

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 317**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2010 E 10004897 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 2384761**

54 Título: **Parvovirus de roedor modificado capaz de propagarse y difundirse en gliomas humanos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.12.2013**

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM  
(100.0%)  
Im Neuenheimer Feld 280  
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**NÜESCH, JÜRIG;  
THOMAS, NADJA;  
PLOTZKY, CLAUDIA;  
ROMMELAERE, JEAN;  
NÜESCH, JÜRIG;  
THOMAS, NADJA;  
PLOTZKY, CLAUDIA y  
ROMMELAERE, JEAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 436 317 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

Parvovirus de roedor modificado capaz de propagarse y difundirse en gliomas humanos

La presente invención se refiere a una variante de parvovirus de roedor capaz de propagarse y difundirse a través de células tumorales humanas, que se puede obtener realizando pases en serie de un parvovirus de roedor como cepa de partida en células tumorales humanas semipermissivas. También se refiere a una variante de parvovirus capaz de propagarse y difundirse a través de células tumorales humanas que se caracteriza por deleciones y/o sustituciones de aminoácidos particulares, por ejemplo, una deleción de varios aminoácidos en el extremo C-terminal de NS1/exón medio de NS2. La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que contiene tal parvovirus, así como a su uso para el tratamiento del cáncer, preferiblemente de un glioblastoma.

Los virus oncolíticos tales como los parvovirus de roedores representan nuevas herramientas para el tratamiento del cáncer. Además de destruir específicamente las células cancerosas (oncolisis), estos agentes también proporcionan señales de peligro que provocan que el sistema inmune elimine tumores infectados por el virus. Como consecuencia de episodios oncolíticos, los sistemas inmunes innato y adaptativo acceden a los antígenos tumorales, lo que produce como resultado unos efectos de cebado cruzado y vacunación. Los parvovirus de roedores son virus de ADN de cadena sencilla que poseen una actividad oncolítica intrínseca, es decir, que preferentemente se replican en células cancerosas y destruyen las células tanto de origen murino como humano.

El glioblastoma es una enfermedad destructiva, que tiene unas posibilidades limitadas de tratamiento. Evidentemente, el pronóstico de pacientes requiere nuevos tratamientos. Los virus oncolíticos competentes en cuanto a la replicación mencionados anteriormente se consideran prometedores ya que son capaces de difundirse a través de tejidos malignos e inducir respuestas inmunes antitumorales. Entre ellos, los parvovirus de roedor parecen ser excelentes candidatos, debido a su oncotropismo natural, su capacidad para infectar células humanas, la toxicidad específica en células neoplásicas y la baja patogenicidad en seres humanos. En un modelo de rata, H1-PV fue capaz de causar una regresión completa de gliomas establecidos sin ninguna recidiva y se demostró que era capaz de dirigirse a diversos gliomas humanos, destruyendo de este modo de manera eficaz estas células, con independencia de su resistencia adquirida frente a inductores conocidos de la muerte celular. Aunque, H1-PV demostró ser capaz de infectar y de destruir eficazmente la mayor parte de las líneas celulares de glioblastoma humano sometidas a ensayo hasta la fecha, la mayoría de estas células se resistía a la replicación eficaz del virus, a la producción de partículas de la progenie y a la difusión. Este fracaso en la propagación y la difusión a través del tejido tumoral humano podría tener un efecto importante sobre la eficacia del tratamiento de gliomas humanos *in vivo*, no solo debido a que se limita la muerte celular a un único acontecimiento con éxito que solo alcanza a una proporción limitada de células tumorales, sino también debido a la falta de un transporte intracelular activo de los viriones de la progenie a la superficie celular.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es superar este retroceso de las cepas de la técnica anterior, es decir, proporcionar parvovirus que son capaces de propagarse y difundirse a través del tejido tumoral humano.

De acuerdo con la invención, esto se consigue con los objetos definidos en las reivindicaciones. Experimentos iniciales de los inventores han mostrado que los viriones de la progenie de PV son transportados desde el núcleo hasta la periferia de la célula a través de vesículas, antes de la lisis celular que es cuando se liberan en el material sobrenadante del medio. Por otra parte, esta salida vesicular está asociada con múltiples proteínas intracelulares (incluyendo posibles antígenos tumorales) que se transportan como una "carga asociada" a la superficie de la célula y podría contribuir a la estimulación inmune antitumoral del hospedador. Para subsanar los defectos de la cepa aislada original H1-PV (pSR19) en la propagación y la difusión vírica en glioblastoma humano, los inventores pretendían obtener variantes de H1-PV competentes en cuanto a la propagación, realizando pases en serie en líneas celulares humanas de glioblastoma obtenidas a partir de pacientes semipermissivos, es decir, para eludir los posibles impedimentos durante el proceso de infección (falta de envoltura, entrega del genoma vírico al núcleo, conversión a doble cadena). El ADN del clon infeccioso de H1-PV (pSR-19) se transfectó a diferentes líneas celulares humanas de glioblastoma (por ejemplo, NCH149, NCH82, NCH89) y este ADN competente en cuanto a la replicación se sometió a pases hasta que se hicieron visibles los efectos citopáticos. Se realizaron pases víricos adicionales (>15) combinando viriones de la progenie asociados con células, obtenidos a través de ciclos repetidos de congelación y descongelación en vTE pH 8,7 con virus liberados al medio mediante infección. Una mezcla de virus competentes en cuanto a la propagación se analizó a continuación, después de 25 pases en células NCH149 que presentaban amplificación eficaz del ADN vírico, generación de viriones de la progenie y difusión a través de una variedad de cultivos de glioblastoma humano. A partir de esta mezcla original, se aislaron clones de virus individuales mediante purificación en placa sobre células NB 324K, se amplificaron nuevamente sobre células NCH149, se clonaron y se secuenciaron.

El análisis genético de todas las variantes de H1-PV ha puesto de manifiesto una deleción de 84 nts que afecta a 28 aminoácidos de la región codificadora de NS1 (C-terminal) y NS2 y una única transición de citosina a timidina en la posición 3913 que cambia His374 a Tyr en VP2. Dos sustituciones adicionales de guanidina a adenosina en la región VP2 (3964 y 4108) que conducen a un cambio de Asp391 a Asn y de Asp439 a Ser, solo se han atribuido a dos cepas aisladas. Algunos cambios en las regiones 3' no codificantes permanecieron con prevalencia diversa. Al parecer, la región situada aproximadamente entre los nts 2000 a 2200 comprende un punto clave de la variabilidad que permite que H1-PV, a través de la modulación de la función de NS1/NS2, se adapte al entorno del hospedador. Por

lo tanto, es posible modificar activamente la gama de hospedadores de H1-PV, y también las otras cepas de PV de rata estrechamente relacionadas, H3 y TVX, a través de inserciones/deleciones dentro de esta región.

Las variantes de H1-PV recién generadas son capaces de propagarse y difundirse a través de células (líneas celulares) de glioblastoma humano. Esto permite un aumento de la infección/destrucción de tumores humanos ya establecidos y, en consecuencia, se espera que se produzca una estimulación inmune antitumoral mejorada. De acuerdo con los hallazgos previos de los inventores sobre la salida vesicular de los parvovirus, es razonable suponer que el cotransporte de proteínas intracelulares a la superficie podría servir para desenmascarar células tumorales para una respuesta inmune del hospedador. Este efecto de carga asociada no está presente en ausencia de formación de viriones de la progenie usando la cepa aislada original de H1-PV (pSR-19).

10 **Compendio de la presente invención**

Con el proceso de adaptación (pases) en células semipermissivas, tal y como se indica en los ejemplos, se podría generar una variante de H1-PV competente en cuanto a la propagación, en muchas otras líneas celulares de glioblastoma humano. El procedimiento descrito se puede ampliar a otras células (líneas celulares) tumorales humanas que incluyen las células madre tumorales.

15 La adaptación del H1-PV de rata a células de glioblastoma humano condujo a una deleción en el extremo C-terminal de NS1/exón medio de NS2 de H1. Esta región representa un área clave para la variación que determina una gama de hospedadores de H1-PV y con adaptaciones/análisis adicionales de otras cepas aisladas de PV de roedor que hasta ahora no se han caracterizado, se pueden encontrar en esta zona variaciones adicionales.

20 Además de generar una variante de H1-PV que es potencialmente capaz de difundirse de célula a célula en tejido tumoral de glioblastoma humano y que, por lo tanto, tiene un mayor potencial para destruir células tumorales (tal y como se indica con los ensayos de aptitud), las partículas de la progenie de esta cepa aislada se transportan activamente a la periferia de la célula a través de vesículas. Además de los viriones recién sintetizados, se observó que múltiples proteínas celulares que estaban asociadas con tales vesículas no estaban presentes después de la infección en células no infectadas de glioblastoma humano. Esta carga asociada podría servir para desenmascarar células tumorales, para ponerlas a disposición del sistema inmune del hospedador, contribuyendo de este modo a una respuesta inmune antitumoral inducida por el virus.

**Breve descripción de los dibujos**

Figura 1:

30 (Parte superior) Presentación esquemática del método de adaptación El parvovirus H1-PV se rata se propaga fácilmente en células de rata transformadas tales como RG-2 de glioma de rata (izquierda), pero está limitado en la producción y la difusión en líneas celulares de glioblastoma humano. Para superar estas limitaciones, se realizaron pases seriados en glioblastoma humano semipermisivo permitiendo que se produjeran mutaciones y la amplificación de variantes de H1-PV permisivas. Las variantes competentes en cuanto a la propagación se obtuvieron/analizaron después de 20 pases consecutivos en células NCH149.

35 (B, C) Determinación de la amplificación de ADN vírico en NCH149 Células NCH149 se infectaron con 10 ufp/célula de H1-PV y la presencia de intermediarios de la replicación se midió por transferencia Southern después de los tiempos indicados, posteriores a la infección.

**(B)** Infección con H1-PV (pSR19) de rata.

40 **(C)** Amplificación primaria y secundaria del ADN con H1-PV adaptado al glioma humano, determinación de la actividad de gelsolina en la salida vesicular y la difusión. Inf. 1, la infección primaria, Inf. 2, los materiales sobrenadantes de Inf. 1 se utilizaron para infectar células NCH149 vírgenes. La generación de productos intermedios de la replicación vírica se midió por transferencia Southern.  $\alpha$ Con, suero testigo;  $\alpha$ Gln, antisuero neutralizante producido contra gelsolina; dRF, producto intermedio dímero de la replicación; mRF, producto intermedio monómero de la replicación; ADNss, partículas víricas de la progenie = genomas de virus de cadena sencilla.

