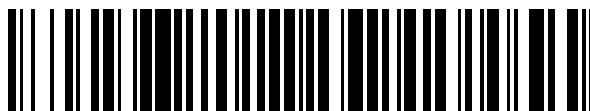


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 423**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76** (2015.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12735448 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2720702**

54 Título: **Viroterapia oncolítica para el tratamiento del sarcoma de Ewing**

30 Prioridad:

**15.06.2011 EP 11004884**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.12.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIS, ZOLTÁN;  
LACROIX, JEANINNE;  
LEUCHS, BARBARA;  
FRANK-STÖHR, MONIKA;  
SCHLEHOFER, JÖRG y  
ROMMELAERE, JEAN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 553 423 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

Viroterapia oncolítica para el tratamiento del sarcoma de Ewing

## 5 Descripción

La presente invención proporciona parvovirus H1 (H-1PV) para los un método de tratamiento del sarcoma de Ewing, que es un tipo de tumor mesenquimático.

10 El sarcoma es un cáncer del tejido blando (tejido muscular, adiposo, nervioso o conectivo) u óseo. Los sarcomas abarcan un grupo de más de 40 tipos diferentes de tumores. En general, los sarcomas están considerados como muy raros, dando cuenta de menos del 1% de todos los diagnósticos de cáncer en los adultos, con aproximadamente 10.000 casos nuevos anualmente en los tejidos blandos y 2400 casos nuevos anualmente en el  
15 tejido óseo. Los sarcomas están considerados como cánceres mesenquimáticos procedentes fundamentalmente de cánceres óseos (distintos de las metástasis óseas de otros cánceres), o de tejidos blandos tales como los músculos (rabdomyosarcoma), tejido adiposo (liposarcoma) o células musculares lisas (leiomyosarcoma). Los mismos se nombran basándose en el tejido del que proceden. Por ejemplo, los condrosarcomas proceden de cartílago, los osteosarcomas proceden de hueso, y los fibrosarcomas proceden de tejido fibrogénico.

20 El osteosarcoma es el tipo más común de sarcoma óseo, dando cuenta de aproximadamente 35% de los tumores óseos. El condrosarcoma es el segundo tipo más común en adultos (dando cuenta del 30% de los sarcomas óseos), y el sarcoma de Ewing es el segundo tipo más común en los niños. Todos los restantes tipos son extremadamente raros, dando cuenta cada uno de menos del 1% de todos los sarcomas óseos. Dentro de estos tipos, existen subtipos histológicos adicionales - por ejemplo, existen 7 tipos diferentes de osteosarcomas  
25 (<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/osteosarcoma/HealthProfessional/page4>).

Los virus oncolíticos son virus que infectan y destruyen selectiva o preferentemente células transformadas al tiempo que respetan los tejidos normales. Además del efecto oncolítico observado tanto *in vitro* como *in vivo*, estos virus proporcionan también señales inmunoestimuladoras que inducen la eliminación de las células tumorales infectadas  
30 por el virus. De este modo, los sistemas inmunes innato y adaptativo logran acceder a los antígenos tumorales, lo que da como resultado efectos de cebado cruzado y vacunación.

Una evaluación preclínica sistemática de enfoques de viroterapia oncolítica para tratamiento del osteosarcoma había sido realizada utilizando los dos virus de tipo salvaje, Virus del Bosque de Semliki (SFV), (1), y Virus del Valle de Senecca (SVV, NTX-010®), (2). En un enfoque de evaluación pediátrica preclínica de 6 modelos de ratón SCID con xenoinjerto de osteosarcoma se observó solamente una respuesta baja al tratamiento para tratamiento intravenoso con el Virus del Valle de Senecca (SVV, i.e. NTX-010®). Sólo 1 de 6 modelos de xenoinjerto exhibía una supervivencia exenta de eventos (EFS) significativamente prolongada en los ratones tratados - en tanto que no se presentaron datos acerca de OS (2). Se demostró que el segundo virus de tipo salvaje, SFV, aumentaba  
40 significativamente la supervivencia tanto en un modelo de xenoinjerto subcutáneo como en un segundo osteosarcoma orto-tópico en ratones lampiños (1). Adicionalmente, se testaron dos adenovirus recombinantes redireccionados al osteosarcoma (3,4). Inyecciones intratumorales de Ad5-Delta24RGD en xenoinjertos de osteosarcoma humano establecidos refractarios al tratamiento quimioterapéutico causaban un retardo significativo del crecimiento tumoral (5). Otro adenovirus condicionalmente replicante basado en Ad5-Delta24, Ad-OC-E1a, expresa el gen viral E1A bajo el control del promotor de la proteína de la matriz ósea osteocalcina que direcciona la replicación de Ad-OC-E1a a las células de la matriz ósea y células malignas derivadas de ellas. La aplicación intravenosa de Ad-OC-E1a reducía significativamente el tamaño de los nódulos de osteosarcoma metastásico pulmonar en un modelo de ratón con xenoinjerto (6).  
45

50 El sarcoma de Ewing puede presentarse en el hueso o tejido blando (denominado extra-óseo), y esto es importante cuando se consideran opciones de tratamiento. La gran mayoría de casos ocurren en los huesos, y la diagnosis es muy común en los años de la adolescencia. El PNET (tumor neuroectodérmico primitivo) es un tipo de sarcoma estrechamente relacionado con el Ewing. El PNET puede ocurrir en el hueso o el sistema nervioso central. El PNET del hueso se trata de igual manera que el sarcoma de Ewing, pero el PNET en el cerebro o la médula espinal es un tumor genéticamente diferente que se trata de distinto modo. Los tumores de Ewing, PNET, Askin y neuroepitelioma contienen todos ellos la misma anomalía genética, denominada translocación cromosómica 11-22 (t11; 22). Debido a esta semejanza, se hace referencia a estos tumores como la familia de tumores del sarcoma de Ewing y se tratan de modo similar.  
55

