015).
- 30 [23] 8. X. Xie, Y. Zhao, C.-Y. Ma, X.-M. Xu, Y.-Q. Zhang, C.-G. Wang, J. Jin, X. Shen, J.-L. Gao, N. Li, Z.-J. Sun, D.-L. Dong, Dimethyl fumarate induces necroptosis in colon cancer cells through GSH depletion/ROS increase/MAPKs activation pathway, *Br. J. Pharmacol.* 172, 3929-3943 (2015).
- 35 [24] N. E. B. Saidu, G. Noé, O. Cerles, L. Cabel, N. Kavian-Tessler, S. Chouzenoux, M. Bahaud, C. Chéreau, C. Nicco, K. Leroy, B. Borghese, F. Goldwasser, F. Batteux, J. Alexandre, Dimethyl Fumarate Controls the NRF2/DJ-1 Axis in Cancer Cells: Therapeutic Applications, *Mol. Cancer Ther.* 16, 529-539 (2017).
- 40 [25] R. Loewe, T. Valero, S. Kremling, B. Pratscher, R. Kunstfeld, H. Pehamberger, P. Petzelbauer, Dimethylfumarate impairs melanoma growth and metastasis, *Cancer Res.* 66, 11888-11896 (2006).
- [26] T. Valero, S. Steele, K. Neumüller, A. Bracher, H. Niederleithner, H. Pehamberger, P. Petzelbauer, R. Loewe, Combination of dacarbazine and dimethylfumarate efficiently reduces melanoma lymph node metastasis, *J. Invest. Dermatol.* 130, 1087-1094 (2010).
- 45 [27] I. Kaluzki, I. Hrgovic, T. Hailemariam-Jahn, M. Doll, J. Kleemann, E. M. Valesky, S. Kippenberger, R. Kaufmann, N. Zoeller, M. Meissner, Dimethylfumarate inhibits melanoma cell proliferation via p21 and p53 induction and bcl-2 and cyclin B1 downregulation, *Tumour Biol.* 37, 13627-13635 (2016).
- 50 [28] I. Kastrati, M. I. Siklos, E. L. Calderon-Gierszal, L. El-Shennawy, G. Georgieva, E. N. Thayer, G. R. J. Thatcher, J. Frasar, Dimethyl Fumarate Inhibits the Nuclear Factor κ B Pathway in Breast Cancer Cells by Covalent Modification of p65 Protein, *J. Biol. Chem.* 291, 3639-3647 (2016).
- 55 [29] B. Gu, L. M. DeAngelis, Enhanced cytotoxicity of bioreductive antitumor agents with dimethyl fumarate in human glioblastoma cells, *Anticancer Drugs* 16, 167-174 (2005).
- [30] D. F. Stojdl, B. D. Lichty, B. R. tenOever, J. M. Paterson, A. T. Power, S. Knowles, R. Marius, J. Reynard, L. Poliquin, H. Atkins, E. G. Brown, R. K. Durbin, J. E. Durbin, J. Hiscott, J. C. Bell, VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents, *Cancer Cell* 4, 263-275 (2003).
- 60 [31] F. Le Boeuf, M. Selman, H. Hee Son, A. Bergeron, A. Chen, J. Tsang, D. Butterwick, R. Arulanandam, N. E. Forbes, F. Tzelepis, J. C. Bell, J. Werier, H. Abdelbary, J.-S. Diallo, Oncolytic Maraba virus MG1 as a treatment for Sarcoma, *Int. J. Cancer* (2017), doi:10.1002/ijc.30813.
- 65

- [32]** C. Sheridan, Gene therapy finds its niche, *Nat. Biotechnol.* 29, 121-128 (2011).
- [33]** D. Moharreggh-Khiabani, R. A. Linker, R. Gold, M. Stangel, Fumaric Acid and its esters: an emerging treatment for multiple sclerosis, *Curr. Neuropharmacol.* 7, 60-64 (2009).
- [34]** R. Bompreszi, Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview, *Ther. Adv. Neurol. Disord.* (2015), doi:10.1177/1756285614564152.
- [35]** C. G. Lemay, J. L. Rintoul, A. Kus, J. M. Paterson, V. Garcia, T. J. Falls, L. Ferreira, B. W. Bridle, D. P. Conrad, V. A. Tang, J.-S. Diallo, R. Arulanandam, F. Le Boeuf, K. Garson, B. C. Vanderhyden, D. F. Stojdl, B. D. Lichty, H. L. Atkins, K. A. Parato, J. C. Bell, R. C. Auer, Harnessing oncolytic virus-mediated antitumor immunity in an infected cell vaccine, *Mol. Ther.* 20, 1791-1799 (2012).
- [36]** M. H. Dornan, R. Krishnan, A. M. Macklin, M. Selman, N. El Sayes, H. H. Son, C. Davis, A. Chen, K. Keillor, P. J. Le, C. Moi, P. Ou, C. Pardin, C. R. Canez, F. Le Boeuf, J. C. Bell, J. C. Smith, J.-S. Diallo, C. N. Boddy, First-in-class small molecule potentiators of cancer virotherapy, *Sci. Rep.* 6, 26786 (2016).
- [37]** M.-C. Bourgeois-Daigneault, D. G. Roy, T. Falls, K. Twumasi-Boateng, L. E. St-Germain, M. Marguerie, V. Garcia, M. Selman, V. A. Jennings, J. Pettigrew, S. Amos, J.-S. Diallo, B. Nelson, J. C. Bell, Oncolytic vesicular stomatitis virus expressing interferon- σ has enhanced therapeutic activity, *Molecular Therapy - Oncolytics* 3, 16001 (2016).
- [38]** M. Selman, C. Rousso, A. Bergeron, H. H. Son, R. Krishnan, N. A. El-Sayes, O. Varette, A. Chen, F. Le Boeuf, F. Tzelepis, J. C. Bell, D. Crans, J.-S. Diallo, Multi-Modal Potentiation of Oncolytic Virotherapy by Vanadium Compounds, *Mol. Ther.* 0 (2017), doi: 10.1016/j.ymthe.2017.10.014.
- [39]** C. S. Robison, M. A. Whitt, The membrane-proximal stem region of vesicular stomatitis virus G protein confers efficient virus assembly, *J. Virol.* 74, 2239-2246 (2000).
- [40]** L. B. Sullivan, E. Martinez-Garcia, H. Nguyen, A. R. Mullen, E. Dufour, S. Sudarshan, J. D. Licht, R. J. Deberardinis, N. S. Chandel, The proto-oncometabolite fumarate binds glutathione to amplify ROS-dependent signaling, *Mol. Cell* 51, 236-248 (2013).
- [41]** M. S. Brennan, M. F. Matos, B. Li, X. Hronowski, B. Gao, P. Juhasz, K. J. Rhodes, R. H. Scannevin, Dimethyl Fumarate and Monoethyl Fumarate Exhibit Differential Effects on KEAP1, NRF2 Activation, and Glutathione Depletion In Vitro, *PLoS One* 10, e0120254 (2015).
- [42]** B. E. Hast, E. W. Cloer, D. Goldfarb, H. Li, P. F. Siesser, F. Yan, V. Walter, N. Zheng, D. N. Hayes, M. B. Major, Cancer-derived mutations in KEAP1 impair NRF2 degradation but not ubiquitination, *Cancer Res.* 74, 808-817 (2014).
- [43]** J. C. Castle, M. Loewer, S. Boegel, J. de Graaf, C. Bender, A. D. Tadmor, V. Boisguerin, T. Bukur, P. Sorn, C. Paret, M. Diken, S. Kreiter, Ö. Türeci, U. Sahin, Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma, *BMC Genomics* 15, 190 (2014).
- [44]** V. A. McGuire, T. Ruiz-Zorrilla Diez, C. H. Emmerich, S. Strickson, M. S. Ritorto, R. V. Sutavani, A. Weiß, K. F. Houslay, A. Knebel, P. J. Meakin, I. R. Phair, M. L. J. Ashford, M. Trost, J. S. C. Arthur, Dimethyl fumarate blocks pro-inflammatory cytokine production via inhibition of TLR induced M1 and K63 ubiquitin chain formation, *Sci. Rep.* 6, 31159 (2016).
- [45]** H. Peng, M. Guerau-de-Arellano, V. B. Mehta, Y. Yang, D. J. Huss, T. L. Papenfuss, A. E. Lovett-Racke, M. K. Racke, Dimethyl fumarate inhibits dendritic cell maturation via nuclear factor κ B (NF- κ B) and extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 (ERK1/2) and mitogen stress-activated kinase 1 (MSK1) signaling, *J. Biol. Chem.* 287, 28017-28026 (2012).
- [46]** J.-S. Diallo, M. Vähä-Koskela, F. Le Boeuf, J. Bell, Propagation, purification, and in vivo testing of oncolytic vesicular stomatitis virus strains, *Methods Mol. Biol.* 797, 127-140 (2012).
- [47]** E. Eden, R. Navon, I. Steinfeld, D. Lipson, Z. Yakhini, GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists, *BMC Bioinformatics* 10, 48 (2009).
- [48]** J.-S. Diallo, D. Roy, H. Abdelbary, N. De Silva, J. C. Bell, Ex vivo infection of live tissue with oncolytic viruses, *J. Vis. Exp.* (2011), doi:10.3791/2854.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* de mejora de la producción, la infección, el crecimiento, la propagación o el título de un virus sensible al interferón en una célula inmortalizada, una célula cancerosa o una célula tumoral, comprendiendo el método:

administrar un compuesto de la fórmula (III),



en donde R_a y R_b son cada uno independientemente hidrógeno; un alquilo lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, que se sustituye opcionalmente con uno o más halógeno, hidroxilo, nitro o ciano; o está ausente; en donde cuando uno de R_a y R_b está ausente o es hidrógeno, el otro está presente y no es hidrógeno, a la célula inmortalizada, cancerosa o tumoral antes, simultáneamente con o después de la infección de la célula inmortalizada, cancerosa o tumoral con el virus sensible al interferón.

2. El método según la reivindicación 1, en donde el virus sensible al interferón es un virus no sensible al interferón que se ha vuelto genéticamente sensible al interferón, un virus sensible al interferón atenuado, un virus oncolítico sensible al interferón o un virus sensible al interferón no replicante.

3. El método según la reivindicación 2, en donde se mejora o aumenta una actividad oncolítica, una actividad de muerte celular y/o actividad citotóxica del virus oncolítico sensible al interferón en la célula cancerosa o la célula tumoral.

4. El método según la reivindicación 2, en donde se mejora, aumenta o potencia una actividad inmunoterapéutica del virus oncolítico sensible al interferón en la célula cancerosa o la célula tumoral, que incluye regulación por incremento de transgenes y/o citocinas codificados por virus.

5. El método según la reivindicación 1, en donde el compuesto de la fórmula (III) es o comprende la estructura de: dimetilfumarato (DMF), dietilfumarato (DEF), monoetilfumarato o monometilfumarato (MMF), o una sal, solvato, hidrato, forma reducida u oxidada farmacéuticamente aceptable de los mismos.

6. El método según la reivindicación 1, en donde el virus sensible al interferón es un reovirus, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la poliomielitis, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la gripe, virus de Maraba (tal como MG-1), virus de la rabia, rotavirus, virus de la hepatitis A, virus de la rubeola, virus del dengue, virus Chikungunya, virus respiratorio sincitial, LCMV, lentivirus, retrovirus replicantes, adenovirus, virus del herpes simple o rhabdovirus, o una variante o derivado del mismo, en donde la variante o derivado es un virus obtenido seleccionando el virus en diferentes condiciones de crecimiento, un virus que se ha sometido a un intervalo de presiones de selección, un virus que se ha modificado genéticamente usando técnicas recombinantes, o un virus que se ha manipulado para ser defectuoso en la replicación y/o expresar transgenes, o cualquier combinación de los mismos.

