

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 358**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2011** **E 11767905 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.09.2014** **EP 2590663**

54 Título: **Uso de parvovirus para eliminar células madre cancerígenas (CSC)**

30 Prioridad:

07.07.2010 EP 10007007

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2014

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(50.0%)**

Im Neuenheimer Feld 280

69120 Heidelberg, DE y

RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG

(50.0%)

72 Inventor/es:

ROMMELAERE, JEAN;

LACROIX, JEANNINE;

SCHLEHOFER, JÖRG;

WITT, OLAF;

DEUBZER, HEDWIG, ELISABETH;

KERN, SONJA;

HEROLD-MENDE, CHRISTEL;

GELETNEKY, KARSTEN y

LEUCHS, BARBARA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 525 358 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

Uso de parvovirus para eliminar células madre cancerígenas (CSC)

- 5 La presente invención se refiere al uso de un parvovirus, preferiblemente H-1PV para la eliminación terapéutica de células madre cancerígenas (CSC), preferiblemente células madre de neuroblastoma o glioblastoma.

10 En niños, los tumores que se originan a partir del sistema nervioso son los tumores sólidos más frecuentes. Entre ellos, el neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más frecuente. Se deriva de células progenitoras del sistema nervioso simpático dando como resultado tumores sumamente malignos a lo largo de la cadena simpática. El neuroblastoma de alto riesgo se caracteriza frecuentemente por una amplificación del oncogén MYCN y la sobreexpresión consecutiva de la proteína N-myc. A pesar de la introducción de conceptos de tratamiento multimodal que incluyen cirugía, tratamiento radiofarmacéutico mediante metayodobencilguanidina, quimioterapia de alta dosis con rescate con células madre autólogas, irradiación local y terapia de mantenimiento con ácido retinoico, los pacientes con neuroblastoma de alto riesgo tienen un desenlace extremadamente malo con tasas de supervivencia a largo plazo de aproximadamente el 30%. Estos tumores siguen siendo un reto terapéutico y los niños supervivientes padecen toxicidades tras dosis única y a largo plazo relacionadas con el tratamiento.

20 Los glioblastomas humanos malignos representan el mayor número de tumores cerebrales malignos humanos. Los enfoques convencionales para el tratamiento de gliomas incluyen técnicas neuroquirúrgicas (procedimientos de resección o estereotácticos), radioterapia y quimioterapia. La radioterapia (RT) de gliomas malignos aumenta la supervivencia de los pacientes en varios meses pero, como otras terapias convencionales, no puede prevenir la recurrencia tumoral. Sin embargo, a pesar de estas terapias, los glioblastomas se consideran incurables, puesto que el tratamiento con radiación ionizante, la quimioterapia y/o la resección quirúrgica sólo logran una prolongación muy limitada de la duración de vida de los pacientes. Normalmente, la duración de vida promedio tras el diagnóstico es del orden de aproximadamente 12 a 16 meses. Por tanto, se requieren urgentemente modalidades de tratamiento novedosas, en particular para neuroblastoma y glioblastoma. Los documentos WO 2009/083232, US 2004/220124 y Di Piazza Matteo *et al*, Journal of Virology, Vol. 81, N.º 8, abril de 2007, págs. 4186-4198 dan a conocer cada uno el tratamiento de tumores cerebrales tales como glioblastoma con un parvovirus tal como parvovirus H1 o un parvovirus de roedor relacionado. Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar medios para la terapia eficaz de tumores, preferiblemente neuroblastoma o glioblastoma, que superen las desventajas de las terapias actuales.

35 Según la invención, esto se logra mediante el contenido definido en las reivindicaciones. Se encontró sorprendentemente que pueden usarse satisfactoriamente parvovirus para la terapia eficaz mediante la destrucción de células madre cancerígenas.

40 Los virus oncolíticos son una clase novedosa prometedora de agentes biológicos específicos para células cancerígenas, que infectan y destruyen células transformadas a la vez que respetan los tejidos normales. Además del efecto oncolítico observado tanto *in vitro* como *in vivo*, estos virus también proporcionan señales inmunoestimuladoras que inducen la eliminación de células tumorales infectadas por virus. De ese modo, los sistemas inmunitarios innato y adaptativo obtienen el acceso a antígenos tumorales, lo que da como resultado efectos de sensibilización cruzada y vacunación. En modelos de neuroblastoma, se ha aplicado una variedad de virus oncolíticos modificados mediante ingeniería genética incluyendo virus de la enfermedad de Newcastle, poliovirus atenuado y virus del herpes simple 1 y 2 oncolíticos.

50 Se mostró que algunos parvovirus de roedor autónomos destruían preferentemente líneas celulares humanas y de roedores derivadas de tumores y transformadas *in vitro*, mientras que no se observó ninguna acción citocida en células no transformadas. En particular, se encontró que H-1PV se replica y ejerce efectos citopáticos en una variedad de células transformadas o derivadas de tumores, mientras que las células no transformadas permanecían sin afectar *in vitro* e *in vivo*. Los efectos oncolíticos de H-1PV observados se han atribuido a diferentes programas de muerte celular, incluyendo apoptosis, necrosis de las células infectadas o permeabilización de membrana lisosómica, que produce la liberación de catepsinas desde la luz lisosómica al citoplasma. El mecanismo individual mediante la inducción de muerte celular en diferentes tumores malignos parece depender principalmente del contexto celular individual.

