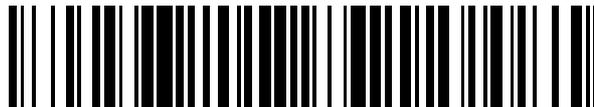


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 396**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2011 E 11724119 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2566491**

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

30 Prioridad:

07.05.2010 EP 10004897

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

16.10.2015

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)**

**Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 548 396 T3

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

DESCRIPCIÓN

Parvovirus de roedor modificado capaz de propagarse y extenderse en los gliomas humanos

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Así, la misma se refiere a una variante de parvovirus de rata H-1 capaz de propagarse y extenderse en las células de tumores humanos, caracterizada porque los péptidos virales comprenden las secuencias de aminoácidos que se muestran en la Figura 8B y que tienen una delección desde la posición 587 a 629 en el término C de NS1 y las sustituciones P124Q y E280K en NS1, una delección desde la posición 95 a la 136 en el exón medio de NS2 y la sustitución de aminoácidos H374Y en VP1/VP2.

Los virus oncolíticos tales como parvovirus de roedor representan nuevas herramientas para el tratamiento del cáncer. Además de destruir específicamente las células del cáncer (oncólisis), estos agentes proporcionan también señales de peligro que incitan al sistema inmune a eliminar los tumores infectados con el virus. Como consecuencias de eventos oncolíticos, los sistemas inmunes innato y adaptativo logran Acceso a los antígenos tumorales, lo que da como resultado efectos de cebado cruzado y vacunación. Los parvovirus de roedor son virus de DNA monocatenario que poseen actividad oncolítica intrínseca, es decir los mismos se replican preferiblemente en las células de cáncer de origen tanto murino como humano y las destruyen.

El glioblastoma es una enfermedad devastadora con sólo posibilidades de tratamiento limitadas. Evidentemente, la prognosis para los pacientes requiere nuevas terapias. Los virus oncolíticos competentes en replicación arriba expuestos se consideran prometedores dado que son capaces de extenderse en los tejidos malignos e inducir respuestas inmunes antitumorales. Entre ellos, los parvovirus de roedor parecen ser candidatos excelentes debido a su oncotropismo natural, su capacidad para infectar células humanas, la toxicidad específica para las células neoplásicas, y la baja patogenicidad para los humanos. En un modelo de rata, H1-PV era capaz de causar una regresión completa de gliomas establecidos sin relapso alguno, y demostró ser capaz de direccionarse a diversos gliomas humanos, destruyendo por ello eficientemente estas células con indiferencia de su resistencia adquirida hacia inductores de muerte conocidos. Aunque H1-PV resultó capaz de infectar y destruir eficientemente la mayoría de los linajes de células de glioblastoma humano ensayadas hasta ahora, la mayoría de estas células resistían la replicación eficiente del virus, la producción de partículas de progenie y la propagación. Este fallo en propagarse y extenderse en los tejidos de tumor humanos podría tener un impacto importante para la eficacia del tratamiento de los gliomas humanos *in vivo*, no sólo debido a que la destrucción de las células se limita a un solo evento exitoso que alcanzaba únicamente una proporción limitada de las células tumorales, sino también debido a la falta de un transporte intracelular activo de viriones de la progenie a la superficie celular.

Por tanto, es un objeto de la presente invención resolver este inconveniente de las cepas de la técnica anterior, es decir, proporcionar parvovirus que sean capaces de propagarse y extenderse en un tejido tumoral humano.

Conforme a la invención, esto se consigue por las materias objeto definidas en las reivindicaciones. Experimentos iniciales de los inventores han demostrado que los viriones de PV de la progenie se desplazan desde el núcleo a la periferia de la célula por vesículas antes de la lisis celular en la que los mismos se liberan al medio sobrenadante. Además, este escape vesicular está asociado con proteínas intracelulares múltiples (que incluyen antígenos tumorales potenciales) que son transportados como "co-carga" a la superficie celular y podrían contribuir a la estimulación inmune antitumoral del hospedador. Para corregir los efectos del aislado de H1-PV original (pSR19) en la propagación y extensión del virus en el glioblastoma humano, los inventores intentaron obtener variantes de H1-PV competentes en propagación por pasadas en serie en linajes de células de glioblastoma humano procedentes de pacientes semi-permisivos, es decir, soslayar los potenciales cuellos de botella durante el proceso de infección (eliminación de la cápsida, suministro del genoma viral al núcleo, conversión en doble cadena) se transfirió DNA de clon infeccioso de H1-PV (pSR-19) a linajes de células de glioblastoma humano diferentes (v.g. NCH149, NCH82, NCH89) y este DNA competente en replicación se sometió a pases hasta que se hicieron visibles los efectos citopáticos. Se realizaron pases virales adicionales (> 15) combinando los viriones de la progenie asociados a las células obtenidos por congelación y descongelación repetidas en vTE de pH 8.7 con virus liberados del medio por infección. Un conjunto de virus competentes en propagación se analizó luego después de 25 pases en células NCH149 que presentaban amplificación eficiente del DNA viral, generación de viriones de la progenie y propagación en una diversidad de cultivos de glioblastoma humano. A partir de este conjunto original, se aislaron clones de virus individuales por purificación de calvas en células NB324K, se amplificaron una vez más en células NCH149, se clonaron y se secuenciaron.

El análisis genético de todas las variantes de H1-PV ha revelado una delección de 84 nucleótidos que afecta a 28 aminoácidos de la región codificante de NS1 (término C) y NS2 y una sola transición de citosina a timidina en la posición 3913 que cambia His374 a Tyr en VP2. Dos sustituciones adicionales de guanidina a adenosina en la región VP2 (3964 y 4108) conducentes a un cambio de Asp391 a Asn y Asp439 a Ser han sido asignadas únicamente a dos aislados. Quedaban un pequeño número de cambios en las regiones 3' no codificantes, con prevalencia diversa. Aparentemente, la región situada aproximadamente entre los nucleótidos 2000 y 2200 comprende un punto caliente de variabilidad que permite que H1-PV, por modulación de la función NS1/NS2 se adapte al ambiente hospedador. Por tanto, es posible modificar activamente el intervalo de hospedadores de H1-PV,

pero también de las otras cepas de PV de rata estrechamente relacionadas, H3 y TVX por inserción/delecciones dentro de esta región.

Las variantes de H1-PV de nueva generación son capaces de propagarse y extenderse en los linajes de células de glioblastoma humano. Esto permite una infección/destrucción incrementada de tumores humanos ya establecidos y, en consecuencia, se espera que dé lugar a una mejor estimulación inmune anti-tumoral. De acuerdo con los descubrimientos previos de los inventores del escape de vesículas de parvovirus, es razonable suponer que el co-transporte de proteínas intracelulares a la superficie podría servir para desenmascarar células tumorales para una respuesta inmune del hospedador. Este efecto de co-carga no está presente en ausencia de formación de viriones de la progenie utilizando el aislado de H1-PV original (pSR-19).

10 **Sumario de la presente Invención**

Con el proceso de adaptación (sometimiento a pasajes) en células semi-permisivas como se reseña en los ejemplos, pudo generarse una variante H1-PV muy eficiente para propagación en muchos otros linajes de células de glioblastoma humano. El procedimiento reseñado puede extenderse a otros linajes de células de tumores humanos, con inclusión de células madre tumorales.

15 La adaptación del H1-PV de rata en las células del glioblastoma humano condujo a una delección en el término C de H1 NS1/exón medio de NS2. Esta región representa un área de punto caliente para variación que determina el intervalo de hospedadores de H1-PV y con adaptaciones/análisis adicionales de otros aislados de PV de roedor no caracterizados hasta ahora, pueden encontrarse en esta área variaciones adicionales.

20 Además de generar una variante H1-PV que es potencialmente capaz de propagarse de célula a célula en un tejido de tumor de glioblastoma humano y por consiguiente tiene un mayor potencial para destrucción de las células tumorales (como se indica por los ensayos de capacidad), las partículas de la progenie de este aislado se transportan activamente a la periferia celular por vesículas. Además de viriones de síntesis nueva, se encontraron después de la infección proteínas celulares múltiples que estaban asociadas con tales vesículas y que no estaban presentes en las células de glioblastoma humano no infectadas. Este co-carga podría servir para desenmascarar células tumorales a fin de hacerlas disponibles para el sistema inmune del hospedador, contribuyendo con ello a una respuesta inmune antitumoral inducida por el virus.

25 **Breve descripción de los dibujos**

Figura 1: (Arriba) Representación esquemática del enfoque de adaptación

30 El parvovirus de rata H1-PV se propaga rápidamente en las células de rata transformadas tales como el glioma de rata RG-2 (izquierda), pero se limita a producirse y propagarse en los linajes de células de glioblastoma humano. Para resolver estas limitaciones, se realizaron pasadas en serie en glioblastoma humano semi-permisivo que permitía que ocurriesen mutaciones y amplificación de variantes permisivas de H1-PV. Se obtuvieron y analizaron variantes competentes en propagación después de 20 pasajes consecutivos en células NCH149.

(B, C) Determinación de la amplificación del DNA en NCH149

35 Células NCH149 se infectaron con 10 unidades formadoras de calvas (pfu)/célula H1-PV, y se midió la presencia de compuestos intermedios de replicación por transferencia Southern después de los tiempos post-infección indicados.

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

40 (C) Amplificación del DNA primario y secundario con H1-PV adaptado al glioma humano, determinación del funcionamiento de gelsolin para escape y propagación vesicular. Se utilizaron Inf 1, infección primaria, e Inf 2, sobrenadantes de Inf 1 para infectar células NCH149 naïf. La generación de compuestos intermedios de replicación viral se midió por transferencia Southern. αCon, suero de control; αGln, antisuero neutralizante generado contra gelsolin; dRF, compuesto intermedio de replicación dímero; mRF, compuesto intermedio de replicación monómero; ssPNA, partículas de virus de la progenie = genomas de virus monocatenarios.

