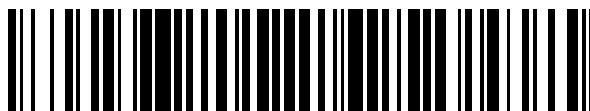


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 294**

51 Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 5/074 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2009** **E 13153949 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.09.2014** **EP 2597154**

54 Título: **Vectores pseudotipos LCMV-GP-VSV y células productoras de virus infiltrantes en tumores para el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

08.10.2008 DE 102008050860

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

24.11.2014

73 Titular/es:

**VIRATHERAPEUTICS GMBH (100.0%)
c/o Sektion für Virologie, Medizinische
Universität Innsbruck, Peter-Mayr-Strasse 4b
6020 Innsbruck , AT**

72 Inventor/es:

**VON LAER, DOROTHEE y
HEIMANN, TSANAN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 523 294 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

Vectores pseudotipos LCMV-GP-VSV y células productoras de virus infiltrantes en tumores para el tratamiento de tumores.

La presente invención se refiere a virus recombinantes derivados de la estomatitis vesicular (VSV) y vectores víricos que comprenden un gen que codifica la glicoproteína GP del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), células empaquetadoras que producen los viriones VSV pseudotipados con GP-LCMV, y el uso de dichos viriones y células empaquetadoras para la preparación de una composición farmacéutica para la terapia de tumores sólidos.

Descripción del estado de la técnica

Los gliomas malignos, el mayor grupo de tumores cerebrales intracraneales primarios, representan un problema terapéutico que no se ha resuelto todavía. Aunque el conocimiento de la biología de estos tumores ha crecido debido a la intensa investigación básica, el progreso y pronóstico clínicos son aún muy malos.

Los gliomas malignos son tumores de origen neuroepitelial y se dividen citológicamente en ependimomas, oligodendrogliomas, oligoastrocitomas, astrocitomas y glioblastomas. Con una proporción de más del 60%, los astrocitomas infiltrantes difusos (grado de la OMS II-IV) representan el mayor grupo de tumores intracraneales. La clasificación de la OMS revisada en 2001 está en su mayor parte establecida como esquema de clasificación para astrocitomas. Según la OMS, los tumores cerebrales se asignan por medio de criterios histológicos en 4 grados de malignidad (Kleihus y Cavenee, 2000). El pronóstico para astrocitomas infiltrantes difusos es generalmente malo. Por una parte, el pronóstico depende del grado de malignidad y, por otra, de la localización del tumor y el procedimiento de terapia. El índice de supervivencia medio para pacientes con un astrocitoma de grado II de la OMS es de más de 5 años, con un astrocitoma de grado III de la OMS, de 2 a 5 años, y con un astrocitoma-glioblastoma de grado IV de la OMS (= glioblastoma), menos de 1 año.

La patogénesis molecular de tumores es un proceso complejo y se basa en mutaciones de diferentes genes que son responsables del control del ciclo celular. Las mutaciones en el gen supresor tumoral p53 son las alteraciones más frecuentemente encontradas en tumores humanos y también son responsables del desarrollo de astrocitomas de grado bajo así como de la progresión al glioblastoma secundario. Sin embargo, los glioblastomas primarios desarrollados tienen muy raramente mutaciones en p53. Se sospecha que un gen adicional, que indica una tendencia maligna de los astrocitomas difusos, está en el brazo largo del cromosoma 19. Genes adicionales que con frecuencia están alterados en caso de glioblastoma son los oncogenes MDM2 y MDM4 y también el gen supresor tumoral p14ARF, que están implicados en el control del ciclo celular dependiente de p53 (Dai y Holland, 2001). Se observa una amplificación del gen del receptor de EGF en el 30-40% de los glioblastomas primarios y por tanto es el oncogén más frecuentemente amplificado en este grupo de tumores (Holland, 2001). La mayoría de los gliomas malignos responden mal a quimio- o radioterapia. Se asume que la razón para esto son las mutaciones de genes asociados al ciclo celular que también están implicados en la regulación de apoptosis.

Se necesitan urgentemente métodos de terapia más eficaces para gliomas malignos ya que de los métodos de terapia existentes tales como quimio- o radioterapia, no se pueden esperar mejoras significativas para el pronóstico de la enfermedad. En contraste, la terapia génica del glioblastoma ofrece posibilidades prometedoras que se necesita explotar. Se desarrollaron una pluralidad de genes diferentes muy eficaces para este fin. Para la mayoría de ellos, están disponibles datos de experimentos en animales (Shir y Levitzki, 2001). Estos genes terapéuticos se pueden asignar a cuatro principios de actuación diferentes:

- (i) El producto génico de los denominados genes suicidas convierte precursores en moléculas citotóxicas. Un ejemplo es la timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple (HSV) en relación con una dosis de ganciclovir. Una ventaja particular es que el trifosfato de ganciclovir tóxico difunde a células adyacentes, por cual tiene un lugar un efecto espectador. En los últimos años, la actividad de esta enzima ha aumentado adicionalmente. TK de HSV es actualmente una posibilidad muy eficaz para eliminar células tumorales así como células productoras de vector implantadas.
- (ii) La expresión de citoquinas inmunoestimuladoras tales como IL-4 puede estimular la defensa natural contra células tumorales.
- (iii) La secreción de proteínas antiangiogénicas tales como la endostatina produce una falta de vasos sanguíneos y por tanto una falta de suministro de nutrientes en el tejido tumoral metabólicamente muy activo. El tumor muere virtualmente "de hambre".
- (iv) Por último, se han descrito una serie de genes que intervienen en la transducción de señales o el ciclo celular de la célula tumoral para inhibir el crecimiento incontrolado de estas células. Sin embargo, las posibilidades de uso de estos genes en clínica están limitados porque estos genes actúan solo en la célula genéticamente modificada misma y no tienen el efecto espectador como los principios activos mencionados primero. Esto significa que para alcanzar un efecto terapéutico, virtualmente todas las células malignas tienen que estar genéticamente modificadas lo que es imposible incluso con sistemas de vectores ideales.

Gracias a la variedad de principios de acción eficaces existentes, se cumple el prerrequisito más importante para una terapia génica con éxito del glioblastoma. Sin embargo, un problema que aún no se ha resuelto es la transferencia génica ineficaz y una mala expresión del gen terapéutico en las células diana. Esto también es la razón por la que, a pesar de la multitud de genes terapéuticos eficaces, la terapia génica de glioblastoma fracasara en la clínica.

La ventaja de la transferencia génica vírica sobre los métodos de transfección fisicoquímicos es la mayor tasa de transferencia génica y la expresión a largo plazo de los genes porque los virus han desarrollado mecanismos particularmente eficaces para introducir su genoma en células y expresarlo. En particular virus competentes para replicación tales como, entre otros, virus del herpes simple (HSV), adenovirus (Ad), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) y el virus de la estomatitis vesicular (VSV) se usan actualmente como virus oncolíticos (VO). Para una viroterapia óptima de glioblastomas, los VO deben tener las siguientes características:

- (i) Deben tener un tropismo específico de tumor, por lo cual la replicación del virus y la lisis celular permanecen limitadas al tejido tumoral. Esta propiedad se puede aumentar por modificación de la envuelta vírica o usando promotores específicos de tumores. Puesto que la asunción es que solo una pequeña parte de las células del glioma se divide durante el tratamiento, los virus que infectan las células en reposo así como las células en proliferación son ventajosos.
- (ii) Con respecto a aspectos relevantes de seguridad, los virus con alta estabilidad genética y una baja toxicidad fuera del tejido tumoral son particularmente adecuados para el uso clínico. Esto permite un título de virus alto y una purificación de los vectores bajo condiciones GMP. Idealmente, los VO deben ser apatogénicos para seres humanos y deben tener un bajo índice de infección entre la población. Una inmunidad ya existente produciría una neutralización prematura del virus y por tanto no permitiría una terapia eficaz.

Los ejemplos prominentes para virus oncolíticos en la terapia de glioblastomas son las variantes atenuadas de HSV G207 y 1716 y el adenovirus ONYX-015. Una objeción sería contra el uso de HSV oncolítico para el tratamiento de tumores en el SNC es su alto nivel de replicación en células cerebrales normales lo que puede producir una encefalitis potencialmente mortal. Por otra parte, además de la potencial persistencia, existe la posibilidad de reactivación de un HSV latente. La variante de HSV 1716, que se generó delecionando una pluralidad de genes, se replica selectivamente en células que proliferan rápidamente del SNC pero no en neuronas posmitóticas. Debido a eso, la neurotoxicidad de HSV se redujo significativamente. El tratamiento de gliomas experimentales en la rata y el ratón con HSV 1716 produjo la destrucción selectiva de células tumorales mientras que el tejido cerebral circundante permaneció sin dañar. ONYX-015 es un virus oncolítico adicional que se desarrolló para terapia de glioblastoma. Mediante una delección en el gen E1B, se pretende que este adenovirus lise selectivamente células con p53 deficiente.

HSV oncolíticos así como ONYX-015 ya se han probado clínicamente para el tratamiento de gliomas. Ambos virus oncolíticos atenuados mostraron una seguridad suficiente en estudios clínicos de fase I/II. Independientemente de si los virus se inyectaron por vía intratumoral o en la cavidad de resección, el tratamiento se toleró bien y no se observaron efectos secundarios serios. Sin embargo, los efectos citolíticos fueron solo de naturaleza transitoria, siempre seguidos por una recaída (Cutter et al., 2206). Puesto que normalmente la velocidad de proliferación de los gliomas supera la velocidad de amplificación y por tanto la ola de propagación del virus, la destrucción de gliomas solo por oncolisis es cuestionable. De hecho, para un tratamiento eficaz, se requiere la combinación de una pluralidad de principios activos. Usando genes suicidas o genes inmunomoduladores en VO, se demostró un efecto sinérgico en estudios preclínicos (Tyminski et al., 2005; Fukuhara et al., 2005).