45 Figura 2: Determinación de la salida vesicular de H1-PV e identificación de la "carga asociada"

50 **(A)** Células NCH149 se infectaron con 10 ufp/célula de H1-PV adaptado a glioma humano y se fraccionaron en fracción nucleica (Nuc), fracción mitocondrial pesada (HMF) y fracción mitocondrial ligera (LMF), que contenían vesículas celulares. Para determinar la presencia de viriones de la progenie en la fracción vesicular, los componentes de LMF se separaron adicionalmente mediante gradientes de iodexanol y la presencia de ADN del virión se midió mediante transferencia Southern en comparación con la presencia de marcadores vesiculares (determinada por transferencia Western).

**(B)** Determinación de proteínas vesiculares en hgH1-PV y células NCH149 infectadas de forma simulada. Las vesículas se purificaron tal y como se ha descrito en (A) y se analizaron para estudiar su contenido en proteínas mediante SDS-PAGE y tinción con plata. Las proteínas representadas en exceso en vesículas celulares infectadas con

hgH1-PV se indican con flechas.

Figura 3:

(A) Determinación de la expresión de proteínas víricas después de la infección de células NCH149 con H1-PV adaptado a glioma humano frente a rata (pSR19)

5 Células NCH149 se infectaron con 10 ufp/célula y se recogieron en los momentos indicados después de la infección. La acumulación de proteínas víricas se determinó mediante transferencia Western. Rodeada con un círculo (rojo) está la gran heterogeneidad de NS1 producida después de la infección con hgH1-PV y la mayor acumulación de NS2 y NS3 (azul).

10 (B) Células RG-2 y NCH149 se infectaron con las preparaciones de virus indicadas con una multiplicidad de 10, y se marcaron metabólicamente con <sup>32</sup>P-ortofosfato 24 h p.i. durante cuatro horas Las células se recogieron, NS1 se purificó mediante inmunoprecipitaciones y SDS-PAGE y se determinó el patrón de fosfopéptidos trípticos mediante electroforesis/cromatografía bidimensional. Se muestra el patrón de fosfopéptidos de NS1 producido por H1-PV de rata (pSR-19), en glioma de rata (izquierda), NCH149 (centro), así como por hgH1-PV en células NCH149 (derecha). Rodeadas con un círculo: fosforilaciones conocidas por dirigir la amplificación del ADN vírico.

15 Figura 4:

(A) Multiplicación de la entrada de virus después de la infección de diversas líneas celulares diana

20 Las líneas celulares indicadas se infectaron con una multiplicidad de 10, se lavaron y se recogieron 4 horas (entrada de virus) 24 y 48 horas después de la infección. Se determinaron los virus asociados con células y el medio mediante ensayo en placas. La amplificación promedio 24 y 48 h después de la infección se expresa sobre la valoración de entrada (4 h) del virus.

(B) Ensayo de aptitud de los virus

Las líneas celulares diana se sembraron en placas de 24 pocillos, se infectaron con las multiplicidades indicadas, con las preparaciones de virus apropiadas, y las células vivas se fijaron y se tiñeron con violeta de metilo 6 días después de la infección.

25 Figura 5:

Parte superior: Organización del genoma de H1-PV, con indicación de la variación encontrada después de la adaptación en glioma humano

Sección media: Fragmentos de PCR generados a partir de preparaciones de virus purificados de la placa

Parte inferior: Determinación genética de las variantes de hgH1-PV purificadas en placa

30 Los fragmentos de PCR clonados se indican con líneas negras, el material secuenciado se indica con cuadrados punteados y la presencia de las variaciones individuales se indica en verde.

Figura 6: Caracterización detallada de todas las variaciones genéticas encontradas por secuenciación de placas individuales

35 Figura 7: Ensayo de aptitud de virus sobre reservas de virus obtenidas a partir de cepas aisladas de placas individuales

Figura 8: Secuencias de proteínas correspondientes a la secuencia de nucleótidos de H1-PV publicada en NC 001358

40 Los tres exones de NS2p, tal y como se deducen a partir del patrón de transcripción de Qiu et al., (2006), están subrayados (extremo N-terminal común con NS1 = exon1) - (exón medio: doble subrayado)-amarillo (exón C-terminal [único para cada isoforma de NS2]). Errores corregidos de la secuenciación están en cursiva (estas diferencias con la secuencia publicada se encontraron también en todas las cepas aisladas). Las variaciones creadas a través de los pases en células NCH149 aparecen en negrita. Las secuencias específicas de VP1 están en negrita y subrayadas.

**Descripción detallada de la presente invención**

45 La presente invención proporciona una variante de parvovirus capaz de propagarse y difundirse a través de células tumorales humanas, caracterizada porque comprende una delección de 28 aminoácidos desde la posición 619 a 646 (Rhode y Paradiso, 1983) en el extremo C-terminal de NS1/posición 126 a 153 en el exón medio de NS2 (Rhode y Paradiso, 1983; Qiu et al., 2006), y una sustitución H374Y en VP1/2.

La presente invención también proporciona una variante de parvovirus capaz de propagarse y difundirse a través de células tumorales humanas caracterizada porque comprende la(s) siguiente(s) sustitución(es) de aminoácidos en

VP1/2:

(a) D391N; y/o

(b) D439S.

5 El término "propagación" tal y como se usa en esta memoria significa que los viriones de la progenie de la variante de parvovirus muestran una amplificación significativamente superior a los niveles de entrada (es decir, > 5 veces).

La expresión "difundir a través de" tal y como se usa esta memoria, significa que los viriones de la progenie de la variante de parvovirus son capaces no solo de destruir las poblaciones de células infectadas principalmente, sino que son capaces de causar infecciones secundarias de células vírgenes, con partículas producidas durante la primera ronda de infección.

10 El término "semipermissivo", tal y como se usa en esta memoria para caracterizar las células hospedadoras, significa que la infección con los virus da como resultado una replicación vírica incompleta dentro del tipo particular de células hospedadoras, pero se caracteriza por una amplificación del ADN vírico y, eventualmente, bajos rendimientos de viriones en la progenie. Estos últimos no tienen que ser necesariamente infecciosos al comienzo del procedimiento.

15 La expresión "parvovirus" comprende cualquier parvovirus, particularmente un parvovirus de roedor, tal como un virus diminuto de ratón (MVM) y virus H-1, así como virus o vectores relacionados basados en tales virus o derivados. La persona experta en la técnica puede llegar a la variante de parvovirus según la presente invención sometiendo a pases en serie una cepa de partida, tal y como se indica en los Ejemplos más abajo, o mediante la introducción de una delección que produce como resultado la modificación deseada de las propiedades biológicas, es decir, la capacidad de la variante de parvovirus para propagarse y difundirse a través de células tumorales humanas, destruyéndolas de este modo, partiendo de la secuencia de ácido nucleico conocida y de secuencias de aminoácidos de las proteínas no estructurales de los parvovirus, por ejemplo, a partir de parvovirus H-1 (Rhode y Paradiso, 1983; Qiu et al., 2006). La persona experta en la técnica también puede analizar fácilmente si una variante particular presenta las propiedades biológicas deseadas descritas, empleando los ensayos que se explican a continuación en los ejemplos.

20 Preferiblemente, la variante de parvovirus de la invención se obtiene a partir de parvovirus H-1 (H-1PV) o de un parvovirus de roedor relacionado. Ejemplos de parvovirus de roedor relacionados preferidos son LuIII, virus diminuto de ratón (MMV), parvovirus de ratón (MPV), virus diminuto de rata (RMV), parvovirus de rata (RPV) o virus de rata (RV).

25 En principio, cualquier tumor se puede curar usando una variante de parvovirus de la presente invención, prefiriéndose los gliomas.

Un glioma preferido en particular es un glioblastoma.

30 Una línea de células tumorales semipermissiva humana preferida es NCH149.

En cuanto al procedimiento de pases en serie, la persona experta en la técnica puede determinar fácilmente cuántos pases son suficientes para llegar a un parvovirus de la presente invención. En general, sin embargo, este método de la invención comprende al menos 10 pases, preferiblemente al menos 20 a 25 pases o más. Preferiblemente, los pases son sobre células NCH149.

35 Con el fin de asegurar la pureza y la estabilidad de las variantes víricas, los clones individuales se pueden purificar en placa después de los pases, preferentemente en células NB 324K.

40 La presente invención también proporciona un método para generar una variante de parvovirus capaz de propagarse y difundirse a través de células tumorales humanas, comprendiendo dicho método realizar pases en serie con un parvovirus de roedor como cepa de partida en células tumorales humanas semipermissivas, tal y como se ha descrito anteriormente y en los ejemplos, a continuación.

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un ácido nucleico, especialmente un ADN que codifica una variante de parvovirus anterior.

45 Un ADN de acuerdo con la invención puede estar presente en un vector y un vector de expresión, respectivamente. Una persona experta en la técnica está familiarizada con ejemplos de los mismos. En el caso de un vector de expresión para *E. coli*, estos son por ejemplo, pGEMEX, derivados de pUC, pGEX-2T, pET3b, vectores de expresión basados en T7 y pQE-8. Para la expresión en levadura se pueden mencionar, por ejemplo, pY100 y Ycpad1, mientras que, por ejemplo, pKCR, pEFBOS, cDM8, pMSCND y pCEV4 se pueden indicar para la expresión en células animales. El vector de expresión de baculovirus pAcSGHisNT-A es especialmente adecuado para la expresión en células de insecto.

50 En una realización preferida, el vector que contiene el ADN de acuerdo con la invención es un virus, por ejemplo, un adenovirus, un virus vaccinia, un virus AAV o un parvovirus, tal como MVM o H-1, prefiriéndose un parvovirus. El vector también puede ser un retrovirus, tal como MoMULV, MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV o GaLV.

Para la construcción de vectores de expresión que contienen el ADN de acuerdo con la invención, es posible utilizar métodos generales conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de recombinación *in vitro*, métodos sintéticos y métodos de recombinación *in vivo*.