Figura 2: Determinación del escape vesicular de H1-PV e identificación de "co-carga"

45 (A) Se infectaron células NCH149 con 10 pfu/célula H1-PV adaptado al glioma humano y se fraccionaron respecto a núcleo (Nuc), fracción mitocondrial pesada (HMF), y fracción mitocondrial ligera (LMF), que contenían vesículas celulares. Para determinar la presencia de viriones de la progenie en la fracción vesicular, los componentes LMF se separaron ulteriormente por gradientes en yodexanol y la presencia de DNA del virión se midió por transferencia Southern en comparación con la presencia de marcadores vesiculares (determinada por transferencia Western).

(B) Determinación de proteínas vesiculares en células NCH149 infectadas con hgH1-PV e infectadas falsamente. Las vesículas se purificaron como se describe en (A) y se analizaron respecto

a su contenido de proteínas por SDS-PAGE y tinción con plata. Las proteínas supra-representadas en las vesículas celulares infectadas con hgH1-PV se indican por flechas.

Figura 3:

5 (A) Determinación de la expresión de proteína viral después de infección de células NCH149 con H1-PV adaptado al glioma de rata (pSR19) frente a glioma humano

Se infectaron células NCH149 con 10 pfu/célula y se recogieron en los tiempos indicados después de la infección. La acumulación de proteínas virales se determinó por transferencia Western. Se muestra dentro de un círculo (rojo) la gran heterogeneidad de NS1 producido después de infección con hgH1-PV y la mayor acumulación de NS2 y NS3 (azul).

10 (B) Se infectaron células RG-2 y NCH149 con las preparaciones de virus indicadas a una multiplicidad de 10, y se etiquetaron metabólicamente con ³²P-ortofosfato a 24 h.p.i. durante 4 horas

15 Se cosecharon las células, se purificó NS1 por inmunoprecipitaciones y SDS-PAGE y se determinó el patrón de fosfopéptido triptico por electroforesis/cromatografía bidimensional. Se muestran los patrones fosfopeptídicos de NS1 producido por H1-PV de rata (pSR-19) en el glioma de rata (izquierda), NCH149 (centro), así como hgH1-PV en células NCH149 (derecha). Se rodean con un círculo: fosforilaciones que se sabe impulsan la amplificación del DNA viral.

Figura 4:

(A) Multiplicación del virus de entrada después de infección de diversos linajes de células diana

20 Los linajes de células indicados se infectaron a una multiplicidad de 10, se lavaron y se recogieron 4 (virus de entrada), 24 y 48 horas después de la infección. El virus asociado con las células y el medio se determinó por ensayo de calvas. La amplificación media 24 y 48 horas después de la infección se expresa respecto al título de virus de entrada (4 horas).

(B) Ensayo de capacidad del virus

25 Se sembraron los linajes de células diana en cubetas de 24 pocillos, se infectaron a las multiplicidades indicadas con las preparaciones de virus apropiadas, y las células vivas se fijaron y se tiñeron con violeta cristal 6 días después de la infección.

Figura 5:

Arriba: organización del genoma de H1-PV con indicación de la variación encontrada después de adaptación en glioma humano

30 Sección media: Fragmentos de PCR generados a partir de las preparaciones de virus purificado en calvas

Abajo: Determinación genética de las variantes de hgH1-PV purificadas en calvas

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

Figura 5b: Calva #13 de la variante H1-PV:

35 Después de la caracterización inicial de 5 calvas (1, 2, 3, 5, y 8) se clonó y secuenció una calva adicional derivada del mismo experimento de adaptación (calva #13). Esta variante adicional fue reconocida por una delección diferente en la parte C-terminal de NS1/ exón medio de NS2 junto con las mutaciones 2 y 6 previamente encontradas en la primera tanda de caracterizaciones (calvas 1 a 8).

40 Figura 6: Caracterización detallada de todas las variaciones genéticas encontradas por secuenciación de calvas individuales.

Figura 6b: Caracterización detallada de la delección adicional en la región codificante de NS1/NS2 encontrada por secuenciación de la calva #13

Figura 7: Ensayo de capacidad viral de stocks de virus derivados de aislados de calvas individuales.

45 Figura 8: Cambios en las secuencias de proteína H1-PV deducidos de los cambios de nucleótidos obtenidos por secuenciación de DNA y resumidos en Fig. 6

Secuencias de proteínas correspondientes a la secuencia de nucleótidos de H1-PV publicada en NC_001358. Los tres exones de NS2p que se deducen del patrón de transcripción de Qiu et al., (2006) se indican en *cursiva* (el término N común con NS1 = exón 1) - regular (exón medio) - cursiva (exón C-terminal [único para cada isoforma

NS2). Los errores de secuenciación corregidos se indican en gris claro (estas diferencias respecto a la secuencia duplicada se encontraban también en la totalidad de los aislados utilizados por los inventores). Las variaciones creadas mediante pases en células NCH149 se indican en negrita y están marcadas en gris claro. Las secuencias específicas de VP1 se presentan en *cursiva*.

- 5 Figura 8b: Cambios en las secuencias de proteína H1-PV en la calva #13 deducidos de los cambios de nucleótidos obtenidos por secuenciación de DNA y resumidos en Fig. 6b.

Las secuencias de proteínas correspondientes a la secuencia de nucleótidos H1-PV se han publicado bajo NC_001358. Los tres exones de NS2p deducidos del patrón de transcripción de Qiu et al., (2006) se indican en *cursiva* (término N común con NS1 = exón 1) - regular (exón medio) - *cursiva* (exón C-terminal [único para cada isoforma NS2]). Los errores de secuenciación corregidos se indican en gris claro (estas diferencias respecto a la secuencia publicada se encontraron también en la totalidad de los cuatro aislados utilizados por los inventores). Las variaciones creadas por sometimiento a pases en células NCH149 se indican en negrita. Las secuencias específicas de VP1 se designan en *cursiva*. Los cambios de codificación de la delección D1b y VP1/2 mut 4 de la calva #13 se presentan en negrita y marcados con color gris claro.

- 15 Figura 9: Impacto de la infección por H1-PV (tipo salvaje y calva #3), respectivamente sobre el crecimiento tumoral de células de glioblastoma U87 implantadas subcutáneamente en ratones balb/c desnudos.

Descripción Detallada de la presente Invención

La presente invención proporciona una variante de parvovirus de rata H-1 capaz de propagarse y extenderse en los las células humorales humanas, caracterizada por que los polipéptidos virales comprenden las secuencias de aminoácidos que se muestran en la Figura 8b y que tienen una delección desde la posición 587 a 629 en el término C de NS1 y las sustituciones P124Q y E280K en NS1, una delección desde la posición 95 a 136 en el exón medio de NS2 y la sustitución de aminoácido H374Y en VP1/VP2.

El término "propagación" como se utiliza en esta memoria significa que los viriones de la progenie de la variante de parvovirus exhiben amplificación significativa con respecto a los niveles de entrada (es decir > 5 veces).

- 25 El término "extensión" como se utiliza en esta memoria significa que los viriones de la progenie de la variante de parvovirus son capaces no solo de destruir poblaciones de células infectadas primariamente, sino que son capaces de causar infecciones secundarias de células naif con partículas producidas durante la primera tanda de infección.

La expresión "semi-permisiva" como se utiliza en esta memoria para caracterización de las células hospedadoras significa que la infección con el virus da como resultado la replicación viral incompleta dentro del tipo particular de células hospedadoras, pero se caracterizan por amplificación del DNA viral y eventualmente por rendimientos bajos de viriones de la progenie. Los últimos no tienen que ser necesariamente infecciosos al comienzo del procedimiento.

La persona experta en la técnica puede llegar a la variante de parvovirus H-1 conforme a la presente invención sometiendo una cepa de partida a pases en serie como se reseña en los Ejemplos, más adelante, o por introducción de una delección que dé como resultado la modificación deseada de las propiedades biológicas, es decir, capacidad de la variante de parvovirus para propagarse y extenderse, destruyendo con ello las células tumorales humanas a partir de la secuencia de ácido nucleico conocida y las secuencias de aminoácidos de las proteínas no estructurales del parvovirus H-1 (Rhode y Paradiso 1983; Qiu et al., 2006). La persona experta en la técnica puede ensayar también fácilmente si una variante particular exhibe las propiedades biológicas deseadas indicadas utilizando los ensayos que se exponen en los ejemplos, más adelante.

- 40 La variante de parvovirus de la invención se deriva del parvovirus H-1 (H-1PV).

En principio, cualquier tumor puede curarse utilizando una variante de parvovirus H-1 de la presente invención, siendo preferidos los gliomas. Un glioma preferido particular es un glioblastoma.

Un linaje de células tumorales semi-permisivas humanas preferidas es NCH149. En lo que respecta al procedimiento de sometimiento a pases en serie, la persona experta en la técnica puede determinar fácilmente cuántos pases son suficientes para llegar a una variante H1 de parvovirus de la presente invención. En general, sin embargo, este método comprende al menos 10 pases, preferiblemente al menos 20 a 25 pases, o más. Con preferencia, los pases se realizan en células NCH149.

Con objeto de asegurar la pureza y estabilidad de las variantes de virus, los clones individuales pueden purificarse en calvas después de los pases, preferiblemente en células NB 324K.

- 50 Una materia adicional que constituye el objeto de la presente invención se refiere a un ácido nucleico, particularmente un DNA, que codifica una variante del parvovirus anterior.

Un DNA conforme a la invención puede estar presente en un vector y vector de expresión, respectivamente. Una persona experta en la técnica está familiarizada con ejemplos de los mismos. En el caso de un vector de expresión

para E. coli, éstos son v.g., pGEMEX, derivados de pUC, pGEX-2T, pET3p, vectores de expresión basados en T7, y pQE-8. Para la expresión en levadura, v.g. tienen que mencionarse pY100 y Ycpad1, mientras que deben indicarse v.g. pKCR, pEFBOS, cDM8, pMSCND, y pCEV4 para la expresión en células animales. El vector de expresión de baculovirus pAcSGHisNT-A es especialmente adecuado para la expresión en células de insecto.