60 Se han publicado hasta ahora pocos intentos terapéuticos basados en virus oncolíticos para el sarcoma de Ewing. Los HSVs oncolíticos modificados genéticamente NV1020 y G207 habían sido testados también en un panel de 10 linajes celulares de sarcoma. Sin embargo, comparados con RMS y los linajes de células de osteosarcoma, los linajes celulares de sarcoma de Ewing exhibían la sensibilidad mínima a los HSVs oncolíticos *in vitro* (7). La sensibilidad de los linajes de células de sarcoma de Ewing a la transducción mediada por adenovirus pudo demostrarse también, dado que se observó la expresión del receptor de adenovirus y el receptor del adenovirus  
65 Coxsackie en estos linajes de células. Además, un adenovirus recombinante condicionalmente replicante inducía

efectos oncolíticos significativos en los linajes de células de sarcoma de Ewing *in vitro* (8). En modelos animales, se testaron sólo dos virus oncolíticos: el virus SVV de tipo salvaje y un AAV recombinante que expresaba un ligando de VEGF antiangiogénico soluble. No pudo demostrarse que ambos virus fuesen terapéuticamente eficaces. Una aplicación intravenosa preventiva de un rAAV que expresaba un ligando de VEGF antiangiogénico soluble en la vena porta de ratones SCID impedía el injerto subsiguiente de xenoinjertos de sarcoma de Ewing. En 4 modelos de xenoinjerto de sarcoma de Ewing, la evaluación sistemática preclínica de SW no inducía efecto terapéutico significativo alguno (2). La sensibilización de las células de sarcoma al tratamiento con doxorubicina por el virus adenoasociado concomitante de tipo salvaje tipo dos (AAV-2) ha sido descrita por Schwarzbach et al. (17). Un estudio prospectivo de infecciones por parvovirus B19 en receptores pediátricos de trasplantes de órganos sólidos y médula ósea y pacientes pediátricos de tumores sólidos ha sido publicado (18). Un enfoque general para tratamiento de neoplasmas con virus ha sido descrito por Roberts et al. (19). Hasta ahora no se ha descrito aplicación alguna de parvovirus de roedores al sarcoma de Ewing.

Típicamente, el tratamiento actual del sarcoma óseo es multimodal y adaptado al riesgo conforme al estudio terapéutico EUFAMOS1 (para osteosarcoma) del GPOH que incluye poliquimioterapia neo-adyuvante, resección del tumor y radioterapia. Conforme a EWING 2008, los pacientes del sarcoma de Ewing de alto riesgo (R2 y R3) reciben quimioterapia a dosis alta en combinación con el trasplante de células madre autólogas. En principio, se utilizan en combinación radiación y goteo intravenoso de productos químicos citotóxicos. Los efectos secundarios, tanto a corto como a largo plazo, pueden ser severos. Efectos secundarios de la quimioterapia negativos a corto plazo incluyen pérdida del cabello y las cejas, pérdida de apetito, presentando llagas en la boca peculiares del sabor de los alimentos, náusea, vómito, heces sueltas o estreñimiento (debido a la menor ingesta de alimentos), fatiga, confusión mental e incapacidad para resistir las infecciones. Otra desventaja a corto plazo es que el tratamiento consume mucho tiempo. Efectos secundarios a largo plazo (dependiendo del tipo de cáncer) incluyen infertilidad, problemas cardíacos, deterioro del sistema nervioso central o deterioro de órganos vitales tales como los pulmones o el hígado.

Por tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar un medio para el tratamiento eficiente del sarcoma de Ewing que resuelve las desventajas de las terapias actuales, es decir, es eficiente y presenta menos efectos secundarios comparado con las modalidades de terapia actuales.

Conforme a la invención, esto se consigue por las materias objeto definidas en las reivindicaciones.

La presente invención está basada en los descubrimientos por la solicitante de la inducción de oncólisis en linajes de células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing después de aplicación de H-1PV, un parvovirus oncolítico no patógeno y competente en replicación. Algunos parvovirus autónomos pertenecen a la categoría de los denominados virus oncolíticos. Los parvovirus son pequeñas partículas (25-30 nm) carentes de envoltura que contienen un genoma de DNA monocatenario de 5,1 kilobases, del cual se expresan las dos proteínas no estructurales (NS1, NS2) y las dos proteínas de la cápsida (VP1, VP2). El parvovirus H-1PV ofrece la ventaja singular de desencadenar un proceso de muerte distinto, a saber la revocación y activación citosólica de las proteasas lisosómicas (catepsinas). Varios miembros del género parvovirus (H-1PV, MVM, Lull), cuyos hospedadores naturales son roedores, están siendo actualmente objeto de consideración para aplicaciones de terapia génica del cáncer debido a su fracaso en cuanto a la transformación de las células hospedadoras, capacidad para infección asintomática de humanos, y posibilidad de propagarse preferentemente en (oncotrop-sm) y destruir (oncólisis) las células transformadas neoplásicamente. Se ha demostrado que los virus MVMp y H-1PV ejercen actividades oncosupresoras *in vivo*, es decir son capaces de inhibir la formación de tumores espontáneos, inducidos química o viralmente en animales de laboratorio. Los vectores basados en una casete de expresión parvoviral retienen las características oncotrópicas de los virus de tipo salvaje.

Los efectos oncolíticos de H-1PV han sido estudiados *in vitro* e *in vivo* en una diversidad de entidades humanas tales como linfoma, cáncer de páncreas, linajes de células de glioblastoma, hepatoma, cáncer de mama (10) y neuroblastoma (11). Sin embargo, el efecto oncolítico de H-1PV sobre tumores óseos pediátricos no había sido estudiado hasta ahora. En los estudios que han conducido a la presente invención, se realizó una evaluación preclínica *in vitro* de la aplicación de H-1PV oncolítico para el tratamiento de linajes de células de osteosarcoma pediátrico y sarcoma de Ewing. La eficiencia de infección, la replicación viral, y la actividad lítica de H-1PV se analizaron en detalle en 3 linajes de células de osteosarcoma y dos linajes de células de sarcoma de Ewing, con estatus de mutación de p53 diferentes.