5 Además, la presente invención se refiere a células hospedadoras que contienen las variantes o vectores descritos anteriormente. Estas células hospedadoras incluyen células humanas 293(T), NBK, células de rata RG2, células NCH149, NCH82 o U87. Los métodos para transformar estas células hospedadoras, para seleccionar fenotípicamente los transformantes y para expresar el ADN de acuerdo con la invención mediante el uso de los vectores descritos anteriormente, son conocidos en la técnica.

10 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para producir la variante de parvovirus de la invención, que comprende el cultivo de una célula hospedadora de la invención en condiciones adecuadas y la recogida de la variante de parvovirus a partir de las células o del medio.

15 Por otra parte, la presente invención se refiere a anticuerpos que reconocen específicamente una variante de parvovirus descrita anteriormente, es decir, la región polipeptídica de la variante de parvovirus en donde se localiza la deleción, caracterizándose la variante de parvovirus de roedor porque es capaz de propagarse y difundirse a través de gliomas humanos. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, policlonales o sintéticos o fragmentos de los mismos, por ejemplo, fragmentos Fab, Fv o scFv. Preferiblemente, se refieren a anticuerpos monoclonales. Para la producción es favorable inmunizar los animales - particularmente los conejos o pollos para un anticuerpo policlonal y los ratones para un anticuerpo monoclonal - con una variante del parvovirus mencionado anteriormente o con fragmentos de la misma. Otras dosis de refuerzo de los animales se pueden efectuar con la misma variante de parvovirus o con fragmentos de la misma. El anticuerpo policlonal se puede obtener después a partir del suero del animal y de la yema de huevo, respectivamente. El anticuerpo monoclonal se puede obtener de acuerdo con métodos convencionales, haciéndose referencia en particular al método de Köhler y Milstein (Nature 256 (1975), 495) y Galfre (Meth. Enzymol. 73 (1981), 3). En este caso, células de mieloma de ratón se fusionan con células de bazo procedentes de los animales inmunizados. Los anticuerpos según la invención se pueden utilizar de muchas maneras, por ejemplo, para la inmunoprecipitación de las variantes de parvovirus descritas anteriormente o para el aislamiento de las mismas. Los anticuerpos se pueden unir en inmunoensayos en fase líquida o a un vehículo sólido. A este respecto, los anticuerpos se pueden marcar de varias maneras. La persona experta en la técnica está familiarizada con marcadores adecuados y con métodos de marcación. Ejemplos de inmunoensayos son ELISA y RIA.

También se proporciona un kit para la aplicación de la presente invención. Este kit comprende lo siguiente:

- 30 (a) una variante de parvovirus según la invención;
- (b) un ADN de acuerdo con la invención, por ejemplo, un vector de expresión, particularmente un parvovirus;
- (c) un anticuerpo de acuerdo con la invención; y/u, opcionalmente,
- (d) agentes auxiliares convencionales, tales como disolventes, tampones, vehículos, marcadores y testigos.

35 De los componentes (a) a (d) pueden estar presentes uno o varios representantes de cada uno.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que contiene una variante de parvovirus de la invención, un vector o una célula que produce dicha variante de parvovirus ("agente parvoterapéutico" o "composición parvoterapéutica"), por ejemplo, células 293(T), NBK humanas o células RG2 de rata.

40 Para la administración, el agente parvoterapéutico se puede combinar con vehículos farmacéuticos adecuados. Los vehículos farmacéuticos adecuados de un tipo bien conocido en la técnica y que se pueden conseguir comercialmente con facilidad, incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato (PBS), agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, agentes humectantes de diversos tipos, soluciones estériles, etc. Tales vehículos se pueden formular con el(los) agente(s) parvoterapéutico(s) mediante métodos de formulación convencionales para administrar al sujeto en una dosis adecuada.

45 Otros vehículos farmacéuticamente compatibles pueden incluir geles, materiales de matrices bioresorbibles, elementos de implantación que contienen el agente terapéutico o cualquier otro vehículo adecuado, medios o material(es) de entrega o de administración.

50 La administración de las composiciones farmacéuticas parvoterapéuticas a un paciente, por ejemplo, un paciente con tumor cerebral, se puede efectuar según cualquiera entre numerosas rutas adecuadas, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intracraneal e intratumoral. La ruta de administración depende por supuesto de la naturaleza de la enfermedad y del(de los) agente(s) terapéutico(s) específico(s) contenido(s) en la composición farmacéutica.

Si tal(es) agente(s) parvoterapéutico(s) comprende(n) partículas víricas infecciosas con capacidad para penetrar a través de la barrera hematoencefálica, el tratamiento se puede realizar o al menos iniciar mediante inyección intra-

venosa del agente terapéutico vírico, por ejemplo, una variante de H1-PV.

Dado que el tratamiento intravenoso a largo plazo es susceptible de volverse ineficaz como consecuencia de la formación de anticuerpos neutralizantes contra el agente terapéutico vírico, se pueden adoptar diferentes modos de administración después de un régimen inicial de administración vírica intravenosa, o técnicas de administración diferentes de este tipo, por ejemplo, la administración vírica intracraneal o intratumoral, se pueden utilizar alternativamente durante todo el transcurso del tratamiento con parvovirus.

Como otra técnica de administración específica, el agente parvoterapéutico (agente de virus, vector y/o agente celular) se puede administrar al paciente a partir de una fuente implantada en el paciente. Por ejemplo, un catéter, por ejemplo, de silicona o de otro material biocompatible, puede estar conectado a un pequeño depósito subcutáneo (depósito de Rickham) instalado en el paciente durante la extirpación del tumor o mediante un procedimiento distinto, para permitir que la composición parvoterapéutica se inyecte localmente en varias veces sin una intervención quirúrgica adicional. La variante de parvovirus o los vectores obtenidos también se pueden inyectar, por ejemplo, en un tumor, por técnicas quirúrgicas estereotácticas o por técnicas de direccionamiento por neuronavegación.

La administración de los agentes o composiciones parvovíricas también se puede realizar mediante infusión continua de partículas víricas o de fluidos que contienen partículas víricas a través de catéteres implantados con tasas de flujo reducidas, utilizando sistemas de bombeo adecuados, por ejemplo: bombas de infusión peristálticas o bombas de administración mejoradas por convección (CED).

Aún otro método de administración de la composición parvoterapéutica es desde un dispositivo implantado, construido y dispuesto para administrar el agente parvoterapéutico en el lugar deseado, por ejemplo, un tumor. Por ejemplo, se pueden emplear obleas que han sido impregnadas con la composición parvoterapéutica, por ejemplo, una variante de parvovirus H-1, en la que la oblea se fija a los bordes de la cavidad de resección al final de la extirpación quirúrgica del tumor. Se pueden emplear múltiples obleas en este tipo de intervención terapéutica.

Las células que producen activamente el agente parvoterapéutico, por ejemplo, una variante de parvovirus H-1, o vectores de la variante H-1, se pueden inyectar en el tumor deseado, o en una cavidad tumoral después de la extirpación del tumor.

Se pueden emplear combinaciones de dos o varios de los modos de administración descritos anteriormente, de cualquier manera adecuada, por ejemplo, concurrente, simultánea o secuencial.

El régimen de dosificación del agente parvoterapéutico es fácilmente determinable por el médico encargado según la experiencia en la técnica, basándose en los datos del paciente, en observaciones y en otros factores clínicos, incluyendo por ejemplo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el sexo, el virus, vector, célula, etc. particular que se va a administrar, el tiempo y la vía de administración, el tipo de tumor y las características, la salud general del paciente y otros fármacos o terapias a los que se está sometiendo al paciente.

En consecuencia, la presente invención también se refiere al uso de una variante de parvovirus según la presente invención, a una célula productora de dicha variante de parvovirus, a un ADN, un vector de expresión o un anticuerpo de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer. Se espera que los tumores cerebrales (preferentemente un glioma, meduloblastoma, meningioma o glioblastoma) sean particularmente susceptibles al tratamiento con un agente de la presente invención.

Los siguientes ejemplos explican la invención con más detalle.

### Ejemplo 1

#### Adaptación de H1-PV (pSR19) de rata a glioma humano

La infección de muchas líneas celulares de glioblastoma humano con H1-PV obtenido a partir de una cepa aislada de pSR19 (número de orden: NC\_001358) condujo a la expresión de proteínas víricas y, en consecuencia, a la muerte celular independientemente de su resistencia a la apoptosis inducida por fármacos. Sin embargo, al controlar la amplificación del ADN vírico y la producción de partículas de la progenie, con excepción de NCH89, la mayoría de las líneas celulares humanas de glioblastoma sometidas a ensayo solo permitió una amplificación reducida del ADN y prácticamente ningún aumento en la producción de progenie (Herrero y Calle et al., 2004; DiPiazza y col., 2007). Para subsanar este defecto, se procuró obtener (a) una(s) variante(s) de H1-PV competente en cuanto a la propagación a través de pases en serie de pSR19 en células de glioblastoma humano, que era competente en cuanto a la amplificación de ADN, aunque la producción de viriones en la progenie se vio obstaculizada. El ADN del clon infeccioso de H1-PV, pSR19 se transfectó en células NCH149, una línea celular que se había mostrado que permitía niveles bajos de amplificación de ADN mediante transferencia Southern (Fig. 1B). Los parvovirus son dependientes de las células en crecimiento (rapidez), ya que la conversión del genoma monocatenario a un molde bicatenario para la transcripción requiere la fase S. Por lo tanto, el inóculo inicial (células transfectadas) se amplificó primero mediante diluciones 1:4 después de llegar a confluencia en la superficie. Después de conseguir  $4 \times 10^8$  células, se recogieron 3/4 de las células, los viriones de la progenie se liberaron mediante ciclos repetidos de congelación y descongelación en el material sobrenadante, y una combinación de células vírgenes y transfectadas se volvió a infectar con es-

tos viriones hasta confluencia o se obtuvo CPE. Este procedimiento se continuó hasta el pase 20-25.