Además de los virus de ADN anteriormente mencionados, también están en desarrollo virus oncolíticos de ARN. VSV es un virus de cadena negativa con envuelta, cuyo espectro de huéspedes comprende roedores y ganado. Las infecciones de seres humanos son raras y en su mayor parte asintomáticas. Debido a la seroprevalencia muy baja entre la población, no se espera una alteración de la eficacia de la terapia por anticuerpos neutralizantes contra VSV. La infección y la replicación citoplásmicas de VSV tienen lugar independientemente del ciclo celular de modo que las células que se dividen activamente y las células en reposo son igualmente infectadas. La lisis eficaz y preferente de células neoplásicas por VSV está relacionada con la ruta de señalización de interferón principalmente deficiente y la replicación vírica acompañante en estas células (Wollmann et al., 2007). También se demostró que independiente de la respuesta inmune celular, las células tumorales con defectos en los genes Myc, Ras o p53 también apoyan la reproducción de VSV (Barber, 2004). La especificidad tumoral de VSV se optimizó adicionalmente en los últimos años mediante la preparación de virus recombinantes. El foco principal aquí es sobre variantes con mutación en la proteína M ($\Delta M51$). Esta variante no puede prevenir la respuesta de interferón en células sanas, por lo cual la replicación del virus en tales células se suprime. En células tumorales con respuesta de IFN deficiente, el virus se puede replicar y por tanto ser selectivamente oncolíticamente activo. Incluso después de la aplicación sistémica, VSV ^{$\Delta M51$} mostró una oncolisis segura y eficaz de gliomas humanos en el modelo de ratón (Lun et al., 2006).

La aplicación de vectores víricos directamente en el cerebro requiere una alta selectividad para células tumorales y solo es posible en volúmenes relativamente pequeños. Por tanto, una transferencia génica eficaz solo se puede

lograr con preparaciones de vectores altamente concentradas ($>10^8$ /ml) que tienen un tropismo fuertemente desarrollado para células de glioma. En el caso de vectores gamma-retrovíricos y lentivíricos, el tropismo del vector y la estabilidad del vector pueden estar influidos mediante integración de una proteína de envuelta no retrovívica. En muchos casos, la proteína de envuelta retrovívica se sustituye con la proteína G más estable de VSV. Un problema de estos denominados vectores pseudotipados es que VSV-G es tóxica para las células, es decir, en las células productoras así como para el tejido sano circundante, que previamente obstaculizaba un uso extenso de tales pseudotipos VSV-G en la clínica.

Los inventores han desarrollado previamente un tipo de vector retrovívico que permite una transferencia génica eficaz en células de glía del SNC. En este nuevo tipo de vector, la glicoproteína GP del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) sirve como proteína de la envuelta vírica (Miletic et al., 1999; Beyer et al., 2002; documento EP 1 006 196). En estudios comparativos de tropismo in vitro e in vivo se demostró que los pseudotipos LCMV-GP transducen preferentemente células de glioma (Miletic et al., 2004; Miletic et al., 2007). En contraste a eso, los pseudotipos VSV-G transducen preferentemente neuronas; mientras que la transferencia génica en células de glioma era menos eficaz que con pseudotipos LCMV-GP. También células tumorales infiltrantes individuales se transducían eficazmente por pseudotipos LCMV-GP. En el modelo de glioma en rata, el 90% de las ratas sanaron mediante inyección intratumoral de vectores lentivíricos LCMV-GP pseudotipados (Miletic et al., 2007b). Los vectores usados codificaban la timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple, con el efecto de que en las células transducidas así como en las células circundantes, ganciclovir se convirtió en un compuesto trifosfato tóxico para la célula.

No solo la transferencia génica selectiva en gliomas sino también una distribución de vector eficaz en todo el tumor son decisivos para el éxito de la terapia. Por tanto, los inventores han desarrollado células empaquetadoras infiltrantes en tumores que se supone que liberan los vectores pseudotipados en el tumor entero (documento WO 2006/008074). Un tipo celular prometedor con capacidades migratorias es la célula progenitora adulta, multipotente, que se puede aislar de la médula ósea (Jiang et al., 2002). En experimentos de trasplante, se examinó el comportamiento de migración de estas células usando el modelo de glioma en rata. Se demostró que las células progenitoras penetraron eficazmente la masa tumoral, pero no infiltraron el tejido cerebral sano circundante (Fischer et al., 2007). Las líneas celulares convencionales tales como fibroblastos de ratón 3T3, fibroblastos de rata Rat-1 o 293T humanos no mostraron infiltración tumoral. Más bien, estas células estaban localmente limitadas al sitio de inyección o la vecindad y no mostraron migración específica de glioma.

En un estudio adicional, los inventores examinaron la eficacia terapéutica de células progenitoras que expresan TK en el modelo de glioma en rata. El resultado de este estudio fue que en el 70% de las ratas la destrucción del tumor se debió solamente al efecto espectador entre células progenitoras y células tumorales (Miletic et al., 2007). Además, se confirmó la localización intratumoral de las células progenitoras por medio de métodos de imágenes. Los cortes histológicos del cerebro de ratas sin síntomas, tratadas tenían una cavidad con tejido cicatricial pronunciado en la localización del tumor; esto indica que el tumor en los animales se erradicó con éxito por la terapia génica. Gracias al fuerte potencial de expansión de estas células progenitoras, es posible una modificación genética con selección posterior de clones de células empaquetadoras individuales. Se desarrolló una célula empaquetadora basada en progenitoras para pseudotipo LCMV-GP gamma-retrovíricos. Estas células empaquetadoras producen continuamente vectores retrovíricos con un título de $1-7 \times 10^3$ TU/ml. Los títulos permanecieron estables durante varias semanas y después de congelación y descongelación repetida de las células (Fischer et al., 2007).

La transferencia génica ineficaz in vivo y no la falta de genes terapéuticamente eficaces evita actualmente la terapia génica con éxito del glioblastoma. Los vectores previamente conocidos para la terapia génica y viroterapia oncolítica de gliomas no son óptimos por varias razones. La eficacia, especificidad y seguridad de los métodos previos de transferencia génica se deben aumentar a tal nivel que sea posible una transferencia génica terapéuticamente eficaz en pacientes.

Por tanto, es el objeto de la presente invención desarrollar un sistema de transferencia génica vírica oncolítica muy potente para genes terapéuticos para la terapia de tumores cerebrales altamente malignos tales como gliomas y otros tumores sólidos.

55 **Compendio de la invención**

Por tanto, el objeto de la invención es un vector pseudotipo del virus de la estomatitis vesicular (VSV) que comprende un gen que codifica una glicoproteína GP del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) y ningún gen funcional que codifica para la proteína de la envuelta G del VSV. LCMV-GP puede ser la glicoproteína GP-1 o GP-2 del LCMV.

Según una forma de realización adicional, en el vector pseudotipo VSV-LCMV-GP, la proteína de la envuelta G del VSV se sustituye por LCMV-GP.

Según una forma de realización adicional, el vector carece de al menos un gen seleccionado del grupo de los genes *n*, *l*, *p* y *m* que codifican las proteínas N, L, P y M del VSV.

- 5 Según una forma de realización adicional, la proteína M del VSV comprende mutaciones que reducen la citopatogenicidad del VSV. Los ejemplos de mutaciones que producen citopatogenicidad reducida de VSV son intercambios de aminoácidos en la región ³⁷PSAP⁴⁰ de la proteína M así como las mutaciones M33A, M51A, V221F, S226R o su combinación.
- 10 Según una forma de realización adicional, el vector pseudotipo VSV-LCMV-GP comprende al menos un transgén terapéuticamente aplicable. El transgén puede ser un gen suicida o un gen inmunoestimulador. Los ejemplos de genes suicidas son genes que codifican la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), citosina desaminasa, FKBP-FAS o FKBP-caspasa 9. Los ejemplos de genes inmunoestimuladores son genes que codifican las citoquinas IL-2, IL-4, IL-12, anti-TGFbeta neutralizante o Flt3L.
- 15 Según una forma de realización adicional, el vector pseudotipo VSV-LCMV-GP comprende un gen marcador. El gen marcador puede ser LacZ, un gen de resistencia a antibióticos o un gen que codifica una proteína fluorescente (GFP, RFP, GGP, etc.).
- 20 El objeto de la invención es además un sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP que comprende al menos dos vectores VSV complementarios replicativos (cr), en donde un vector del sistema de vectores comprende un gen gp que codifica LCMV-GP, en donde el sistema de vectores comprende además los genes *n*, *l*, *p* y *m* que codifican las proteínas N, L, P y M del VSV y ningún gen funcional que codifique la proteína de la envuelta G del VSV, en donde cada vector del sistema de vectores carece de uno de los genes ("gen complementario") *gp*, *n*, *l*, *p* y *m*, y en donde el gen que falta está presente en cualquier otro vector del sistema de vectores. Los genes *m* y *gp* son genes complementarios preferidos.
- 25 Según una forma de realización adicional, la proteína M del vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP comprende mutaciones que reducen la citopatogenicidad del VSV, como se ha ilustrado anteriormente.
- 30 Según una forma de realización adicional, el sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP comprende al menos un transgén terapéuticamente aplicable y/o un gen marcador, como se ha ilustrado anteriormente. El transgén/gen marcador puede estar localizado en cualquier vector del sistema de vectores.
- 35 El objeto de la invención es además un virión VSV pseudotipado con LCMV-GP que comprende una proteína GP del LCMV como proteína de la envuelta.
- 40 El objeto de la invención es además una célula productora de virus que produce un virión VSV pseudotipado con LCMV-GP.
- 45 Según una forma de realización adicional, la célula productora de virus es una célula madre adulta. La célula madre adulta puede ser una célula progenitora adulta multipotente (MAPC), una célula madre neuronal (NSC), una célula madre mesenquimatosas (MSC), una célula BM-TIC (célula infiltrante en tumor derivada de médula ósea) derivada de MSC.
- Según una forma de realización adicional, la célula productora de virus comprende uno o más casetes de expresión para la expresión de genes seleccionados del grupo que consiste en los genes *n*, *l*, *p* y *m* que codifican las proteínas N, L, P y M del VSV, respectivamente, y un gen *gp* que codifica la glicoproteína LCMV-GP.
- 50 Según una forma de realización adicional, la célula productora de virus comprende además un vector de transferencia génica para empaquetar en un virión VSV pseudotipado con LCMV-GP.
- 55 Según una forma de realización adicional, el vector de transferencia génica comprende un transgén terapéuticamente aplicable y/o un gen marcador, como se ha ilustrado anteriormente.
- El objeto de la invención es además un método in vitro para transferir un transgén a una célula, método en el que la célula se transduce con un virión VSV pseudotipado con LCMV-GP, en donde el virión comprende un transgén.
- 60 El objeto de la invención es además un método in vitro para transferir un transgén a una célula, método en el que la célula se pone en contacto con una célula productora de virus que produce un virión VSV pseudotipado con LCMV-GP, en donde el virión comprende un transgén.
- Se prefiere que la célula sea una célula tumoral, por ejemplo, una célula de glioma.
- 65 El objeto de la invención es además el uso de un vector pseudotipo VSV-LCMV-GP o un sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para la terapia de un tumor sólido.