La oncospecificidad del virus se confirmó por la infección de cultivos a corto plazo de células infantiles no malignas de origen mesenquimático. Los fibroblastos de prepucio neonatal humano y osteoblastos humanos en cultivo a corto plazo no revelaban efecto significativo alguno de H-1PV sobre la viabilidad o morfología de las células para dosis de virus inferiores a 50 unidades formadoras de calvas [pfu] por célula. Todos los linajes de células tumorales óseas podían ser infectados por H-1PV como se muestra por la infección con H-1EGFP, un virus recombinante, deficiente en replicación que expresa EGFP. Con el H-1PV de tipo salvaje, se indujo infección lítica en 4 de 5 linajes de células de osteosarcoma (SaOS, CAL-72, U2-OS y H-OS) y la totalidad de los linajes de células de sarcoma de Ewing (MHH-ES-1, TC-71, RD-ES, SK-ES-1 y CADO-ES) examinados. Tres de 5 linajes de células de osteosarcoma y 4 de 5 linajes de células de sarcoma de Ewing exhibían una respuesta de 50% al tratamiento para MOIs entre menos de 1 y 5 p.f.u. por célula. La replicación activa de H-1PV pudo demostrarse a modo de ejemplo en un linaje de células

de sarcoma de Ewing con un aumento de títulos de virus de hasta 10 veces en el transcurso de 96 horas después de la infección. El efecto lítico de H-1PV en los linajes de células de sarcoma se observó con independencia de su estatus de mutación en p53.

5 La eficiencia de infección, la replicación rápida del virus y los efectos líticos relevantes sobre las células del sarcoma de Ewing y la mayoría de las células de osteosarcoma junto con la baja toxicidad de H-1PV para las células mesenquimáticas no transformadas, hacen que este parvovirus sea un candidato prometedor para la viroterapia oncolítica de enfermedades malignas del sistema esquelético. En suma, los experimentos que han conducido a la presente invención demuestran que la infección con H-1PV de las células mesenquimáticas malignas, v.g., las células de osteosarcoma o de sarcoma de Ewing, representa una terapia nueva y altamente eficaz con sólo muy bajos efectos secundarios.

### Breve descripción de los dibujos

15 Figura 1: Las células del osteosarcoma y el sarcoma de Ewing son susceptibles a la infección con H-1PV

Infección con células de osteosarcoma humano (U2-OS, SaOS-2, MG-63) y sarcoma de Ewing (SK-ES-1, RD-ES) con virus H-1 recombinante y deficiente en replicación que expresaba GFP (H-1EGFP) a diversos MOIs (0, 1, 10, 50 pfu/célula). Además de los linajes de células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing, se infectaron un linaje de células de neuroblastoma (WAC -2), que servía como control positivo, y células osteoblastos y fibroblastos humanas no transformadas.

20 (A) imágenes de microscopía con contraste de fase (filas superiores) y fluorescente (filas inferiores) tomadas dos días después de la infección con las células con H1-EGFP. Aumento: 1:20.000.

25 (B) gráficos que representan el número de células que expresaban GFP a diversas MOIs (0, 1, 10, 50 pfu/célula en diferentes momentos después de la infección. Las células que expresaban GFP se contaron bajo el microscopio fluorescente en un conjunto de 4000 células sembradas; para los experimentos con osteoblastos y fibroblastos no transformados, se sembraron  $10^4$  células.

30 Figura 2: Las proteínas parvovirales se expresan en las células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing

Resultados de transferencia Western utilizando el anticuerpo específico de las proteínas 1 y 2 de la cápsida viral (VP1 y VP2). Se sembraron las células y se infectaron después de 12 horas con H-1PV a una MOI de 1 pfu/célula o se infectaron falsamente con una dilución igual de iodixanol. Se recogieron cada 24 horas muestras para el análisis por transferencia Western. En los lisados celulares de las células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing infectadas con H-1PV aparecen bandas específicas de VP1 y VP2.

40 Figura 3: H-1PV se replica activamente en las células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing

45 Figura 4: Los cambios citomorfológicos en las células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing infectadas indican un efecto citopático de H-1PV

Se tomaron fotografías de células antes de realizar los tests de citotoxicidad, el día 3 y el día 6 para células tumorales óseas y control positivo y el día 7 para células fibroblastos y osteoblastos no transformadas. La escala de aumento utilizada para las células U-2 OS, SK-ES-1, WAC-2, fibroblastos y osteoblastos es 1:104, mientras que para SaOS-2, MG-63, y RD-ES es 1-204. En el caso de las células tumorales óseas para las determinaciones del día 3 se sembraron 1000 células/pocillo, mientras que para las determinaciones del día 6 se sembraron 500 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Para WAC-2 se sembraron 200 células/pocillo para ambas determinaciones del día 3 y el día 6 en placas de 96 pocillos. Se sembraron 2500 células/pocillo de osteoblastos y fibroblastos no transformados en las mismas placas de 96 pocillos.

50 Figura 5: H-1PV induce efectos citostáticos en dos de tres linajes de células de osteosarcoma y en dos linajes de células de sarcoma de Ewing de una manera dependiente de la dosis

55 **Test MTT (panel izquierdo):** Para cuantificar la viabilidad celular de los linajes de células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing después de la infección con H-1PV, se utilizaron tests MTT. Para ello, transcurridas 12 horas después de sembrarlas, las células se infectaron con H-1PV de tipo salvaje a las MOIs indicadas y se dejaron crecer hasta que las células de control falsamente infectadas llegaron a hacerse confluentes. Tres y seis días después de la infección, se determinó la actividad metabólica y por tanto la viabilidad celular utilizando tests MTT. Los valores para actividad metabólica se expresan con relación a células de control falsamente tratadas.

60 **Ensayos de liberación de LDH (panel derecho):** La citotoxicidad de H-1PV sobre los linajes de células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing se cuantificó por ensayos de liberación de LDH. Para esto, se tomaron 50  $\mu$ l del sobrenadante de las células sembradas para los tests MTT y se ensayó la liberación de LDH tres y seis días después de la infección con H-1PV (como en los tests MTT) para medir la citólisis. La actividad de LDH en los

sobrenadantes se expresó con relación a células completamente lisadas por lisis con Triton. Los valores medios de 8 experimentos y los errores estándar dobles respectivos se muestran tanto para los tests MTT como para los ensayos de liberación de LDH.

5 Figura 6: Análisis del ciclo celular de las células de osteosarcoma infectadas con H-1PV y falsamente infectadas

La infección con H-1PV inducía apoptosis en los linajes de células de osteosarcoma. Después de infección con MOI 1 y tinción subsiguiente con yoduro de propidio, se realizó el análisis del ciclo celular por citometría de flujo. La infección con H-1PV era capaz de inducir la detención en G2 y la aparición de una población sub-G1, como se muestra ilustrativamente para los linajes de células de osteosarcoma SaOS y U2-OS.