## Ejemplo 2

### Análisis de glioma humano adaptado a H1-PV

5 Después de más de 20 pases consecutivos, los inventores obtuvieron una reserva de virus competente en cuanto a la amplificación del ADN vírico, la producción de viriones en la progenie y la difusión en cultivos de NCH149. Se analizaron las propiedades de esta mezcla de virus. Como se muestra en la Fig. 1C mediante transferencia Southern, esta mezcla de virus se caracterizaba por una fuerte amplificación del ADN después de la infección de células NCH149, produciendo productos intermedios de la replicación monómeros y dímeros, así como ADN monocatenario de virión. Además de reflejar la producción de ADN vírico genómico, esta última forma indica la formación de viriones en la progenie, ya que la generación de ADN monocatenario se asocia con el proceso de empaquetamiento. Por otra parte, cuando se recogió el material sobrenadante de células infectadas (Inf. 1) para infectar células NCH149 vírgenes (Inf. 2), se observó una amplificación del ADN similar y una generación de ADN monocatenario de virión, lo que demuestra la producción y la liberación de un gran número de viriones infecciosos de la progenie en las células NCH149. En efecto, la liberación de viriones de la progenie en el material sobrenadante del medio es dependiente de la actividad de gelsolina celular, ya que la aplicación de anticuerpos neutralizantes de gelsolina inhibe este proceso. Esta dependencia de gelsolina para la liberación de los viriones de la progenie indica la participación de un transporte vesicular activo a la periferia celular, de los viriones de la progenie (Bar et al., 2008).

20 Como se muestra en la Fig. 2A mediante transferencia Southern del ADN monocatenario de los viriones de la progenie, después de fraccionamientos bioquímicos, se observa que partículas de la progenie de la variante H1-PV están fuertemente asociadas con fracciones vesiculares de las células infectadas. Por otra parte, comparando las vesículas de células NCH149 no infectadas frente a infectadas, analizando el contenido en proteínas mediante tinción con plata se identificó una serie de proteínas que están asociadas con fracciones vesiculares que contienen viriones, la cual está ausente en células no infectadas. La naturaleza de estas proteínas se determina actualmente mediante análisis MS/MS.

25 A continuación, se identificó la naturaleza de la(s) modificación(es) vírica(s) que produce el fenotipo permisivo en las células NCH149. H1-PV (pSR19) original se produjo en glioma RG-2 de rata, mientras que la variante H1-PV adaptada (hgH1-PV) fue generada en NCH149. Ambas reservas de virus se valoraron mediante ensayos en placa en células NB324K permisivas. Las infecciones se llevaron a cabo con una multiplicidad de 10 en células NCH149 y la producción de proteínas víricas se determinó en un experimento de evolución temporal mediante transferencia Western. Como se muestra en la Fig. 3A, se observaron diferencias notables en los niveles de expresión de las proteínas pequeñas no estructurales NS2 y NS3, mientras que NS1 de hgH1-PV mostró ser mucho más heterogénea que NS1 de pSR19. NS1 es una fosfoproteína multifuncional que es necesaria para muchos procesos durante las amplificaciones de virus y está regulada en su funcionamiento por fosforilaciones diferenciales. En efecto, tal y como se muestra en la Fig. 3B, cuando se analizaron los patrones de fosforilación de NS1 obtenida a partir de pSR19 después de infecciones de células RG-2 de rata y de células NCH149 humanas, se observó la falta de dos péptidos característicos después de la infección de NCH149 (dentro de un círculo). Por el contrario, hgH1-PV era capaz de generar estos fosfopéptidos (y un péptido adicional marcado con una flecha), lo que explica las diferencias en el patrón de migración observado con transferencia Western. Por otra parte, análisis funcionales detallados de la fosforilación (patrón) de NS1 de MVM, que se asemeja mucho a la observada para pSR19 en RG-2/hgH1-PV en NCH149, sugiere que los dos péptidos dentro de un círculo son fosforilaciones importantes que intervienen en las funciones replicativas de la proteína NS1.

45 Por último, las reservas de hgH1-PV adaptado se sometieron a ensayo para determinar su aptitud para propagarse y difundirse a través de una variedad de cultivos de glioblastoma (humano), en comparación con la cepa aislada de pSR19. Como se muestra en la Fig. 4. además de las células NCH149, todas las otras líneas celulares de glioblastoma humano sometidas a ensayo hasta ahora, mostraron ser aptas para amplificar viriones de la progenie de hgH1-PV (pero no pSR19) por lo menos diez veces más que los niveles de entrada y mostraron ser superiores a pSR19 en la difusión a través de los cultivos.

## Ejemplo 3

### Caracterización genética de H1-PV adaptado a glioma humano

50 Para determinar las variaciones genéticas de hgH1-PV adquiridas durante los pases en NCH149 en comparación con el inóculo inicial (pSR19), se realizaron valoraciones del punto final de virus individuales purificados en placa y se aisló el ADN de los viriones. Como se muestra en la Fig. 5, se obtuvo el ADN de cinco placas individuales, la región codificadora completa se amplificó por PCR en tres etapas y los fragmentos solapantes se clonaron en pCR2.1. Las variaciones genéticas se determinaron mediante secuenciación y se compararon con la secuencia publicada de pSR19 (número de orden NC\_001358). Se indican las mutaciones comparadas con la secuencia de pSR19 que se encontraron presentes en las cepas aisladas de placas individuales, se numeraron y se localizaron en el mapa de H1. Las alteraciones detalladas de la secuencia se muestran en la Fig. 6.

Para caracterizar mejor las propiedades de los clones individuales, se generaron reservas de virus de cepas aisladas



5 a partir de placas individuales y se sometió a ensayo su aptitud para difundirse y destruir cultivos de células de glioblastoma humano, en comparación con pSR19 generado en células RG-2 de rata. Tal y como se muestra en la Fig. 7, todas las cepas aisladas que albergaban un mutante por delección en la parte C-terminal de NS1/exón medio de NS2, superaron a pSR19 en su aptitud para difundirse y destruir células de glioblastoma humano, lo que confirma los hallazgos iniciales con las variantes reunidas y demuestra que el mutante por delección es responsable del selector de la gama de hospedadores observada.

**Lista de Referencias**

Rhode, S.L. III y Paradiso, P.R. (1983). Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation. *J. Virol.* 45, 173-184.

10 Qiu, J., Yoto, Y., Tullis, G. y Pintel, D.J. (2006). Parvovirus processing strategies. págs. 253-274. En "Parvoviruses" Editores Kerr, J.R., Cotmore, S.F., Bloom, M.E., Linden, R.M. y Parrish, C.R. Hodder Arnold, Londres.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 15 <110> Deutsches Krebsforschungszentrum  
 <120> Parvovirus de roedor modificado capaz de propagarse y de difundirse en gliomas humanos  
 <130> K3357EP  
 <160> 12  
 <170> PatentIn versión 3.3
- 20 <210> 1  
 <211> 672  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial
- 25 <220>  
 <223> NS1  
 <400> 1

ES 2 436 317 T3

Met Ala Gly Asn Ala Tyr Ser Asp Glu Val Leu Gly Val Thr Asn Trp  
1 5 10 15

Leu Lys Asp Lys Ser Ser Gln Glu Val Phe Ser Phe Val Phe Lys Asn  
20 25 30

Glu Asn Val Gln Leu Asn Gly Lys Asp Ile Gly Trp Asn Ser Tyr Arg  
35 40 45

Lys Glu Leu Gln Asp Asp Glu Leu Lys Ser Leu Gln Arg Gly Ala Glu  
50 55 60

Thr Thr Trp Asp Gln Ser Glu Asp Met Glu Trp Glu Ser Ala Val Asp  
65 70 75 80

Asp Met Thr Lys Lys Gln Val Phe Ile Phe Asp Ser Leu Val Lys Lys  
85 90 95

Cys Leu Phe Glu Val Leu Ser Thr Lys Asn Ile Ala Pro Ser Asn Val  
100 105 110

Thr Trp Phe Val Gln His Glu Trp Gly Lys Asp Pro Gly Trp His Cys  
115 120 125

His Val Leu Ile Gly Gly Lys Asp Phe Ser Gln Pro Gln Gly Lys Trp  
130 135 140

Trp Arg Arg Gln Leu Asn Val Tyr Trp Ser Arg Trp Leu Val Thr Ala  
145 150 155 160

Cys Asn Val Gln Leu Thr Pro Ala Glu Arg Ile Lys Leu Arg Glu Ile  
165 170 175

Ala Glu Asp Ser Glu Trp Val Thr Leu Leu Thr Tyr Lys His Lys His

ES 2 436 317 T3

180					185					190					
Thr	Lys	Lys	Asp	Tyr	Thr	Lys	Cys	Val	Leu	Phe	Gly	Asn	Met	Ile	Ala
		195					200					205			
Tyr	Tyr	Phe	Leu	Ser	Lys	Lys	Lys	Ile	Cys	Thr	Ser	Pro	Pro	Arg	Asp
	210					215					220				
Gly	Gly	Tyr	Phe	Leu	Ser	Ser	Asp	Ser	Gly	Trp	Lys	Thr	Asn	Phe	Leu
225					230					235					240
Lys	Glu	Gly	Glu	Arg	His	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Tyr	Thr	Asp	Glu	Met
				245					250					255	
Lys	Pro	Glu	Thr	Val	Glu	Thr	Thr	Val	Thr	Thr	Ala	Gln	Glu	Ala	Lys
			260					265					270		
Arg	Gly	Arg	Ile	Gln	Thr	Arg	Glu	Glu	Val	Ser	Ile	Lys	Thr	Thr	Leu
		275					280					285			
Lys	Glu	Leu	Val	His	Lys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Glu	Asp	Trp	Met	Met
	290					295					300				
Met	Gln	Pro	Asp	Ser	Tyr	Ile	Glu	Met	Met	Ala	Gln	Pro	Gly	Gly	Glu
305					310					315					320
Asn	Leu	Leu	Lys	Asn	Thr	Leu	Glu	Ile	Cys	Thr	Leu	Thr	Leu	Ala	Arg
				325					330					335	
Thr	Lys	Thr	Ala	Phe	Asp	Leu	Ile	Leu	Glu	Lys	Ala	Glu	Thr	Ser	Lys
			340					345					350		
Leu	Ala	Asn	Phe	Ser	Met	Ala	Ser	Thr	Arg	Thr	Cys	Arg	Ile	Phe	Ala
		355					360					365			
Glu	His	Gly	Trp	Asn	Tyr	Ile	Lys	Val	Cys	His	Ala	Ile	Cys	Cys	Val
	370					375					380				
Leu	Asn	Arg	Gln	Gly	Gly	Lys	Arg	Asn	Thr	Val	Leu	Phe	His	Gly	Pro
385					390					395					400
Ala	Ser	Thr	Gly	Lys	Ser	Ile	Ile	Ala	Gln	Ala	Ile	Ala	Gln	Ala	Val
				405					410					415	
Gly	Asn	Val	Gly	Cys	Tyr	Asn	Ala	Ala	Asn	Val	Asn	Phe	Pro	Phe	Asn
			420					425					430		
Asp	Cys	Thr	Asn	Lys	Asn	Leu	Ile	Trp	Val	Glu	Glu	Ala	Gly	Asn	Phe
		435					440					445			
Gly	Gln	Gln	Val	Asn	Gln	Phe	Lys	Ala	Ile	Cys	Ser	Gly	Gln	Thr	Ile