7. El método según la reivindicación 2, en donde el virus oncolítico sensible al interferón comprende un rhabdovirus que es el virus de la estomatitis vesicular o un derivado o variante del mismo, en donde la variante o derivado es un virus obtenido seleccionando el virus en diferentes condiciones de crecimiento, un virus que se ha sometido a un intervalo de presiones de selección, un virus que se ha modificado genéticamente usando técnicas recombinantes, o un virus que se ha manipulado para ser defectuoso en la replicación y/o expresar transgenes, o cualquier combinación de los mismos.

8. El método según la reivindicación 1, en donde el virus sensible al interferón comprende un virus seleccionado en condiciones de crecimiento específicas, se somete a una o más presiones de selección, se modifica genéticamente usando una técnica recombinante, o cualquier combinación de los mismos.

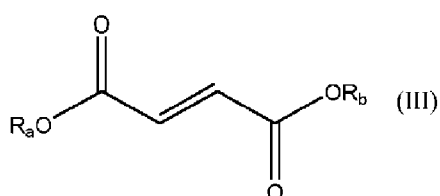
9. El método según la reivindicación 1, en donde la célula es de mamífero.

10. El método según la reivindicación 9, en donde la célula es humana.

11. El método según la reivindicación 1, en donde la célula inmortalizada, la célula cancerosa o la célula tumoral comprende células de leucemia linfoblástica, células de leucemia mielóide, carcinoma adrenocortical, células de cánceres relacionados con el sida, células de linfoma relacionado con el sida, células de cáncer anal, células de cáncer del apéndice, células de astrocitoma, células de tumor teratoide/rabdoide atípico, carcinoma de células

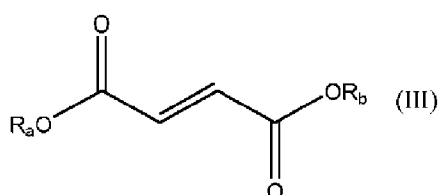
5 basales, células de carcinoma de las vías biliares, células de cáncer de vejiga, células de cáncer de huesos, células de osteosarcoma, células de histiocitoma fibroso maligno, células de glioma de tronco encefálico, células de tumor cerebral, células de astrocitoma cerebeloso, células de astrocitoma cerebral/glioma maligno, células de craneofaringioma, células de ependimoblastoma, células de meduloblastoma, células de tumores del parénquima
 10 pineal de diferenciación intermedia, células de tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales y pineoblastoma, células de glioma de la vía óptica e hipotalámico, células de tumores de médula espinal, células de cáncer de mama, células de tumores bronquiales, células de linfoma de Burkitt, células de tumor carcinoide, células de linfoma del sistema nervioso central, células de cáncer de cuello uterino, células de cordoma, células de leucemia linfocítica crónica, células de leucemia mielógena crónica, células de trastornos mieloproliferativos
 15 crónicos, células de cáncer de colon, linfoma cutáneo de linfocitos T, células de tumores embrionarios, células de cáncer endometrial, células de ependimoblastoma, células de ependimoma, células de cáncer de esófago, tumor extracraneal de células germinativas, tumor extragonadal de células germinativas, células de cáncer extrahepático de las vías biliares, células de cáncer de ojo, células de melanoma intraocular, células de retinoblastoma, células de cáncer de vesícula biliar, células de cáncer gástrico (estómago), células de tumor carcinoide gastrointestinal, células de tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células del estroma gastrointestinal, tumores de células germinativas, células de tumores extracraneales, células de tumores extragonadales, células de tumores de ovario, células de tumor trofoblástico gestacional, células de glioma, leucemia de células pilosas, células de cáncer de cabeza y cuello, células de cáncer hepatocelular (hígado), células de histiocitosis, cáncer de células de Langerhans, células de cáncer hipofaríngeo, tumores de células de los islotes, células de sarcoma de Kaposi,
 20 células de cáncer de laringe, células de leucemia linfocítica, células de cáncer de labio y de cavidad oral, células de cáncer de pulmón de células no pequeñas, células de cáncer de pulmón de células pequeñas, células de linfoma de Hodgkin, células de linfoma no hodgkiniano, células de meduloepitelioma, células de melanoma, células de melanoma intraocular, carcinoma de células de Merkel, células de mesotelioma, células de cáncer escamoso metastásico de cuello, células de cáncer de boca, células de síndrome de neoplasia endocrina múltiple, células de mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, células de cáncer de fosa nasal y de los senos paranasales, células de cáncer nasofaríngeo, células de neuroblastoma, células de cáncer de boca, células de cáncer bucofaríngeo, células de cáncer pancreático, células de cáncer de paratiroides, células de cáncer de pene, células de cáncer de faringe, células de feocromocitoma, células de tumores del parénquima pineal, células de pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, células de tumor de pituitaria, células de blastoma pleuropulmonar, células de cáncer de próstata, células de cáncer de recto, células de cáncer de células renales (riñón), células de cáncer de pelvis renal y de uréter, cáncer de células de transición, células de carcinoma de las vías respiratorias, células de retinoblastoma, células de rhabdomyosarcoma, células de cáncer de las glándulas salivales, células de sarcoma uterino, células de cáncer de piel, carcinoma de piel de células de Merkel, células de cáncer de intestino delgado, células de sarcoma de tejido blando, carcinoma de células escamosas,
 35 células de cáncer escamoso de cuello, células de tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, células de linfoma de linfocitos T, células de cáncer testicular, células de cáncer de garganta, células de timoma y carcinoma tímico, células de cáncer de tiroides, células de tumor trofoblástico, células de cáncer uretral, células de cáncer uterino, células de cáncer vaginal, células de cáncer vulvar o tumor de Wilms.

40 12. Un compuesto de la fórmula (III),



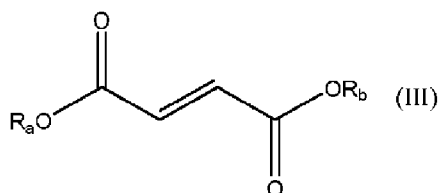
45 en donde R_a y R_b son cada uno independientemente hidrógeno; un alquilo lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, que se sustituye opcionalmente con uno o más halógeno, hidroxilo, nitro o ciano; o está ausente; en donde cuando uno de R_a y R_b está ausente o es hidrógeno, el otro está presente y no es hidrógeno, para su uso en el tratamiento de un tumor o un cáncer, en donde el compuesto es para administración a un sujeto antes, después o simultáneamente con la administración de un virus oncolítico sensible al interferón al sujeto.

50 13. Una composición que comprende un virus sensible al interferón y al menos un compuesto de la fórmula (III)



en donde R_a y R_b son cada uno independientemente hidrógeno; un alquilo lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, que se sustituye opcionalmente con uno o más halógeno, hidroxilo, nitro o ciano; o está ausente; en donde cuando uno de R_a y R_b está ausente o es hidrógeno, el otro está presente y no es hidrógeno.

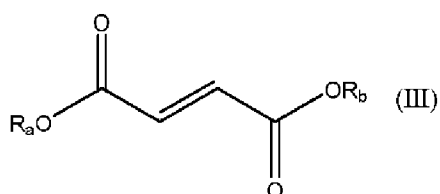
- 5 14. Un método de producción de un virus sensible al interferón que comprende:
cultivar una célula inmortalizada, una célula cancerosa o una célula tumoral con el virus sensible al interferón o con un virus sensible al interferón que codifica un transgén y/o una citocina, en un medio apropiado en presencia de al menos un compuesto de la fórmula (III)



15 en donde R_a y R_b son cada uno independientemente hidrógeno; un alquilo lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, que se sustituye opcionalmente con uno o más halógeno, hidroxilo, nitro o ciano; o está ausente; en donde cuando uno de R_a y R_b está ausente o es hidrógeno, el otro está presente y no es hidrógeno; y producir el virus sensible al interferón a partir de la célula inmortalizada, el cáncer o la célula tumoral.

15 15. El método según la reivindicación 14, en donde el virus sensible al interferón es un virus atenuado, un virus modificado genéticamente, un virus no replicante o un virus oncolítico.

- 20 16. Un método de preparación de una vacuna, que comprende:
cultivar una célula inmortalizada, una célula cancerosa o una célula tumoral con un virus sensible al interferón, o con un virus sensible al interferón que codifica un transgén y/o una citocina, en un medio apropiado en presencia de al menos un compuesto de la fórmula (III)



30 en donde R_a y R_b son cada uno independientemente hidrógeno; un alquilo lineal, ramificado o cíclico, saturado o insaturado, que se sustituye opcionalmente con uno o más halógeno, hidroxilo, nitro o ciano; o está ausente; en donde cuando uno de R_a y R_b está ausente o es hidrógeno, el otro está presente y no es hidrógeno; producir el virus sensible al interferón a partir de la célula inmortalizada, el cáncer o la célula tumoral; y preparar la vacuna con dicho virus sensible al interferón producido o con el cultivo celular con el virus sensible al interferón.

- 35 17. El método según la reivindicación 15, en donde el virus producido es un vector de genoterapia para el cáncer basado en virus sensible al interferón.

DIBUJOS

Figura 1

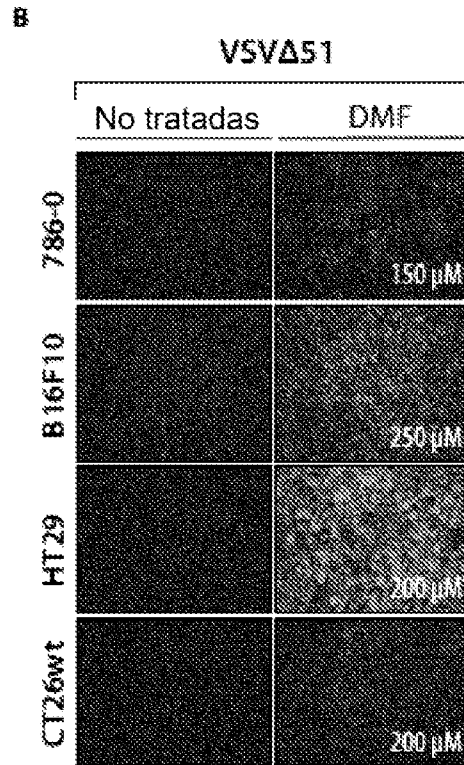
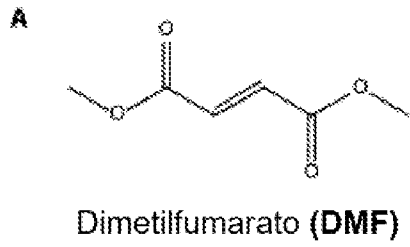
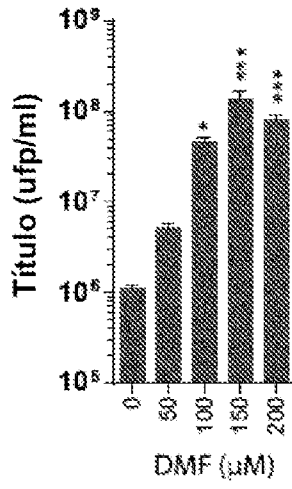