La presente invención proporciona parvovirus H1 para uso en un método para el tratamiento del sarcoma de Ewing.

15 El término "parvovirus", como se utiliza en esta memoria, comprende virus de tipo salvaje, virus replicantes y derivados modificados de los mismos competentes en replicación y virus no replicantes, virus armados de CPG así como virus afines o vectores basados en tales virus o derivados. Los parvovirus, derivados, etc. adecuados que son útiles para terapia, pueden ser determinados fácilmente dentro de la experiencia en la técnica basándose en la descripción hecha en esta memoria, sin esfuerzo empírico excesivo. Para el uso de la presente invención se prefieren virus competentes en replicación. El tratamiento se logra por destrucción de las células del cáncer, es decir, las células del cáncer son destruidas por la actividad oncolítica y citotóxica del parvovirus, de tal modo que estas células ya no son capaces de generar tumores.

20 Preferiblemente, dicho parvovirus se formula como una composición farmacéutica, en la cual el parvovirus está presente en una dosis eficaz y combinado con un portador farmacéuticamente aceptable. "Farmacéuticamente aceptable" significa que comprende cualquier portador que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos y que no es tóxico para el paciente al cual se administra el mismo. Ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Portadores farmacéuticamente compatibles adicionales pueden incluir geles, materiales matriz bioadsorbibles, elementos de implantación que contienen el parvovirus (agente terapéutico), o cualquier otro vehículo, medios o material(es) de suministro o dispensación adecuado(s). Tales portadores pueden formularse por métodos convencionales y pueden ser administrados al individuo a una dosis eficaz.

25 Una "dosis eficaz" se refiere a cantidades de los ingredientes activos que son suficientes para realizar el tratamiento del sarcoma. Una "dosis eficaz" puede determinarse utilizando métodos conocidos por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Fingl et al., The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman and Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., New York, pp. 1-46 (1975)).

30 La administración del parvovirus puede efectuarse por diferentes vías, v.g. por administración intravenosa, intratumoral, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La ruta de administración, por supuesto, depende de la clase de terapia. Rutas de administración preferidas son la administración intravenosa (i.v.), intratumoral o endobronquial. La aplicación endobronquial del virus puede utilizarse para el tratamiento de las metástasis pulmonares que se presentan frecuentemente como el primer relapso sistémico en los pacientes de osteosarcoma y particularmente en los de sarcoma de Ewing. Si se utilizan partículas de virus infecciosas que tienen la capacidad de penetrar a través de la barrera hematoencefálica, el tratamiento podría realizarse o al menos iniciarse por inyección intravenosa de, v.g., virus H1. Sin embargo, el tratamiento intravenoso a largo plazo podría resultar ineficiente por la formación de anticuerpos neutralizantes para el virus H1. Por tanto, podrían ser preferibles modos diferentes de aplicación intratumoral del virus. El parvovirus o vectores derivados pueden inyectarse también en las metástasis hepáticas o pulmonares de tumores óseos. Esto podría realizarse por punciones intra-hepáticas guiadas por ultrasonidos o por CT o suministro del virus asistido por broncoscopia en los nódulos pulmonares metastásicos. Son posibles también combinaciones de los métodos de aplicación arriba mencionados.

35 El régimen de dosificación del parvovirus 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 volumen del paciente, área de la superficie corporal, edad, sexo, el parvovirus particular a administrar, etc., el tiempo y la ruta de administración, el tipo de tumor mesenquimático, el estado general de salud del paciente, y otras fármaco-terapias a las que esté siendo sometido el paciente.

40 Como otra técnica de administración específica, el parvovirus 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 separado, para permitir que el parvovirus se inyecte localmente en diversos momentos sin intervención quirúrgica ulterior. El parvovirus puede inyectarse también en el tumor por técnicas quirúrgicas estereotácticas o técnicas de direccionamiento por neuronavegación.

65

La administración del parvovirus puede realizarse también por infusión continua de partículas virales o fluidos que contienen partículas virales a través de catéteres implantados a caudales bajos utilizando sistemas de bombeo adecuados, v.g. bombas de infusión peristálticas o bombas de suministro mejorado por convección (CED).

5 Otro método adicional de administración del parvovirus es desde un dispositivo implantado construido y dispuesto para dispensar el parvovirus al tumor deseado. Por ejemplo, pueden emplearse obleas que se han impregnado con el parvovirus, v.g., parvovirus H1, en las cuales la oblea está fijada a los bordes de la cavidad de resección a la conclusión de la extirpación quirúrgica del tumor. En dicha intervención terapéutica pueden emplearse múltiples obleas. Células que producen activamente el parvovirus, v.g., parvovirus H1, pueden inyectarse en el tumor óseo, o  
10 en la cavidad tumoral después de la extirpación del tumor.

La terapia conforme a la invención es útil para el tratamiento del sarcoma de Ewing y puede mejorar significativamente la prognosis de dicha enfermedad. La respuesta antitumoral incrementada por infección con parvovirus oncolíticos combina la citotoxicidad directa y específica de este virus contra las células tumorales (pero no las células sanas) con una actividad antitumoral secundaria y a largo plazo. En caso de relapso, el sarcoma de Ewing no puede tratarse con intención curativa. Para ello, opciones terapéuticas alternativas, tales como la parvoviroterapia oncolítica, que es capaz de destruir la célula del sarcoma de Ewing *in vitro* a dosis de entrada de virus comparables a las dosis requeridas para los linajes de células de glioma de alto grado de adultos prometen  
15 eficacia terapéutica relevante.

En una realización preferida de la presente invención, las células del tumor mesenquimático a tratar son (a) resistentes a la quimioterapia o radioterapia, o (b) células tumorales potencialmente relapsantes.

Conforme a la presente invención, el parvovirus es parvovirus H1 (H1PV).

25 Pacientes que pueden ser tratados por el parvovirus conforme a la invención incluyen humanos y animales no humanos. Ejemplos de los últimos incluyen, sin limitación, animales tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros, y gatos.

30 El tratamiento de utilización de un parvovirus puede combinarse con clases de terapia adicionales, v.g., quimioterapia utilizando, por ejemplo, un agente quimioterapéutico como etoposido, ifosfamida, adriamicina, vincristina, y doxiciclina.

Los ejemplos que siguen explican la invención con más detalle.