ES 2 436 317 T3

Leu Lys Asp Lys Ser Ser Gln Glu Val Phe Ser Phe Val Phe Lys Asn  
 20 25 30  
 Glu Asn Val Gln Leu Asn Gly Lys Asp Ile Gly Trp Asn Ser Tyr Arg  
 35 40 45  
 Lys Glu Leu Gln Asp Asp Glu Leu Lys Ser Leu Gln Arg Gly Ala Glu  
 50 55 60  
 Thr Thr Trp Asp Gln Ser Glu Asp Met Glu Trp Glu Ser Ala Val Asp  
 65 70 75 80  
 Met Thr Lys Lys Phe Asn Ala Leu Thr Ile Ser Asp Ser Glu Lys Tyr  
 85 90 95  
 Ala Ser Gln Pro Lys Leu Arg Ser Tyr Ser Thr Cys Ile Gly Pro Cys  
 100 105 110  
 Gly Pro Ser Ser Arg Ala Leu Glu His Thr Lys Tyr Ser Cys Cys Gly  
 115 120 125  
 His Cys Ser Lys Pro Lys His Trp Gly Gly Trp Phe His Ser Leu Pro  
 130 135 140  
 Arg Cys Ser Thr Glu Pro Asn Leu Val Arg Asp Arg Gly Gly Phe Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Leu Leu Gln Ser Arg Thr Val Gly Glu Arg Leu Gln Arg Gly Ala  
 165 170 175  
 Asp Leu Gly Leu Arg Tyr Gly Val Leu Met Tyr Asp Tyr Leu Phe Tyr  
 180 185 190  
 Arg Pro Glu Ile Thr Trp Phe  
 195

<210> 3  
 <211> 738  
 <212> PRT  
 <213> secuencia artificial

5

<220>  
 <223> VP1/2

<400> 3

Met Ala Pro Pro Ala Lys Arg Ala Lys Arg Gly Trp Val Pro Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Ser Leu Asp Gln Gly Glu Pro Thr  
 20 25 30  
 Asn Pro Ser Asp Ala Ala Ala Lys Glu His Asp Glu Ala Tyr Asp Gln

10

ES 2 436 317 T3

	35		40		45														
Tyr	Ile	Lys	Ser	Gly	Lys	Asn	Pro	Tyr	Leu	Tyr	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp				
	50					55					60								
Gln	Arg	Phe	Ile	Asp	Gln	Thr	Lys	Asp	Ala	Lys	Asp	Trp	Gly	Gly	Lys				
65					70					75					80				
Val	Gly	His	Tyr	Phe	Phe	Arg	Thr	Lys	Arg	Ala	Phe	Ala	Pro	Lys	Leu				
				85					90					95					
Ser	Thr	Asp	Ser	Glu	Pro	Gly	Thr	Ser	Gly	Thr	Ser	Gly	Val	Ser	Arg				
			100					105					110						
Pro	Gly	Lys	Arg	Thr	Lys	Pro	Pro	Ala	His	Ile	Phe	Val	Asn	Gln	Ala				
		115					120					125							
Arg	Ala	Lys	Lys	Lys	Arg	Ala	Ser	Leu	Ala	Ala	Gln	Gln	Arg	Thr	Leu				
	130					135					140								
Thr	Met	Ser	Asp	Gly	Thr	Glu	Thr	Asn	Gln	Pro	Asp	Thr	Gly	Ile	Ala				
145					150					155					160				
Asn	Ala	Arg	Val	Glu	Arg	Ser	Ala	Asp	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly				
				165					170					175					
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ile	Gly	Val	Ser	Thr	Gly	Thr	Tyr				
			180					185					190						
Asp	Asn	Gln	Thr	Thr	Tyr	Lys	Phe	Leu	Gly	Asp	Gly	Trp	Val	Glu	Ile				
		195					200					205							
Thr	Ala	His	Ala	Ser	Arg	Leu	Leu	His	Leu	Gly	Met	Pro	Pro	Ser	Glu				
	210					215					220								
Asn	Tyr	Cys	Arg	Val	Thr	Val	His	Asn	Asn	Gln	Thr	Thr	Gly	His	Gly				
225					230					235				240					
Thr	Lys	Val	Lys	Gly	Asn	Met	Ala	Tyr	Asp	Thr	His	Gln	Gln	Ile	Trp				
				245					250					255					
Thr	Pro	Trp	Ser	Leu	Val	Asp	Ala	Asn	Ala	Trp	Gly	Val	Trp	Phe	Gln				
			260					265					270						
Pro	Ser	Asp	Trp	Gln	Phe	Ile	Gln	Asn	Ser	Met	Glu	Ser	Leu	Asn	Leu				
		275					280					285							
Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Glu	Leu	Phe	Asn	Val	Val	Val	Lys	Thr	Val	Thr				
	290					295					300								
Glu	Gln	Gln	Gly	Ala	Gly	Gln	Asp	Ala	Ile	Lys	Val	Tyr	Asn	Asn	Asp				

ES 2 436 317 T3

305                                    310                                    315                                    320  
 Leu Thr Ala Cys Met Met Val Ala Leu Asp Ser Asn Asn Ile Leu Pro  
    325                                    330  
 Tyr Thr Pro Ala Ala Gln Thr Ser Glu Thr Leu Gly Phe Tyr Pro Trp  
    340                                    345                                    350  
 Lys Pro Thr Ala Pro Ala Pro Tyr Arg Tyr Tyr Phe Phe Met Pro Arg  
    355                                    360                                    365  
 Gln Leu Ser Val Thr Ser Ser Asn Ser Ala Glu Gly Thr Gln Ile Thr  
    370                                    375  
 Asp Thr Ile Gly Glu Pro Gln Ala Leu Asn Ser Gln Phe Phe Thr Ile  
    385                                    390                                    395                                    400  
 Glu Asn Thr Leu Pro Ile Thr Leu Leu Arg Thr Gly Asp Glu Phe Thr  
    405                                    410  
 Thr Gly Thr Tyr Ile Phe Asn Thr Asp Pro Leu Lys Leu Thr His Thr  
    420                                    425                                    430  
 Trp Gln Thr Asn Arg His Leu Ala Cys Leu Gln Gly Ile Thr Asp Leu  
    435                                    440                                    445  
 Pro Thr Ser Asp Thr Ala Thr Ala Ser Leu Thr Ala Asn Gly Asp Arg  
    450                                    455                                    460  
 Phe Gly Ser Thr Gln Thr Gln Asn Val Asn Tyr Val Thr Glu Ala Leu  
    465                                    470                                    475                                    480  
 Arg Thr Arg Pro Ala Gln Ile Gly Phe Met Gln Pro His Asp Asn Phe  
    485                                    490                                    495  
 Glu Ala Asn Arg Gly Gly Pro Phe Lys Val Pro Val Val Pro Leu Asp  
    500                                    505                                    510  
 Ile Thr Ala Gly Glu Asp His Asp Ala Asn Gly Ala Ile Arg Phe Asn  
    515                                    520  
 Tyr Gly Lys Gln His Gly Glu Asp Trp Ala Lys Gln Gly Ala Ala Pro  
    530                                    535                                    540  
 Glu Arg Tyr Thr Trp Asp Ala Ile Asp Ser Ala Ala Gly Arg Asp Thr  
    545                                    550                                    555                                    560  
 Ala Arg Cys Phe Val Gln Ser Ala Pro Ile Ser Ile Pro Pro Asn Gln  
    565                                    570                                    575  
 Asn Gln Ile Leu Gln Arg Glu Asp Ala Ile Ala Gly Arg Thr Asn Met





# ES 2 436 317 T3

	<220>		
	<223> variación nº 2		
	<400> 6		
	gctggcgagg actatgatgc	20	
5	<210> 7		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> variación nº 3		
	<400> 7		
	acaacatggc gaaaattggg	20	
	<210> 8		
	<211> 20		
15	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> variación nº 4		
	<400> 8		
20	gcgagaaaac gccatagctg	20	
	<210> 9		
	<211> 19		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> variación nº 5		
	<400> 9		
	tataaaaata acataatat	19	
	<210> 10		
30	<211> 22		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> variación nº 6		
35	<400> 10		
	aacataatat ggtattggtt aa	22	
	<210> 11		
	<211> 20		
40	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> variación nº 7		
	<400> 11		
	ctgtaaaaaa caatagaact	20	
45	<210> 12		
	<211> 78		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> variación nº 8		

ES 2 436 317 T3

<400> 12

agatagaata taagaagatt ttgtatttta aaataaatat agttagttgg ttaatgtag 60

atagaatata aaaagatt 78

5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una variante de parvovirus de roedor capaz de propagarse y difundirse a través de células tumorales humanas, caracterizada porque la variante de parvovirus comprende (a) una delección de 28 aminoácidos desde la posición 619 a 646 en el extremo C-terminal de NS1/desde la posición 126 a 153 en el exón medio de NS2 y (b) la sustitución de aminoácidos H374Y en VP1/2.
2. La variante de parvovirus según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente las sustituciones de aminoácidos D391N y/o D439S.
3. La variante de parvovirus según la reivindicación 1 o 2, en donde la cepa de partida es un parvovirus de rata.
- 10 4. La variante de parvovirus según la reivindicación 3, que es un parvovirus H-1 de rata.
5. La variante de parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde las células tumorales son células de glioma.
6. La variante de parvovirus según la reivindicación 5, en la que el glioma es un glioblastoma.
7. Un ADN que codifica la variante de parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 15 8. Un vector de expresión que comprende el ADN según la reivindicación 7.
9. Una célula hospedadora que contiene la variante de parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el vector de expresión según la reivindicación 8.
10. Un anticuerpo dirigido contra la proteína NS1 de una variante de parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado adicionalmente porque solo se une a la proteína de la variante que tiene la delección pero no a la proteína de tipo silvestre.
- 20 11. Kit que comprende:
  - (a) una variante de parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6;
  - (b) un ADN según la reivindicación 7;
  - (c) un anticuerpo según la reivindicación 10; y/u, opcionalmente,
  - 25 (d) agentes auxiliares convencionales, tales como disolventes, tampones, vehículos, marcadores y testigos, en donde de los componentes (a) a (d) pueden estar presentes uno o varios representantes de cada uno.
12. Una composición farmacéutica que contiene (a) un parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el ADN según la reivindicación 7, el vector de expresión según la reivindicación 8, la célula hospedadora según la reivindicación 9 y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 13. Uso de un parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el ADN según la reivindicación 7, el vector de expresión según la reivindicación 8, la célula hospedadora según la reivindicación 9, para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer.
14. El parvovirus según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el ADN según la reivindicación 7, el vector de expresión según la reivindicación 8, la célula hospedadora según la reivindicación 9, para uso en un método de tratamiento del cáncer.
- 35 15. El uso según la reivindicación 13 o 14, en el que dicho cáncer es un tumor cerebral.
16. El uso según la reivindicación 15, en el que dicho tumor cerebral es un glioma, un meduloblastoma, un meningioma o un glioblastoma.