Figura 1

c



d

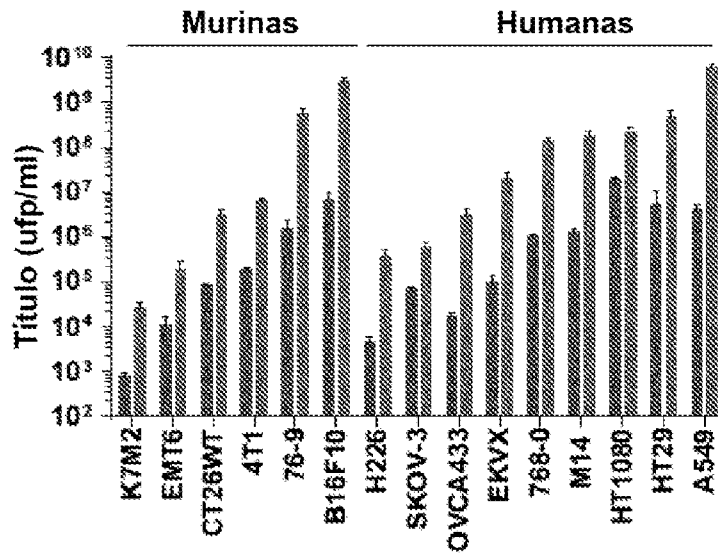


Figura 1

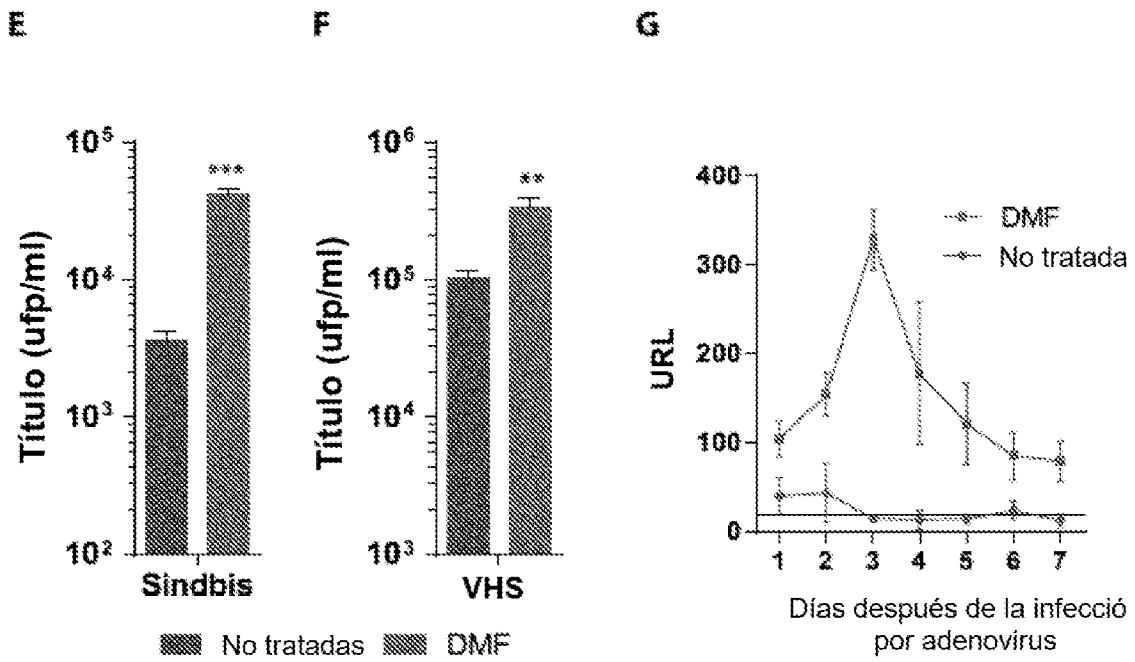


Figura 1

H

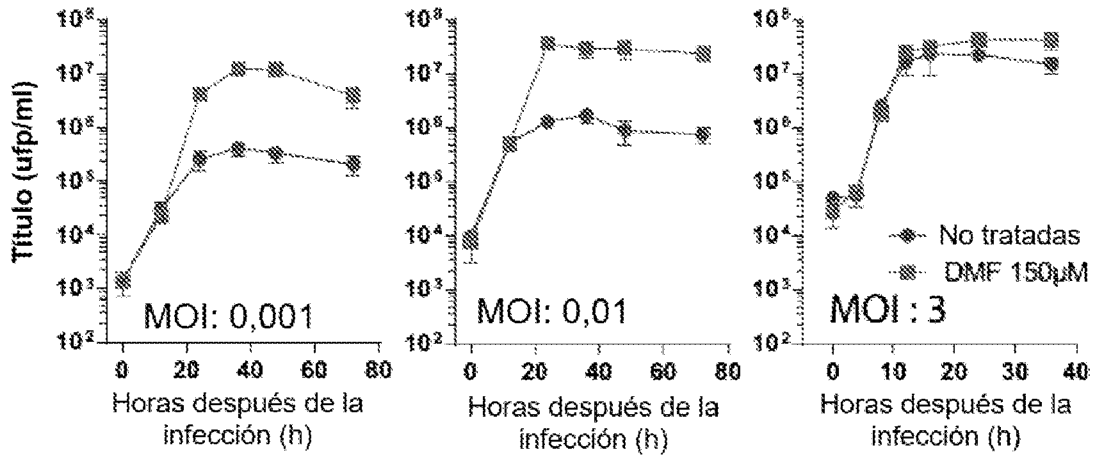


Figura 1

I

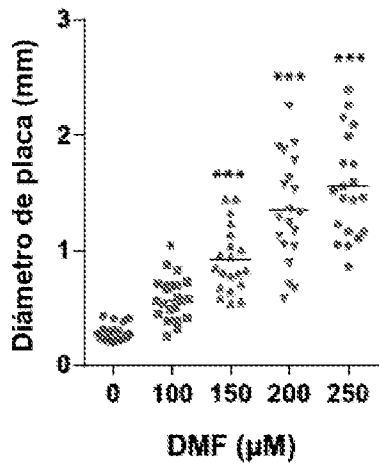
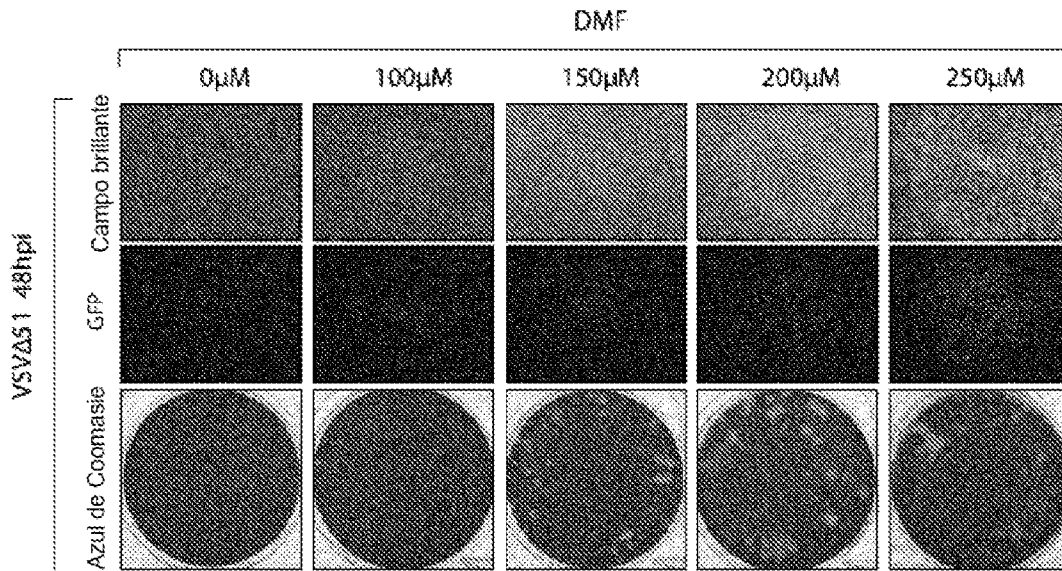
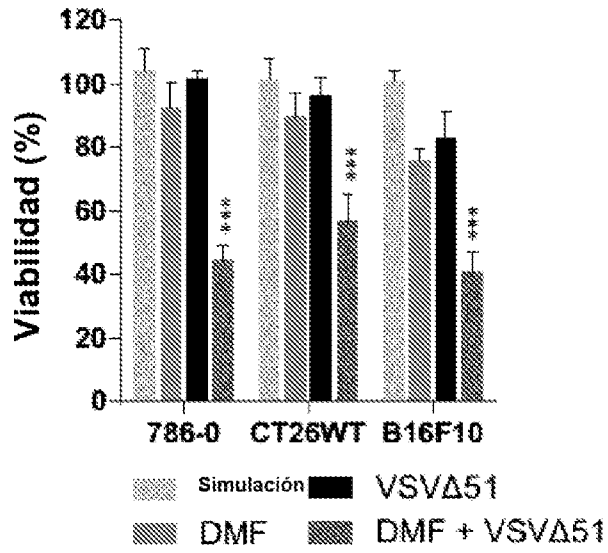