- 5 En una realización preferida, el vector que contiene el DNA conforme a la invención es un virus, v.g., un adenovirus, virus vaccinia, un virus AAV o un parvovirus, tal como MVM o H-1, siendo preferido un parvovirus. El vector puede ser también un retrovirus, tal como MoMULV, MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV o GaLV.

- 10 Para construcción de vectores de expresión que contienen el DNA conforme a la invención, es posible utilizar métodos generales conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen v.g. técnicas de recombinación in vitro, métodos de síntesis y métodos de recombinación in vivo.

- 15 Adicionalmente, la presente invención se refiere a células hospedadoras que contienen las variantes o vectores arriba descritas(os). Estas células hospedadoras incluyen 293 (T) humanas, NBK, células RG2 de rata, NCH149, NCH82 o células U87. Métodos de transformación de estas células hospedadoras, o de selección fenotípica de transformantes y de expresión de DNA conforme a la invención utilizando los vectores arriba descritos se conocen en la técnica.

Así, la presente descripción proporciona también un método de producción de la variante parvovirus de la invención, que comprende el cultivo de una célula hospedadora de la invención en condiciones adecuadas y la recolección de la variante de parvovirus de las células o el medio.

- 20 Además, la presente invención se refiere a anticuerpos que reconocen específicamente una variante de parvovirus arriba descrita, es decir, la región polipeptídica de la variante de parvovirus en la que se localiza la delección, que caracteriza la variante de parvovirus de roedor en el sentido de que es capaz de propagarse y extenderse en gliomas humanos. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, policlonales o sintéticos o fragmentos de los mismos, v.g., fragmentos Fab, Fv o scFv. Preferiblemente se trata de anticuerpos monoclonales. Para la producción es favorable inmunizar animales - particularmente conejos o pollos para un anticuerpo policlonal y ratones para un anticuerpo monoclonal - con una variante de parvovirus anterior o con fragmentos de la misma. Los reforzantes adicionales de los animales pueden verse afectados por la misma variante de parvovirus o con fragmentos de la misma. El anticuerpo policlonal puede obtenerse luego a partir del suero del animal y yema de huevo, respectivamente. El anticuerpo monoclonal puede obtenerse conforme a métodos estándar, haciéndose particularmente referencia al método de Köhler y Milstein (Nature 256 (1975), 495) y Galfre (Meth. Enzymol. 73 (1981), 3). En este caso, se fusionan células de mieloma de ratón con células de bazo originarias de los animales inmunizados. Los anticuerpos conforme a la invención pueden utilizarse de muchas maneras, v.g. para la inmunoprecipitación de las variantes de parvovirus arriba descritas o para el aislamiento de las mismas. Los anticuerpos pueden combinarse en inmunoensayos en fase líquida o a un portador sólido. En conexión con esto, los anticuerpos pueden etiquetarse de diversas maneras. La persona experta en la técnica está familiarizada con marcadores y métodos de etiquetado adecuados. Ejemplos de inmunoensayos son ELISA y RIA.

Se proporciona también un kit para la aplicación de la presente invención. Este kit comprende lo siguiente:

- (a) una variante de parvovirus conforme a la invención;
- (b) un DNA conforme a la invención, v.g. un vector de expresión, particularmente un parvovirus ;
- (c) un anticuerpo conforme a la invención; y/u, opcionalmente,
- 40 (d) agentes adyuvantes convencionales, tales como disolventes, tampones, portadores, marcadores y controles.

De los componentes (a) a (d) pueden estar presentes uno o más representativos de cada uno.

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

- 50 Para la administración, el agente parvoterapéutico puede combinarse con portadores farmacéuticos adecuados. Portadores farmacéuticos adecuados de un tipo bien conocido en la técnica y fácilmente disponibles en el comercio, incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato (PBS), agua, emulsiones tales como emulsiones aceite/agua, agentes humectantes de diversos tipos, soluciones estériles, etc. Tales portadores pueden formularse con el o los agentes parvoterapéuticos por métodos de formulación convencionales para administración al individuo a una dosis adecuada.

Portadores farmacéuticamente compatibles adicionales pueden incluir geles, materiales matriz bioabsorbibles, elementos de implante que contienen el agente terapéutico, o cualquier otro vehículo, medio de suministro o dispensación o material(es) adecuado(s). La administración de las composiciones farmacéuticas parvoterapéuticas a

un paciente, v.g. un paciente con tumor cerebral, puede efectuarse por cualquiera de numerosas vías adecuadas, v.g., por administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intracraneal, e intratumoral. Por supuesto, la ruta de administración depende de la naturaleza de la enfermedad y el o los agentes terapéuticos específicos contenidos en la composición farmacéutica.

- 5 Si tal o tales agentes parvoterapéuticos comprenden partículas infecciosas de virus con capacidad para penetrar a través de la barrera hematoencefálica, el tratamiento puede realizarse o iniciarse al menos por inyección intravenosa del agente terapéutico viral, v.g., una variante H1-PV.

- 10 Dado que el tratamiento intravenoso a largo plazo es susceptible de resultar ineficiente como consecuencia de la formación de anticuerpos neutralizantes para el agente terapéutico viral, pueden adoptarse diferentes modos de administración después de un régimen inicial de administración viral intravenosa, o tales técnicas de administración diferentes, v.g., administración intracraneal o intratumoral del virus, pueden utilizarse alternativamente a lo largo de todo el curso del tratamiento parvoviral.

- 15 Como otra técnica específica de administración, el agente parvoterapéutico (virus, vector y/o agente celular) puede administrarse al paciente desde una fuente implantada en el paciente. Por ejemplo, un catéter, v.g., de silicona u otro material biocompatible, puede estar conectado a un pequeño depósito subcutáneo (depósito de Rickham) instalado en el paciente durante la extirpación del tumor o por un procedimiento independiente, para permitir que la composición parvoterapéutica se inyecte localmente en diversos momentos sin intervención quirúrgica ulterior. La variante de parvovirus o vectores derivados pueden inyectarse también, v.g., en un tumor, por técnicas quirúrgicas estereotácticas, o por técnicas de direccionamiento por neuronavegación.

- 20 La administración de los agentes o composiciones parvovirales puede realizarse también por infusión continua de partículas virales o fluidos que contienen partículas virales a través de catéteres implantados a velocidades de flujo bajas utilizando sistemas de bombeo adecuados, v.g., bombas de infusión peristálticas o bombas de suministro por convección mejorado (CED).

- 25 Otro método adicional de administración de la composición parvoterapéutica es a partir de un dispositivo implantado construido y dispuesto para dispensar el agente parvoterapéutico al locus deseado, v.g., un tumor. Por ejemplo, pueden emplearse obleas que se han impregnado con la composición parvoterapéutica, v.g., una variante del parvovirus H-1, en las cuales la oblea está fijada a los bordes de la cavidad de resección a la terminación de la extirpación quirúrgica del tumor. Pueden emplearse obleas múltiples en dicha intervención terapéutica.

- 30 Las células que producen activamente el agente parvoterapéutico, v.g., una variante de parvovirus H-1, o vectores de variante H-1, pueden inyectarse en el tumor deseado, o en una cavidad tumoral después de la extirpación del tumor.

Combinaciones de dos o más de los modos de administración arriba descritos pueden emplearse de cualquier manera adecuada, v.g., juntas, al mismo tiempo, o secuencialmente.

- 35 El régimen de dosificación del agente parvoterapéutico puede ser determinado fácilmente dentro de la experiencia en la técnica por el médico encargado del caso basándose en datos del paciente, observaciones y otros factores clínicos, que incluyen por ejemplo el volumen del paciente, el área de la superficie corporal, la edad, el sexo, el virus, vector, o célula particular, etc. a administrar, el tiempo y la ruta de administración, el tipo y características del tumor, el estado general de salud del paciente, y otros fármacos o terapias a las que esté siendo sometido el paciente.

- 40 Conforme a ello, la presente invención se refiere también al uso de una variante de parvovirus conforme a la presente invención, una célula que produce dicha variante de parvovirus, un DNA, un vector de expresión o anticuerpo de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer. Es de esperar que los tumores cerebrales (preferiblemente un glioma, meduloblastoma, meningioma, o glioblastoma) sean particularmente sensibles al tratamiento con un agente de la presente invención.

Los ejemplos que siguen explican la invención con mayor detalle.

45 **Ejemplo 1**

Adaptación del H1-PV de rata (pSR19) al glioma humano

- La infección de muchos linajes de células de glioblastoma humano con H-PV derivado del aislado pSR19 (No. de Acceso: NC_001358) condujo a la expresión de proteínas virales y en consecuencia la destrucción de células con indiferencia de su resistencia hacia la apoptosis inducida por el fármaco. No obstante, la monitorización de la amplificación del DNA viral y la producción de partículas de progenie, con excepción de NCH89, la mayoría de los linajes de células de glioblastoma humano testados permitían sólo poca amplificación del DNA y virtualmente ningún aumento en la producción de progenie (Herrero y Calle et al., 2004; DiPiazza et al., 2007). Para corregir este defecto, se intentó obtener (a) variante(s) de H1-PV competentes en propagación por sometimiento seriado a pasajes de pSR19 en células de glioblastoma humano, que eran competentes para amplificación de DNA aunque se veía 55 dificultada la producción de viriones de la progenie. El DNA del clon infeccioso de H1-PV, pSR19 se transfectó a

células NCH149, un linaje de células que se demostró permitía niveles bajos de amplificación del DNA por transferencia Southern (Fig. 1B). Los parvovirus dependen de las células en crecimiento (rápido), dado que la conversión del genoma monocatenario en un molde de transcripción bicatenario requiere fase S. Por ello, se amplificó primeramente el inóculo inicial (células transfectadas) por diluciones 1:4 después de confluencia en la superficie. Después de alcanzar 4×10^8 células, se recogieron 3/4 de las células, se liberaron viriones de la progenie por congelación y descongelación repetidas en el sobrenadante, y una combinación de células naif y transfectadas se reinfeció con estos viriones hasta que se obtuvo confluencia o CPE. Este procedimiento se continuó hasta el pase 20-25.