# Generación de PVs (roedor) que se multiplican en células de glioma humanas

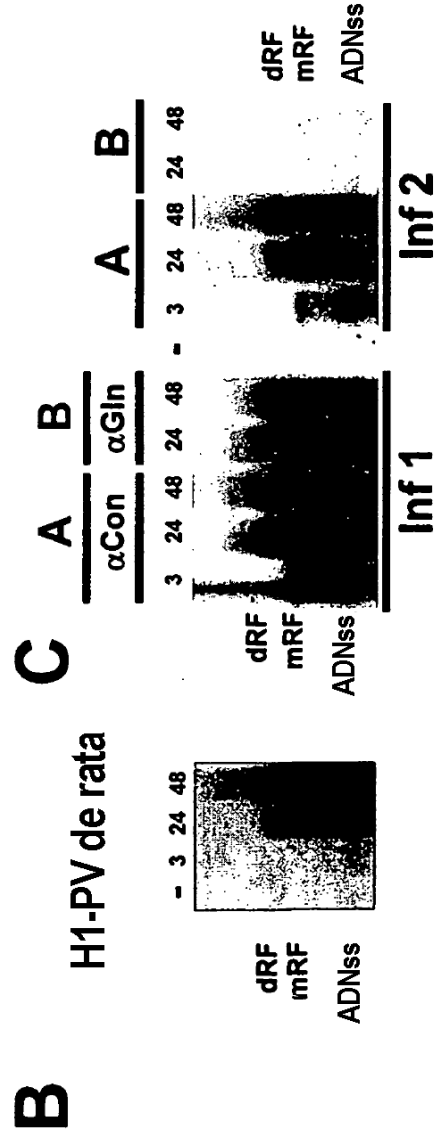
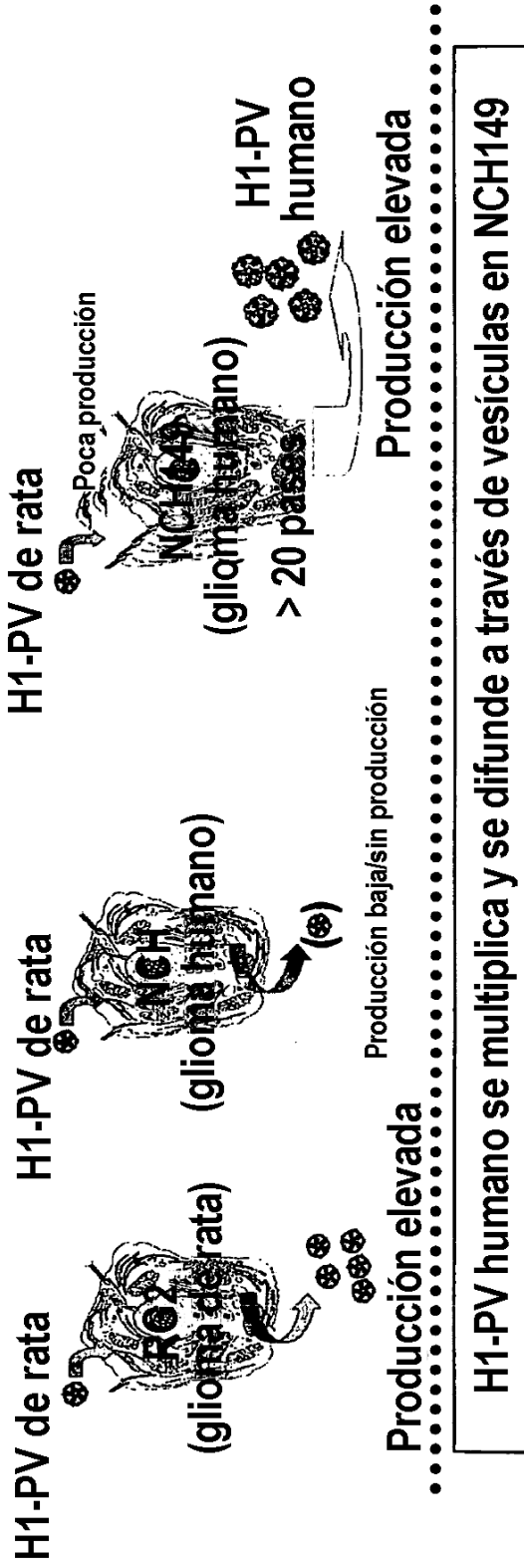


Fig. 1

# Salida vesicular de carga asociada de células NCH 149 infectadas con hgH1-PV

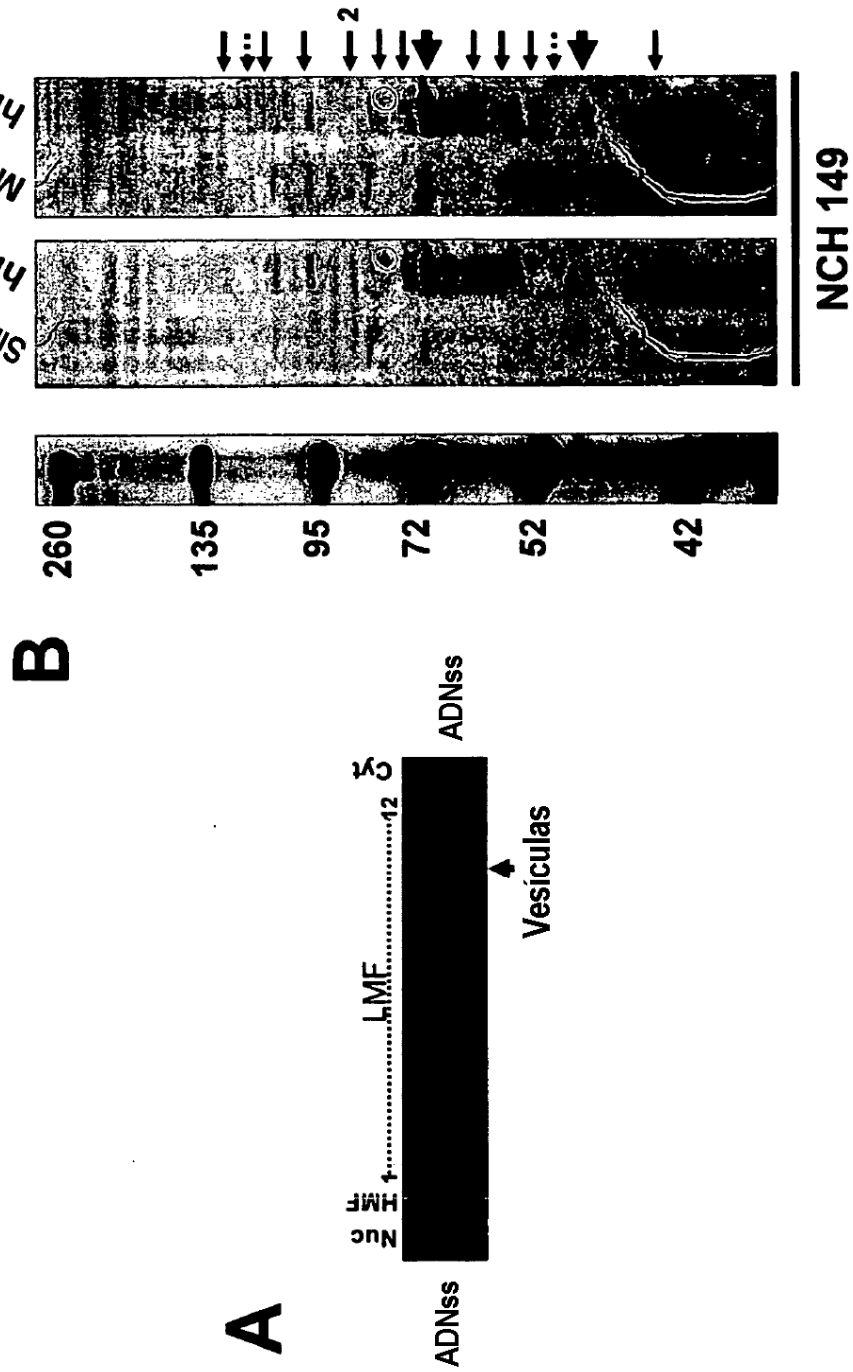
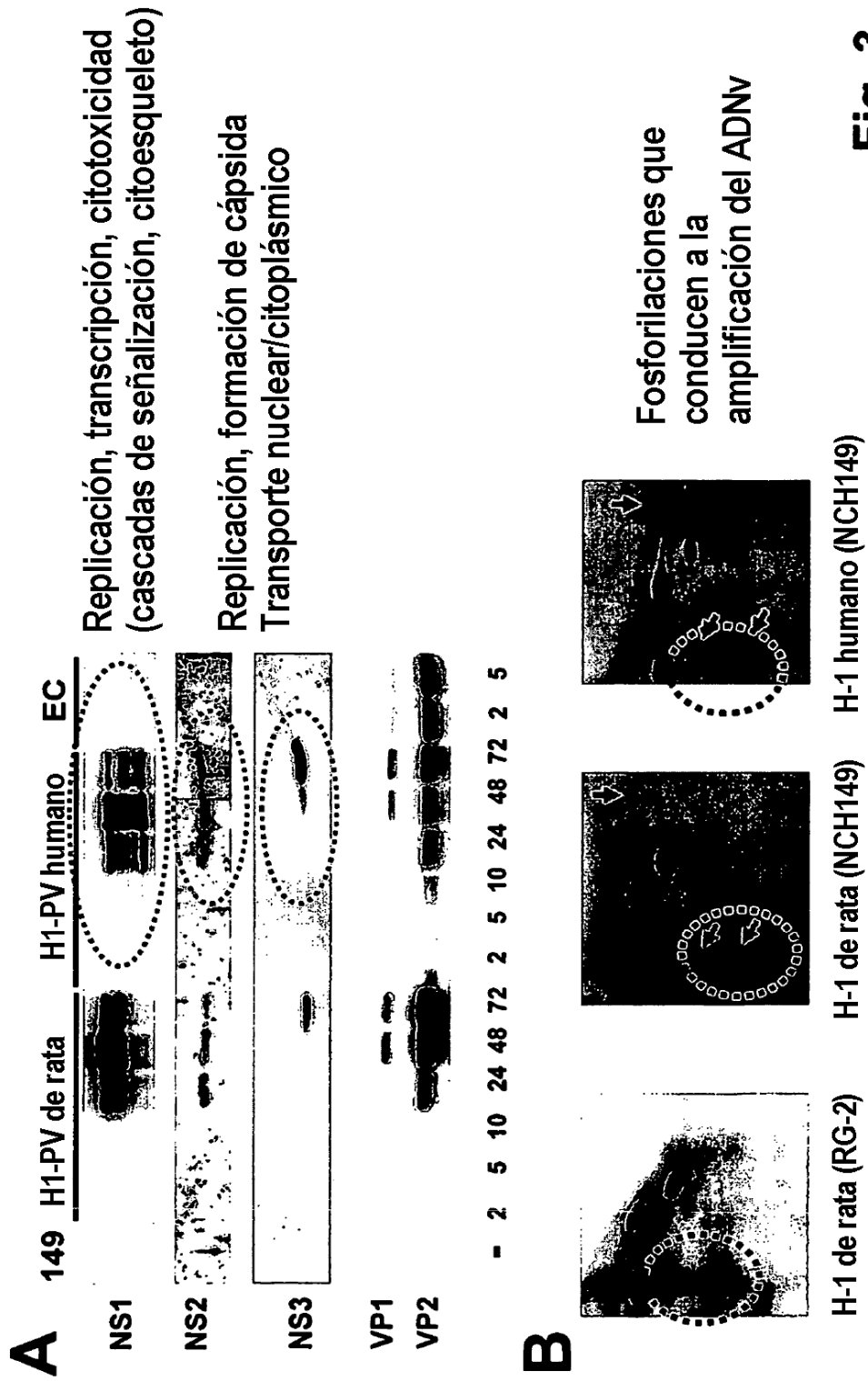