Figura 1

J



K

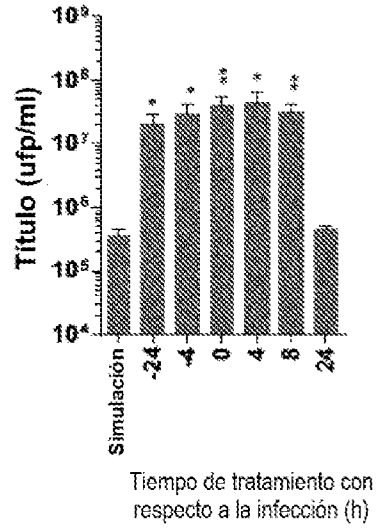


Figura 2

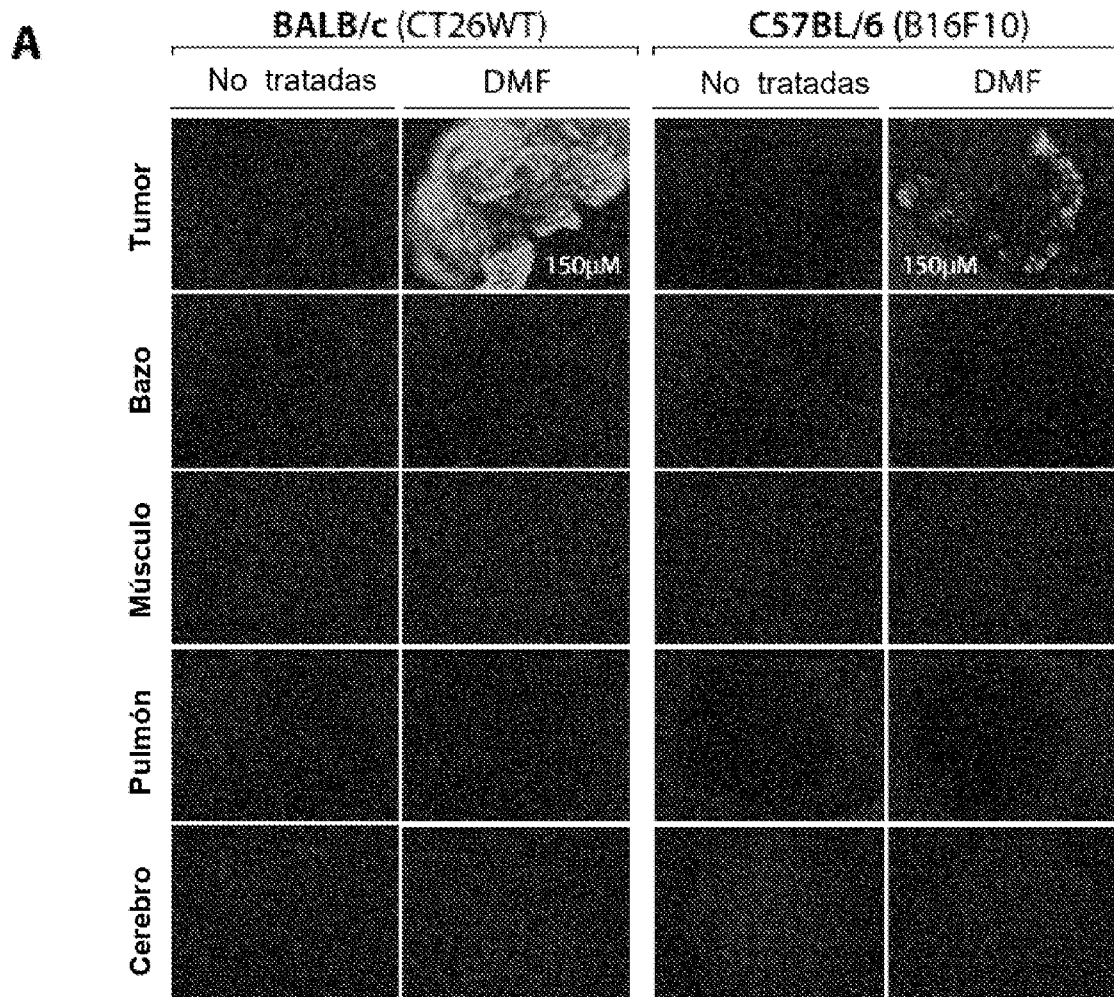


Figura 2

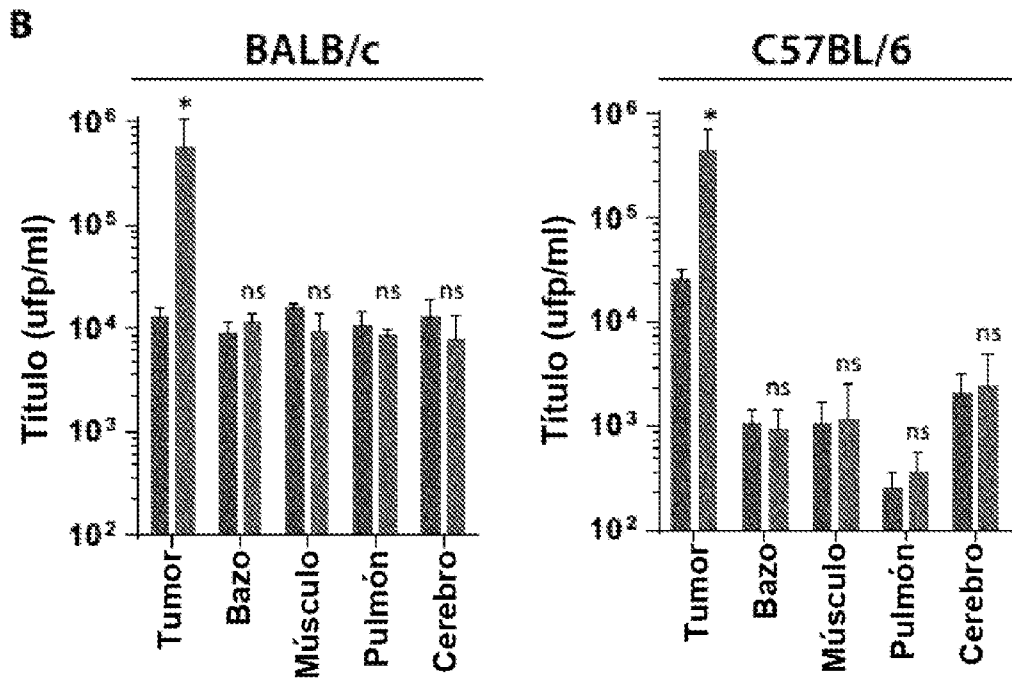


Figura 2

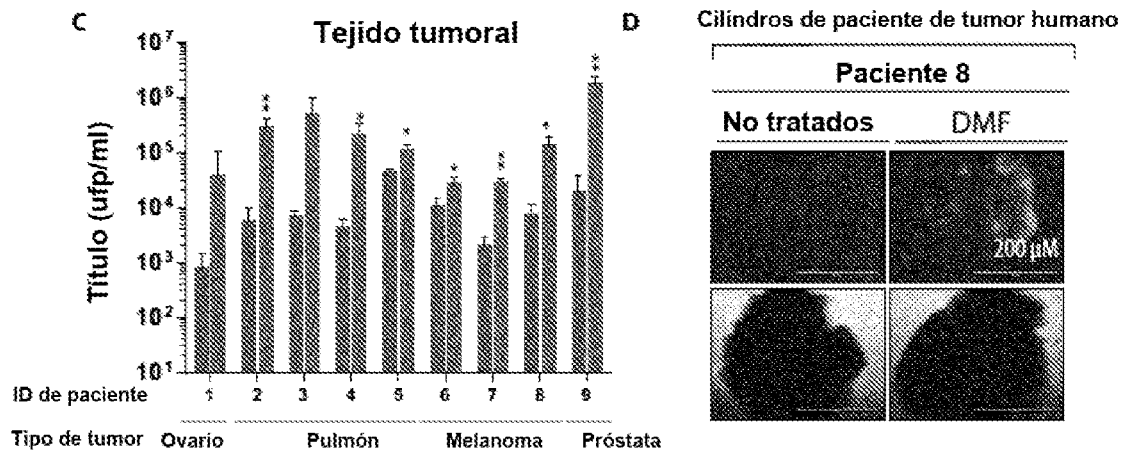


Figura 2

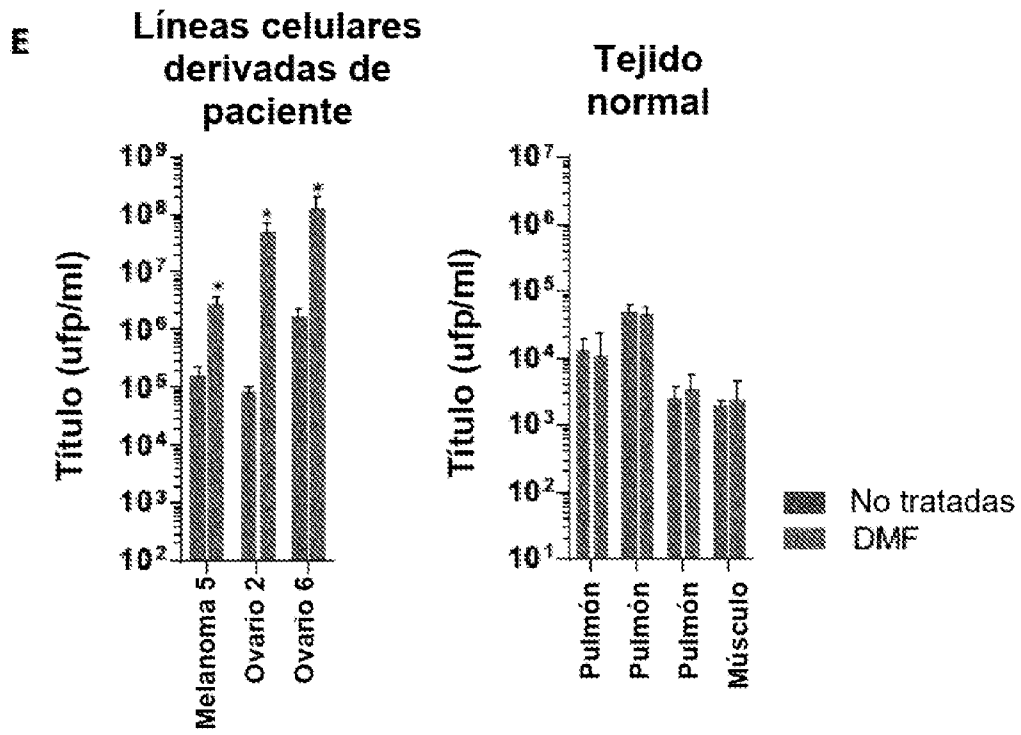
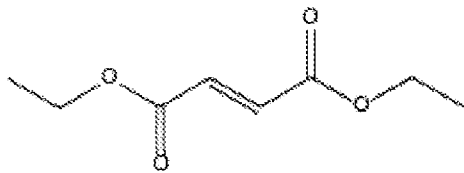
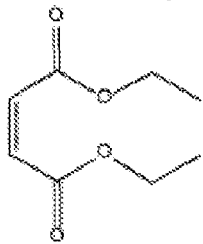


Figura 3

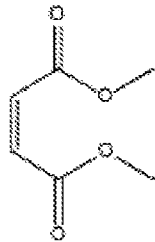
A



Diethylfumarato (DEF)

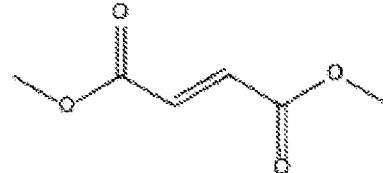


Diethylmaleato (DEM)

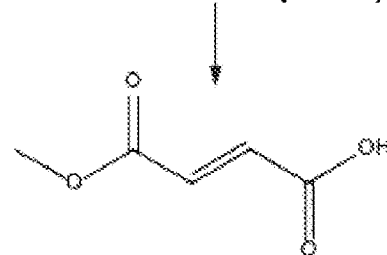


Dimethylmaleato (DMM)

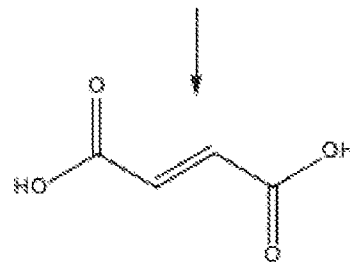
B



Dimetilfumarato (DMF)



Monometilfumarato (MMF)



Ácido fumárico (FA)