60 H-1PV es un parvovirus sin envuelta pequeño (de 20-25 nm) que contiene un genoma de ADN monocatenario lineal de aproximadamente 5 kb. Su replicación en el núcleo depende estrictamente de factores asociados con la fase S y que se complete el ciclo infeccioso. El ciclo infeccioso depende enormemente de factores celulares que se expresan como consecuencia de procesos de proliferación y diferenciación. La proteína no estructural NS1 desempeña un papel esencial en el inicio de la replicación parvoviral y en la inducción de su citotoxicidad. Los parvovirus no puede inducir que células quiescentes entren en la fase S, y la infección sigue siendo críptica hasta que las células huésped entran en la replicación de ADN por sí mismas. Esta dependencia de la replicación de las células huésped representa, en parte, la especificidad tisular, oncotropismo y actividad oncolítica de parvovirus de roedores autónomos.

65 Las ratas son el huésped natural de H-1PV, pero podrían infectarse de manera experimental otros roedores tales

como hámster y *Mastomys*. Ocasionalmente, se han notificado la infección y seroconversión de seres humanos. H-1PV parece ser no tóxico en seres humanos, incluso cuando se aplica de manera sistémica. Se han estudiado los efectos oncolíticos de H-1PV *in vitro* e *in vivo* sobre una variedad de entidades humanas tales como líneas celulares de linfoma, cáncer de páncreas, glioblastoma, hepatoma y cáncer de mama. Sin embargo, el efecto oncolítico de H-1PV sobre tumores pediátricos no se había estudiado hasta la fecha.

En los estudios que dieron como resultado la presente invención, se realizó una evaluación preclínica *in vitro* de la aplicación de H-1PV oncolítico para el tratamiento de células de neuroblastoma. Se analizaron la eficacia de infección, replicación viral y actividad lítica de H-1PV en once líneas celulares de neuroblastoma con diferente estado de MYCN. Se confirmó la oncoselectividad del virus mediante la infección de cultivos a corto plazo de células de lactante no malignas de diferente origen. El cultivo mezclado de células de la glía, células neuronales, astrocitos en cultivos a corto plazo no reveló ningún efecto de H-1PV sobre la viabilidad o la morfología de las células. En cambio, se indujo una infección lítica en todas las líneas celulares de neuroblastoma examinadas a MOI de entre 0,001 y 1 ufp/célula. H-1PV se replicó de manera activa con títulos virales que aumentaron hasta 10.000 veces en el plazo de 48 a 96 horas tras infección. Se observó el efecto lítico de H-1PV independientemente del estado de diferenciación o amplificación del oncogén MYCN. Además, la expresión de proteínas virales en una línea celular de neuroblastoma con MYCN amplificado se correlacionó con la regulación por disminución de la expresión de N-myc. La eficacia de infección, la rápida replicación viral y los efectos líticos exhaustivos sobre células de neuroblastoma junto con la baja toxicidad de H-1PV para células no transformadas, convierte a este parvovirus en un candidato prometedor para la viroterapia oncolítica de neuroblastoma.

En resumen, los experimentos que dieron como resultado la presente invención muestran que la infección de células madre cancerígenas, por ejemplo, células madre de neuroblastoma, con parvovirus representa una terapia nueva y sumamente eficaz sólo con efectos secundarios muy bajos. Esta clase de terapia es incluso eficaz con respecto a CSC que son resistentes a quimioterapia y radioterapia.

Por tanto, la presente invención proporciona un parvovirus, preferiblemente un parvovirus de roedor para su uso en un método para destruir terapéuticamente células madre cancerígenas (CSC).

El término "células madre cancerígenas (CSC)" tal como se usa en el presente documento se refiere a células cancerígenas (que se encuentran dentro de tumores o cánceres hematológicos) que presenta características asociadas con células madre normales, específicamente la capacidad para dar lugar a todos los tipos celulares que se encuentran en una muestra cancerosa particular. Las CSC son por tanto tumorígenicas (formadoras de tumor), en números celulares mucho menores que los cultivos celulares usados comúnmente que se hacen crecer en medio que contiene FCS. Las CSC pueden generar tumores a través de los procesos de células madre de autorrenovación y diferenciación en múltiples tipos celulares. En la bibliografía más reciente, el término inicial "células madre cancerígenas" se ha sustituido por los términos "células tumorales con propiedades de células madre" o "células iniciadoras de tumor". Por tanto, los términos "células tumorales con propiedades de células madre" o "células iniciadoras de tumor" son esencialmente sinónimos al término "células madre cancerígenas".

Esta subfracción de células malignas dentro de un tumor se caracteriza por la expresión de marcadores de células madre, tales como CD133, nestina y SOX2 para células iniciadoras de tumor de origen neuroectodérmico tales como glioblastoma o neuroblastoma. Para varias enfermedades malignas, entre ellas glioblastoma, se ha mostrado *in vitro* e *in vivo* que el tratamiento con fármacos citostáticos convencionales aumenta el número de células dentro de esta fracción. Por tanto, se ha planteado la hipótesis de que estas células madre tumorales producen recidiva y metástasis al dar lugar a nuevos tumores. Por tanto, la terapia de la presente invención dirigida a las CSC mejora la supervivencia y la calidad de vida de pacientes con cáncer, especialmente para niños y para pacientes con enfermedad metastática.

El término "destruir terapéuticamente células madre cancerígenas" significa que las CSC se destruyen por la actividad oncolítica y citotóxica del parvovirus de modo que la proporción de CSC dentro de un tumor disminuye con el tratamiento.