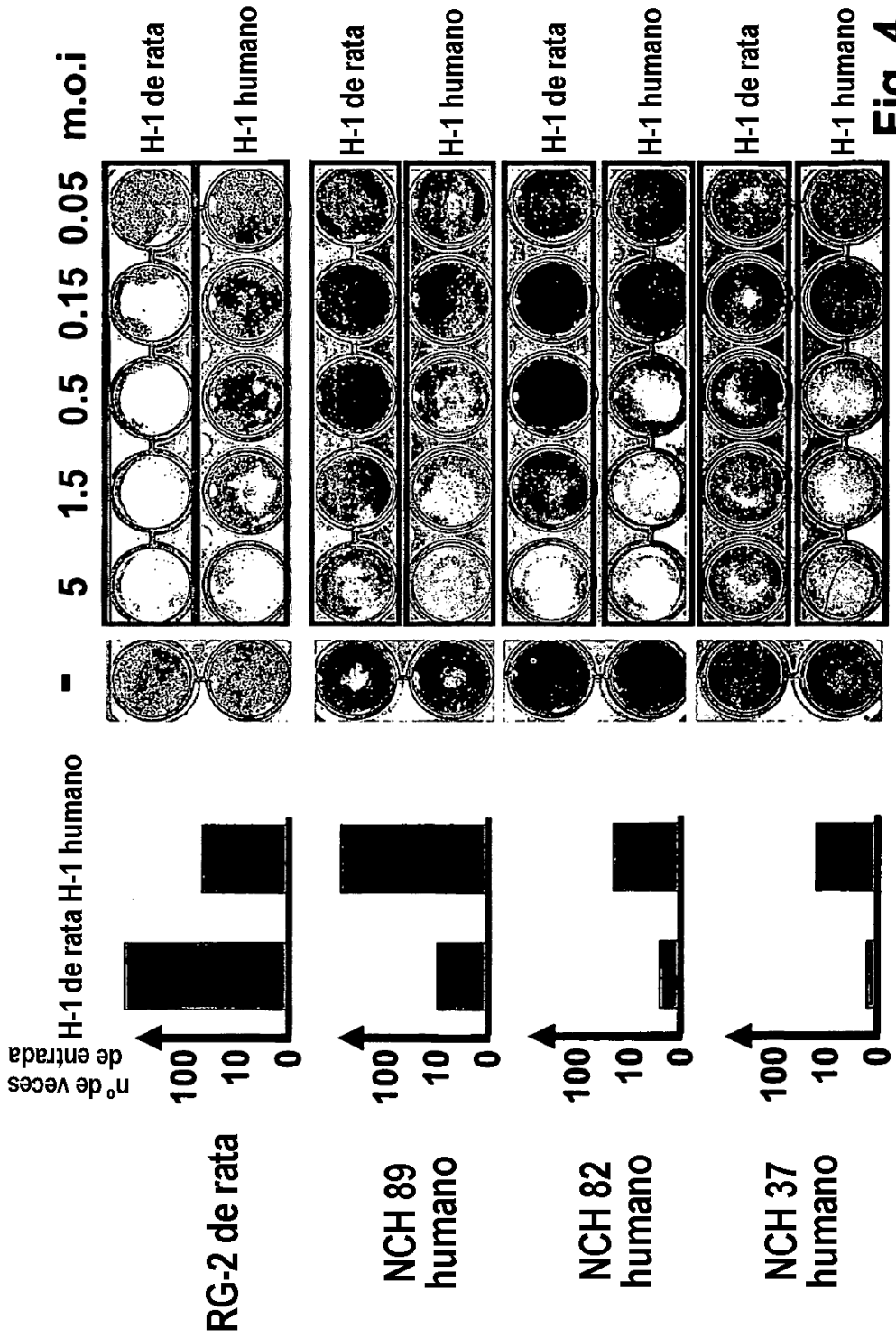
Fig. 2

# La adaptación conduce a cambios en proteínas no estructurales de H1-PV humano en glioma humano

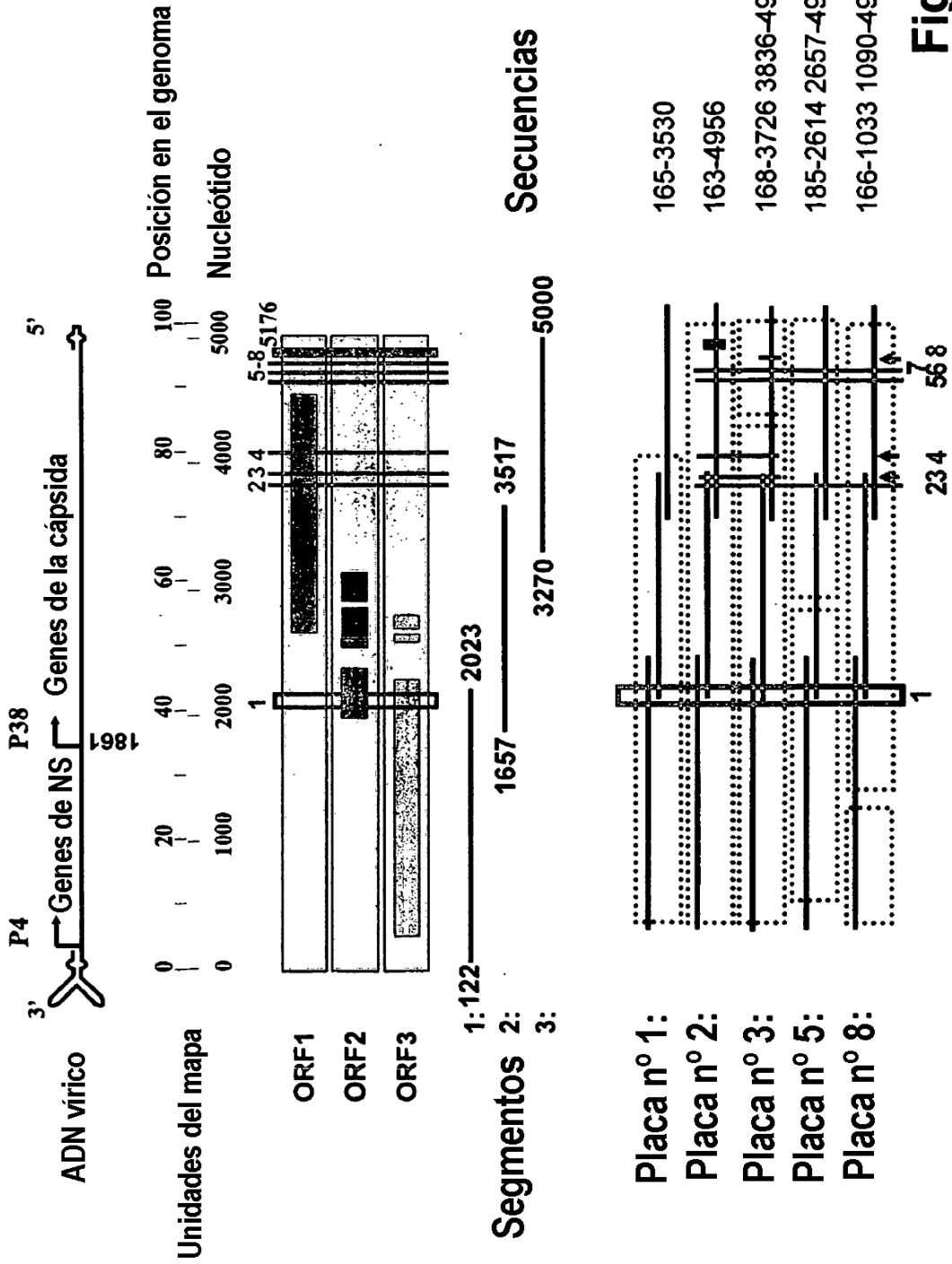


**Fig. 3**

# La multiplicación conduce a una difusión a través de cultivos de glioma humano



# Anexo 2: Variantes de H1-PV: Localización y Clones



**Fig. 5**



Variación nº 1: (nts deletados en *cursiva*)  
 2100 -  
 GCACACAAA TACTCCTGTT GCGGGCACTG  
 CAGCAAGCCA AAACACTGGG  
 GAGGCTGGTT CCACAGCCTG CCAAGGTGCT  
 CAACGGAGCC CAACCTGGTC  
 CGAGATCGAG -2211  
 Variación nº 2: (nt cambiado en **negrita/cursiva**)  
**bold/italics**  
 3900 -GCTGGCGAGG ACTATGATGC -3921  
 Variación nº 3 (nt cambiado en **negrita/cursiva**)  
**bold/italics**  
 3950 -ACAACATGGC GAA~~A~~ATTGGG -3971  
 Variación nº 4: (nt cambiado en **negrita/cursiva**)  
**bold/italics**  
 4100 -GCGAGAA~~A~~AC GCCATAGCTG -4121  
 Variación nº 5: (nt deletado °)  
 4660 -TAT~~°~~AAAAAT AACATAATAT -4681  
 Variación nº 6: (nt insertado en **negrita/cursiva**)  
**bold/italics**  
 4670 -AACATAATAT GGTAT~~T~~GGTTAA -4691  
 Variación nº 7: (nt cambiado en **negrita/cursiva**)  
**bold/italics**  
 4690 -CTGTAAAAA CAATAGAACT -4711  
 Variación nº 8: (nt insertado en *cursiva*)  
 4800 -AGATAGA  
 ATATAAGAAGATTTTGTATTTTAAAAATAAATATAGTTAGTT  
 GGTTAATGTTAGATAGA  
 ATA TAAAAAGATT -4821

Fig. 6

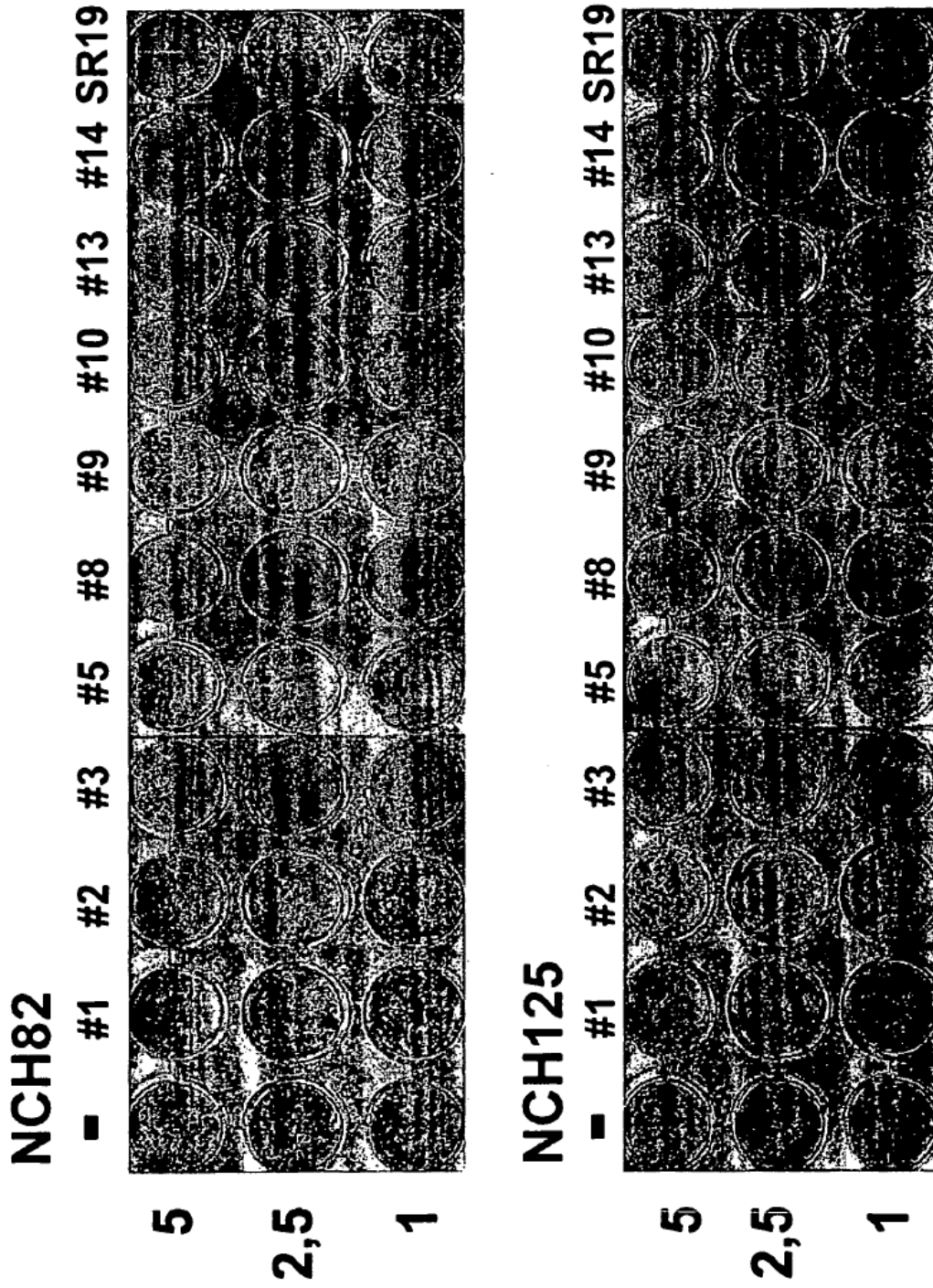


Fig. 7

# Figura 8

**NS1**

MAGNAYSDEV LGVTNWLKDK SSQEVFSFVF KNENVQLNGK DIGWNSYRKE  
 LQDDELKSLQ RGAETTDQSD EDMEWESAVD DMTKKQVFIF DSLVKKCLFE  
 VLSTKNIAPS NVTWFVQHEW GKDPGWCHV LIGGKDFSQP QGKWWRRQLN VYWSRWLVTA  
 CNVQLTPAER IKLREIAEDS EWTLLTYKH KHTKKDYTKC VLFGNMIAYY FLSKKKICTS  