Figura 3

c

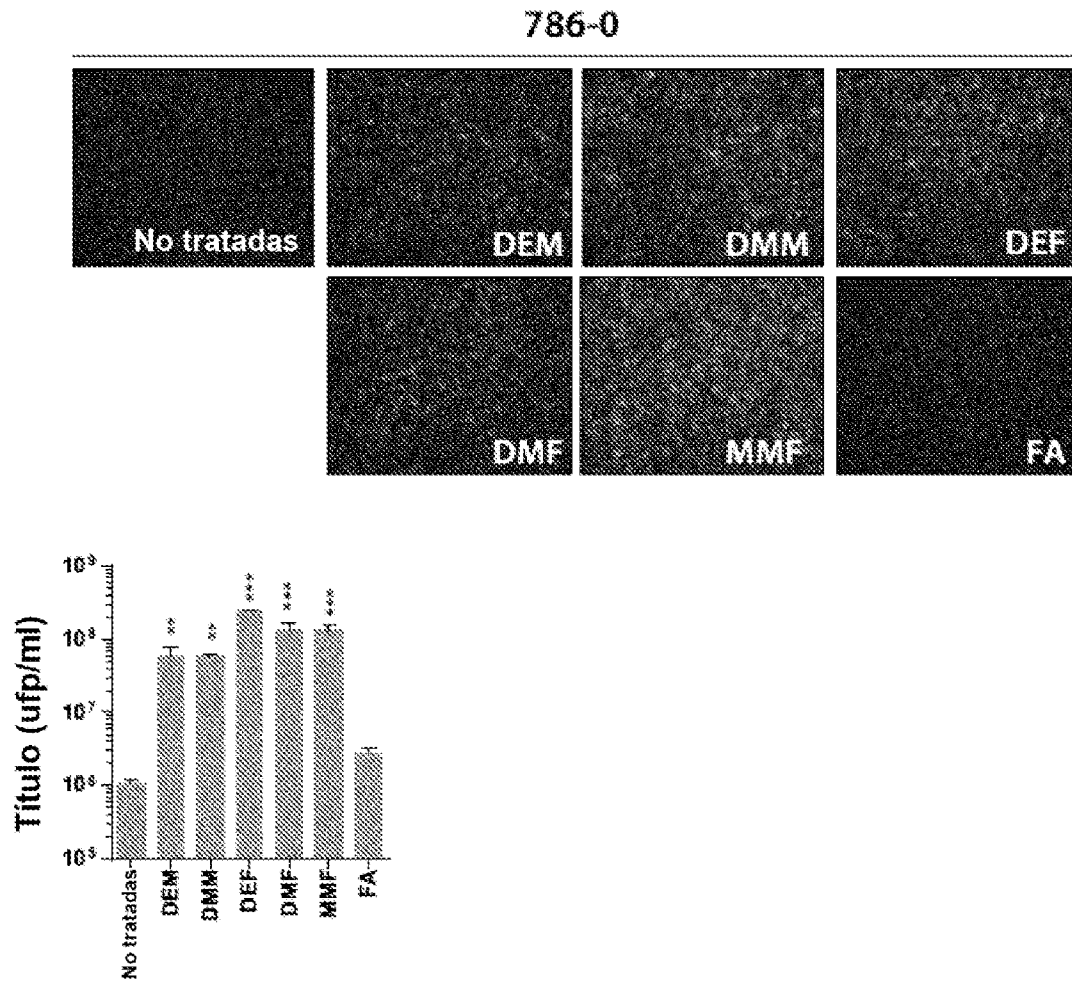


Figura 3

D

BALB/c (CT26WT)

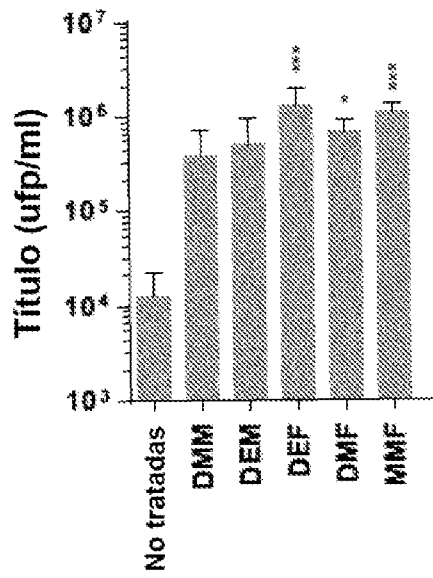
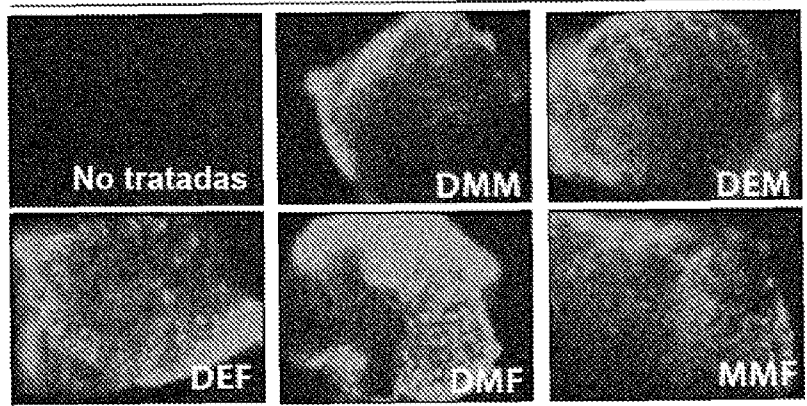


Figura 3

E

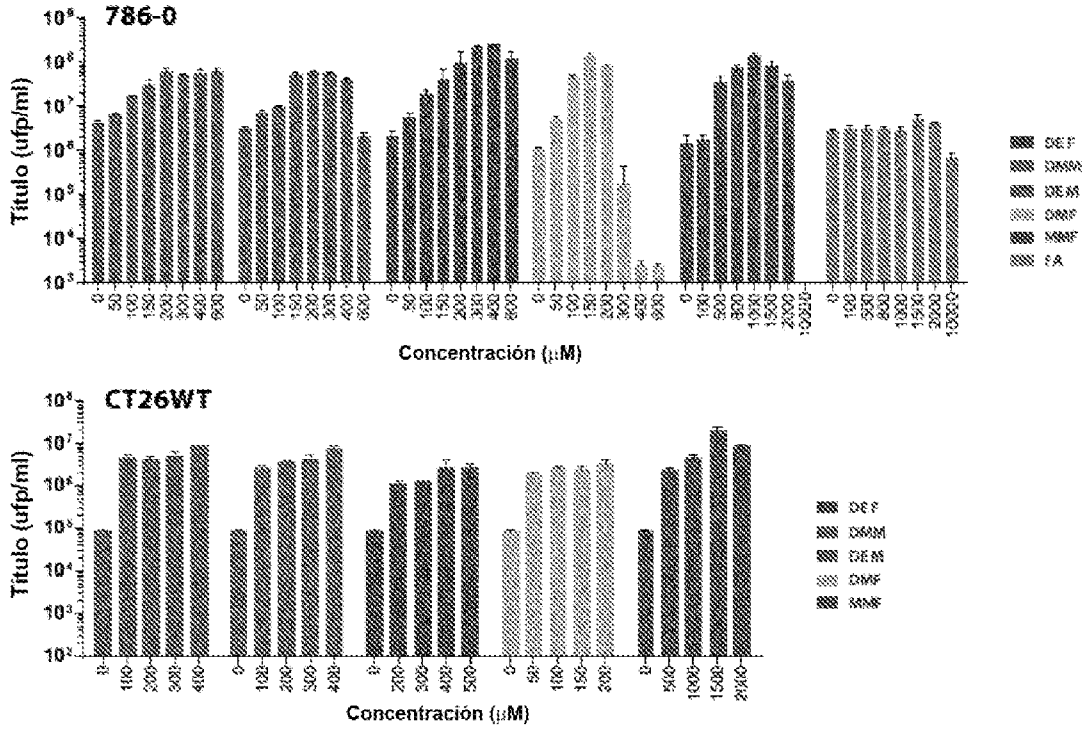


Figura 3

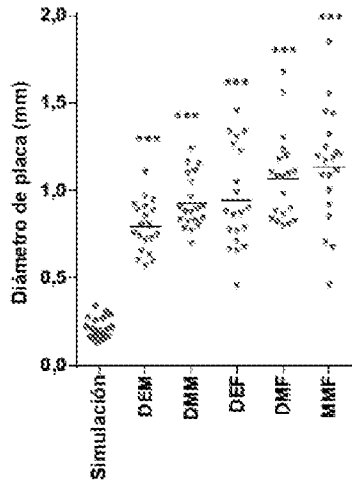
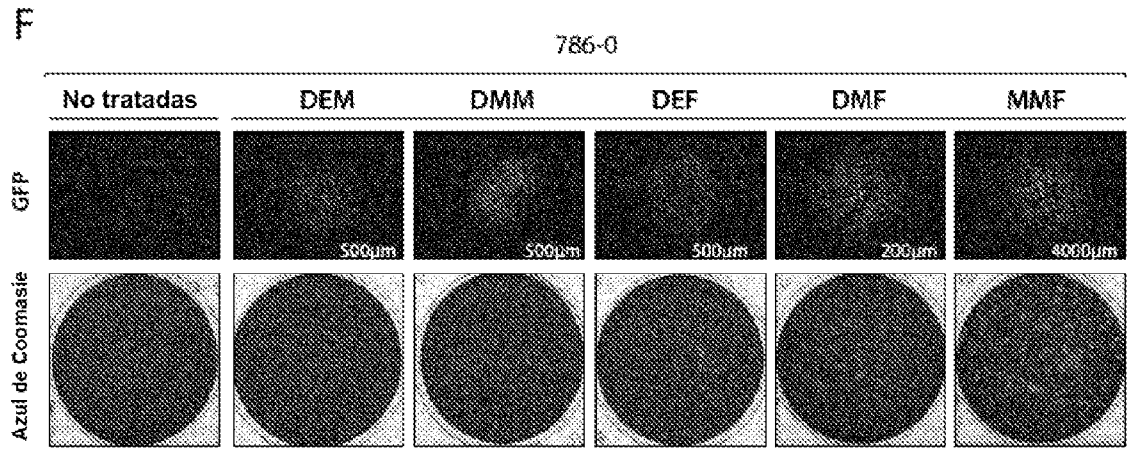