### 35 Ejemplo 1

#### Materiales y Métodos

##### 40 (A) Cultivo de células

Los linajes de células de osteosarcoma humano H-OS, CAL-72, U2-OS, SaOS -2, y MG-63 y los linajes de células de sarcoma de Ewing MHH-ES, TC-71, SK-ES-1, RD-ES y CADO-ES se obtuvieron de CLS (Cell Lines Service, Eppelheim, Alemania). Los cinco linajes de células de osteosarcoma (H-OS, SaOS-2, CAL-72, U2-OS y MG-63) se dejaron crecer en condiciones estándar, 37° C, 5% CO<sub>2</sub> en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (Sigma Aldrich, Munich, Alemania), suplementado con 10% de suero de bovino fetal desactivado por calentamiento, y 1% de penicilina-estreptomina. Los linajes de células de sarcoma de Ewing (MHH-ES, TC-71, MHH-ES, SK-ES-1, y RD-ES) se dejaron crecer en medio de cultivo de células RPMI1640, suplementado con 10% de FBS desactivado por calentamiento, y 1% de penicilina-estreptomina.

##### 50 (B) Producción del virus e infección

Se produjo H-1PV de tipo salvaje por infección de células de riñón embrionario humano NBK-324K, y se purificó por filtración (diámetro máximo de partícula 0,2 µm) y centrifugación en gradiente de iodoxanol. La contaminación de stocks de virus con endotoxinas era <2,5 EU/ml. Las células se infectaron con H-1PV como cultivos que crecían adhesivamente 12 a 24 horas después de recuento y siembra de las células.

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

60 Se determinaron los títulos de virus como se ha descrito previamente (12). Se sembraron las células NB-324K (7,6 x 10<sup>3</sup> células/pocillo) en placas de 96 pocillos, 24 horas antes del ensayo. Las células se infectaron por medio de diluciones seriadas al décuplo del sobrenadante de los linajes de células de osteosarcoma o sarcoma de Ewing infectados previamente y se incubaron durante 72 horas a 37° C, 5% CO<sub>2</sub>. Después de lisis alcalina (NaOH 0,75 M) se transfirió el DNA a una membrana de nailon, se reticuló, y se hibridó con una sonda específica de NS-1 radiomarcada con P<sup>32</sup>. Las transferencias se expusieron a film de rayos X para autorradiografía. Los experimentos

de titulación se realizaron siempre por triplicado. El virus se aplicó a multiplicidades de infección (MOI, expresada en unidades formadoras de calvas por célula; pfu) como se indica.

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

5 El sobrenadante de los cultivos de células infectadas se recogió en momentos diferentes después de la infección. Los sobrenadantes se trataron con 50 U por ml de Benzonasa Nucleasa (grado Ultrapuro; Sigma), a 37° C durante 30 minutos para digerir el DNA genómico remanente. Para liberar DNA viral de los viriones, se sometieron a lisis alcalina 10 µl de extracto de células en NaOH 1M en tampón TE a 56° C durante 30 minutos. La lisis se detuvo por adición de 960 µl de HCl 40 mM. Después de neutralización con una concentración equimolar de HCl, las muestras se diluyeron en una ratio 1:100 con agua estéril y se analizaron directamente.

15 El sobrenadante se incubó en tampón TE durante 30 minutos a 56 °C. La cuantificación del DNA viral se llevó a cabo por amplificación PCR cuantitativa en tiempo real de un fragmento de DNA de 141 nucleótidos dentro del gen NS-1 utilizando los cebadores siguientes NS1-FOR: 5'-GCG CGG CAG AAT TCA AAC T-3'; NS1-REV: 5'-CCA CCT GGT TGA GCC ATC AT-3'. El amplicón se detectó utilizando la sonda TaqMan™ específica de NS1 5'-6-FAM-ATGCAGCCAG-ACAGTTA-Q-MGB 3' (Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad (CA), EE.UU.) en un ciclador térmico ABI Prism 7700 (Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad (CA), EE.UU.) y se analizó por medio de software SDS 2.1 (Applied Biosystems by Life Technologies, Carlsbad (CA), EE.UU.) como se describe en otro lugar (13). Un plásmido que contenía la secuencia NS1 en diluciones seriadas en el intervalo de 101-108 copias/reacción se utilizó para estandarizar la qPCR. Las mezclas de reacción individuales (20 p1) están constituidas por 1 x TaqMan Universal PCR Master Mix™ (Applied Biosystems), 0,3 µM de sonda NS1-TaqMan™ marcada, 0,3 µM de cada cebador y 3 µl de molde. Las condiciones de la PCR fueron dos minutos a 50 °C (destrucción del molde contaminante por AmpErase™), a continuación 10 minutos al 95 °C, seguidos por 40 ciclos de desnaturalización a 95° C durante 15 segundos y reasociación/extensión a 60 °C durante 60 segundos.

#### (E) Microscopía

30 Se generaron imágenes con contraste de fase utilizando un microscopio de contraste de fase invertida (Olympus; Modelo CKX41) y software Cell B para procesamiento de imágenes (Olympus Europa GmbH, Hamburgo, Alemania). Se obtuvieron otras imágenes de contraste de fase utilizando una cámara Leica DFC350 FX™ (Leica Microsystems Biosystems, Wetzlar, Alemania) y el software Leica FireCam™ para Macintosh.

#### (F) Evaluación de la viabilidad y lisis celular

35 La actividad metabólica de las células se determinó basándose en el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) conforme a la recomendación del fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE.UU.). Las células (entre 1000 y 2000 células por pocillo) se cultivaron en placas de 96 pocillos y se infectaron a las MOIs indicadas en las Figuras. Después de tres y seis días, las células se lavaron en PBS y se incubaron con 40 0,5 µg/ml de solución de MTT durante hasta dos horas. Después de desechar el sobrenadante y secar las células, se añadieron 100 µl de isopropanol por pocillo. Los valores de extinción se determinaron fotométricamente a 570 nm (Multiscan Plus™, Titertek Instruments Inc., Huntsville, AL, EE.UU.).

45 La lisis celular se determinó por medida de la liberación de lactato-deshidrogenasa en el medio de cultivo mediante el uso del kit de ensayo de citotoxicidad Citotox 96™ (Promega Biosystems Promega Corporation, Madison WI, EE.UU.) conforme a las recomendaciones del fabricante.