Ejemplo 2

10 Análisis de H1-PV adaptado al glioma humano

Después de más de 20 pases consecutivos, los inventores obtuvieron un stock de virus competente para amplificación del DNA viral, producción de viriones de la progenie y propagación en cultivos de NCH149. Se analizaron las propiedades de este conjunto de virus. Como se muestra en Fig. 1C por transferencia Southern, este conjunto de virus se caracterizó por amplificación fuerte del DNA después de infección de las células NCH149, produciendo compuestos intermedios de replicación monómeros y dímeros así como DNA monocatenario del virión. Además de reflejar la producción de DNA genómico viral, esta última forma indica la formación de viriones de progenie, dado que la generación de DNA monocatenario está asociada con el proceso de empaquetamiento. Además, cuando se recogieron sobrenadantes de células infectadas (Inf 1) para infectar células NCH149 naif (Inf 2) se observó una amplificación similar del DNA y generación de DNA de viriones monocatenario, demostrando la producción y liberación de grandes números de viriones de la progenie infecciosa en las células NCH149. De hecho, la liberación de viriones de la progenie en los sobrenadantes del medio es dependiente de la actividad de gelsolín celular, dado que la aplicación de anticuerpos de gelsolín neutralizantes inhibía este proceso. Esta dependencia de gelsolín para liberación de viriones de la progenie indica la implicación de un transporte vesicular activo a la periferia de la célula por viriones de la progenie (Bar et al., 2008).

Como se muestra en Fig. 2A por transferencia Southern del DNA monocatenario de viriones de la progenie después de fraccionamientos bioquímicos, se encuentran partículas variantes de la progenie de H1-PV que están asociadas fuertemente con fracciones vesiculares de células infectadas. Además, por comparación de vesículas de células no infectadas frente a células NCH149 infectadas analizando el contenido de proteínas por tinción con plata, se identificó cierto número de proteínas que estaban asociadas con fracciones vesiculares que contenían viriones, en tanto que estaban ausentes en las células no infectadas. La naturaleza de estas proteínas se determina actualmente por análisis MS/MS.

A continuación, se identificó la naturaleza de la o las modificaciones del virus que causaban el fenotipo permisivo en células NCH149. Se produjo H1-PV original (pSR19) en glioma RG2 de rata, en tanto que la variante H1-PV adaptada (hgH1-PV) se generó en NCH149. Ambos stock de virus se dosificaron por ensayos de calvas en células NB324K permisivas. Las infecciones se realizaron a una multiplicidad de 10 en células NCH149 y la producción de proteínas virales se determinó en un experimento de desarrollo temporal por transferencia Western. Como se muestra en Fig. 3A, se observaron diferencias notables en los niveles de expresión de las pequeñas proteínas no estructurales NS2 y NS3, mientras que NS1 de hgH1-PV demostró ser, con mucho, más heterogéneo que NS1 de pSR19. NS1 es una fosfoproteína multifuncional, que es necesaria para muchos procesos durante las amplificaciones de virus y está regulada en cuanto a su funcionamiento por fosforilaciones diferenciales. De hecho, como se muestra en Fig. 3B, cuando se analizaron los patrones de fosforilación de NS1 obtenida a partir de pSR19 después de infecciones de células RG-2 de rata y células humanas NCH149, se observó la ausencia de dos péptidos característicos después de infección de NCH149 (encirculados). En contraste, hgH1-PV era capaz de generar estos fosfopéptidos (y un péptido adicional marcado con una flecha), que daban cuenta de las diferencias en el patrón de migración observado por transferencia Western. Además, los análisis funcionales detallados de la fosforilación de MVM NS1 (patrón), que se asemeja estrechamente al observado para pSR19 en RC-2/hgH1-PV en NCH149 sugieren que los dos péptidos encirculados son fosforilaciones importantes implicadas en las funciones replicativas de la proteína NS1.

Finalmente, el stock adaptado de hgH1-PV se testó en cuanto a su capacidad para propagarse y extenderse en los una diversidad de cultivos de glioblastoma (humanos) en comparación con el aislado pSR19. Como se muestra en Fig. 4, además de las células NCH149, todos los restantes linajes de células de glioblastoma humano testados hasta ahora demostraron ser muy eficientes para amplificar viriones de la progenie de hgH1-PV (pero no pSR19) al menos 10 veces por encima de los niveles de entrada y demostraron ser superiores a pSR19 para propagarse en los cultivos.

55 Ejemplo 3

Caracterización genética del H1-PV adaptado al glioma humano

Para determinar variaciones genéticas de hgH1-PV adquiridas durante el sometimiento a pases en NCH149 en comparación con el inóculo original (pSR19), se realizaron titulaciones de punto final para purificar en calvas

variantes individuales de virus y se aisló DNA del virión. Como se muestra en Figs. 5 y 5b, se obtuvo DNA de seis calvas individuales, se amplificó la región codificante entera por PCR en tres pasos y los fragmentos solapantes se clonaron en pCR2.1. Las variaciones genéticas se determinaron por secuenciación y se compararon con la secuencia publicada de pSR19 (No. de Acceso NC_001358). Las mutaciones que estaban presentes comparadas con la secuencia de pSR19 en los aislados de calvas individuales se indican, se numeran y se posicionan en el mapa H1. Las alteraciones de secuencia detalladas se muestran en Figs. 6 y 6B.

Para caracterizar adicionalmente las propiedades de clones individuales, se generó un stock de virus de aislados de calvas individuales, y se testó su capacidad para extensión y destrucción de cultivos de células de glioblastoma humano en comparación con pSR19 generado en células RG-2 de rata. Como se muestra en Fig. 7, todos los aislados que albergan un mutante de delección en la parte C-terminal de NS1/ exón medio de NS2 sobrepasaban a pSR en su capacidad de extenderse y destruir las células de glioblastoma humano, confirmando los hallazgos iniciales con las variantes agrupadas y demostrando que el mutante de delección es responsable del cambio de intervalo de hospedadores observado.

Ejemplo 4

15 Impacto de la infección de H1-PV (tipo salvaje y calva #3) sobre el crecimiento del tumor

Se infectaron o no *ex vivo* células de glioblastoma U87 con una MOI de 1,5 pfu/célula. (WT: H-1PV tipo salvaje; Calva #3: H1-PV adaptado derivado de la calva #3, falsamente infectado: células U87 no infectadas). Las células se lavaron y disolvieron en PBS 4 horas después de la infección y 2×10^6 células falsamente infectadas o infectadas con H1-PV en 100 μ l de PBS se implantaron subcutáneamente en 8 ratones por grupo. El tamaño del tumor (longitud, anchura, altura) se midió mecánicamente con un calibre dos veces por semana, comenzando 12 días después de la implante de las células tumorales. El volumen se calculó como sigue: $\frac{1}{2} \times \text{longitud} \times \text{anchura}^2$. Los animales se sacrificaron a un tamaño de tumor de 2500 mm^3 como máximo, en el caso de aparición de carcinosis peritoneal o ascitis maligna. Todos los animales supervivientes se sacrificaron el día 61 después de la implante de las células. (1 x WT, 2 x calva #3) como se indica por "supervivientes". Se demostró en Figs. 9, 9a y 9b que la inhibición del tumor de la calva #3 era más fuerte que con el tipo salvaje H1-PV. Adicionalmente, la calva #3 conducía a más supervivientes que el tipo salvaje H1-PV.

Lista de referencias

Rhode, S.L. III and Paradiso, P.R. (1983). Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation. *J. Virol.* 45, 173-184. Qiu, J., Yoto, Y., Tullis, G., and Pintel, D.J. (2006). Parvovirus processing strategies. pp.253-274. In "Parvoviruses" Eds. Kerr, J.R., Cotmore, S.F., Bloom, M.E., Linden, R.M., and Parrish, C.R. Hodder Arnold, Londres.

REIVINDICACIONES

1. Una variante H-1 de parvovirus de rata capaz de propagarse y extenderse en las células tumorales humanas, **caracterizada por que** los polipéptidos virales comprenden las secuencias de aminoácidos que se muestran en la Figura 8B y que tienen una delección desde la posición 587 a la 629 en el término C de NS1 y las sustituciones P124Q y E180K en NS1, una delección desde la posición 95 a 136 en el exón medio de NS2 y la sustitución de aminoácido H374Y en VP1/VP2.
2. La variante H-1 de parvovirus de rata de la reivindicación 1, en la cual las células tumorales son células de glioma.
3. La variante H-1 de parvovirus de rata de la reivindicación 2, en la cual el glioma es un glioblastoma.
4. Un DNA, que codifica la variante H-1 de parvovirus de rata conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
5. Un vector de expresión, que comprende el DNA conforme a la reivindicación 4.
6. Una células hospedadora que contiene la variante H-1 de parvovirus de rata de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o el vector de expresión conforme a la reivindicación 5.
7. Un anticuerpo, dirigido contra la proteína NS1 de una variante de parvovirus conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado por que** el mismo se fija solo a la proteína variante que tiene la delección pero no a la proteína de tipo salvaje.
8. Kit que comprende:
 - (a) una variante de parvovirus de rata H-1 de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
 - (b) un DNA conforme a la reivindicación 4;
 - (c) un anticuerpo conforme a la reivindicación 7; y/u, opcionalmente,
 - (d) agentes adyuvantes convencionales, tales como disolventes, tampones, portadores, marcadores y controles, en donde pueden estar presentes uno o más representantes de cada uno de los componentes (a) a (d).
9. Una composición farmacéutica que contiene (a) una variante de parvovirus de rata H-1 conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el DNA de la reivindicación 4, el vector de expresión de la reivindicación 5, la célula hospedadora de la reivindicación 6 y (b) un portador farmacéuticamente aceptable.
10. Uso de una variante de parvovirus de rata H-1 conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el DNA de la reivindicación 4, el vector de expresión de la reivindicación 5 o la célula hospedadora de la reivindicación 6 para la preparación de una composición farmacéuticamente para el tratamiento del cáncer.
11. La variante de parvovirus de rata H-1 conforme a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el DNA de la reivindicación 4, el vector de expresión de la reivindicación 5 o la célula hospedadora de la reivindicación 6, para uso en el método de tratamiento del cáncer.
12. El uso de la reivindicación 10 ó 11, en el que dicho cáncer es un tumor cerebral.
13. El uso de la reivindicación 12, en el que dicho tumor cerebral es un glioma, meduloblastoma, meningioma o glioblastoma.