El objeto de la invención es el uso de un virión VSV pseudotipado con LCMV-GP para la preparación de una composición farmacéutica para la terapia de un tumor sólido.

5 El objeto de la invención es además el uso de una célula productora de virus de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para la terapia de un tumor sólido. Se prefiere que el tumor sea un tumor cerebral, en particular un glioma.

10 Según una forma de realización adicional, se usan al menos dos células productoras de virus para la preparación de una composición farmacéutica para la terapia de un tumor sólido, en donde una primera célula productora de virus comprende un primer vector del sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP y una segunda célula productora de virus comprende un segundo vector del sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP.

15 Además, el objeto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un vector pseudotipo VSV-LCMV-GP, un sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP, un virión VSV pseudotipado con LCMV-GP o una célula productora de virus que produce un virión VSV pseudotipado con LCMV-GP. La composición también puede comprender sustancias auxiliares y/o soportes adecuados.

Descripción de las figuras

20 Figura 1: Pseudotipado de vectores VSVgfp ncp-ΔG con LCMV-GP.

Figura 2: Transducción de líneas de células de glioma con vectores VSV-LCMV-GP.

25 Figura 3: Pseudotipado de vectores VSVgfp ncp-ΔG con LCMV-GP en BM-TIC.

Figura 4: Ilustración esquemática del sistema de vectores VSV-LCMV-GP cr. a) uno de los vectores comprende rfp en lugar de la fosfoproteína P y LCMVGP en lugar de VSV-G. b) El vector complementario codifica la proteína P que falta en a), pero comprende en lugar de una glicoproteína vírica, por ejemplo, la timidina quinasa (TK) del virus del herpes simple como gen terapéutico. Ambos vectores comprenden un gen M modificado (Mncp).

30 Figura 5: Ilustración esquemática de los vectores víricos. En el vector optimizado, se supone que el gen terapéutico se clona en lugar de la proteína P. Junto con los genes inmunomoduladores (IL-12, Flt3L), el segundo vector comprende además la timidina quinasa (TK) de HSV.

35 Descripción de la invención

La invención se refiere a virus de la estomatitis vesicular (VSV) recombinantes y vectores VSV. El genoma de VSV comprende cinco genes l, m, n, p y g que codifican las proteínas L, M, N, P y G y que son esenciales para la reproducción del virus. N es una nucleoproteína que empaqueta el ARN genómico de VSV; el genoma de VSV solo se puede replicar como complejo ARN-proteína. L y P juntas forman un complejo polimerasa que replica el genoma de VSV y transcribe el ARNm de VSV. M es una proteína de matriz que forma un tipo de kit entre la envuelta lipídica y la nucleocápside y es importante para la gemación de partículas en la membrana celular. G es la proteína de la envuelta que se incorpora en la envuelta vírica y es esencial para la infectividad del virus.

45 El objeto de la invención es un vector pseudotipo VSV-LCMV-GP y un virión VSV pseudotipado con LCMV-GP. El vector de la invención comprende un gen *gp* que codifica la proteína GP en lugar del gen *g* que codifica la proteína G del VSV. Según esto, el virus/virión de la invención comprende una proteína LCMV-GP como proteína de la envuelta. La proteína LCMV-GP puede ser GP1 o GP2. La invención incluye proteínas GP de diferentes cepas de LCMV. En particular, las variantes de LCMV-GP pueden derivar de LCMV de tipo salvaje o cepas de LCMV LCMV-WE, LCMV-WE-HPI, LCMV-WE-HPlopt (documento WO 2006/008074).

Los vectores que se basan en el virus de la estomatitis vesicular tienen ventajas sobre los vectores retrovíricos:

- 55 (i) Los vectores VSV son oncolíticos y tienen una actividad oncolítica particularmente alta comparada con otros vectores víricos oncolíticos.
- (ii) Los vectores VSV se replican preferentemente en células tumorales y tienen una capacidad de replicación particularmente alta comparados con otros vectores víricos oncolíticos.
- (iii) Los vectores VSV infectan células que se dividen activamente así como células en reposo.
- 60 (iv) Los vectores VSV inducen una respuesta inmune humoral y celular innata fuerte.
- (v) Los vectores VSV se replican puramente en el citoplasma, es decir, como virus ARN no se pueden integrar en el genoma de la célula huésped o recombinarse en virus competentes para replicación.
- (vi) Los vectores VSV son fáciles de empaquetar.
- (vii) La glicoproteína de VSV es intercambiable con una proteína de envuelta exógena. Los ejemplos para glicoproteínas que se han incorporado previamente en la envuelta de VSV son: VIHgp160 (Owens y Rose 1993), HCVE1/E2 (Tani et al., 2007), SARS S (Ge et al., 2006) y GP de Lassa (Garbutt et al., 2004).
- 65

En conjunto, los vectores VSV tienen un potencial terapéutico particularmente alto.

Otra ventaja del vector pseudotipo VSV-LCMV-GP según la invención es una toxicidad considerablemente reducida de los virus VSV pseudotipados con LCMV-GP contra células cerebrales sanas, es decir, neuronas. La neurotoxicidad del VSV se atribuye a la proteína G del VSV (Shinosaki et al., 2005). Realmente, los pseudotipos VSV-G preferentemente infectan neuronas normales. Puesto que el neurotropismo es un factor limitante de la dosis en todas las aplicaciones de VSV oncolíticos, el uso del vector según la invención es una gran ventaja para todos los tumores.

Además, el vector pseudotipo VSV-LCMV-GP tiene una especificidad aumentada por células de tumores cerebrales que vuelve al tropismo específico de glioma de la glicoproteína LCMV-GP usada y la transcripción/replicación selectiva de VSV en células tumorales. En contraste a VSV-G, la proteína de envuelta LCMV-GP tiene un tropismo particular por células de glioblastoma. Sin embargo, el vector según la invención se puede usar con éxito en otros tumores fuera del SNC porque allí también la neurotoxicidad de VSV, en particular en el caso de aplicación sistémica, es un factor limitante de la dosis.

Los vectores pseudotipados con LCMV-GP tienen tres características cruciales que los vectores no pseudotipados no tienen, es decir:

- (i) LCMV-GP no tóxica para la célula.
- (ii) Los vectores pseudotipo LCMV-GP se pueden concentrar por ultracentrifugación sin pérdida de infectividad.
- (iii) Los vectores pseudotipo LCMV-GP muestran un tropismo preferido por células de glía, mientras que las neuronas se infectan ineficazmente.

La invención incluye virus deficientes para replicación así como competentes para replicación. Los últimos tienen una ventaja adicional porque se puede alcanzar una velocidad de transducción alta usando virus capaces de reproducción. A este respecto, los vectores víricos oncolíticos replicables son más eficaces que los vectores incompetentes para replicación.

Para aumentar la seguridad durante el uso de virus replicables en usos terapéuticos, se proporciona un sistema de vectores que asegura que la replicación, oncolisis y la producción de virus VSV tienen lugar solo en células que están infectadas por al menos dos vectores deficientes en replicación mutuamente complementarios.

Por tanto, el objeto de la invención es un sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP que comprende al menos dos vectores VSV complementarios. Tales vectores VSV complementarios de replicación (cr) se pueden propagar a un nivel limitado en el tumor, lo que aumenta la eficacia de la transferencia génica y la oncolisis. Por tanto, el sistema de vectores según la invención permite la preparación de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP con capacidad de reproducción limitada para la transferencia génica en gliomas y otros tumores.

El principio del sistema de vectores según la invención es que cada vector del sistema carece de uno de los genes esenciales *m*, *n*, *l* y *p* del VSV o *gp* del LCMV que, sin embargo, está presente en cualquier otro vector del sistema. El gen *gp* que codifica LCMV-GP así como posibles genes adicionales tales como genes de terapia y/o genes marcadores pueden estar presentes en cualquier vector del sistema.

Diferentes variantes del sistema de vectores según la invención son posibles. Por ejemplo, el sistema de vectores puede consistir en dos vectores como se ilustra en la figura 5. Un primer vector comprende GP de LCMV en lugar de G de VSV y una delección del gen *p* que codifica la proteína P. Tampoco un segundo vector comprende VSV-G pero expresa la proteína P de VSV. Cada vector expresa la nucleoproteína (N) y polimerasa (L) de VSV así como una variante menos citopatogénica de la proteína M (M_{ncp}). El primer vector tiene además el gen marcador *rfp*, mientras que el segundo vector tiene el gen suicida *HSV-TK* y el gen marcador *gfp*. En las variantes ilustradas en la figura 6, ambos vectores pueden comprender un gen terapéutico, en donde el primer vector comprende, por ejemplo, *Flt3L* o *IL-12* y el segundo vector comprende, por ejemplo, *HSV-TK*.

Hasta ahora, se han perseguido diferentes conceptos para la terapia del glioblastoma: (i) la transferencia de genes suicidas, (ii) la eliminación de la inmunosupresión relacionada con glioblastoma usando genes inmunoestimuladores y por medio de inmunoterapia de citoquinas, (iii) la transferencia de factores que contrarrestan la angiogénesis inducida por el tumor, (iv) el uso de moduladores del ciclo celular y (v) la inducción de apoptosis. Para los fines de la invención, se deben considerar principalmente los primeros tres planteamientos (i-iii).

Además de sus propiedades oncolíticas inherentes, los vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP y sistemas de vectores basados en los mismos se pueden mejorar adicionalmente introduciendo genes suicidas y/o genes inmunoestimuladores. Los ejemplos de proteínas suicidas son timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), citosina desaminasa, FKBP-FAS, FKBP-caspasa 9. Los ejemplos de proteínas inmunoestimuladoras son citoquinas tales como IL-2, IL-4, IL-12 y Flt3L, anti-TGFbeta neutralizantes. Las inserciones de genes con un tamaño de hasta 4,5 kb son toleradas por el genoma de VSV de modo que sería incluso posible combinar dos o más genes

terapéuticos (por ejemplo, HSV-TK + citoquina) en un genoma de VSV. Además, los productos génicos ejercen su acción también sobre células tumorales no infectadas por medio de un denominado efecto espectador.