El término "parvovirus" tal como se usa en el presente documento comprende derivados de tipo natural o recombinantes de los mismos o vectores basados en tales virus o derivados. Los parvovirus adecuados, derivados etc. que son útiles para terapia génica los conoce el experto en la técnica.

En una realización preferida del uso de la presente invención, las CSC son (a) células madre cancerígenas resistentes a quimioterapia o radioterapia, o (b) células madre cancerígenas que producen potencialmente recidiva.

En una realización adicional preferida del uso de la presente invención, dichas células madre cancerígenas son células madre de neuroblastoma o células madre de glioblastoma, que representan un modelo para células madre cancerígenas de origen neuroectodérmico.

En una realización adicional preferida, el parvovirus es un parvovirus de roedor, preferiblemente H1, o un parvovirus de roedor relacionado tal como Lull3, virus minúsculo de ratón (MMV), parvovirus de ratón (MPV), virus minúsculo de

rata (RMV), parvovirus de rata (RPV) o virus de rata (RV).

Para la administración, estos parvovirus etc. se combinan preferiblemente con portadores farmacéuticos adecuados. Se conocen bien en la técnica ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados e incluyen disoluciones de solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Además, en un modelo de hepatoma de rata metastásica, H-1PV pudo mostrar que actuaba como vacuna terapéutica cuando se administraba en células tumorales autólogas que sirven como portadores (Raykov *et al.*, 2007). Tales portadores pueden formularse mediante métodos convencionales y pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse de diferentes maneras, por ejemplo mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. Si se usan partículas virales infecciosas que tienen la capacidad para penetrar a través de la barrera hematoencefálica, el tratamiento podría realizarse o al menos iniciarse mediante inyección intravenosa de, por ejemplo, virus H-1. Sin embargo, el tratamiento intravenoso a largo plazo podría resultar ineficaz por la formación de anticuerpos neutralizantes contra el virus H1. Por tanto, podrían ser preferibles diferentes modos de aplicación viral intracraneal o intratumoral. Además, tras la colocación de un catéter de silicio conectado a un pequeño depósito subcutáneo (depósito de Rickham) durante la extirpación del tumor o mediante un procedimiento independiente, puede inyectarse parvovirus de manera local en diversos momentos sin cirugía adicional. El parvovirus o vectores derivados también pueden inyectarse en las CSC con cirugía estereotáctica o mediante direccionamiento con neuronavegación. También son posibles combinaciones de los métodos de aplicación mencionados anteriormente.

El régimen de dosificación se determinará por el médico encargado y otros factores clínicos. Tal como se conoce bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, incluyendo la talla, el área superficial corporal, la edad, el sexo del paciente, el virus, célula etc. particular que vaya a administrarse, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos o terapias que estén aplicándose de manera concurrente.

Leyendas de las figuras

30 Figura 1:

(A) NB124, 72 h tras la infección con H-1EGFP, MOI 1.

35 (B) NCH 421, 36 h tras la infección con H-1EGFP, MOI 50.

(C) Kelly, 48 h tras la infección con H-1EGFP, MOI 1.

(D) IMR-32, 48 h tras la infección con H-1EGFP, MOI 1.

40 Figura 2:

(A) Inmunotransferencia de tipo Western de NS1 de células progenitoras de neuroblastoma NB 124.

45 (B) Inmunotransferencia de tipo Western de NS1 de tres células de glioblastoma con propiedades de células madre.

Figura 3: Infección de células iniciadoras de neuroblastoma y células de glioblastoma con propiedades de células madre con wtH-1PV. Véase el ejemplo 4 para más detalles.

50 Figura 4:

(A) Citomorfología de NB 124, tres semanas tras la infección con wtH-1PV.

(B) Citomorfología de NCH 421, tres semanas tras la infección con wtH-1PV.

55 Figura 5: La infección con H-1PV reduce significativamente la viabilidad celular en células iniciadoras de neuroblastoma y glioblastoma con propiedades de células madre en el plazo de 15 días tras la infección

panel izquierdo: NB 124 mediante MTT el día 15 tras la infección con H-1PV.

60 **panel derecho:** NCH 421 mediante MTT el día 15 tras la infección con H-1PV.

Figura 6: H-1PV induce efectos citostáticos sobre células iniciadoras de neuroblastoma y sobre tres líneas celulares de glioblastoma con propiedades de células madre de manera dependiente de la dosis. Véase el ejemplo 7 para más detalles).

65

Los siguientes ejemplos explican la invención en más detalle.

Ejemplo 1**Materiales y Métodos**5 (A) Cultivo celular

Se obtuvo el cultivo de neuroesferas de neuroblastoma humano NB124 del Dr. Hedwig E. Deubzer (Unidad de Cooperación Clínica, Oncología Pediátrica, Centro Alemán de Investigación del Cáncer). Las líneas celulares de glioma humano con propiedades de células madre NCH 421, NCH 441, NCH 620 y NCH 644 se obtuvieron del PD Dr. Christel Herold-Mende del Departamento de Neurocirugía (Campos *et al.*, 2010). Medio básico (para células madre): DMEM (Sigma Aldrich, Múnich), penicilina-estreptomicina al 1%, L-glutamina al 1%. Medio para células madre: medio básico, complemento de BIT 100 al 20% (provitro GmbH, Berlín), bFGF al 0,02% (RELIA Tech GmbH, Wolfenbüttel), EGF al 0,02% (RELIA Tech GmbH). Medio de bloqueo de tripsina: DMEM (Sigma Aldrich, Múnich), suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%. Se hicieron crecer células con propiedades de células madre como cultivos de neuroesferas tal como se publicó previamente y se cultivaron a 37°C, el 5% de CO₂ en el medio de crecimiento respectivo (Wan *et al.*, 2010).