Generación de PVs (de roedor) Multiplicándose en Células de Glioma Humano

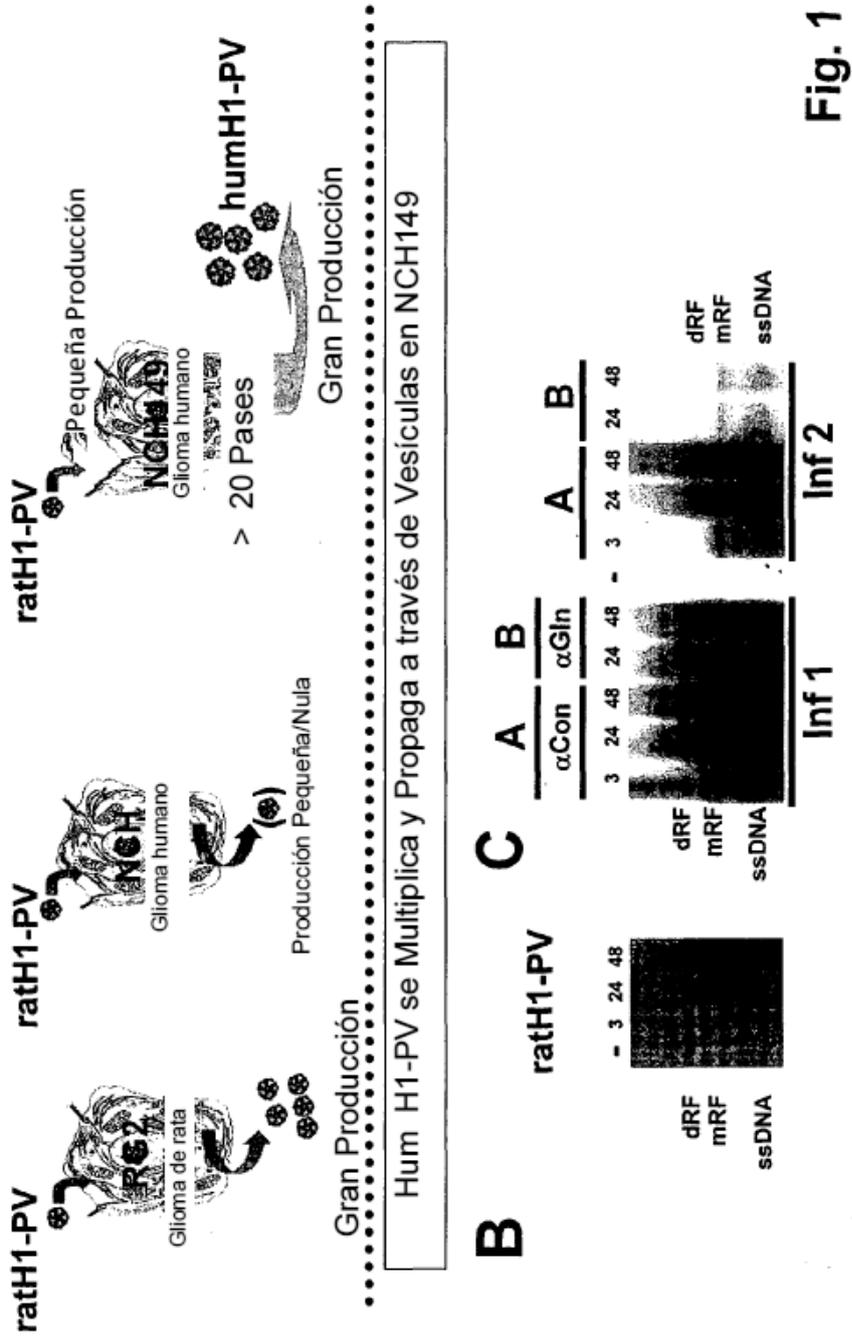


Fig. 1

Escape Vesicular Co-carga de Células NCH 149 infectadas con hgH-1 PV

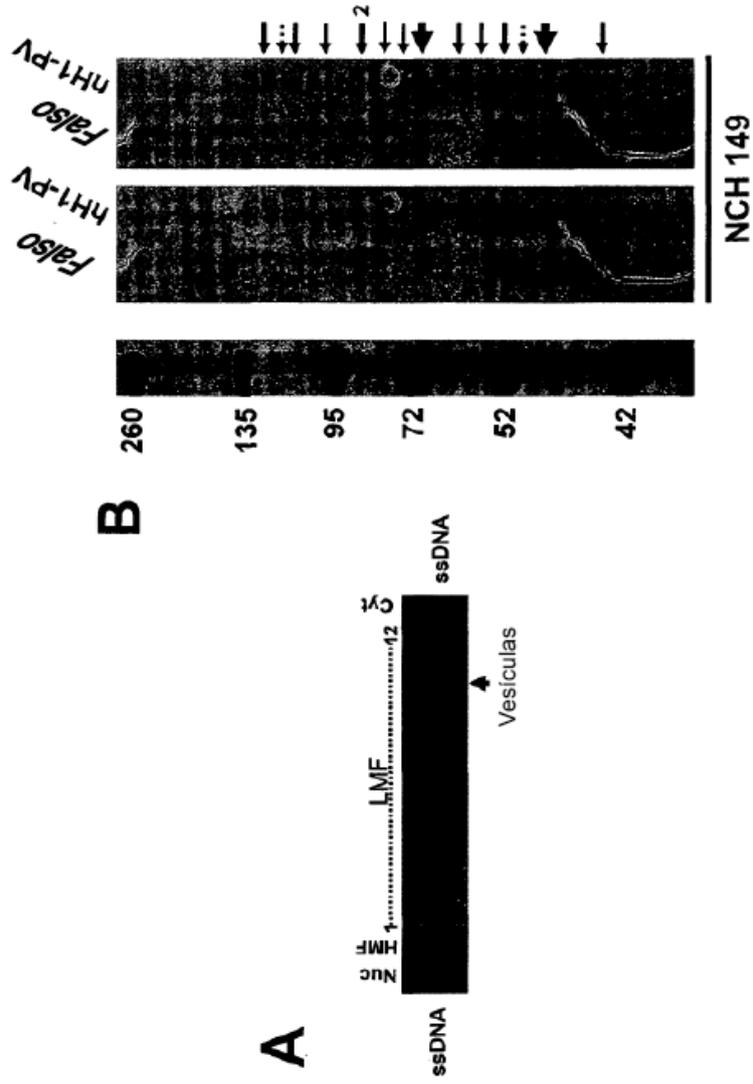


Fig. 2

La adaptación Conduce a Cambios de las Proteínas No Estructurales de humH1-PV en el Glioma Humano

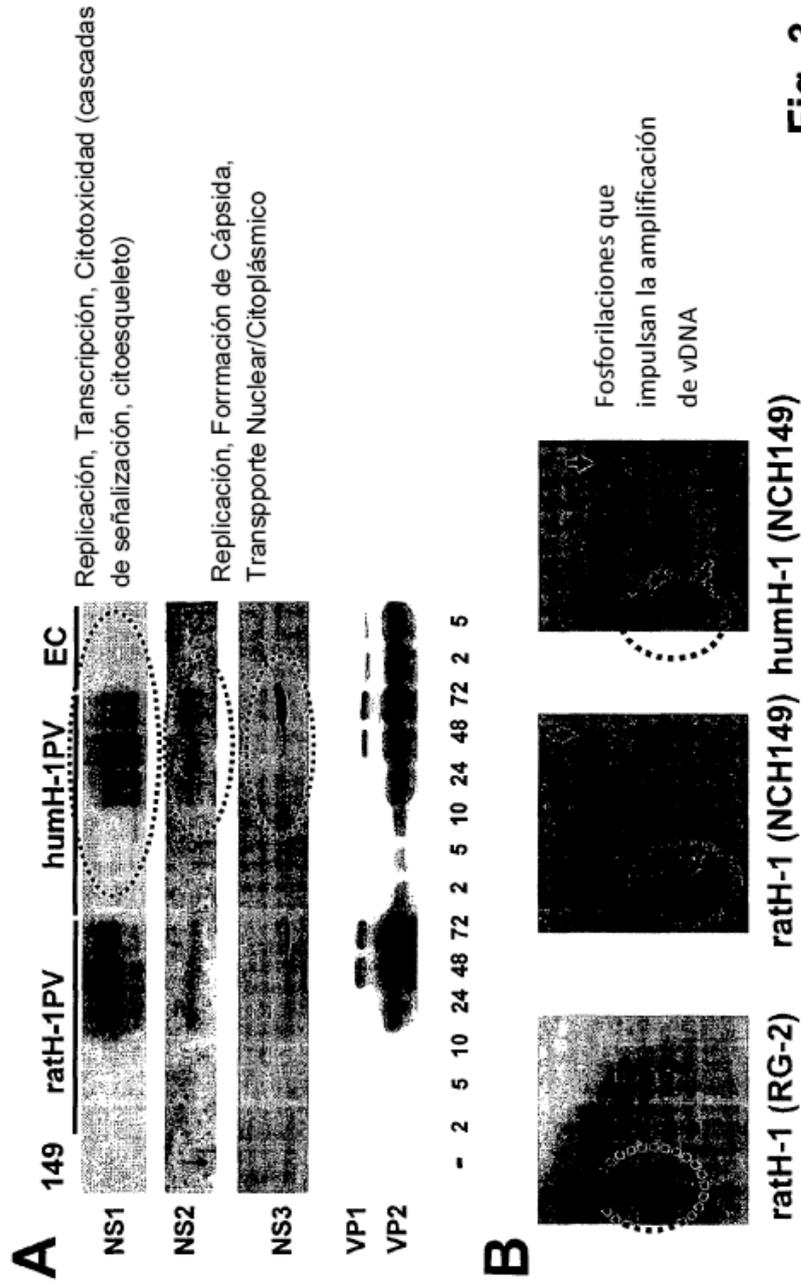


Fig. 3

La Multiplicación Conduce a Propagación a través de los Cultivos de Glioma Humano