5 Los vectores víricos inyectados penetran desde el sitio de inyección solo unos pocos milímetros en el tejido tumoral. Para optimizar la distribución del vector y para la destrucción dirigida del tumor, se usan células productoras de virus infiltrantes en el tumor que migran específicamente en el tumor liberando de este modo los virus en el sitio remoto del sitio de inyección.

10 Las células productoras de virus en el sentido de la invención incluyen células empaquetadoras clásicas para la producción de viriones a partir de vectores no replicables así como células productoras para la producción de viriones a partir de vectores capaces de reproducción. Las células empaquetadoras habitualmente comprenden uno o más plásmidos para la expresión de genes esenciales que faltan en el vector respectivo para ser empaquetado y/o son necesarios para la producción de viriones.

15 En estudios previos, las células empaquetadoras se usaron para transferir vectores víricos; sin embargo, esto implicaba principalmente fibroblastos que no migran dentro del tumor (Short et al., 1990; Culver et al., 1992). En contraste, las células madre adultas, en particular células madre neuronales (NSC) y mesenquimatosas (MSC) tienen un alto potencial migratorio. Permanecen confinadas al tejido tumoral, por lo cual se alcanza una transferencia génica muy eficaz pero también específica en el tejido tumoral. Sin embargo, estas células madre tienen capacidad de pase limitada in vitro.

20 Una subpoblación de células madre mesenquimatosas adultas, denominadas BM-TIC (células infiltrantes en tumor derivadas de médula ósea) infiltran, después de inyección en gliomas experimentalmente inducidos, el tumor entero y, además, siguen a células tumorales individuales remotas de la masa tumoral (Miletic et al., 2007). Las BM-TIC se aíslan de médula ósea adulta, tienen un alto potencial de expansión y se pueden usar como células productoras que migran para vectores MLV (Fischer et al., 2007) y VSV.

25 El objeto de la invención es por tanto células productoras de virus que producen vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP oncolíticos. En particular, estas son células productoras que infiltran tumores que liberan dichos vectores durante su migración en el tumor. Las células preferidas son célula madre adultas, en particular, células madre neuronales (NSC) y mesenquimatosas (MSC). Las células particularmente preferidas son las células BM-TIC derivadas de MSC.

30 Un obstáculo para la preparación de una célula productora de virus rabdovírico es la citopatogenicidad de las proteínas M y G. Puesto que la proteína G del VSV se sustituye por glicoproteína específica de glioma y no citotóxica del LCMV en los vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP de la invención, solo la proteína M permanece un problema. Para reducir la toxicidad de la proteína M en la línea de células productoras de VSV, se puede usar una variante no citopatogénica de la proteína M.

35 Por tanto, las células productoras de virus de la invención y por tanto también los vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP producidos por dichas células pueden comprender un gen que codifica una proteína M mutada. Esta variante del vector es selectivamente oncolítica para células tumorales, mientras que es no tóxica para células sanas. Se prefieren variantes de M con intercambio de aminoácidos en la región ³⁷PSAP⁴⁰ de la proteína M o con mutaciones únicas (M51R) o múltiples (V221F y S226R; M33A y M51A) fuera de la región PSAP de la proteína M. Una proteína M con mutaciones M33A, M51R, V22F y S226R es particularmente preferida. Para asegurar una producción de virus eficaz en células empaquetadoras, la variante de M se puede transfectar establemente con un antagonista de interferón vírico.

40 Además, el objeto de la invención es un método in vitro para la transferencia génica, en donde un vector pseudotipo VSV-LCMV-GP o un sistemas de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP que comprende un transgén se introduce en una célula directamente o por medio de células productoras de virus (células empaquetadoras) según la invención. Si se usa un sistema de vectores complementarios de replicación (cr) con al menos dos vectores, se usan al menos dos células empaquetadoras, en donde cada una de las células produce uno de los vectores cr (incompetentes para replicación). La producción de virus VSV tiene lugar solo en células que están infectadas con todos los vectores del sistema de vectores cr y por tanto comprende todos los genes víricos esenciales.

45 Además, la invención se refiere al uso de vectores y células productoras de virus según la invención como fármacos en métodos terapéuticos. En particular, los vectores y células productoras de virus según la invención se usan para la terapia de tumores sólidos. El efecto terapéutico está causado por las propiedades oncolíticas de los vectores y virus recombinantes así como por el uso de genes terapéuticos.

50 Los tumores sólidos pueden ser un tumor cerebral, tumor hepático, en particular carcinoma hepatocelular, tumor de pulmón, en particular carcinoma bronquial, y tumor intestinal, en particular carcinoma de colon. Los tumores preferidos son tumores cerebrales, por ejemplo un glioma, en particular, ependimoma, oligodendroglioma, oligoastrocitoma, astrocitoma, glioblastoma o un meduloblastoma.

55

El objeto de la invención es además una composición farmacéutica que comprende el vector, el virión, la célula productora de virus de la invención y opcionalmente aditivos tales como un soporte y sustancias auxiliares.

5 Para aumentar la oncolisis vírica y la eficacia de transferencia de los genes terapéuticos, células productoras de virus que se infiltran en tumores que liberan vectores continuamente se formulan para la implantación directa en los tumores.

La invención se ilustra por medio de los siguientes ejemplos.

10 Ejemplos

Ejemplo 1: Transducción de células de glioma por vectores pseudotipados VSV-LCMV-GP

15 Se transdujeron células BHK-21 y Vero que a su vez expresan establemente la GP de LCMV con vectores VSV deficientes que codifican GFP pero no la proteína de la envuelta vírica (VSVgfp-ncp-ΔG). Se sembraron 1x10E5 células (BHK-21, -GP, vero, -GP) por cavidad de una placa de 24 pocillos y cuatro horas después se transdujeron a una MOI=5 con vectores VSVgfp-ncp-ΔG. 24 horas más tarde, el sobrenadante del cultivo se recogió y se determinó el título en BHK-21 por medio de análisis de FACS de la expresión de GFP. La figura 1 muestra que las células transducidas producían vectores VSV pseudotipados con LCMV-GP, en donde dependiendo del tipo celular usado, 20 los títulos del pseudotipo variaban entre 2-7x10E5 TU/ml.

Puesto que los pseudotipos se pretendían para la transferencia génica en gliomas, se comprobó la eficacia de transducción de los vectores para diferentes líneas celulares de glioma. Se probaron dos líneas celulares de glioma 25 humanas (U87, G44) y una línea celular de glioma de rata (9L). Se usaron de nuevo BHK-21 como control. Se sembraron 1x10E5 células por cavidad en una placa de 24 pocillos y cuatro horas después se transdujeron a una MOI=0,3 (titulación en BHK-21) con vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP. 24 horas después, se determinó el porcentaje de células que expresaban GFP por FACS y se calculó su título a partir de ello. La figura 2 muestra que las líneas celulares de glioma se transdujeron eficazmente por vectores VSV pseudotipados con LCMV-GP.

30 Ejemplo 2: Empaquetamiento de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP en células progenitoras multipotentes

Los inventores ya han demostrado que las células madre que se aislaron según el protocolo de C. Verfaillie (Jiang et al., 2002), tenían propiedades infiltrantes en tumor. Puesto que solo se examinó su potencial de migración pero no su potencial de diferenciación, estas células se llamaron BM-TIC (células infiltrantes en tumores derivadas de 35 médula ósea). Para probar la capacidad de empaquetamiento de BM-TIC para vectores VSV, se transdujeron células BM-TIC que expresaban LCMV-GP con el vector VSV-GFP deficiente. Se sembraron 1x10E5 células (BM-TIC, -GP, BHK-21) por cavidad en placas de 24 pocillos y cuatro horas después se transdujeron a una MOI=5 con vectores VSVgfp-ncp-ΔG. 24 horas más tarde, el sobrenadante del cultivo se recogió tituló en BHK-21. La figura 3 muestra que los pseudotipos VSV-LCMV-GP también se pueden preparar en BM-TIC. Sin embargo, los títulos son 40 más bajos que por ejemplo con células BHK-21 (véase la figura 1).

Ejemplo 3: Desarrollo de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP complementarios replicativos (cr)

Se puede alcanzar una alta tasa de transducción con virus capaces de reproducción. Para aumentar la tasa de 45 transferencia génica en gliomas y al mismo tiempo asegurar un alto grado de seguridad, se estableció un vector pseudotipo VSV que es competente para replicación a un nivel limitado. Los sistemas con virus complementarios deficientes se han descrito para retrovirus (Trajceviski et al., 2005) y diferentes flavivirus (Riepl & Mandl, 2007). El principio de tales sistemas es distribuir el genoma vírico entre dos replicones incompletos. Los virus infecciosos solo se producen si la misma célula se infecta con ambos vectores y solo mediante esta coinfección comprende todos los 50 componentes necesarios para el empaquetamiento del genoma del virus.

La figura 4 muestra un ejemplo de vectores complementarios del sistema de vectores según la invención. Para una replicación y empaquetamiento eficaces, el primer vector carece de fosfoproteína P. Para poder determinar el título vírico de estos vectores de una manera más sencilla, el vector codifica la proteína fluorescente roja (rfp) en lugar de P. La función de P que falta se complementa durante la coinfección de la célula mediante el segundo vector. Sin embargo, el último solo no es capaz de reproducción ya que carece de la proteína de envuelta esencial VSV-G. Por medio de este vector, se aplican genes terapéuticos. 55

Mientras que solo el ARN genómico de virus ARN de cadena positiva es infeccioso, los virus ARN de cadena negativa tales como el VSV necesitan además del genoma de ARN vírico al menos la nucleoproteína vírica (N) y la polimerasa vírica (L) para generar un virión infeccioso a partir de los ADNc víricos clonados. El sistema para preparar VSV recombinante se basa en la expresión citoplásmica de ARN (+) vírico y las proteínas víricas N, P y L usando la ARN polimerasa de T7 que se expresa constitutivamente en células BSR T7/5. Para preparar los vectores deseados, se cotransfectan construcciones genómicas junto con los plásmidos de expresión para N, P y L y además 60 el plásmido de expresión para VSV-G en el caso del vector b) (figura 4) en BSR T7/5. Los títulos pueden aumentar considerablemente pasando los virus obtenidos de esta manera en células que expresan el componente que falta en 65

trans. Para el vector deficiente en LCMV-GP, se estableció una línea de células BHK-21 que expresa establemente GP. Para el vector deficiente en P, se estableció una línea de células BHK-21 que expresa la proteína P.