(B) Producción e infección viral

20 Se produjo H-1PV de tipo natural mediante la infección de células de riñón embrionario humano NBK-324K, y se purificaron mediante filtración (diámetro máximo de las partículas de 0,2 µm) y centrifugación en gradiente de iodixanol. La contaminación de las disoluciones madre virales con endotoxinas era < 2,5 UE/ml. Se infectaron las células con H-1PV como suspensiones monocelulares tras tratamiento con tripsina en su medio de crecimiento respectivo a 37°C.

25

(C) Detección de partículas infecciosas de H-1PV

Se determinaron los títulos virales tal como se describió previamente (Angelova *et al.*, 2009). Brevemente, se sembraron células NB-324K (7,6 x 10³ células/pocillo) en placas de 96 pocillos 24 h antes del ensayo. Se infectaron las células mediante diluciones en serie de 10 veces del sobrenadante de los cultivos de neuroesferas infectados previamente y se incubaron durante 72 h a 37°C, el 5% de CO₂.

30

Tras lisis alcalina (NaOH 0,75 M), se transfirió el ADN a una membrana de nailon, se reticuló y se hibridó con una sonda específica de NS-1 radiomarcada con P³². Se expusieron las inmunotransferencias a película de rayos X para autorradiografía. Siempre se realizaron por duplicado los experimentos de titulación. Se aplicó el virus a multiplicidades de infección (MOI, expresadas en unidades formadoras de placas por célula; ufp) tal como se indica en el texto.

35

(D) Extracción de ADN viral y PCR cuantitativa en tiempo real

40

Se recogió el sobrenadante de los cultivos celulares de neuroesferas infectados en diferentes puntos de tiempo tras la infección. Se sometió el sobrenadante a lisis alcalina en NaOH 1 M en tampón TE durante 30 min a 56°C. Tras la neutralización con una concentración equimolar de HCl, se diluyeron las muestras 1:100 con agua estéril y se analizaron directamente. Se llevó a cabo la cuantificación de ADN viral mediante qPCR en tiempo real con una sonda TaqMan™ específica de NS1 (Applied Biosystems de Life Technologies, Carlsbad (CA), EE.UU.), usando un cicladador térmico ABI Prism 7700 (Applied Biosystems de Life Technologies, Carlsbad (CA), EE.UU.) y se analizó por medio de software SDS 2.1 (Applied Biosystems de Life Technologies, Carlsbad (CA), EE.UU.) tal como se describe en otra parte (Abschuetz *et al.*, 2006). Brevemente, se amplificó un fragmento de ADN de 141 nt dentro del gen NS1 de H-1PV, y se detectó usando la sonda: 5'-6-FAM-ATGCAGCCAG-ACAGTTA-Q-MGB 3'. Se usó un plásmido que contenía la secuencia de NS1 en diluciones en serie en el intervalo de 10¹-10⁸ copias/reacción, para normalizar la qPCR. Las mezclas de reacción individuales (20 µl) consistían en 1 x TaqMan Universal PCR Master Mix™ (Applied Biosystems), sonda NS1-TaqMan™ marcada 0,3 µM, 0,3 µM de cada cebador y 3 µl de molde. Las condiciones de PCR fueron 2 minutos a 50°C (destrucción de molde contaminante por AmpErase™), luego 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos e hibridación/extensión a 60°C durante 60 s.

50

(E) Microscopía

Se generaron imágenes con contraste de fases usando un microscopio de contraste de fases invertido (Olympus; modelo CKX41) usando el software Cell B (Olympus Europa GmbH, Hamburgo, Alemania). Se obtuvieron otras imágenes con contraste de fases usando una cámara Leica DFC350 FX™ (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y el software Leica FireCam™ para Macintosh.

60

(F) Evaluación de la viabilidad y lisis celular

65 Se sometió a prueba la proliferación de células de neuroblastoma con el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) tal como recomienda el fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Se

cultivaron células (2.500 células por pocillo) en placas de 96 pocillos y se infectaron a las MOI indicadas en las figuras. Tras 15 días, se lavaron las células en PBS y se incubaron con disolución de MTT 0,5 µg/ml durante hasta 2 horas. Tras desechar el sobrenadante y secar las células, se añadieron 100 µl de isopropanol por pocillo. Se determinaron fotométricamente los valores de extinción a 570 nm (Multiscan Plus™, Titertek Instruments Inc., Huntsville, AL, EE.UU.).