### **Ejemplo 2**

#### **Las células de osteosarcoma y del sarcoma de Ewing son susceptibles de infección con H-1PV**

50 Para determinar si H-1PV era capaz de infectar las células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing, se expusieron las células en paralelo a 1 y 50 unidades de replicación por célula de virus H-1 recombinante, deficiente en replicación (H-1EGFP), que expresaba GFP. Como control positivo sirvieron células de neuroblastoma WAC-2 (proporcionadas amablemente por el profesor O. Witt, CCU Pediatric Oncology, DKFZ, Heidelberg). La expresión de EGFP podía detectarse en todos los linajes de células con H-1 EGFP, lo que indicaba la expresión con éxito del gen de infección impulsada por el promotor viral en las células mesenquimáticas no transformadas y en células de cáncer óseo (Figura la y b).

### **Ejemplo 3**

#### **Las proteínas H-1PV se expresan en las células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing**

65 Para demostrar que las proteínas de H-1PV de tipo salvaje se expresaban en las células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing infectadas, se realizó un análisis por transferencia Western de las proteínas de la cápsida de VP1 y VP2 en células infectadas. NS1 y NS2 son proteínas no estructurales requeridas para la infección con las células

hospedadoras (14), y VP1/2 son proteínas estructurales de la cápsida viral (15). Subsiguientemente a la infección con una pfu de H-1PV de tipo salvaje por célula, las proteínas de la cápsida viral se expresaban en todos los linajes de células de cáncer óseo investigadas durante 96 horas después de la infección (Figura 2).

#### 5 Ejemplo 4

##### **H-1PV se replica activamente en las células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing**

10 Para abordar la cuestión en cuanto a si H-1PV era capaz de multiplicarse en las células de cáncer óseo, se infectaron células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing con H-1PV de tipo salvaje. Los títulos de copias del genoma viral en el sobrenadante de las células infectadas se determinaron por PCR en tiempo real en un periodo de tiempo comprendido entre 24 y 96 horas después de la infección. En los linajes de células de osteosarcoma no pudo observarse replicación viral eficiente alguna. Únicamente pudo demostrarse replicación eficiente del virus en el linaje de células RD-ES del sarcoma de Ewing (Figura 3), lo que es comparable a la eficiencia de replicación en los linajes de células de glioma de alto grado humano (16).

15 Para confirmar la multiplicación de H-1PV de la progenie infecciosa, se realizaron ensayos de partículas infecciosas con sobrenadantes de los mismos linajes de células de cáncer óseo infectados en cultivo. Los virus H-1 de la progenie eran biológicamente activos, es decir capaces de infectar las células NBK-324K. Considerado en su conjunto, pudo demostrarse que H-1PV infecta productivamente las células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing. Pudo demostrarse que la infección con estas células induce la expresión de proteínas virales esenciales. Sin embargo, la replicación y producción viral eficiente de progenie infecciosa de H-1PV pudo demostrarse únicamente en uno de dos linajes de células de sarcoma de Ewing.

#### 25 Ejemplo 5

##### **H-1PV induce infección lítica en los linajes de células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing**

30 Con objeto de testar en qué proporción la infección de las células de osteosarcoma con H-1PV de tipo salvaje era lítica, se documentó la citomorfología de las células infectadas por microscopía con contraste de fase. Tres días después de la infección, pudo demostrarse que H-1PV induce efectos citopáticos significativos en 2 de 3 células de osteosarcoma aplicando una MOI de una a cinco pfu por célula o más (Figuras 4 y 5). Tres días después de la infección, pudo demostrarse que H-1PV induce efectos citopáticos significativos en los dos linajes de células de sarcoma de Ewing aplicando una MOI de una pfu por célula o más (Figuras 4 y 5).

#### 35 Ejemplo 6

##### **H1PV induce efectos citostáticos en dos de tres linajes de células de osteosarcoma y en dos linajes de células de sarcoma de Ewing de una manera dependiente de la dosis**

40 Los linajes de células de osteosarcoma H-OS, SaOS-2, U2-OS y MG-63 y los linajes de células de sarcoma de Ewing MHH-ES, RD-ES, y SK-ES-1 se infectaron con dosis crecientes de H-1PV de tipo salvaje entre 0,01 y 10 pfu por célula. Los días 3 y 6 después de la infección se determinó la viabilidad celular por el test MTT, y se analizó la lisis celular por medida de la actividad extracelular de LDH, liberada al sobrenadante por las células líticas. La lisis de las células infectadas con la misma MOI inducida por aplicación de un detergente sirvió como referencia para la lisis completa (Figura 5). Como controles negativos se utilizaron fibroblastos y osteoblastos no transformados en cultivo a corto plazo. Los resultados se resumen también en la Tabla 1.

#### 50 Ejemplo 7

##### **Los efectos citopáticos sobre las células de cáncer óseo parecen estar mediados por apoptosis**

55 Se analizaron linajes de células de osteosarcoma y sarcoma de Ewing por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo subsiguiente respecto a la presencia de una población de células con un contenido de DNA sub-G1 (menor que 2n), que es indicativa de fragmentación y apoptosis del DNA. La infección con H-1PV de osteosarcoma y sarcoma de Ewing era capaz de inducir la detención en G2 y la aparición de una población sub-G1, como se muestra ilustrativamente para los linajes de células de osteosarcoma SaOS y U2-OS (Figura 6).

##### **Tabla 1: Valores TCID50 para células de cáncer óseo no transformadas y malignas**

60 Los valores TCID50 se determinaron basándose en la investigación de efectos citopáticos, actividad metabólica y lisis celular de las células infectadas.