Preparación y caracterización de vectores VSV pseudotipo VSV-LCMV-GP cr

Después de la caracterización de los vectores individuales con respecto a su título y su eficacia de transducción, se examina la propagación de los vectores in vitro. Para esto, se coinfectan células BHK-21 con ambos vectores y se examina la replicación y por tanto la generación de nuevos vectores por pase en serie del sobrenadante del cultivo en BHK-21 nativas. Estos experimentos se repiten con diferentes líneas celulares de glioblastoma (G44, G62, U87) que se cultivan como monocapas así como esferoides.

Los esferoides tumorales son grupos celulares organoides tridimensionales que reflejan la naturaleza y heterogeneidad de los tumores mejor que los cultivos en monocapa. Las células tumorales que se dividen activamente se localizan en una formación suelta al extremo del agregado celular, mientras que las células localizadas más profundamente dentro no se dividen más y aquí tiene lugar una formación de áreas necróticas (Carlsson et al., 1984). Los experimentos con esferoides proporcionan información sobre la eficacia de transducción intratumoral, la cinética de propagación y el efecto oncolítico del sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP cr. Por tanto, estos esferoides permiten una optimización inicial del sistema sin la necesidad de realizar experimentos en animales. En el modelo animal se examinan una posible toxicidad de los vectores VSV pseudotipados con LCMV-GP cr, la eficacia terapéutica de la oncolisis y la presencia de los virus restantes después de la eliminación del tumor (véase el ejemplo 6).

La ARN polimerasa vírica no tiene actividad recombinasa y tampoco hay recombinasas celulares en el citoplasma de modo que la recombinación entre dos virus ARN de cadena negativa solo puede tener lugar por un cambio de molde de la ARN polimerasa. Sin embargo, este un suceso extremadamente raro (Finke & Conzelmann, 2005; Spann et al., 2003). La generación de un VSV recombinante, replicable representa un riesgo de seguridad y se examina. Para esto, se aísla el ARN vírico a diferentes tiempos a partir del sobrenadante del cultivo de células coinfectadas y se examina con una sonda específica del transgén (por ejemplo, gfp) en transferencias Northern. Si son detectables especies de ARN con "exceso de longitud", los virus del sobrenadante se purifican por placa y se examinan por medio de métodos estándar con respecto a su infectividad y posteriormente se caracterizan por medio de biología molecular.

Ejemplo 4: Establecimiento de una célula productora que migra para la preparación de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP terapéuticamente eficaces

Se establecen células productoras de VSV-LCMV-GP que migran para vectores VSV cr y para vectores VSV-LCMV-GP competentes para replicación.

Preparación y caracterización de diferentes variantes de M

La proteína M de VSV tiene dos funciones esenciales en el ciclo de VSV. Por una parte, es esencial como componente estructural del virión para el ensamblaje y la gemación de los virus. Por otra parte, contribuye significativamente a la patogénesis vírica a través de su actividad de "parada del huésped" dirigida a la síntesis de proteínas del huésped y mediante la inducción de apoptosis. En este sentido, una función importante de M es la inhibición del transporte núcleo-citoplásmico del ARNm de IFN. Por lo tanto, se suprime el primer mecanismo de defensa de la célula contra la infección vírica.

Debido a este efecto citotóxico fuerte, no es posible expresar la proteína M en líneas celulares a largo plazo. Sin embargo, se conocen una pluralidad de mutaciones en la proteína M que producen la atenuación del virus. Irie y colaboradores demostraron que mediante intercambios de aminoácidos en la denominada región ³⁷PSAP⁴⁰ de la proteína M, se creó un mutante de VSV con citopatogenicidad muy reducida (Irie et al., 2007). Además, como se muestra en experimentos en ratón, las variantes de M con mutaciones únicas (M51R) o múltiples (V221F y S226R; M33A y M51A) fuera de la región PSAP también están muy atenuadas (Desforges et al., 2001; Jayakar y Whitt, 2002). Estos virus no pueden suprimir la liberación de IFN- α/β y por tanto inducen un estado antivírico que protege a los animales contra una infección. Sin embargo, en tumores que con frecuencia tienen defectos en el sistema de IFN, estos virus se pueden reproducir y lisar el tumor. Por razones de seguridad, tales variantes atenuadas son de importancia particular para la terapia génica ya que se replican preferentemente en células tumorales.

Además, los inventores han clonado una variante no citopatogénica de la proteína M (M_{ncp}) que comprende las mutaciones mencionadas M33A, M51R, V221F y S226R y ya no puede suprimir la síntesis de IFN- β . Esta variante se replica de una manera eficaz similar que el virus parental en células incompetentes en IFN, pero se atenúa en células competentes en IFN. Para asegurar la producción eficaz de virus en BM-TIC, las células se transfectan establemente con un antagonista de interferón vírico (Haller et al., 2006).

Preparación y caracterización de una célula productora derivada de BM-TIC para vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP

Las células tumorales se transducen principalmente debido al tropismo específico de glioma de los pseudotipos VSV-LCMV-GP. Por tanto, también es posible trabajar con variantes de M que aún muestran cierta citopatogenicidad. Para mantener los efectos tóxicos en BM-TIC bajos, la proteína antivírica MxA se debe expresar en las células a través de un promotor inducible por Tet. Los vectores retrovíricos con promotor inducible por Tet se conocen (Loew et al., 2006). El elemento de respuesta a Tet (tTA) también se introduce en BM-TIC a través de un vector retrovívico. MxA es una GTPasa inducida por interferón con actividad antivírica hacia virus ARN (Pavlovic et al., 1992; Stäheli y Pavlovic, 1991). En el citoplasma está presente en forma de oligómeros grandes, no es tóxica e inhibe la replicación de VSV por un mecanismo hasta ahora desconocido. Las BM-TIC que expresan LCMV-GP se transducen con MxA regulada por Tet y el vector tTA y posteriormente se infectan con los vectores VSV. Mientras esté presente el antibiótico en el medio, las células son resistentes contra una infección productiva con VSV (LCMV-GP) debido a la presencia de MxA. Solo durante la aplicación in vivo, el antibiótico se elimina y la replicación vírica y la producción de VSV (LCMV-GP) empieza gradualmente. Puesto que MxA con una semivida de dos días es muy estable, se puede usar alternativamente el mutante de MxA (L612K). MxA(L621K) inhibe la infección de VSV con la misma eficacia que la proteína salvaje, pero no puede formar oligómeros. Por este medio se desestabiliza y tiene una semivida corta de solo dos horas (Janzen et al., 2000).

Ambas células productoras, BM-TIC que produce vectores con M no citopatogénica así como BM-TIC que están protegidas contra lisis relacionada con VSV mediante la expresión de MxA, se caracterizan como sigue:

- (i) Se determinan los títulos del vector y la duración de la producción del vector.
- (ii) Se analiza la influencia de la congelación y descongelación de las células en el título del vector.
- (iii) Se analiza si las células aún tienen propiedades infiltrantes en tumor y que eficacias de transducción se alcanzan en el tejido tumoral primero en el modelo esferoide y posteriormente en el modelo animal.
- (iv) Se comprueba la presencia de VSV replicable en el sobrenadante del vector producido.

Ejemplo 5: Clonación y empaquetamiento de genes terapéuticos

Se puede usar un gen suicida como gen terapéutico según la invención. Un ejemplo de tal gen es la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK) con la mayor experiencia en la clínica. Mediante la expresión constitutiva de HSV-TK, las células empaquetadoras y las células transducidas se pueden eliminar de forma segura al final de la terapia de modo que no puede surgir daño de células empaquetadoras mitóticamente activas.

Para la inmunoterapia de gliomas malignos, es decir, para reforzar la respuesta inmune local mal desarrollada en el cerebro, se pueden usar genes inmunomoduladores. Los ejemplos de tales genes son citoquinas, en particular IL-12 y Flt3L. Después de la estimulación por antígeno, IL-12 se secreta de forma natural por las células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas, macrófagos y células B y media una fuerte respuesta inmune antitumoral basada en Th1. Aumenta el crecimiento y la diferenciación de células T indiferenciadas a células Th1 y por tanto contrarresta una supresión inducida por glioma de la proliferación de células T y la producción de IFN-gamma. IL-12 aumenta la actividad citotóxica de las células citolíticas naturales y CD8+ y además tiene una actividad antiangiogénica (Majewski et al., 1996). En una pluralidad de modelos animales, la eficacia de una respuesta inmune mediada por IL-12 contra gliomas ya se ha demostrado de una manera impresionante (Toda et al., 1998; Kikuchi et al., 1999). La citoquina Flt3L es esencial para la proliferación y diferenciación de células dendríticas presentadoras de antígeno y por tanto parece ser particularmente adecuada para los fines de una terapia génica. Sumia y colaboradores observaron en rata/ratón un fuerte influjo local de células dendríticas después de la transducción i.c. de gliomas con el gen Flt3L. El 70% de las ratas tratadas mostró regresión del tumor y sobrevivió.

La combinación de una citoquina con un gen suicida (TK) no solo ofrece seguridad máxima, sino que también permite una terapia exitosa con baja eficacia de transducción debido al efecto espectador. Este planteamiento combina tres principios activos, es decir oncolisis vírica, apoptosis inducida por genes suicidas e inmunestimulación local para aumentar la eficacia de la terapia génica del glioblastoma.