Se determinó la lisis celular midiendo la liberación de lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo mediante el uso del kit de ensayo Cytotox 96 cytotoxicity assay kit™ (Promega Corporation, Madison WI, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 2

Las células progenitoras de neuroblastoma y glioblastoma con propiedades de células madre son susceptibles a la infección con H-1PV

Para determinar si H-1PV podía infectar células progenitoras de neuroblastoma, se sometieron células NB124 a una unidad de replicación por célula de virus H-1 deficiente en la replicación, recombinante (H-1EGFP) que expresa GFP. Se infectaron neuroesferas de glioblastoma NCH 421 con MOI 50 de H-1EGFP. Las líneas celulares de neuroblastoma con *MYCN* amplificado Kelly e IMR-32 las proporcionó amablemente el Prof. Dr. Olaf Witt, CCU Oncología Pediátrica, Centro Alemán para la Investigación del Cáncer, Heidelberg y sirvieron como controles positivos. La microscopía de inmunofluorescencia reveló que podía detectarse la expresión de GFP tanto en líneas celulares de neuroblastoma como en el cultivo de neuroesferas de NB124 y tras la infección con H-1EGFP, indicando la infección satisfactoria de células de neuroblastoma y la expresión génica dirigida por el promotor viral en las células progenitoras de neuroblastoma infectadas (figura 1, panel izquierdo, microscopía de contraste de fases, panel central fusión, panel derecho, microscopía de fluorescencia).

Ejemplo 3

La expresión de la proteína de H-1PV persiste en células progenitoras de neuroblastoma y células madre de glioma de grado alto hasta 15 días

Para demostrar que las proteínas de wtH-1PV se expresaban en células progenitoras de neuroblastoma y de glioma de grado alto infectadas, se realizó el análisis de inmunotransferencia de tipo Western de proteínas NS1 y NS2 en células infectadas. NS1 y NS2 son proteínas no estructurales requeridas para la infección de células huésped, y VP1/2 son proteínas estructurales de la cápside viral (Chen *et al.*, 1989; Caillet-Fauquet *et al.*, 1990, Brandenburger *et al.*, 1990). Tras la infección con 50 ufp por célula de wtH-1PV, se expresaron estas proteínas virales en todas las líneas de células madre investigadas, en el día 9 y el día 15 tras la infección (figuras 2A,B). Líneas celulares sin propiedades de células madre de neuroblastoma (IMR-32) y glioblastoma (U87) humano sirvieron como controles positivos. Células de glioblastoma humano U87 en condiciones convencionales sirvieron como control positivo.

Ejemplo 4

H-1PV se replica de manera activa en células progenitoras de neuroblastoma y células de glioblastoma con propiedades de células madre

Para tratar el asunto de si H-1PV podía multiplicarse en células progenitoras de neuroblastoma, se infectaron células con wtH-1PV. Se determinaron los números de copias del genoma viral en el sobrenadante mediante PCR en tiempo real en un periodo de tiempo que osciló entre 3 días y 21 días tras la infección. En células de neuroblastoma NB 124, los números de copias del genoma viral aumentaron hasta 1.000 veces y el título de partículas infecciosas aumentó incluso hasta 100.000 veces, indicando la multiplicación viral sumamente eficaz en estas células. La eficacia de replicación de la progenie viral completamente infecciosa en estas células progenitoras de neuroblastoma incluso superó la observada en líneas celulares de neuroblastoma convencionales que presentaron un aumento significativo en los números de copias virales que variaron en un aumento de entre 10^2 y 10^4 veces en el plazo de 72 a 144 h tras la infección (Lacroix *et al.*, 2010).

En células de glioblastoma NCH 421 con propiedades de células madre, los números de copias del genoma viral aumentaron hasta 10.000 veces durante 21 días tras la infección, que es comparable a la eficacia de replicación en otras líneas celulares de glioma humano sin propiedades de células madre (Geletneky *et al.*, 2005).

Para cuantificar la generación de H-1PV de progenie infecciosa, se realizaron adicionalmente ensayos de partículas infecciosas con sobrenadantes de la misma línea celular progenitora de neuroblastoma infectada en cultivo. Los virus H-1 de progenie eran biológicamente activos, es decir podían infectar células NBK-324K. En el ensayo de unidades de infección, pudo determinarse un aumento de 4.000 veces en el cultivo de neuroesferas de neuroblastoma NB124 y un aumento de 3.500 veces de partículas infecciosas en la línea celular de glioma con propiedades de células madre NCH 421 en comparación con el virus introducido (figura 3; curva superior: Vg/ml; curva inferior: UI/ml).

Tomado en conjunto, pudo demostrarse que H-1PV infectaba de manera productiva células progenitoras de neuroblastoma y células de glioblastoma con propiedades de células madre. Pudo demostrarse que la infección de estas células inducía la expresión de proteínas virales esenciales, una replicación viral eficaz y la producción de progenie infecciosa de H-1PV.

Ejemplo 5

H-1PV induce infección lítica en líneas celulares de neuroblastoma y de glioma de alto grado “madre”

Para someter a prueba en qué grado era lítica la infección de células de neuroblastoma con H-1PV de tipo natural, se documentó la citomorfología de las células infectadas mediante microscopía de contraste de fases. Tres semanas tras la infección, pudo mostrarse que H-1PV inducía efectos citopáticos significativos sobre células NB124 cultivadas aplicando una MOI de 0,01 u.f.p por célula o más (figura 4A). Tres semanas tras la infección, pudo mostrarse que H-1PV inducía efectos citopáticos significativos sobre células NCH 421 cultivadas aplicando una MOI de 1 u.f.p por célula o más (figura 4B).