 PPRDGGYFLS SDSGWKTNFL KEGERHLVSK LYTDKMPET VETTVTTAQE AKRGRIQTR  
 EVSIKTTLKE LVHKRVTSPE DWMMQPDY IEMMAQPGGE NLLKNTLEIC TLTLARTKTA  
 FDLILEKAET SKLANFSMAS TRTCRIFAEH GWNYIKVCHA ICCVLNRQGG KRNTVLFHGP  
 ASTGKSIIAQ AIAQAVGNVG CYNAANVNFV FNDCTNKNLI WVVEAGNFGQ  
 QVNQFKAICS GQTIRIDQKG KGSKQIEPTP VIMTTNENIT VVRIGCEERP EHTQPIRDRM  
 LNIHLTRTLP GDFGLVDKHE WPLICAWLVK NGYQSTMACY CAKWGKVPDW SEDWAEPKLD  
 TPINSLGSMR SPSLTPRSTP LSQNYALTPL ASDLADLAL PWTSPNTPVA **GTAASQNTGE**  
 AGSTACQGAQ RSPTWSEIEA DLRACFSQEQ LESDFNEELT LD

D1: **dl aa619-646; P124Q; E280K**

**NS2**

MAGNAYSDEV LGVTNWLKDK SSQEVFSFVF KNENVQLNGK DIGWNSYRKE  
LQDDELKSLQ RGAETTDQSD EDMEWESAVD MTKKFNALTI SDSEKYASQP  
KLRSYSTCIG PCGPSSRALE HTKYSCCGHC SKPKHWGGWF HSLPRCSTEP  
NLVRDRGGFE SLLOSRTVGE RLQAGADLGL RYGVLMYDYL FYRPEITWF

D1:dl aa126-153

**VP1/2**

MAPPAKRAKR GWVPPGYKYL GPGNSLDOGE PTNPSDAAAK EHDEAYDOYI  
KSGKNPYLYF SPADQRFIDQ TKDAKWGGK VGHYEFRTKR AFAPKLSTDS  
EPGTSGETSGV SRPGKRTKPP AHIFVNOARA KKKRASLAAQ ORTLT

MSDGTETNQP DTGIANARVE RSADGGGSSG GGGGSGGGGI GVSTGTYDNQ  
 TTYKFLGDGW VEITAHASRL LHLGMPPSEN YCRVTVHNNQ TTGHGTVKVK

*D(in)*

NMAYDTHQOI WTPWSLVDAN AWGVWFQPSD WQFIQNSMES LNLDSLSQEL  
 FNVVVKTVTE QQGAGQDAIK VYNNDLTACM MVALDSNNIL PYTPAAQTSE TLGFYPWKPT  
 APAPYRYFF MPRQLSVTSS NSAEGTQITD TIGEPQALNS

*GMPPR (sb)*

QFFTIENTLP ITLLRTGDEF TTGTIYFNTD PLKLTHTWQT NRHLACLQGI  
 TDLPTS DAT ASLTANGDRF GSTQTQNVNY VTEALRTRPA QIGFMQPHDN  
 FEANRGGPEK VPVPLDITA GEDHDANGAI RFNYGKQHGE DWAKQGAPE  
 RYTWDAIDSA AGRDTARCFV QSAPISIPPV QNQILQREDA IAGRTNMHYT  
 NVFNSYGPLS AFPHDPPIYP NGQIWDKELD LEHKPRLHVT APFVCKNNPP

*N (sb)*

GQLFVHLGPN LTDQFDPNST TVSRIVTYST FYWKGILKFK AKLRPNLTWN  
 PVYQATTDV ANSYMNVKKW LPSATGNMHS DPLICRPVPH MTY

2: **H374Y; 3: D391N; 4: D439S**