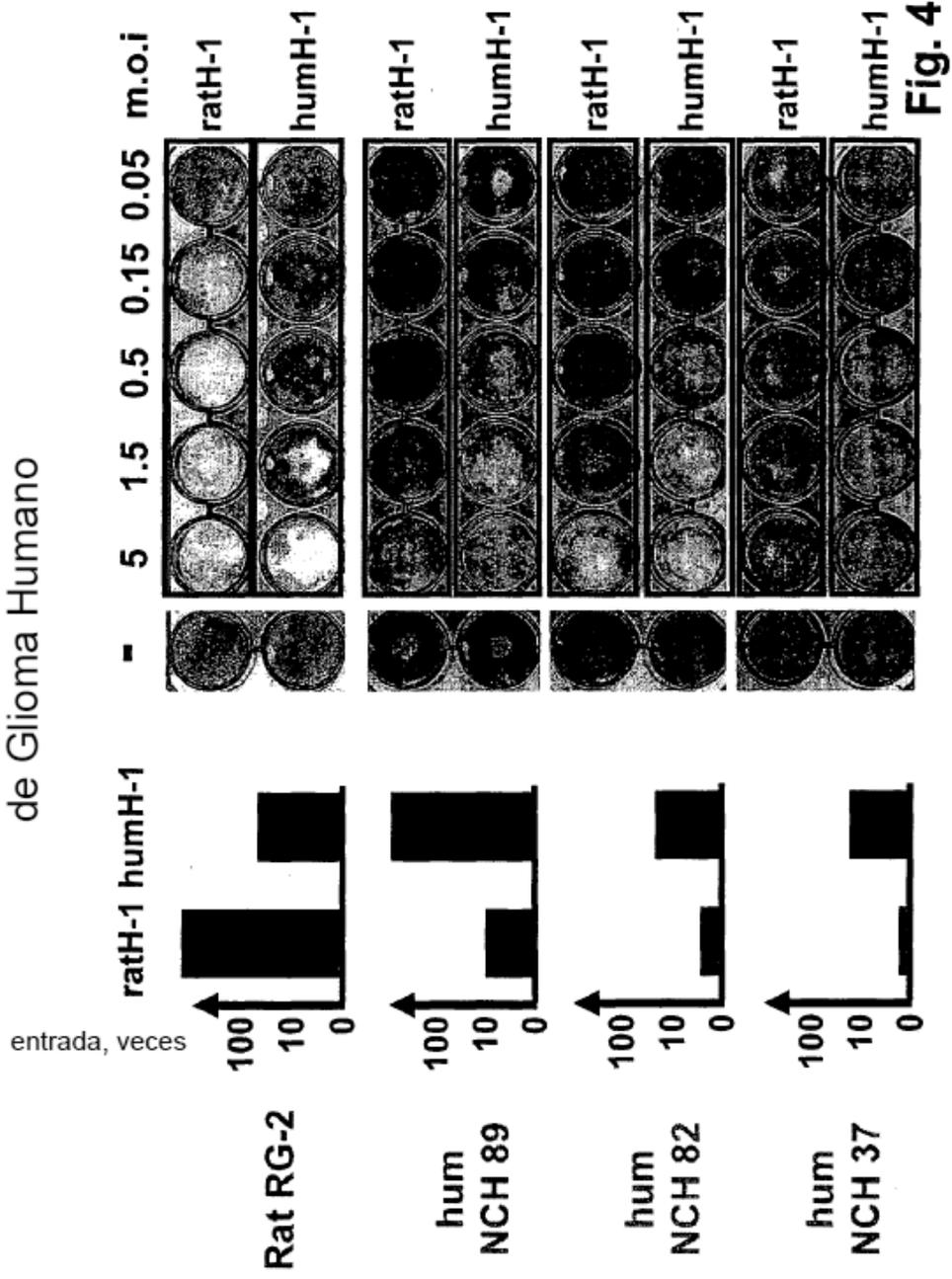


Fig. 4

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

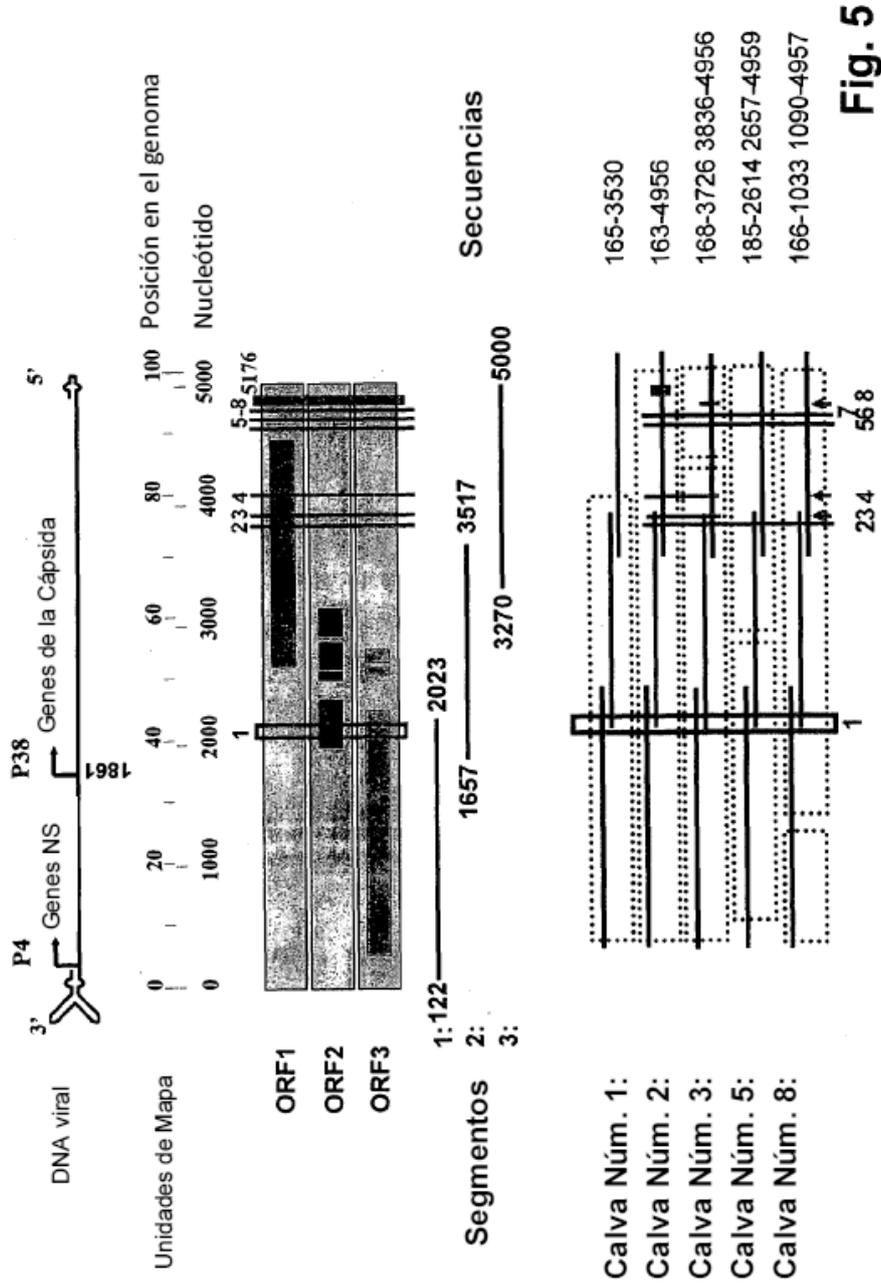
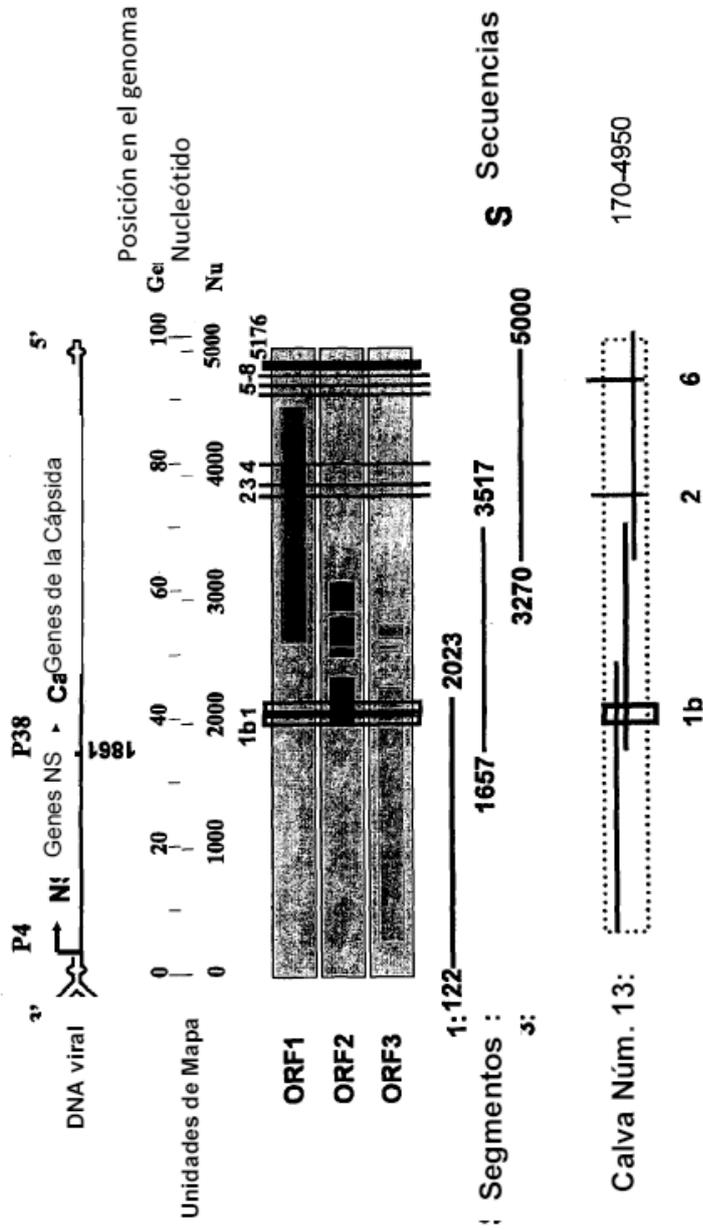