Figura 4

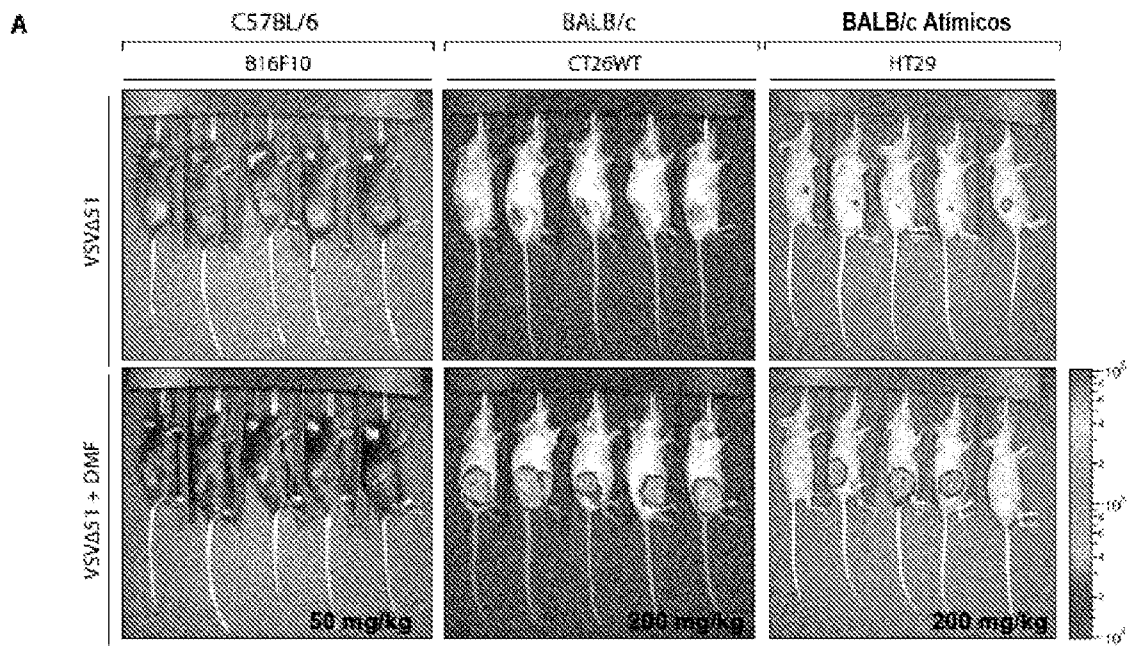


Figura 4

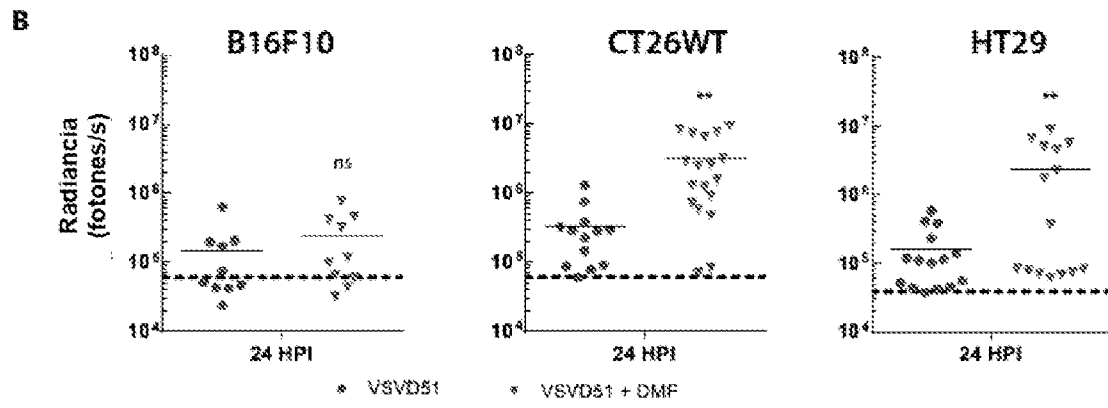


Figura 4

c

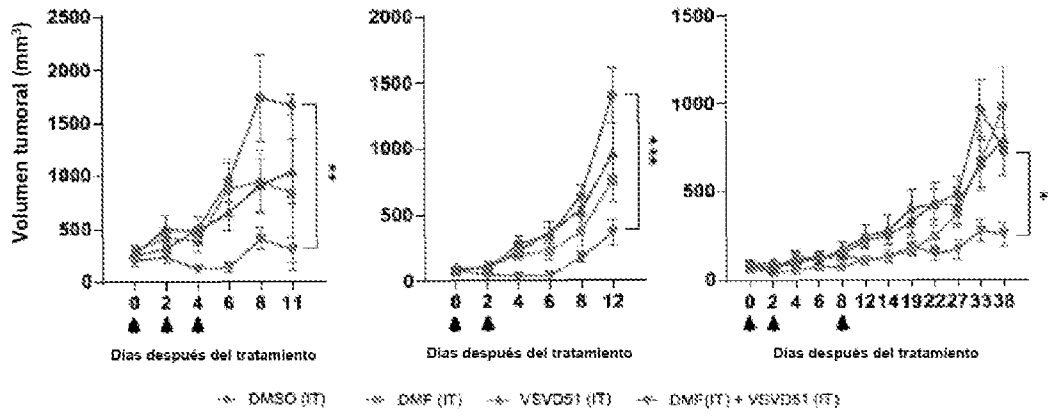


Figura 4

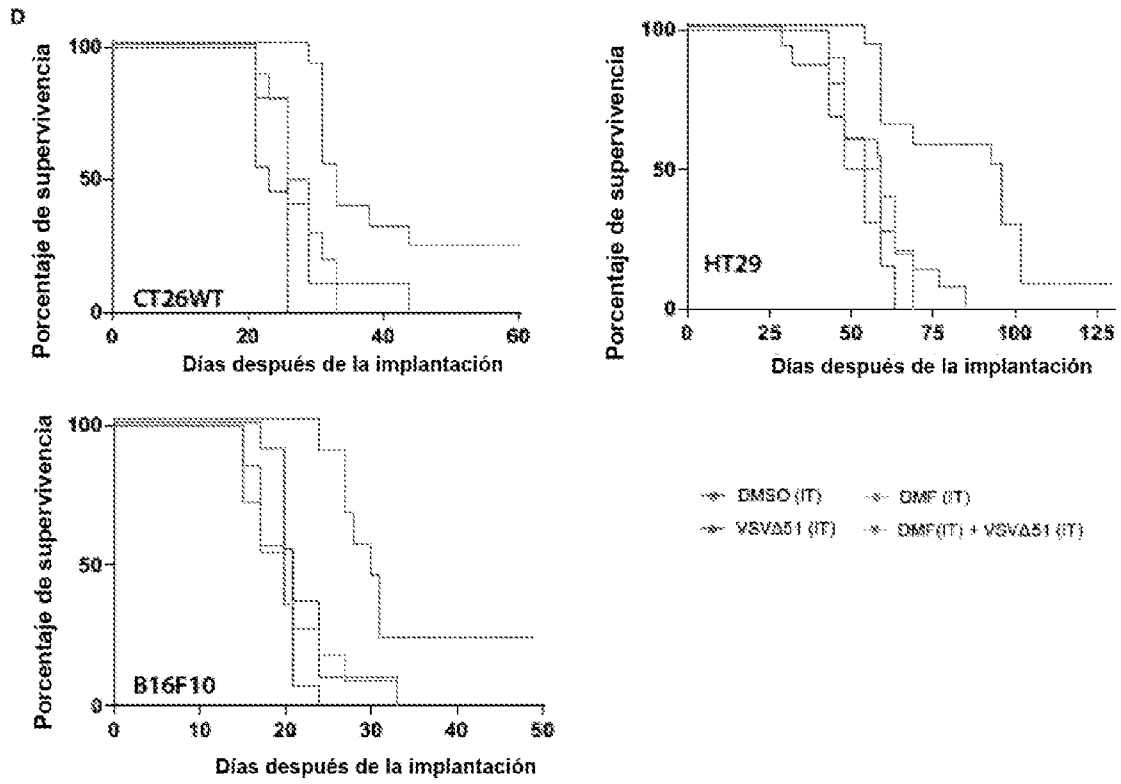


Figura 4

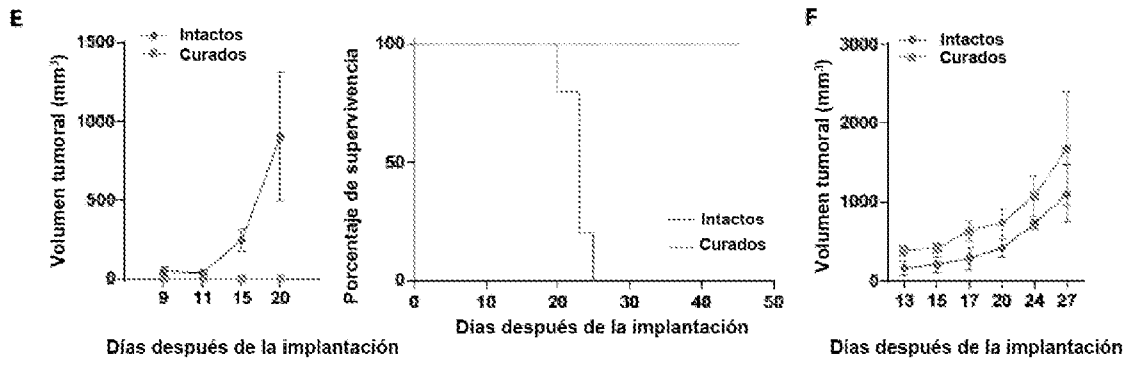


Figura 5

A

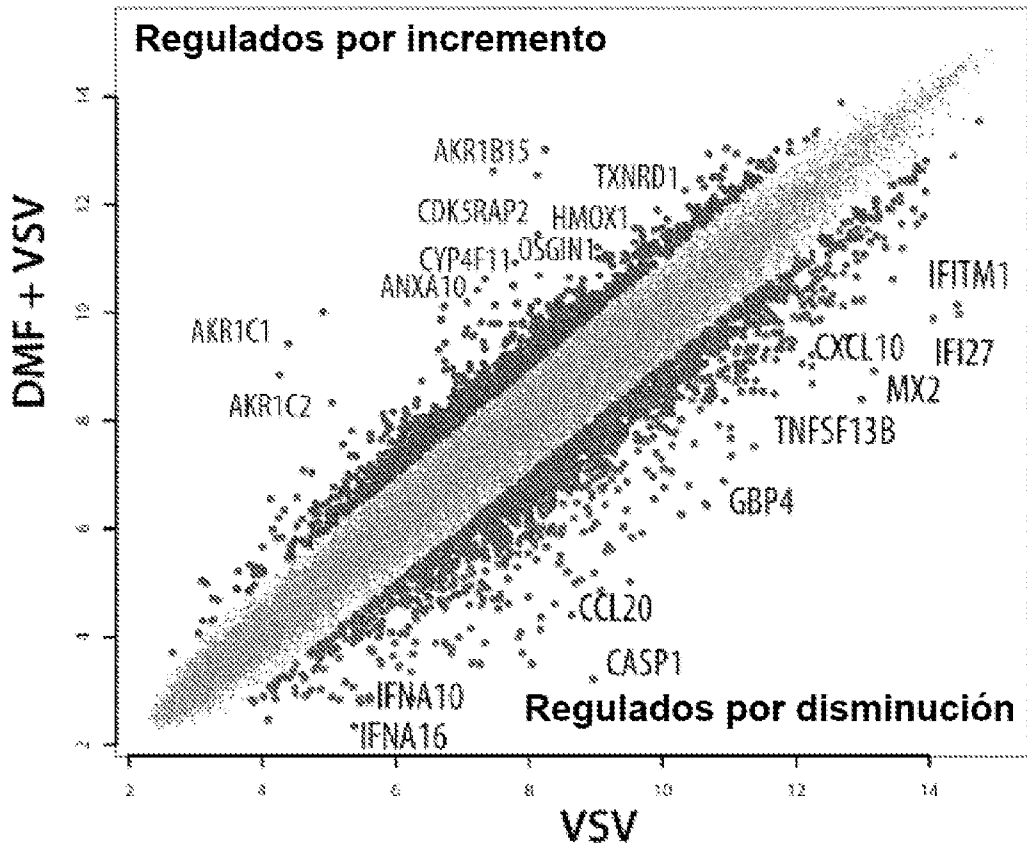


Figura 5

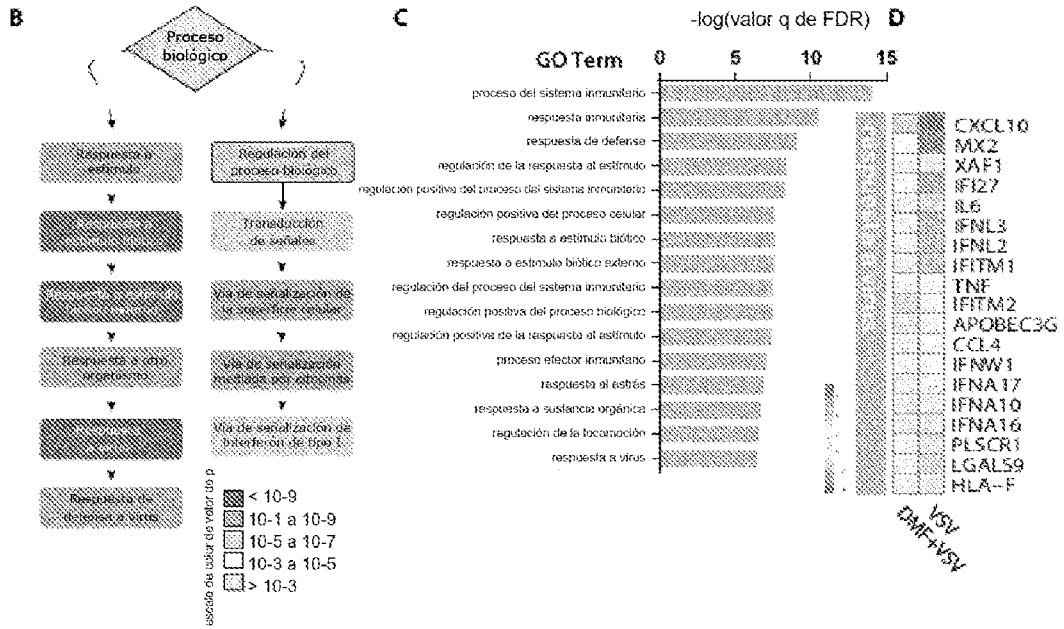
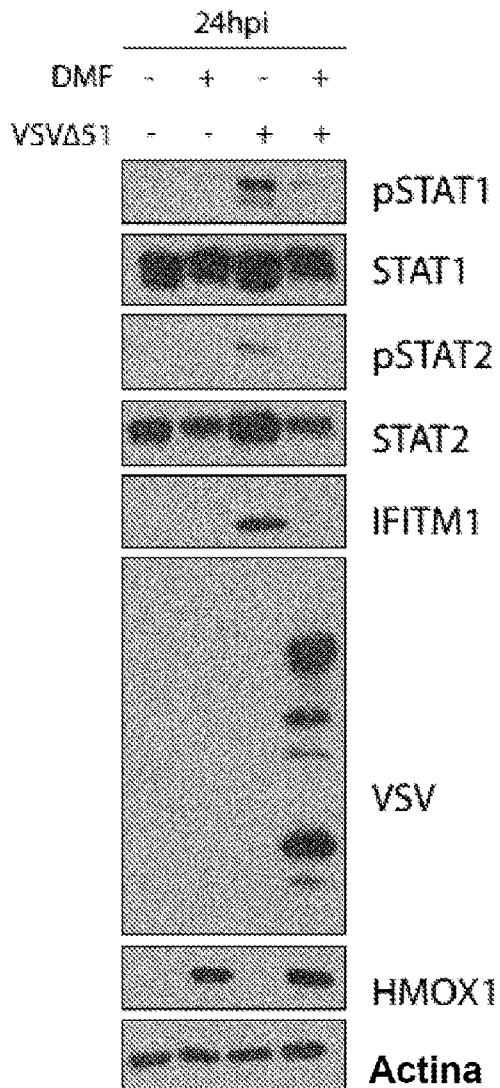