Primero, IL-12 y Flt3L se clonan en los vectores VSV. IL-12 es activa específicamente en su especie de modo que la IL-12 murina se tiene que usar para probar en el modelo de glioma en rata. En contraste, más del 70% de las Flt3L humanas y murinas son homólogas y dan reacción cruzada en ambas especies. Los genes inmunestimuladores se clonan en la posición del gen p, mientras que TKgfp o gfp en el segundo vector sustituye el gen VSV-G. Las siguientes combinaciones de genes se clonaron en los dos vectores del sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP cr (figura 5):

- 1) vector a = IL12 o Flt3L + vector b = TKgfp (o TK)
- 2) vector a = IL12 o Flt3L + vector b = gfp
- 3) vector a = IL12 o Flt3L + vector b = vacío
- 4) vector a = vacío + vector b = TKgfp (o TK)
- 5) vector a = vacío + vector b = gfp
- 6) vector a = vacío + vector b = vacío

Después de clonar, se transdujeron líneas celulares de glioma y BM-TIC y la concentración de la citoquina contenida en el sobrenadante se verifica por ELISA. Para la producción de cantidades fisiológicamente relevantes los vectores se concentran a través de ultracentrifugación. Los vectores se usan primero para la transducción de esferoides y se examina su competencia para la muerte de espectador en este sistema. Después de ello, los sobrenadantes de los vectores junto con las células empaquetadoras preparadas se envían a Bergen a nuestro socio de cooperación. Allí, tiene lugar el ensayo in vivo en el modelo de glioma singénico de rata. Se evalúa el índice de supervivencia de las ratas tratadas después de la aplicación de ganciclovir. Al mismo tiempo, se examina la eficacia terapéutica de la inmunoterapia en ausencia de TK. La combinación de vectores 6) proporciona información sobre la eficacia de la oncolisis. El tamaño del tumor y por tanto el éxito de la terapia se siguen a través de IRM y PET (Miletic et al., 2007). Se evalúa el efecto de los genes inmunomoduladores por medio de métodos inmunohistoquímicos para la detección de células infiltradas. Como se describe en el siguiente párrafo, el planteamiento terapéutico también se examina en el modelo de glioma humano.

Ejemplo 6: Ensayo del principio activo terapéutico en dos modelos de glioma

Los vectores VSV recombinantes se caracterizan primero in vitro y posteriormente se investiga su eficacia en el modelo animal. Para este fin, se usan dos modelos de rata particularmente significativos.

Se usa un modelo de glioma de rata 9L singénico para el examen de aspectos inmunológicos y llevar a cabo los métodos inmunoterapéuticos. Para este fin, se implantan líneas celulares de glioma en los cerebros de ratas Fisher que posteriormente desarrollan tumores en unos pocos días. Las células de gliosarcoma 9L que se aislaron de ratas Fisher sirvieron como líneas celulares tumorales. Varios vectores o líneas celulares se inyectan después esterotácticamente en los tumores inducidos. Este modelo de rata tiene las siguientes características:

- (i) Representa un sistema bien reproducible con una varianza interindividual baja.
- (ii) Los tumores tienen características similares a los gliomas humanos tales como, por ejemplo, el comportamiento de crecimiento invasivo y agresivo así como la producción de TGFβ2 como factor inmunosupresor.
- (iii) En contraste con el modelo de ratón SCID/desnudo o el modelo de xenoinjerto de rata, el sistema permite el examen de aspectos inmunológicos o el ensayo de métodos inmunoterapéuticos.

Se usa un modelo de glioma humano en ratas desnudas para ensayar la actividad oncolítica de los vectores y células según la invención hacia células de glioma humanas. El modelo de xenoinjerto en rata simula varias características de crecimiento de gliomas humanos. Se usa aquí no una línea celular de glioblastoma definida sino material de tumores primarios de pacientes para establecer el tumor, lo que permite simular la heterogeneidad en gliomas humanos (Sakariassen et al., 2006). Mediante el pase en serie de gliomas humanos en ratas desnudas, se pueden mapear diferentes fases del desarrollo del tumor maligno y se puede examinar el éxito de la terapia. El modelo de glioma humano es particularmente adecuado para el examen de los planteamientos terapéuticos ya que tiene las siguientes características:

- (i) Los tumores tienen características similares a los gliomas humanos tales como, por ejemplo, el comportamiento de crecimiento invasivo y agresivo. Se usa no una línea celular de glioblastoma sino material de tumores primarios de pacientes para establecer el tumor.
- (ii) Mediante el pase en serie de gliomas humanos en ratas desnudas, se pueden mapear diferentes fases del desarrollo del tumor maligno y se puede verificar el éxito de la terapia. Los tumores de la primera generación crecen despacio, son muy invasivos y tienen neovascularización baja. Un fenotipo muy vascularizado con proliferación fuerte e invasión reducida se desarrolla mediante el pase.
- (iii) El fenotipo celular de gliomas muy invasivos, no angiogénicos es similar a uno de células madre tumorales. Por tanto, este modelo animal permite el ensayo de la eficacia terapéutica de nuestro concepto en el componente de células madre del GBM humano.

Se pueden distinguir dos categorías de tumores:

- (i) Tumores tempranos con un comportamiento de crecimiento muy invasivo, lento. Estos tumores tienen solo una baja vascularización.
- (ii) Tumores tardíos que tienen buen suministro de sangre y crecen deprisa. Este fenotipo es poco invasivo.

El modelo de glioma humano es adecuado para examinar la terapia de genes suicidas así como la oncolisis vírica. Sin embargo, hasta ahora no hay modelos animales para el glioblastoma humano que se puedan usar para el análisis de la eficacia inmunoterapéutica de los métodos terapéuticos génicos.

El éxito de la terapia se analiza y evalúa por medio de métodos de imagenología y por último con técnicas histológicas. Primero, el modo de acción de los pseudotipos VSV (LCMV-GP) complementarios de replicación se examina por inyección intratumoral de sobrenadantes de vector concentrados en el modelo de glioma de rata. La eficacia de transducción y la distribución de los vectores que codifican gfp en los tumores se examinan después de unos pocos días por medio de un análisis microscópico de fluorescencia de secciones congeladas. Además, la

oncolisis y la invasión de células inmunes se evalúan inmunohistoquímicamente. Como suplemento, la eficacia también se examina en el modelo animal para el glioblastoma humano.

5 En el mismo modelo, se examinan la capacidad de migración de las células productoras BM-TIC y la infectividad de los vectores VSV producidos. Para este fin, las células se tiñen con un colorante verde mientras que los vectores liberados codifican rfp. Este planteamiento permite una diferenciación sencilla basada en fluorescencia entre BM-TIC y células tumorales transducidas.

10 Por último, se compara la eficacia terapéutica de los pseudotipos que codifican los transgenes individuales. Para este fin, las células empaquetadoras y también los sobrenadantes de vectores concentrados se inyectan en tumores 9L establecidos. Los vectores comprenden un gen inmunoestimulador en combinación con TK. La administración de ganciclovir empieza unos pocos días después de la aplicación estereotáctica de los vectores o las células empaquetadoras. La eficacia terapéutica del componente inmunomodulador del vector se evalúa en animales que reciben vectores de contienen solo TK. Tras completar el tratamiento, se evalúa la eficacia de los conceptos de la
15 terapia individual basándose en el tamaño del tumor con métodos de imagenología (IRM, PET). Una parte de los cerebros de las ratas tratadas con inmunoterapia se usa para caracterizar el estado inmune. La expresión de moléculas de MHC y la distribución de células T, granulocitos, macrófagos y células de microglía se examina en secciones congeladas por métodos inmunohistoquímicos. Además, se analizan la cantidad y composición fenotípica de las células infiltradas i.c. por citometría de flujo. La formulación con el mejor efecto terapéutico se adapta para el
20 tratamiento de gliomas humanos. Tal prototipo se podría transferir directamente a estudios de seguridad preclínicos y, después de establecer los métodos respectivos para la producción GMP, a estudios clínicos.

Bibliografía

- 25 1. Barber GN. Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector. *Viral Immunol.* 2004;17(4):516-27
2. Beyer WR, Westphal M, Ostertag W, von Laer D. Oncoretrovirus and lentivirus vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoprotein: generation, concentration, and broad host range (2002). *J Virol.* 76:1488-95
3. Carlsson J, Yuhas JM. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent Results Cancer Res.* 1984; 95:1-23
30 4. Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, Blaese RM. In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science.* 12 Junio 1992;256(5063):1550-2
5. Cutter JL, Kurozumi K, Chiocca EA, Kaur B. Gene therapeutics: the future of brain tumor therapy? *Expert Review of Anticancer Therapy;* 2006, 6(7): 1053-1064
6. Dai C, Holland EC. Glioma models. *Biochim Biophys Acta.* 31 Agosto 2001;1551(1): M19- 27
35 7. Desforges M, Charron J, Berard S, Beausoleil S, Stojdl DF, Despars G, Laverdiere B, Bell JC, Talbot PJ, Stanners CP, Poliquin L. Different host-cell shutoff strategies related to the matrix protein lead to persistence of vesicular stomatitis virus mutants on fibroblast cells. *Virus Res.* Julio 2001;76(1):87-102
8. Finke S, Conzelmann KK. Recombinant rhabdoviruses: vectors for vaccine development and gene therapy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;292:165-200
40 9. Fischer YH, Miletic H, Giroglou T, Litwak S, Stenzel W, Neumann H, von Laer D. A retroviral packaging cell line for pseudotype vectors based on glioma-infiltrating progenitor cells (2007) *Journal of Gene Medicine* 9:335-344
10. Fukuhara H, Martuza RL, Rabkin SD, Ito Y, Todo T. Oncolytic herpes simplex virus vector g47delta in combination with androgen ablation for the treatment of human prostate adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 1 Nov. 2005 ;11(21):7886-90
45 11. Garbutt M, Liebscher R, Wahl-Jensen V, Jones S, Moller P, Wagner R, Volchkov V, Klenk HD, Feldmann H, Stroher U. Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J Virol.* Mayo 2004; 78(10): 5458-65
12. Ge J, Wen Z, Wang X, Hu S, Liu Y, Kong X, Chen H, Bu Z. Generating vesicular stomatitis virus pseudotype bearing the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike envelope glycoprotein for rapid and safe neutralization test or cell-entry assay. *Ann N Y Acad Sci.* Oct. 2006; 1081:246-8
50 13. Irie T, Carnero E, Okumura A, Garcia-Sastre A, Harty RN. Modifications of the PSAP region of the matrix protein lead to attenuation of vesicular stomatitis virus in vitro and in vivo. *J Gen Virol.* Sep. 2007;88(Pt 9):2559-67
14. Hanika A, Larisch B, Steinmann E, Schwegmann-Wessels C, Herrler G, Zimmer G. Use of influenza C virus glycoprotein HEF for generation of vesicular stomatitis virus pseudotypes. *J Gen Virol.* Mayo 2005;86(Pt 5):1455-65
55 15. Haller O, Kochs G, Weber F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology.* 5 Enero 2006;344(1):119-30
16. Holland EC. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet.* Feb. 2001;2(2):120-9
17. Janzen C, Kochs G, Haller O. A Monomeric GTPase-Negative MxA Mutant with Antiviral Activity. *J Virol* Sept. 2000, 74(17):8202-8206
60 18. Jayakar HR, Whitt MA. Identification of two additional translation products from the matrix (M) gene that contribute to vesicular stomatitis virus cytopathology. *J Virol.* Agosto 2002;76(16):8011-8
19. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418:41-9
65 20. Kikuchi, T., Joki, T., Akasaki, Y., Abe, T, Ohno, T. (1999) *Cancer Lett.* 135, 47-51