Fig. 5

Variante de H1-PV. Calva # 13



Verde: Variaciones de H1-PV ya descritas para las Calvas 1, 2, 3, 5 u 8

Rojo: Nueva Variación de H1-PV determinada para las Calvas 13

Fig.5b

Variación No 1: (delecionados los nucleótidos *en cursiva*)
2100-
GCACACCAA TACTCCTGTT *GCGGGCACTG*
CAGCAAGCCA AAACACTGGG
GAGGCTGGTT CCACAGCCTG CCAAGGTGCT
CAACGGAGCC CAACCTGGTC
CGAGATCGAG -2211

Variación No 2: (nucleótido cambiado en **negrita/cursiva**)
3900-GCTGGCGAGG ACTATGATGC -3921

Variación No 3: (nucleótido cambiado en **negrita/cursiva**)
3950-ACAACATGGC GAAAATTGGG -3971

Variación No 4: (nucleótido cambiado en **negrita/cursiva**)
4100-GCGAGAAAAC GCCATAGCTG -4121

Variación No 5: (nucleótido delecionado °)
4660-TAT°AAAAAT AACATAATAT -4681

Variación No 6: (nucleótido insertado en **negrita/cursiva**)
4670-AACATAATAT GGTAT**TT**GGTTAA-4691

Variación No 7: (nucleótido cambiado en **negrita/cursiva**)
4690-CTGTAAAAAA CAATAGAACT -4711

Variación No 8: (nucleótido insertado en *cursiva*)
4800-AGATAGA
ATATAAGAAGATTTTGTATTTTAAAATAAATATAGTTAGTT
GGTTAATGTTAGATAGA
ATA TAAAAAGATT -4821

Fig. 6

Variación Núm. 1b (Calva #13): (nucleótidos deletionados en cursiva)

2010 -
CTCTGACTCC GAGAAGTACG CCTCTCAGCC *AAACTACGC*
TCTTACTCCA CTTGCATCGG *ACCTTGCGGA* CCTAGCTCTA
GAGCCTTGGG GCACACCAA TACTCCTGTT *GCGGGCACTG*
CAGCAAGCCA *AAACTGCGG* GAGGCTGGTT
-2161

Fig. 6b

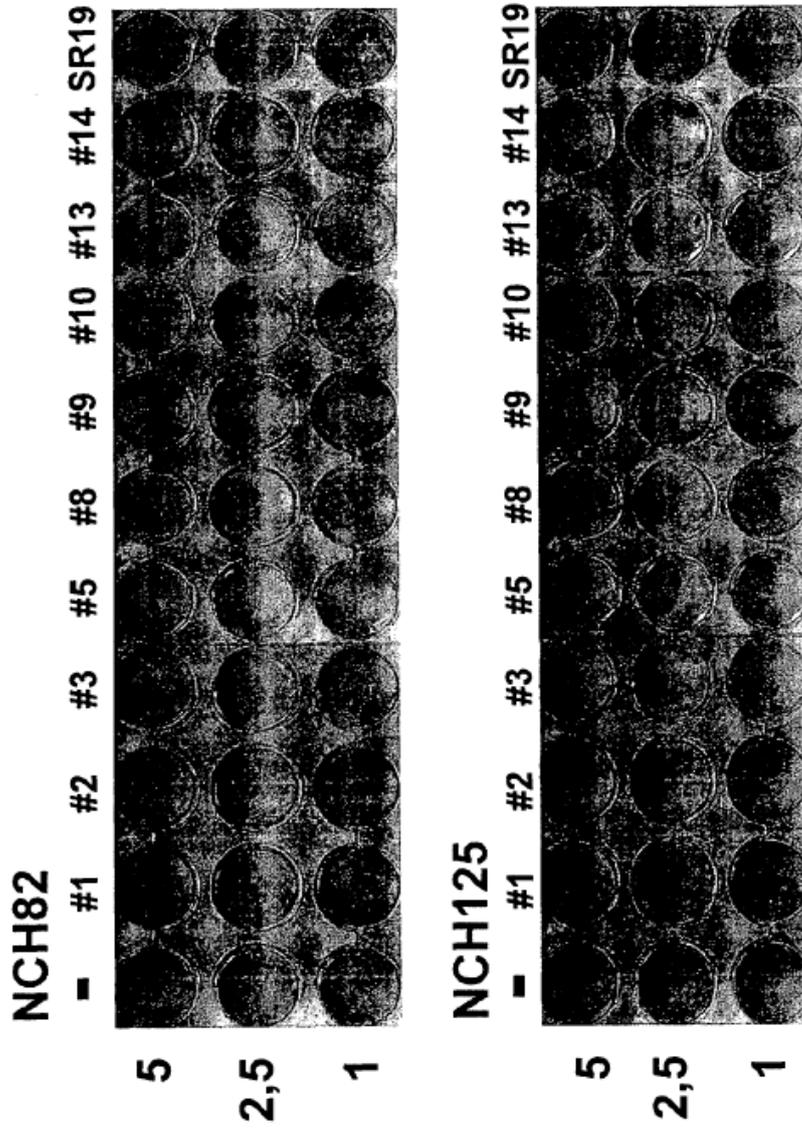


Fig. 7

Secuencias de Proteínas de H1-PV Calva #13

NS1
WAGNAYSDEV LGVTVMLNDK SSQVYFSFVF KKNVQLNCK DICWNSYRKS
LQDDELKSLQ RGAFTVWQS EDWESSAVD DWTKKVFIF DSLVKKCLPE
VLSTFRLARS VYTFVQCHW GDQGNKCHV LIOCHDFQAP QCHWNRQLA
VYRERLVA CVVQLFAR IKLRIRKDS HWVLLTYR KTKEDYTK
VLRGDIAYY VLSKKKICYS PPRGGTFYS SDSGKTFPL KGRRHVLSK
LVYDREKPEI VETVTVAG AKRGLQTE EYSIKITLKE LVHRVTSPE
DMMWQDPSY IEMNAQPGK NLANFTLEIC TLTARTETA FDLLEKAEI
SKLAMPMSAS TTKCIKFAH GRVYKVAHA ICCVLRQGG KRNVLFRGP
ASTGKSLAQ ALAQAVNG CTRKAVNPP FNDCTKNLI WVRKSNPQQ
QWRPFALCS GQTIIDQEG KGRMIDRPT VMTQNKMT VVRIGCSRP
ERTQPIRDM LNIHLRILP GDFGLDKHE NPLICAMLYK NGVOSTWACY
CAWGVKPDW SDHARPKLD TPINLSQSR SPFLTPRQVLSGDFLQVPL
ASDSEKVAE VVETVTVAG VVETVTVAG AGSTRCQCAQ RSPVWSEIRA
DLRACPSQO LESDFNSILT LD
DDEGRLIETLSEGGG: P124Q; E260K

NS2
MAGNAYSDEV LGVTVMLNDK SSQVYFSFVF KKNVQLNCK DICWNSYRKS
LQDDELKSLQ RGAFTVWQS EDWESSAVD MTKFNALTI SDSKSTASQ
KGRHFKICIGPWPSSKALNHTKESCKGRV ESKYNGGWF HSLPRCSTEP
NLVDRGCPR SLLQSRVWGE RLQRCNDLGL RYGVLMYDYL FYRDEITWF
Dlb: dl aa95-135

YP1/2
MAPPAKAKR GWVPGYKYL GPGNSLQGE FTFPSDAAK SHDAYDQYI
KSGKPTLYF SPADQRFIDQ TKDADWGGK VEHYFFRYR AFAPKLSLDS
ERQTSYTSYV SRPGKTRPP AHI FVNDARA KLRASLAAQ QRTILT
MSKZETNQP DTGLANARVE RSLDCGSSG GCGSCGCCI GVSTGYDNG
TYKFLGDN VEITABASHL LRLGPPPSN YCRVTVHNSQ TVGRGIVKGS
D (10)
NMYDTHQOI WTPNSLVDRN ARGVFPQSD NQPIQNSMES LRLDLSQEL
FNWVYKVT E QCGAQDAIK VINNDELTAQ MWALDSRNL TTFPAQITSE
TLGFYPKFT APAPRYTF NFRQLSVTS NSNAGTQITD TIGEPQALNS
GMPFR (sb)
QRFTEWTLIP IGLRTGDRP TVYTVIPND FLKGLVITWT NRHLACLOCI
TDLPTSDTAT ABLTANGDRP CSTQCVNRY VTEALSTRA QIGFVQPHDN
FRNRGGPFK VVVPLADITA GRDDANGAI RFRYGRGGE DMAGQAAPE
RYTWDALISA AGRDTRCFV QSAFISLPPN QQLLQREDA IAGRTNMYIT
NVFNSYGLAS APPRDPYIP NQIWDKELD LKHKPELRVT APFYCKRNP
N (sb)
COLFVHLGPN LTDQDFDNST TVSHVYVST FVWGLKFK AKLRNLIWA
FYQATYDSV ANSYMVKRW LPSAVCKMS DPLICHVPR NTY
E260K; 3. D19AL.4. P41E