Figura 5

E



F

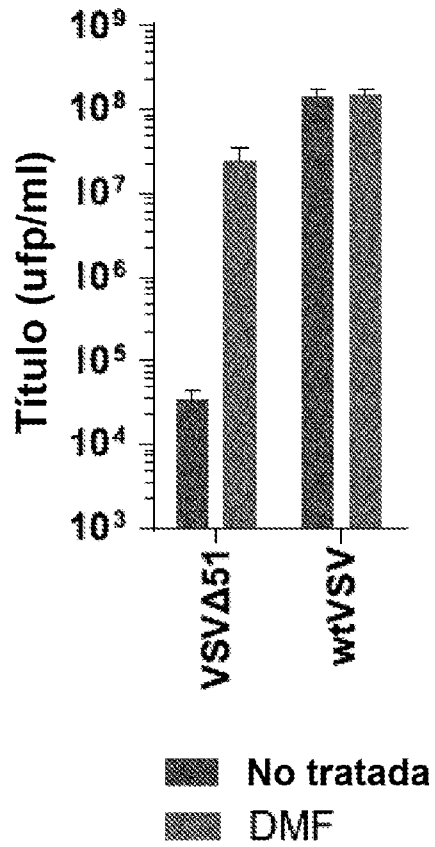


Figura 5

G

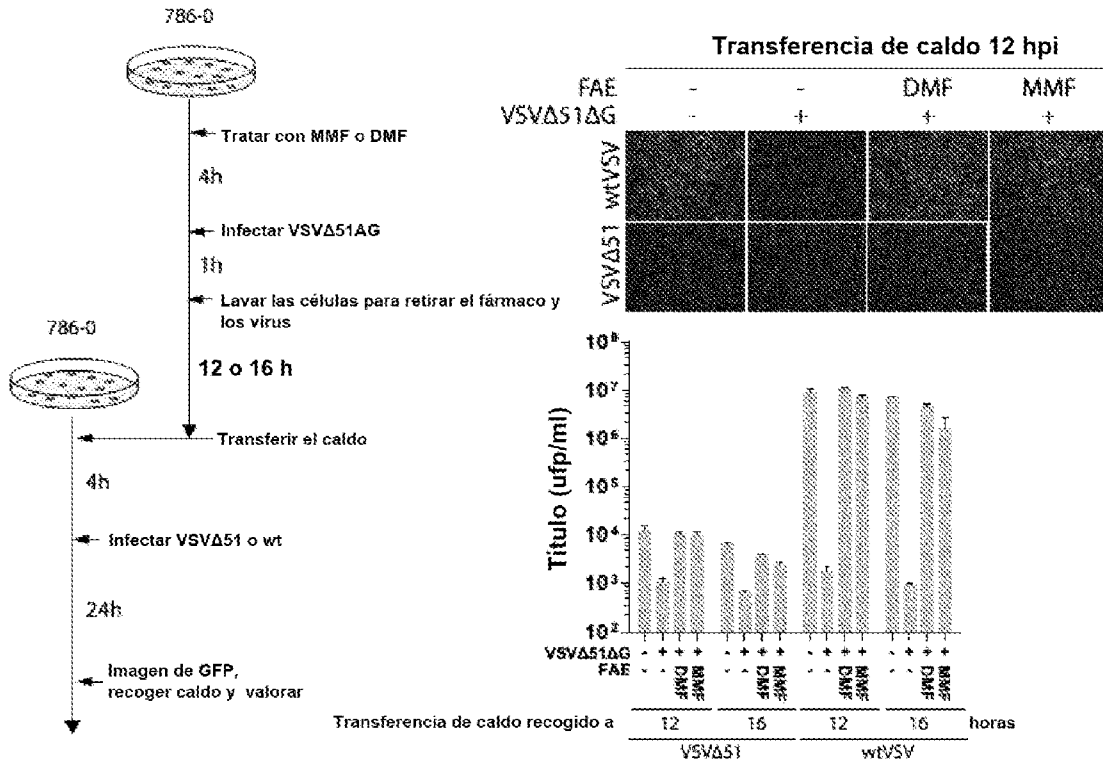


Figura 5

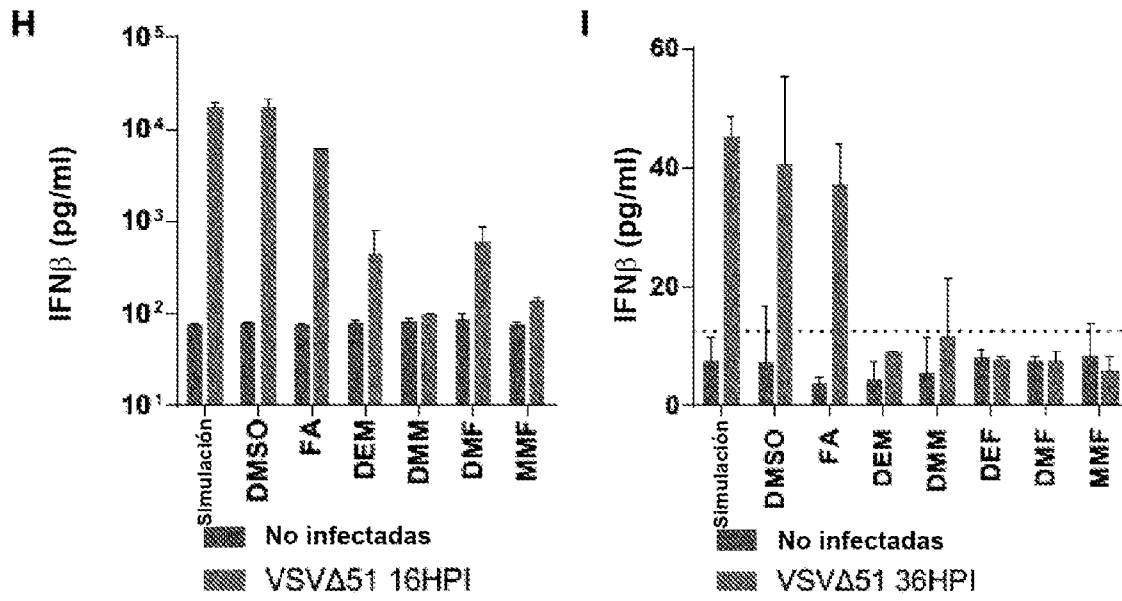


Figura 5

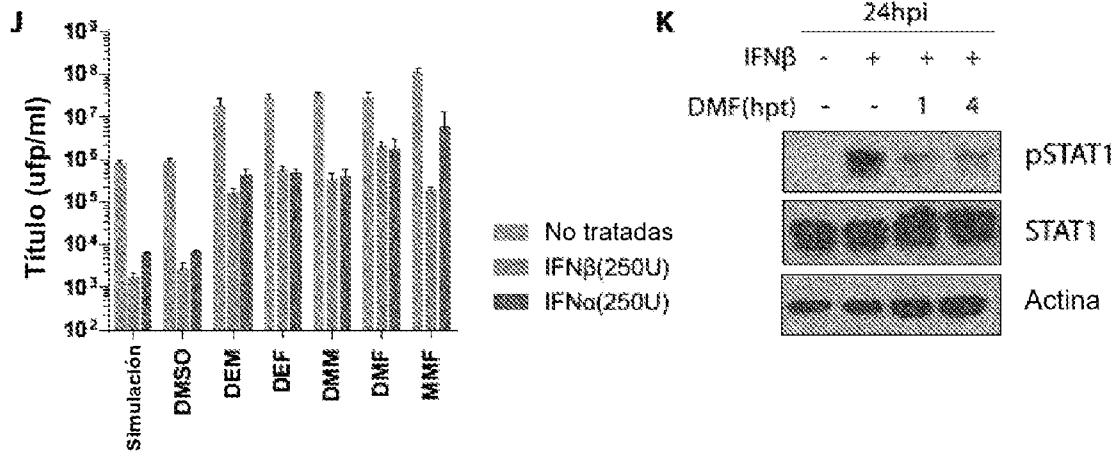


Figura 6