21. Kleihues, P. y Cavenee, W.K. World Health Organization Classification of Tumours- Pathology and Genetics, Tumours of the Nervous system. 2000 (International Agency for Research on cancer, Lyon)
22. Loew R, Vigna E, Lindemann D, Naldini L, Bujard H. Retroviral vectors containing Tet-controlled bidirectional transcription units for simultaneous regulation of two gene activities. *JMol GenMed* 2006, 2(1), 107-118
- 5 23. Lun X, Senger DL, Alain T, Oprea A, Parato K, Stojdl D, Lichty B, Power A, Johnston RN, Hamilton M, Parney I, Bell JC, Forsyth PA. Effects of intravenously administered recombinant vesicular stomatitis virus (VSV(deltaM51)) on multifocal and invasive gliomas. *J Natl Cancer Inst.* 1 Nov. 2006;98(21):1546-57
24. Majewski, S., Marczak, M., Szmurlo, A., Jablonska, S. & Bollag, W. (1996) *J. Invest. Dermatol.* 106, 1114-1118
- 10 25. Miletic H, Bruns M, Tsiakas K, Vogt B, Rezai R, Baum C, Kuhlke K, Cosset FL, Ostertag W, Lothar H, von Laer D (1999) Retroviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 73:6114-6
26. Miletic H, Fischer YH, Neumann H, Hans V, Stenzel W, Giroglou T, Hermann M, Deckert M, Von Laer D. (2004). Selective transduction of malignant glioma by lentiviral vectors pseudotyped with lymphocytic choriomeningitis virus glycoproteins. *Hum Gene Ther.* 15: 1091-100
- 15 27. Miletic H, Fischer YH, Litwak S, Giroglou T, Waerzeggers Y, Winkeler A, Li H, Himmelreich U, Lange C, Stenzel W, Deckert M, Neumann H, Jacobs AH, von Laer D. Bystander Killing of Malignant Glioma by Bone Marrow-Derived Tumor Infiltrating Progenitor Cells Expressing a Suicide Gene (2007). *Molecular Therapy* 15:1373-1381
28. Miletic H, Fischer YH, Giroglou T; Rueger MA, Winkeler A, Li H, Himmelreich U, Stenzel W, Jacobs AH, von Laer D. Normal brain cells contribute to the bystander effect in suicide gene therapy of malignant glioma.(2007b) *Jorurnal of Clinical Cancer Research*, en prensa
- 20 29. Owens RJ, Rose JK. Cytoplasmic domain requirement for incorporation of a foreign envelope protein into vesicular stomatitis virus. *J Virol.* Enero 1993;67(1):360-5
30. Pavlovic J, Haller O, Staeheli P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol.* Abril 1992;66(4):2564-9
- 25 31. Riepl C, Mandl C. Two non-infectious flaviviruses can form an infectious alliance. Nürnberg, 2007. Poster en the annual Meeiting of the Gesellschaft für Virologie
32. Sakariassen PO, Prestegarden L, Wang J, Skafnesmo KO, Mahesparan R, Molthoff C, Sminia P, Sundlisaeter E, Misra A, Tysnes BB, Chekenya M, Peters H, Lende G, Kalland KH, Oyan AM, Petersen K, Jonassen I, van der Kogel A, Feuerstein BG, Terzis AJ, Bjerkvig R, Enger PO. Angiogenesis-independent tumor growth mediated by stem-like cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 31 Octubre 2006;103(44):16466-71
- 30 33. Shinosaki K, Ebert O, Suriawinata A, Thung SN, Woo SL. Prophylactic alpha interferon treatment increases the therapeutic index of oncolytic vesicular stomatitis virus virotherapy for edvanced hepatocellular carcinoma in immune-competent rats. *J Virol.* Nov. 2005;79(21):13705-13
34. Shir A, Levitzki A. Gene therapy for glioblastoma: future perspective for delivery systems and molecular targets. *Cell Mol Neubiol.* Dic. 2001; 21: 645-60
- 35 35. Short MP, Choi BC, Lee JK, Malick A, Breakefield XO, Martuza RL. Gene delivery to glioma cells in rat brain by grafting of a retrovirus packaging cell line. *J Neurosci Res.* Nov. 1990;27(3):427-39
36. Staeheli P, Pavlovic J. Inhibition of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis by human MxA protein. *J Virol.* Agosto 1991;65(8):4498-501
- 40 37. Sumia A, Curtin JF, Zirger JM, Xiong W, King GD, Barcia C, Liu C, Puntel1 M, Goverdhana S, Lowenstein PR, Castro MG. Inflammatory and Anti-glioma Effects of an Adenovirus Expressing Human Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 3 Ligand (hsFlt3L): Treatment with hsFlt3L Inhibits Intracranial Glioma Progression. *Molecular Therapy* (2004) 10, 1071-1084
- 45 38. Tani H, Komoda Y, Matsuo E, Suzuki K, Hamamoto I, Yamashita T, Moriishi K, Fujiyama K, Kanto T, Hayashi N, Owsianka A, Patel AH, Whitt MA, Matsuura Y. Replication-competent recombinant vesicular stomatitis virus encoding hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol.* 2007 Aug;81(16):8601-12. Epub 6 junio 2007
39. Toda, M., Martuza, R. L., Kojima, H. & Rabkin, S. D. (1998) *J. Immunol.* 160, 4457-4464
40. Trajcevski S, Solly SK, Frisen C, Trenado A, Cosset FL, Klatzmann D. Characterization of a semi-replicative gene delivery system allowing propagation of complementary defective retroviral vectors. *J Gene Med.* Marzo 2005;7(3):276-87
- 50 41. Tyminski E, Leroy S, Terada K, Finkelstein DM, Hyatt JL, Danks MK, Potter PM, Saeki Y, Chiocca EA. Brain tumor oncolysis with replication-conditional herpes simplex virus type 1 expressing the prod ru g-activati ng genes, CYP2B1 and secreted human intestinal carboxylesterase, in combination with cyclophosphamide and irinotecan. *Cancer Res.* 1 Agosto 2005;65(15):6850-7
- 55 42. Wollmann G, Robek MD, van den Pol AN. Variable deficiencies in the interferon response enhance susceptibility to vesicular stomatitis virus oncolytic actions in glioblastoma cells but not in normal human glial cells. *J Virol.* Febrero 2007;81(3):1479-91
43. Zimmer G, Conzelmann KK, Herrler G. Cleavage at the furin consensus sequence RAR/KR(109) and presence of the intervening peptide of the respiratory syncytial virus fusion protein are dispensable for virus replication in cell culture. *J Virol.* Sep. 2002;76(18):9218-24

60 Además, la presente invención se refiere a los siguientes puntos:

1. Vector pseudotipo VSV-LCMV-GP, caracterizado en que comprende un gen que codifica una glicoproteína GP del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) y carece de un gen funcional que codifica la proteína de la envuelta G del VSV.

65

2. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP del punto 1, caracterizado en que la proteína de la envuelta G se sustituye por GP de LCMV.
- 5 3. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP del punto 1 o 2, caracterizado en que la proteína M del VSV comprende mutaciones que reducen la citopatogenicidad del VSV.
4. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP de cualquiera de los puntos 1 a 3, caracterizado en que el sistema comprende al menos un transgén.
- 10 5. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP del punto 4, caracterizado en que el transgén codifica una proteína suicida, una proteína inmunoestimuladora o una proteína marcadora.
6. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP del punto 5, caracterizado en que la proteína suicida es la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), citosina desaminasa, FKBP-FAS o FKBP-caspasa9.
- 15 7. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP del punto 5, caracterizado en que la proteína inmunoestimuladora es IL-2, IL-4, IL-12, anti-TGFbeta neutralizante o Flt3L.
- 20 8. Sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP, caracterizado en que el sistema comprende al menos dos vectores VSV complementarios replicativos, en donde el sistema comprende los genes n, l, p y m que codifican las proteínas N, L, P y M de VSV, un gen gp que codifica LCMVGP y carece de un gen funcional que codifica la proteína G de VSV, en donde cada vector del sistema carece de uno de los genes n, l, p, m y gp, y en donde el gen que falta está presente en cualquier otro vector del sistema.
- 25 9. El sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP del punto 8, caracterizado en que la proteína M del VSV comprende al menos una mutación que reduce la citopatogenicidad del VSV.
10. El sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP del punto 8, caracterizado en que el sistema comprende al menos un transgén.
- 30 11. Virión VSV pseudotipado, caracterizado en que el virión comprende una proteína GP del LCMV como proteína de envuelta.
12. Célula productora de virus, caracterizada en que la célula produce un virión VSV pseudotipado del punto 11.
- 35 13. La célula productora de virus del punto 12, caracterizada en que la célula es una célula madre adulta.
14. La célula productora de virus del punto 12 o 13, caracterizada en que la célula madre adulta es una célula progenitora adulta multipotente (MAPC), un célula madre neural (NSC), una célula madre mesenquimatosas (MSC) o un célula infiltrante en tumor derivada de médula ósea (BM-TIC).
- 40 15. La célula productora de virus de cualquiera de los puntos 12 a 14, caracterizada en que la célula comprende uno o más casetes de expresión para la expresión de al menos uno de los genes seleccionados del grupo que consiste en los genes n, l, p y m que codifican las proteínas N, L, P y M de VSV y un gen gp que codifica la glicoproteína GP de LCMV.
- 45 16. La célula productora de virus de cualquiera de los puntos 12 a 15, caracterizada en que la célula comprende un vector de transferencia génica para el empaquetamiento en un virión VSV pseudotipado con LCMV-GP, en donde el vector de transferencia génica comprende un transgén.
- 50 17. La célula productora de virus del punto 16, caracterizada en que el transgén es un gen que codifica una proteína suicida, una proteína inmunoestimuladora o una proteína marcadora.
18. Método para la transferencia de un transgén en una célula in vitro, caracterizado en que la célula se transduce con un virión pseudotipado del punto 11, en donde el virión comprende un transgén.
- 55 19. Método para la transferencia de un transgén en una célula in vitro, caracterizado en que la célula se pone en contacto con una célula productora de virus del punto 16 o 17.
- 60 20. El método del punto 18 o 19, caracterizado en que la célula es una célula tumoral.
21. Uso de un vector pseudotipo VSV-LCMV-GP de cualquiera de los puntos 1 a 7, un sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP de cualquiera de los puntos 8 a 10, un virión VSV pseudotipado del punto 11, o una célula productora de virus de cualquiera de los puntos 12 a 17, para la preparación de una composición farmacéutica para la terapia de un tumor sólido.
- 65