Fig. 8b

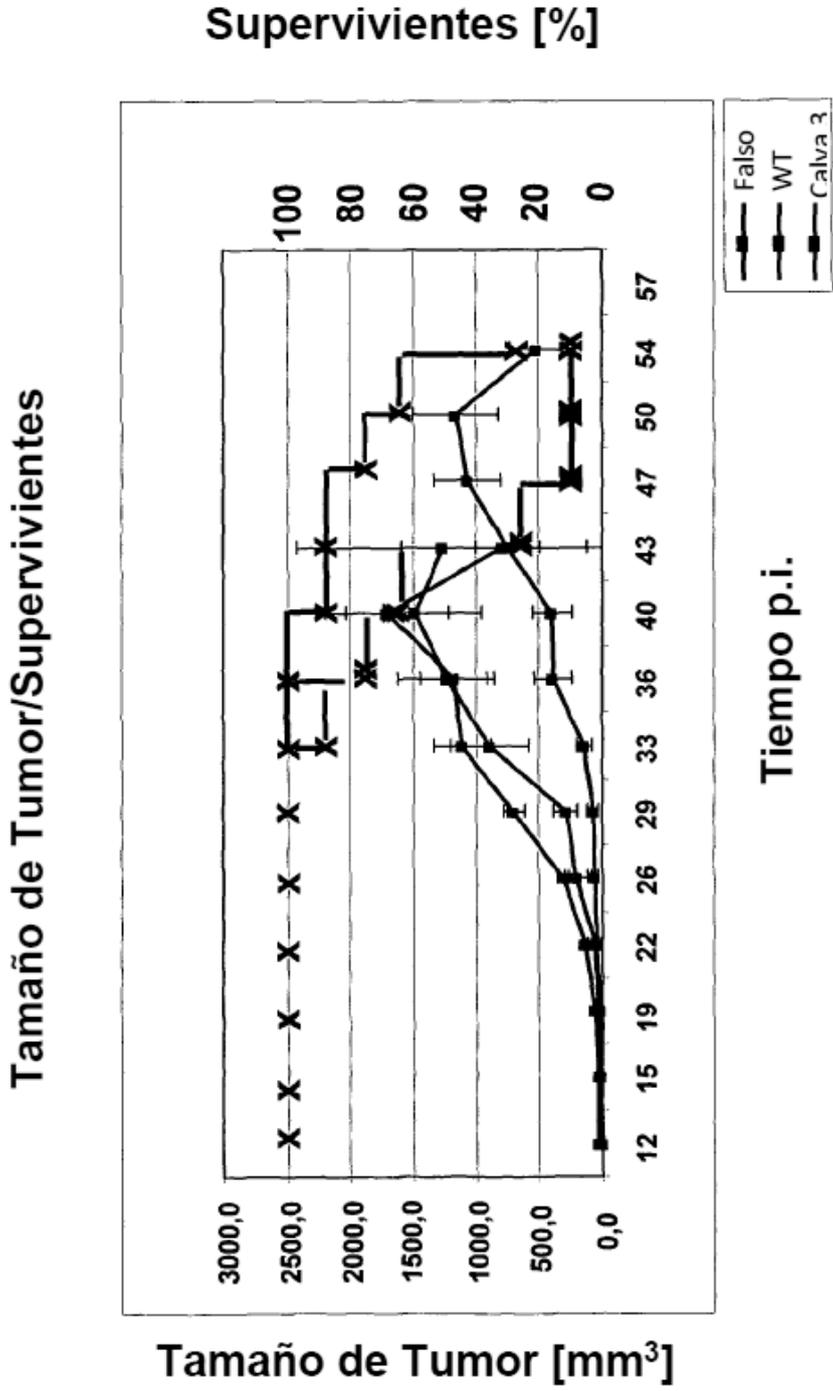


Fig. 9

Tamaño de Tumor

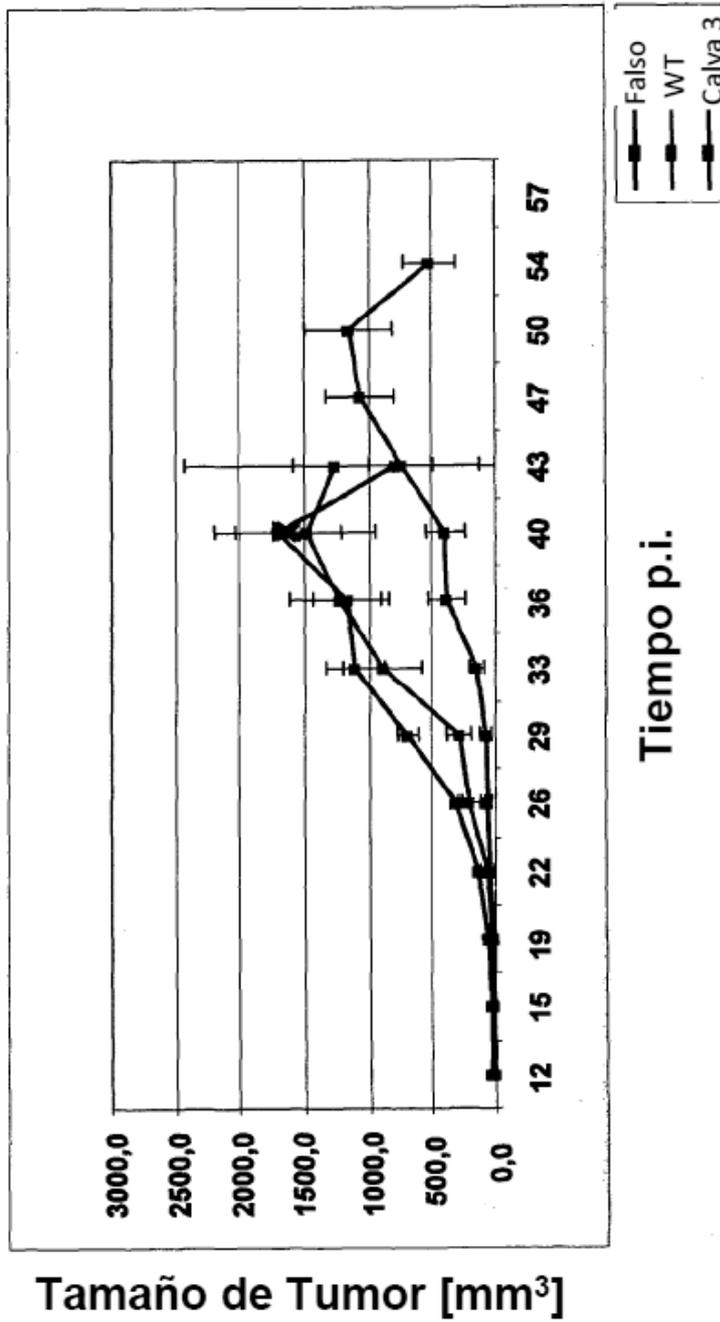


Fig. 9a

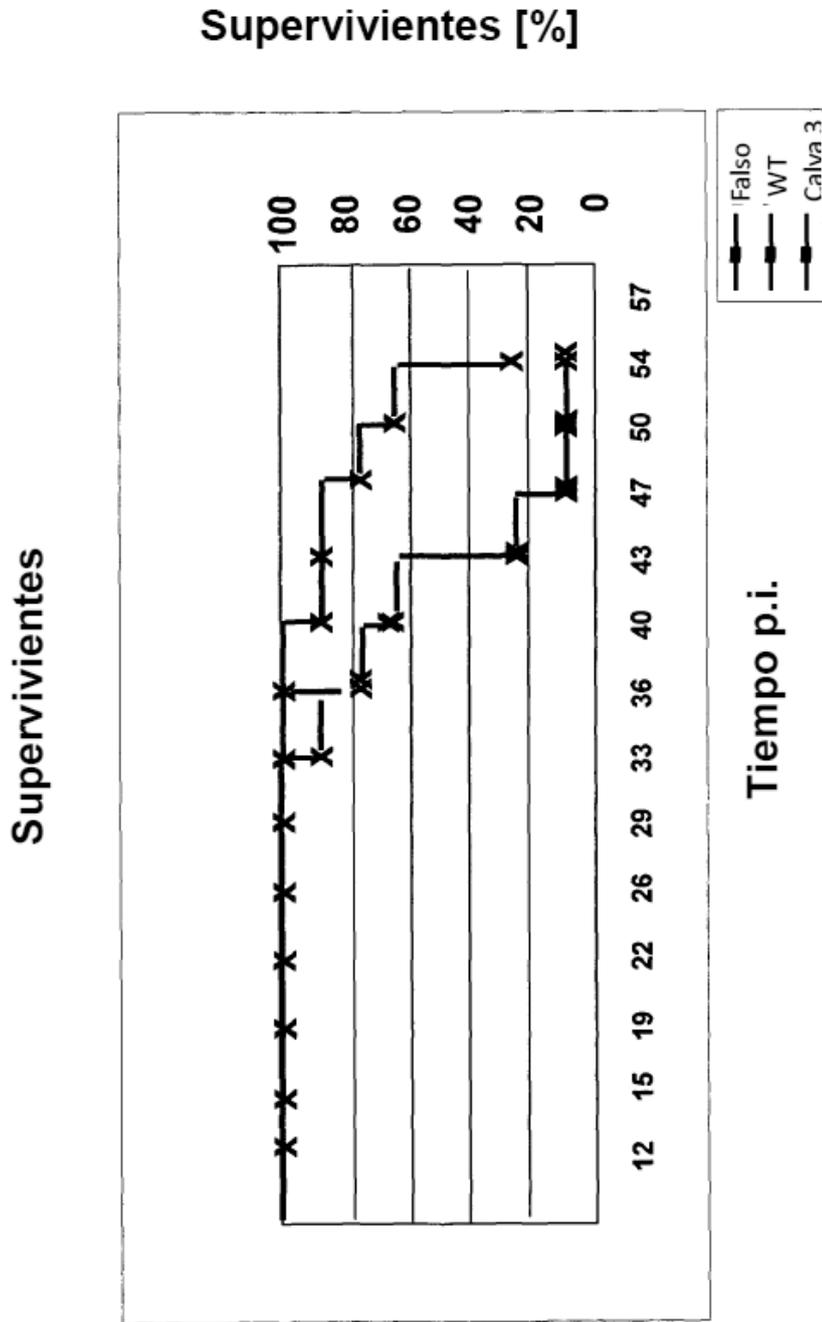


Fig. 9b