Ejemplo 6

La infección con H-1PV reduce significativamente la viabilidad celular en células progenitoras de neuroblastoma y de glioblastoma con propiedades de células madre en el plazo de 15 días tras la infección

Pudo mostrarse que H-1PV inducía efectos citopáticos significativos sobre neuroesferas de neuroblastoma cultivadas. Para cuantificar los efectos citopáticos con respecto a la actividad metabólica y la integridad celular, se realizó la prueba de MTT en células NB124 y NCH 421, 15 días tras la infección con MOI crecientes de wtH-1PV. Aplicar una MOI de 1 ufp/célula redujo las células progenitoras de neuroblastoma viables en el 80% y en células de glioblastoma con propiedades de células madre en el 60% en el plazo de 15 días tras la infección (figura 5).

Ejemplo 7

H-1PV induce efectos citostáticos sobre células progenitoras de neuroblastoma y sobre tres líneas celulares de glioblastoma con propiedades de células madre de manera dependiente de la dosis.

Se infectaron cultivos de neuroesferas de neuroblastoma NB 124 y células de glioblastoma con propiedades de células madre NCH 421, NCH 620 y NCH 644 con o bien 1 ufp por célula (figura 6, panel izquierdo) o bien 50 ufp por célula (figura 6, panel derecho) y posteriormente se contaron las células viables en múltiplos de 6 pocillos por punto de tiempo. Empezando del día 12 al 15 tras la infección, pudo demostrarse una diferencia significativa en el número de células viables para cada línea de células madre tumorales. Aplicando una MOI de 1, el efecto fue menos pronunciado que tras la aplicación del MOI mayor de 50 u.f.p. por célula (figura 6; curva superior: simulada; curva inferior: H-1PV).

Ejemplo 8

El efecto citostático sobre “células madre tumorales” no parece estar mediado por apoptosis

Se analizaron cultivos celulares de neuroesferas de neuroblastoma y glioma de alto grado mediante tinción con yoduro de propidio y posterior citometría de flujo para determinar la presencia de una población celular con contenido de ADN sub-G1 (menor de 2n) que es indicativo de fragmentación de ADN y apoptosis. En paralelo, se realizaron inmunotransferencias de tipo Western para la detección de proteínas virales tales como NS1. Sin embargo, la inducción de expresión de NS1 en células madre de neuroblastoma NB124 ni en células de glioma de alto grado “madre” ni se correlacionó con detención en G2 ni con la aparición de una población sub-G1.

Referencias

Abschuetz, A., *et al.* “Oncolytic murine autonomous parvovirus, a candidate vector for glioma gene therapy, is innocuous to normal and immunocompetent mouse glial cells.” *Cell Tissue Res.* 325.3 (2006): 423-36.

Angelova, A. L., *et al.* “Improvement of gemcitabine-based therapy of pancreatic carcinoma by means of oncolytic parvovirus H-1PV.” *Clin. Cancer Res.* 15.2 (2009): 511-19.

Brandenburger, A., *et al.* “NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp.” *Virology* 174.2 (1990): 576-84.

Caillet-Fauquet, P., *et al.* “Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins.” *EMBO Journal* 9.9 (1990): 2989-95.

Campos, B., *et al.* "Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells." *Clin.Cancer Res.* 16.10(2010):2715-27.

5 Chen, Y. C., *et al.* "Sensitization of human keratinocytes to killing by parvovirus H-1 takes place during their malignant transformation but does not require them to be tumorigenic." *Carcinogenesis.* 10.1 (1989):163-7.

Geletneky, K., *et al.* "Oncolytic potential of rodent parvoviruses for cancer therapy in humans: a brief review." *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52.7-8 (2005): 327-30.

10 Lacroix, J., *et al.* "Parvovirus H1 selectively induces cytotoxic effects on human neuroblastoma cells." *Int. J. Cancer* (2010).

Raykov, Z., *et al.* "Combined oncolytic and vaccination activities of parvovirus H-1 in a metastatic tumor model." *Oncology Reports* 17 (2007): 1493-99.

15 Wan, F., *et al.* "The Utility and Limitations of Neurosphere Assay, CD133 Immunophenotyping and Side Population Assay in Glioma Stem Cell Research." *Brain Pathol.* (2010).

REIVINDICACIONES

1. Parvovirus para su uso en un método para destruir terapéuticamente células madre cancerígenas (CSC).
- 5 2. Parvovirus para el uso según la reivindicación 1, en el que dichas células madre cancerígenas son (a) células madre cancerígenas resistentes a quimioterapia o radioterapia, o (b) células madre cancerígenas que pueden producir potencialmente recidiva.
- 10 3. Parvovirus para el uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que dichas células madre cancerígenas son células madre de neuroblastoma o células madre de glioblastoma.
- 15 4. Parvovirus para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho parvovirus es H1 (H-1PV) o un parvovirus de roedor relacionado seleccionado del grupo que consiste en LullI, virus minúsculo de ratón (MMV), parvovirus de ratón (MPV), virus minúsculo de rata (RMV), parvovirus de rata (RPV) o virus de rata (RV).
5. Parvovirus para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho parvovirus se administra mediante administración intravenosa (i.v.), intratumoral, intracraneal o intracerebral.
6. Uso de un parvovirus para la preparación de una composición farmacéutica para destruir CSC.