22. El uso del punto 21, caracterizado en que el tumor es un tumor cerebral.
23. El uso del punto 22, caracterizado en que el tumor es un tumor cerebral maligno.
- 5 24. Composición farmacéutica, caracterizada en que la composición comprende un vector pseudotipo VSV-LCMV-GP de cualquiera de los puntos 1 a 7, un sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP de cualquiera de los puntos 8 a 10, un virión VSV pseudotipado del punto 11, o una célula productora de virus de cualquiera de los puntos 12 a 17.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vector pseudotipo VSV-LCMV-GP, en donde el vector pseudotipo comprende un gen que codifica una glicoproteína GP del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) y carece de un gen funcional que codifica la proteína de la envuelta G del VSV y en donde el vector pseudotipo muestra un tropismo por células de glía.
- 10 2. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP según la reivindicación 1, en donde la proteína de la envuelta G de VSV se sustituye por la glicoproteína GP de LCMV.
- 15 3. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la glicoproteína GP de LCMV tiene un tropismo por células de glioblastoma.
- 20 4. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el LCMV se selecciona del grupo que consiste en LCMV-WE, LCMV-WE-HPI y LCMV-WE HPIopt.
- 25 5. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la proteína M del VSV comprende mutaciones que reducen la citopatogenicidad del VSV.
- 30 6. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el vector pseudotipo comprende al menos un transgén.
- 35 7. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP según la reivindicación 6, en donde el transgén codifica una proteína suicida, una proteína inmunoestimuladora o una proteína marcadora.
- 40 8. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP según la reivindicación 7, en donde la proteína suicida es la timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), citosina desaminasa, FKBP-FAS o FKBP-caspasa9.
- 45 9. El vector pseudotipo VSV-LCMV-GP según la reivindicación 7, en donde la proteína inmunoestimuladora es IL-2, IL-4, IL-12, anti-TGFbeta neutralizante o Flt3L.
- 50 10. Sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP, en donde el sistema de vectores pseudotipo comprende al menos dos vectores VSV complementarios replicativos, en donde el sistema comprende los genes n, l, p y m que codifican las proteínas N, L, P y M de VSV, un gen gp que codifica una glicoproteína GP de LCMV y carece de un gen funcional que codifica la proteína de la envuelta G de VSV, en donde cada vector del sistema carece de uno de los genes n, l, p, m y gp, y en donde el gen que falta está presente en cualquier otro vector del sistema y en donde el LCMV se selecciona del grupo LCMV-WE, LCMV-WE-HPI y LCMV-WE HPIopt.
- 55 11. El sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP según la reivindicación 10, en donde la proteína M del VSV comprende al menos una mutación que reduce la citopatogenicidad del VSV.
- 60 12. El sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP según la reivindicación 10 o 11, en donde el sistema de vectores pseudotipo comprende al menos un transgén.
- 65 13. Virión VSV pseudotipado, en donde el virión VSV comprende una glicoproteína GP de un LCMV seleccionado del grupo LCMV-WE, LCMV-WE-HPI y LCMV-WE HPIopt como proteína de envuelta.
14. Célula productora de virus, en donde la célula productora de virus produce un virión VSV pseudotipado de la reivindicación 13.
15. La célula productora de virus según la reivindicación 14, en donde la célula productora de virus es una célula madre adulta.
16. La célula productora de virus según la reivindicación 15, en donde la célula madre adulta es una célula progenitora adulta multipotente (MAPC), un célula madre neural (NSC), una célula madre mesenquimatosa (MSC) o una célula BM-TIC (célula infiltrante en tumor derivada de médula ósea).
17. La célula productora de virus según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en donde la célula productora de virus comprende uno o más casetes de expresión para la expresión de al menos uno de los genes del grupo que consiste en los genes n, l, p y m que codifican las proteínas N, L, P y M de VSV y un gen gp que codifica la glicoproteína GP de LCMV.
18. La célula productora de virus según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, en donde la célula productora de virus comprende un vector de transferencia génica para el empaquetamiento en un virión VSV pseudotipado con LCMV-GP, en donde el vector de transferencia génica comprende un transgén.

19. La célula productora de virus según la reivindicación 18, en donde el transgén es un gen que codifica una proteína suicida, una proteína inmunoestimuladora o una proteína marcadora.
- 5 20. Método para la transferencia de un transgén en una célula in vitro, en donde la célula se transduce con un virión VSV pseudotipado según la reivindicación 13, en donde el virión comprende un transgén.
21. Método para la transferencia de un transgén en una célula in vitro, en donde la célula se pone en contacto con una célula productora de virus según la reivindicación 18 o 19.
- 10 22. El método según la reivindicación 20 o 21, en donde la célula es una célula tumoral.
23. Uso de un vector pseudotipo VSV-LCMV-GP según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, un sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, un virión VSV pseudotipado según la reivindicación 13 o una célula productora de virus según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, para la producción de una composición farmacéutica para la terapia de un tumor sólido.
- 15 24. Uso según la reivindicación 23, en donde el tumor es un tumor cerebral.
- 20 25. Uso según la reivindicación 24, en donde el tumor es un tumor cerebral maligno.
26. Composición farmacéutica, en donde la composición comprende un vector pseudotipo VSV-LCMV-GP según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, un sistema de vectores pseudotipo VSV-LCMV-GP según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, un virión VSV pseudotipado según la reivindicación 13 o una célula productora según virus de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19.
- 25

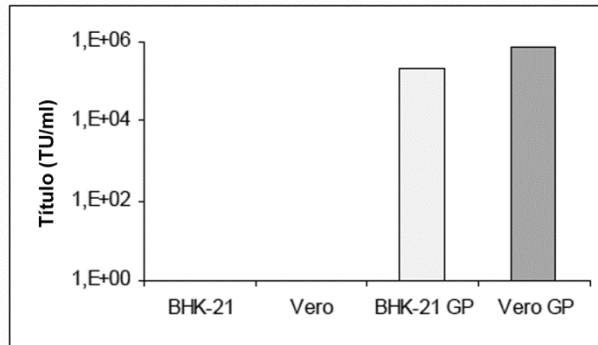


Figura 1

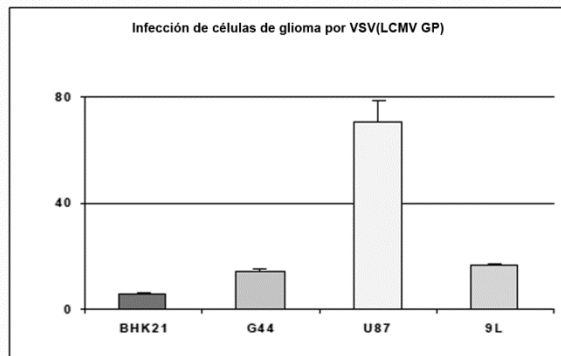


Figura 2

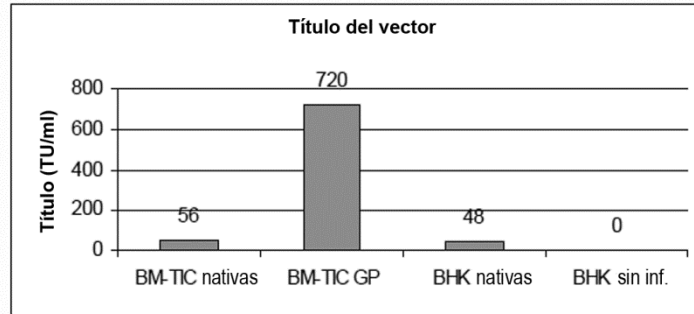


Figura 3

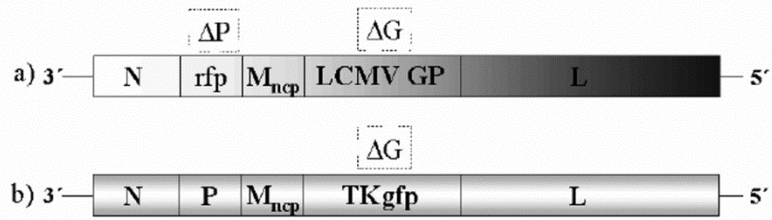


Figura 4

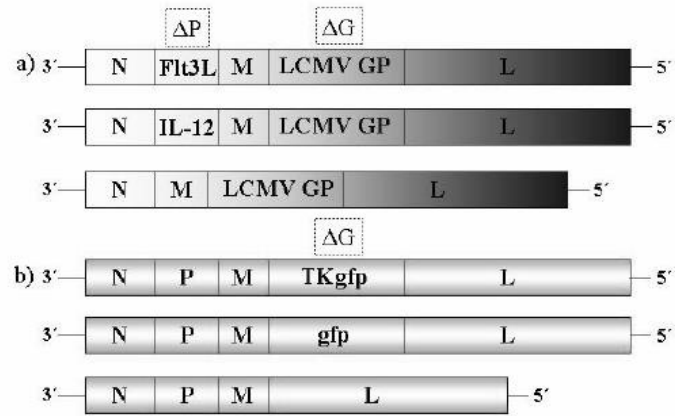


Figura 5