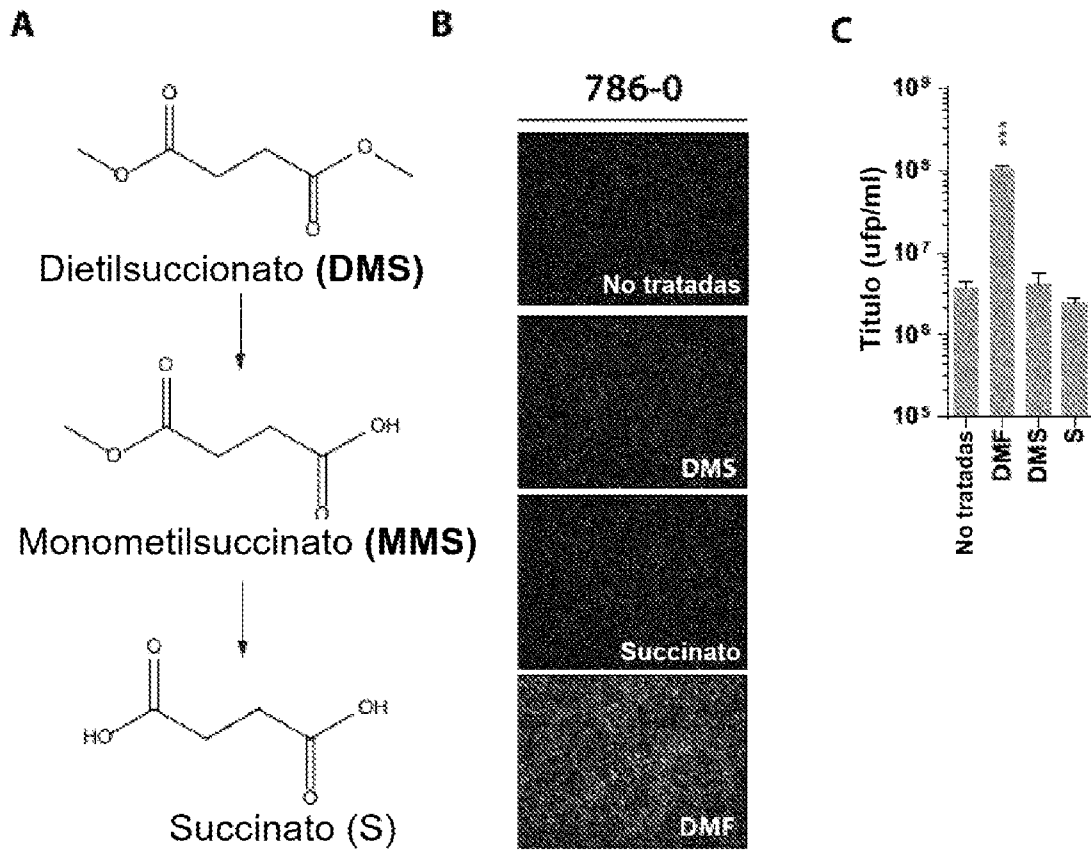


Figura 6

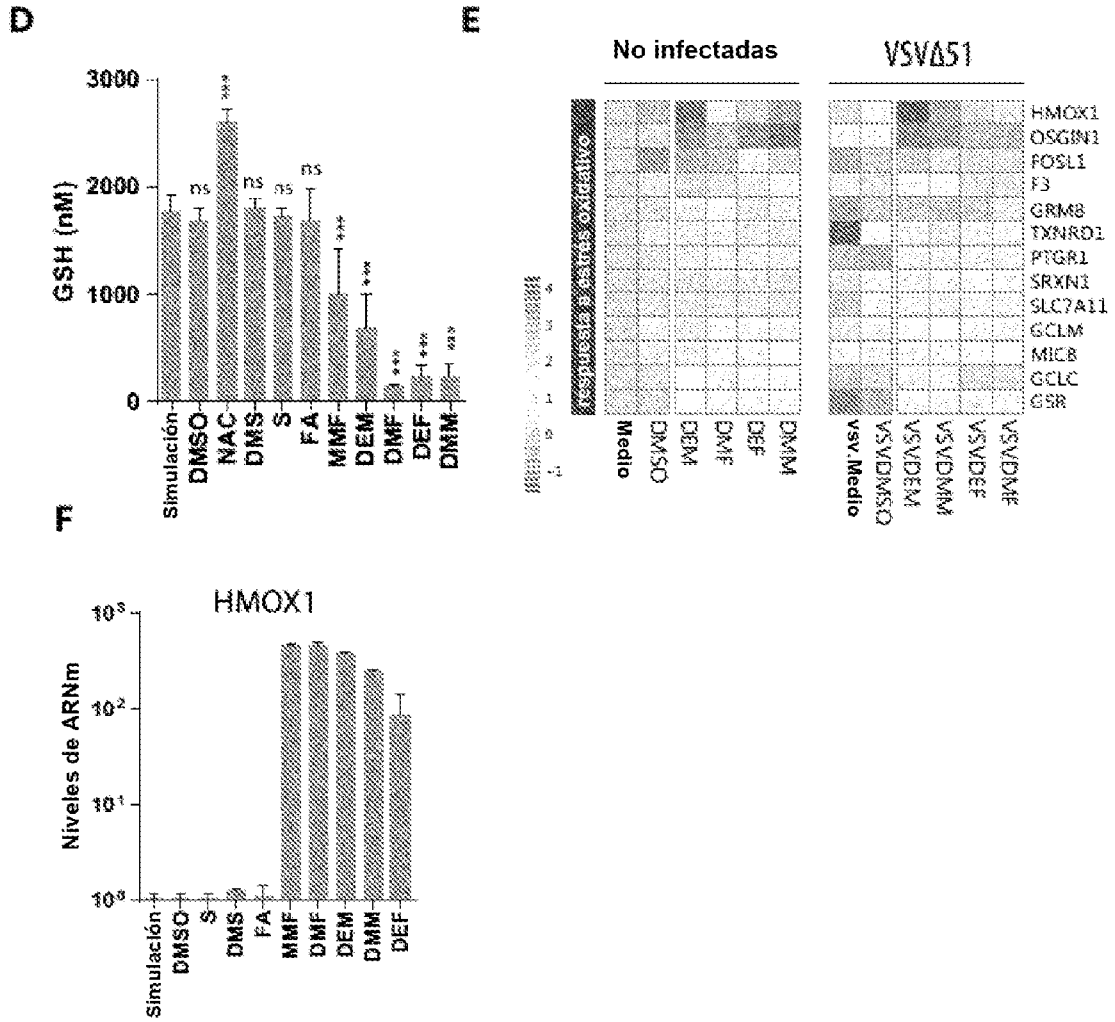


Figura 6

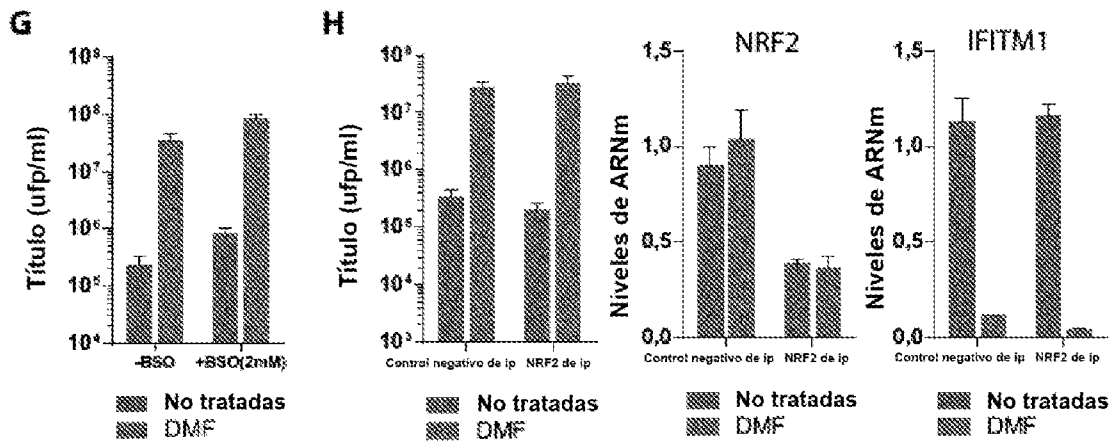


Figura 6

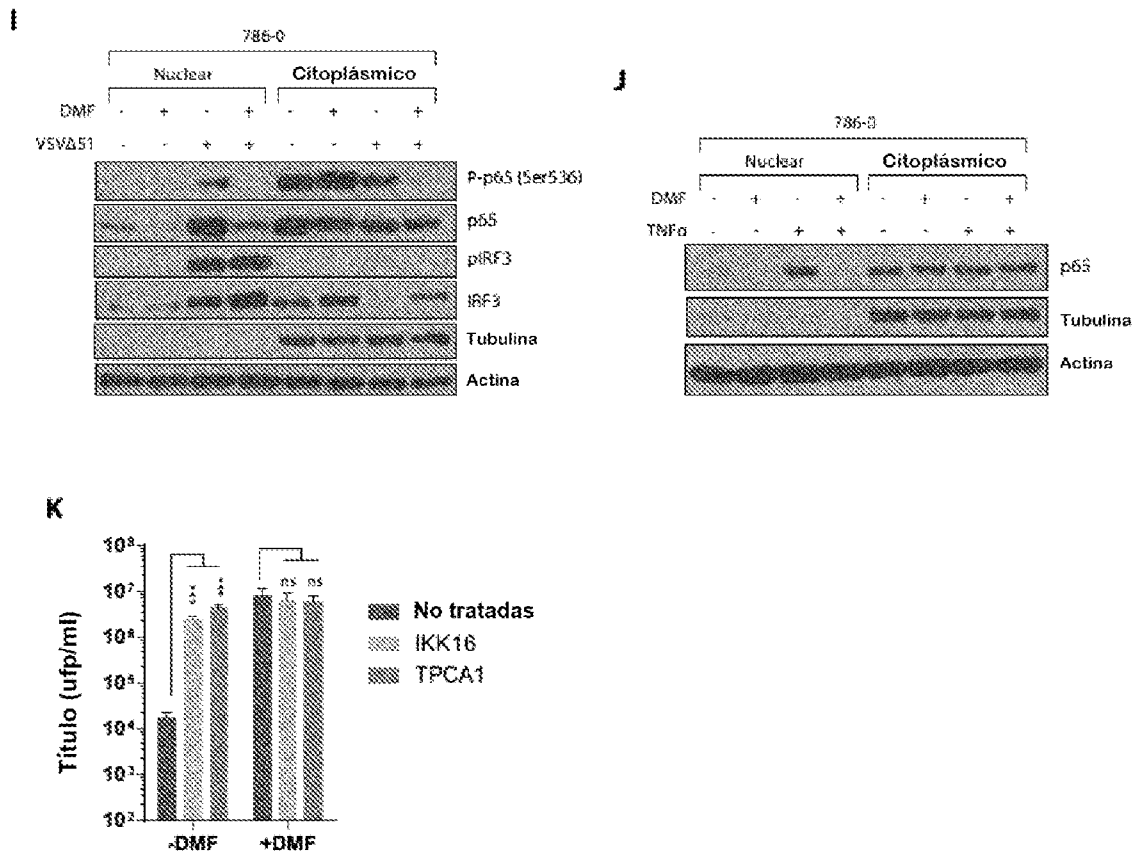


Figura 7

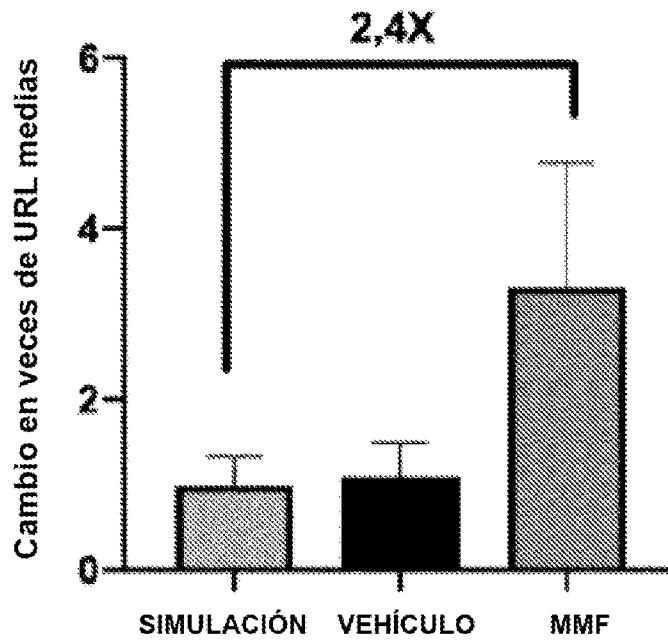


Figura 8