Figura 1

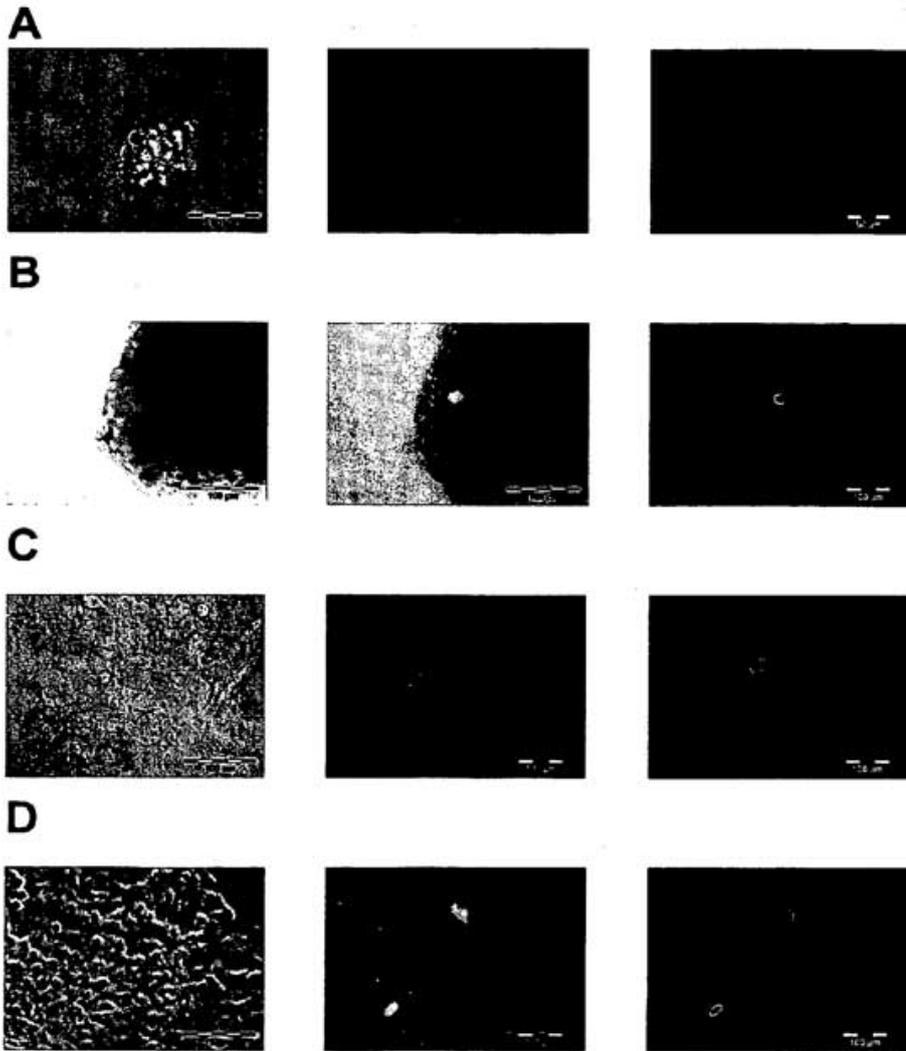
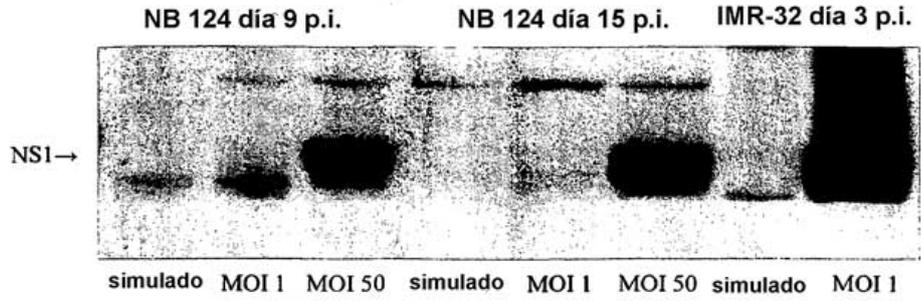


Figura 2

A



B

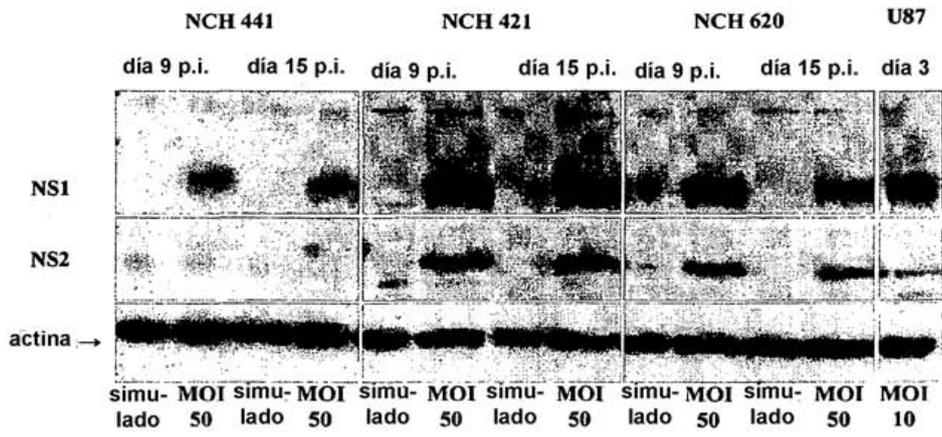


Figura 3

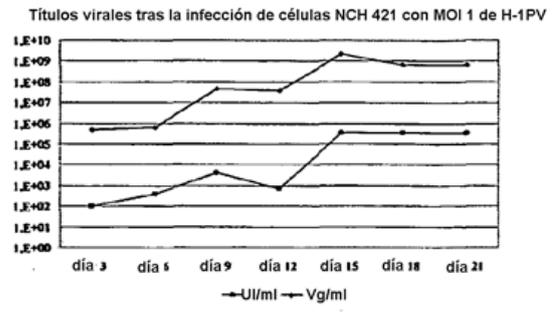
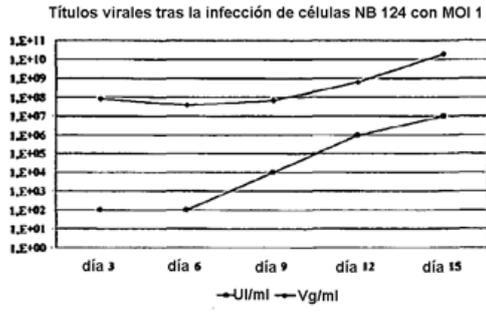


Figura 4

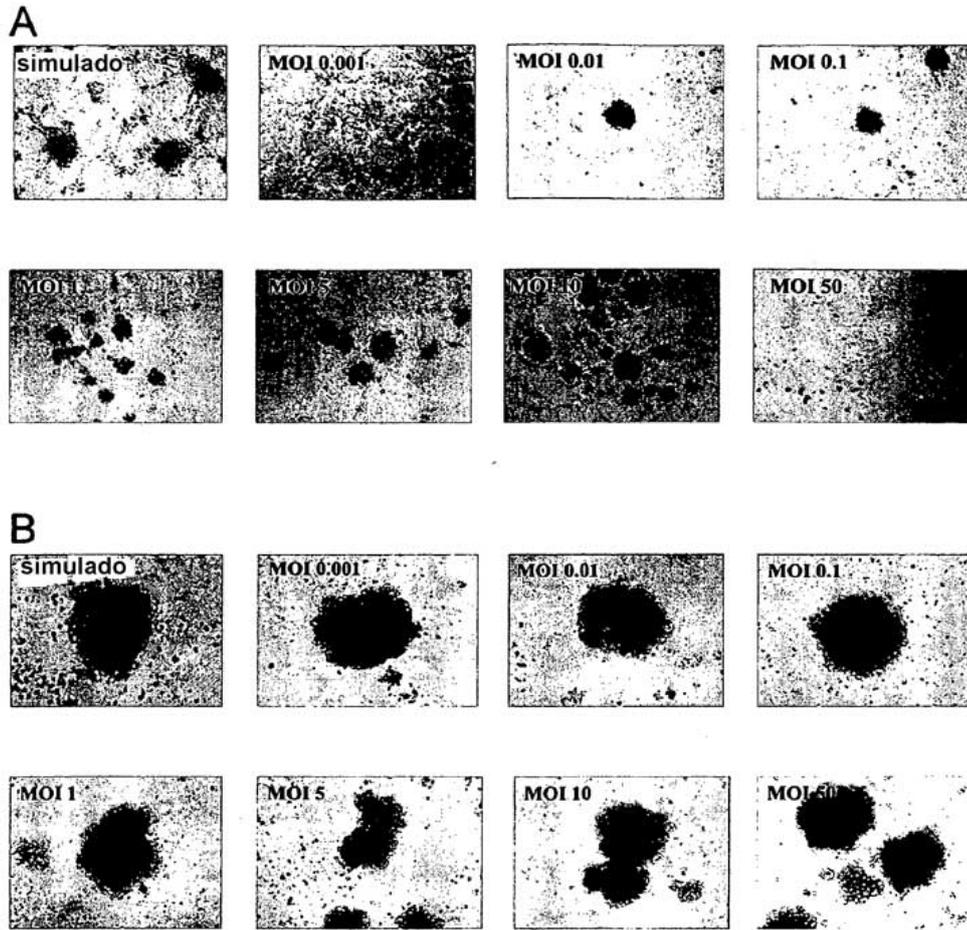


Figura 5

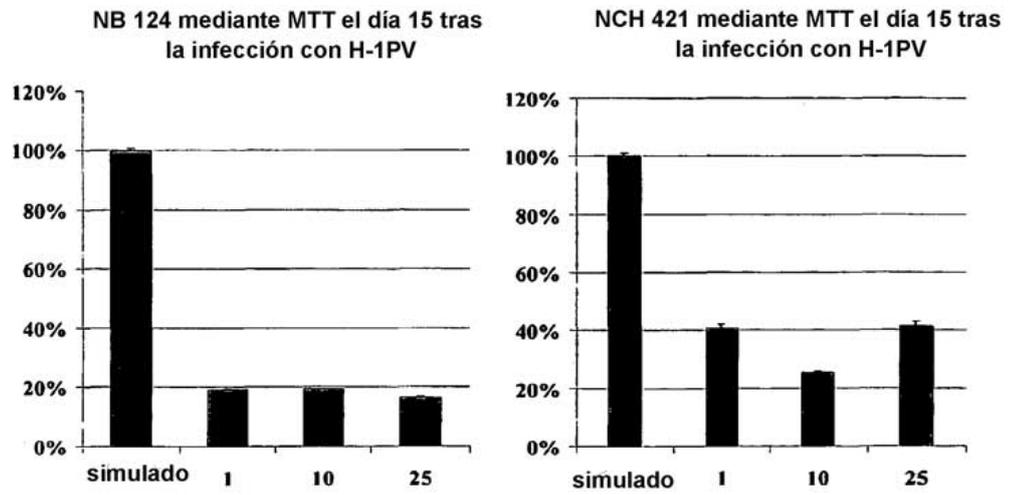


Figura 6