Linaje de células	DL50 [p.f.u./célula]	Tipo de tumor
H-OS	< 1	<b>osteosarcoma</b>



Linaje de células	DL50 [p.f.u./célula]	Tipo de tumor
CAL-72	1	<b>osteosarcoma</b>
Sa-OS 2	5	<b>osteosarcoma</b>
U-2 OS	50	<b>osteosarcoma</b>
MG-63	> 50	<b>osteosarcoma</b>
MHH-ES-1	< 1	<b>Sarcoma de Ewing</b>
TC-71	< 1	<b>Sarcoma de Ewing</b>
RD-ES	1	<b>Sarcoma de Ewing</b>
SK-ES-1	5	<b>Sarcoma de Ewing</b>
CADO-ES	50	<b>Sarcoma de Ewing</b>
Osteoblastos	> 50	<b>no transformado</b>
Fibroblastos (neonatales)	> 50	<b>no transformado</b>

#### Lista de referencias

- (1) Ketola A, Hinkkanen A, Yongabi F, Furu P, Maatta AM, Liimatainen T, et al. Oncolytic Semliki forest virus vector as a novel candidate against unresectable osteosarcoma. *Cancer Res* 2008;68:8342-50.
- (2) Morton CL, Houghton PJ, Kolb EA, Gorlick R, Reynolds CP, Kang MH, et al. Initial testing of the replication competent Seneca Valley virus (NTX-010) by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55:295-303.
- (3) Witlox MA, Lamfers ML, Wuisman PI, Curiel DT, Siegal GP. Evolving gene therapy approaches for osteosarcoma using viral vectors: review. *Bone* 2007;40:797-812.
- (4) Graat HC, van Beusechem VW, Schagen FH, Witlox MA, Kleinerman ES, Helder MN, et al. Intravenous administration of the conditionally replicative adenovirus Ad5-Delta24RGD induces regression of osteosarcoma lung metastases. *Mol Cancer* 2008;7:9.
- (5) Witlox AM, van Beusechem VW, Molenaar B, Bras H, Schaap GR, Alemany R, et al. Conditionally replicative

adenovirus with tropism expanded towards integrins inhibits osteosarcoma tumor growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2004;10:61-7.

(6) Li X, Jung C, Liu YH, Bae KH, Zhang YP, Zhang HJ, et al. Anti-tumor efficacy of a transcriptional replication-competent adenovirus, Ad-OC-E1a for osteosarcoma pulmonary metastasis. *J Gene Med* 2006;8:679-89.

(7) Bharatan NS, Currier MA, Cripe TP. Differential susceptibility of pediatric sarcoma cells to oncolysis by conditionally replication-competent herpes simplex viruses. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:447-53.

(8) Rice AM, Currier MA, Adams LC, Bharatan NS, Collins MH, Snyder JD, et al. Ewing sarcoma family of tumors express adenovirus receptors and are susceptible to adenovirus-mediated oncolysis. *J Pediatr Hematol Oncol* 2002;24:527-33.

(9) Davidoff AM, Nathwani AC, Spurbeck WW, Ng CY, Zhou J, Vanin EF. rAAV-mediated long-term liver-generated expression of an angiogenesis inhibitor can restrict renal tumor growth in mice. *Cancer Res* 2002;62:3077-83.

(10) Rommelaere J, Geletneky K, Angelova AL, Daeffler L, Dinsart C, Kiprianova I, et al. Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010, Vol. 21, No. 2-3, pp. 185-195.

(11) Lacroix J, Leuchs B, Li J, Hristov G, Deubzer HE, Kulozik AE, et al. Parvovirus H1 selectively induces cytotoxic effects on human neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 2010;127:1230-9.

(12) Angelova AL, Aprahamian M, Grekova SP, Hajri A, Leuchs B, Giese NA, et al. Improvement of gemcitabine-based therapy of pancreatic carcinoma by means of oncolytic parvovirus H-1PV. *Clin Cancer Res* 2009;15:511-9.

(13) Abschuetz A, Kehl T, Geibig R, Leuchs B, Rommelaere J, Regnier-Vigouroux A. Oncolytic murine autonomous parvovirus, a candidate vector for glioma gene therapy, is innocuous to normal and immunocompetent mouse glial cells. *Cell Tissue Res* 2006;325:423-36.

(14) Caillet-Fauquet P, Perros M, Brandenburger A, Spegelaere P, Rommelaere J. Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J* 1990;9:2989-95.

(15) Chen YQ, Tuynder MC, Cornelis JJ, Boukamp P, Fusenig NE, Rommelaere J. 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* 1989;10:163-7.

(16) Herrero YC, Cornelis JJ, Herold-Mende C, Rommelaere J, Schlehofer JR, Geletneky K. Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing. *Int J Cancer* 2004;109:76-84.

(17) Schwarzbach M, Eisold S, Burguete T., Willeke F, Klein-Bauernschmitt P., Schlehofer J., Herrfart C., Ridder R., von Knebel-Doberitz M., *Int. J. of Oncology* 2002, 20, pp. 1211-1218.

(18) Mutlu D., Kupesiz A., Colak D., Hazar V., Ongut G., Tezcan G., Aydin G., Yesilipek A., Gultekin M., *Int. J. of Infectious Diseases* 2006, Vol. 10, p. S30.

(19) US 2008/057037

**REIVINDICACIONES**

1. Parvovirus H1 (H1-PV) para uso en un método para el tratamiento de un sarcoma de Ewing.
- 5 2. El parvovirus para el uso conforme a la reivindicación 1, en el cual las células de dicho sarcoma de Ewing son (a) resistentes a la quimioterapia o radioterapia, o (b) células tumorales potencialmente relapsantes.
3. El parvovirus para el uso conforme a la reivindicación 1 ó 2, en el cual dicho parvovirus se administra por administración intravenosa (i. v.), intratumoral o endobronquial.

10

Figura 1a:

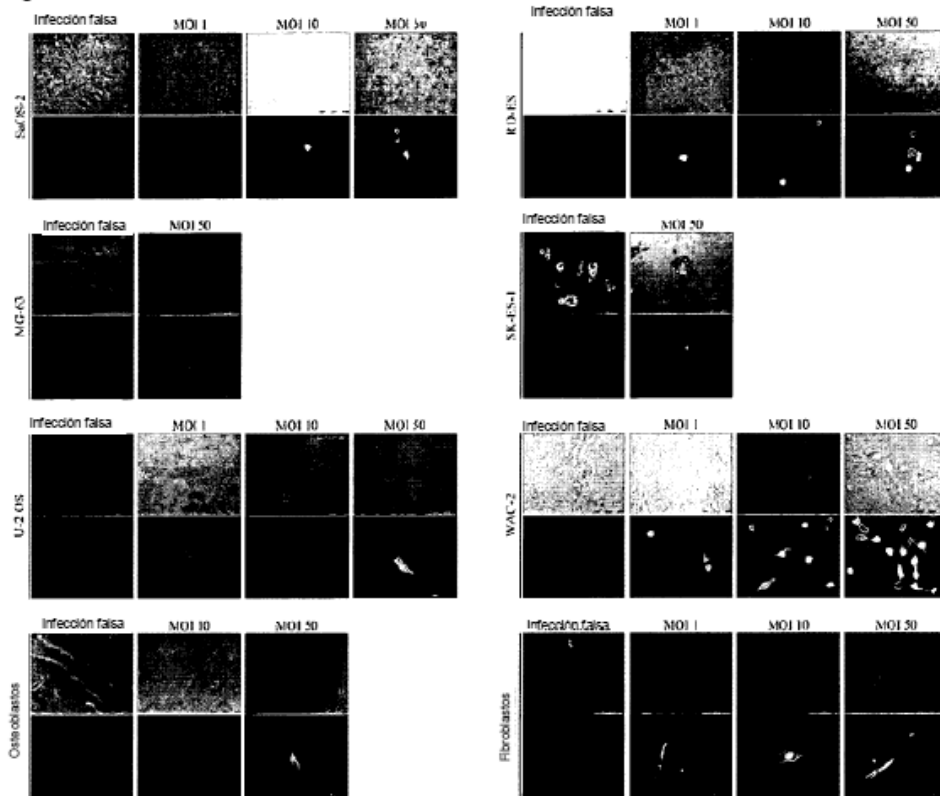


Figura 1b:

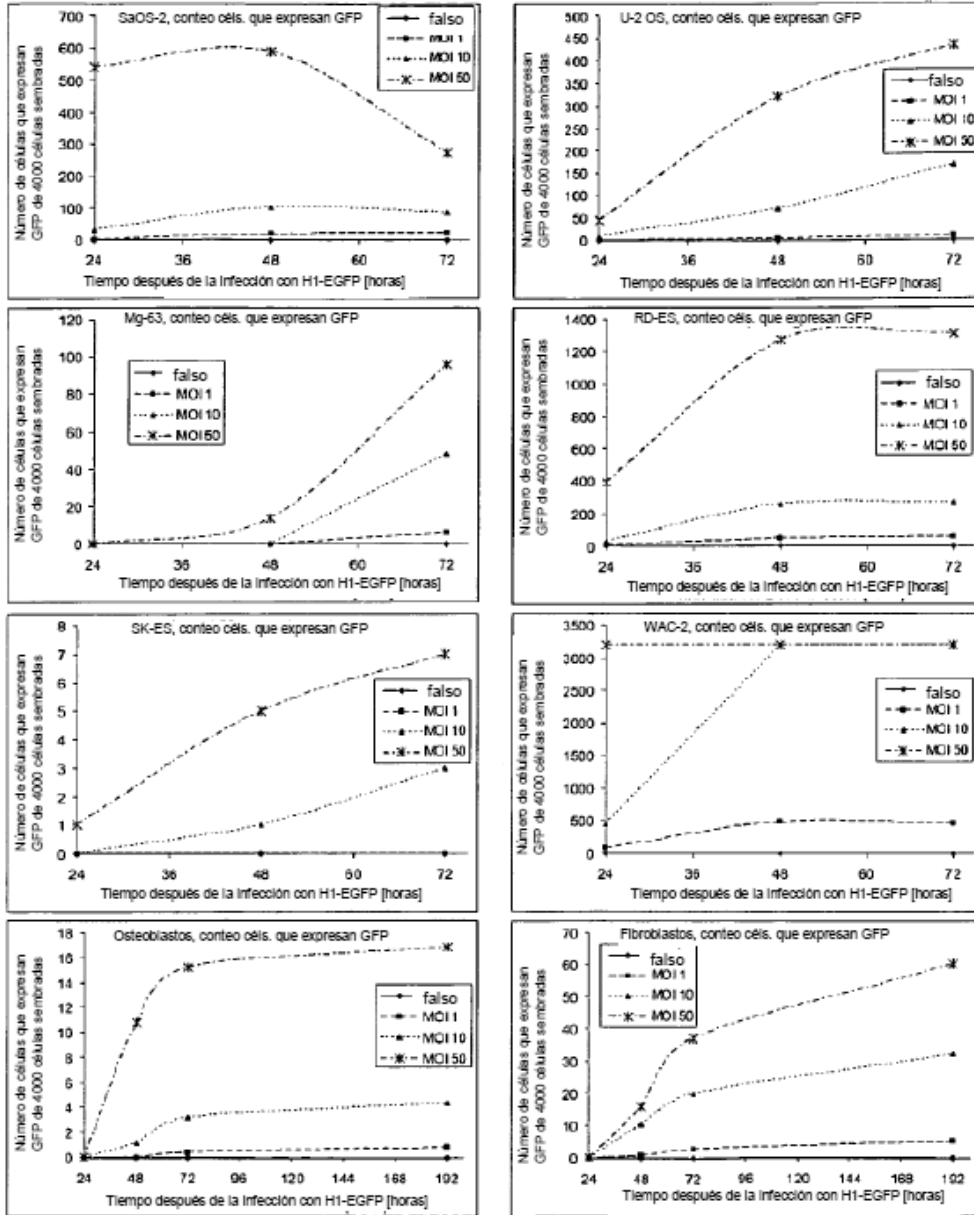


Figura 2:

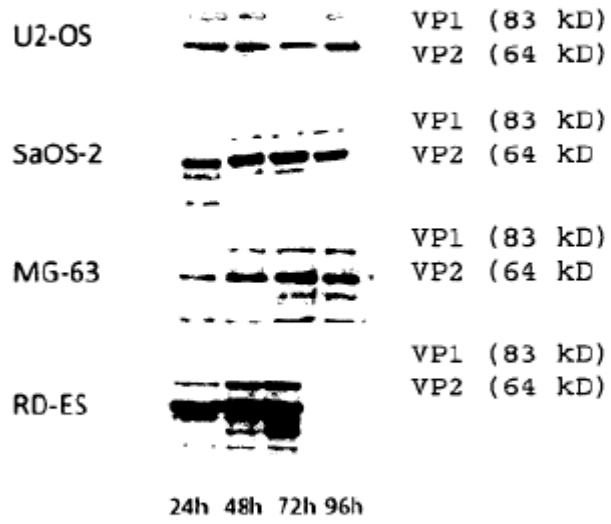
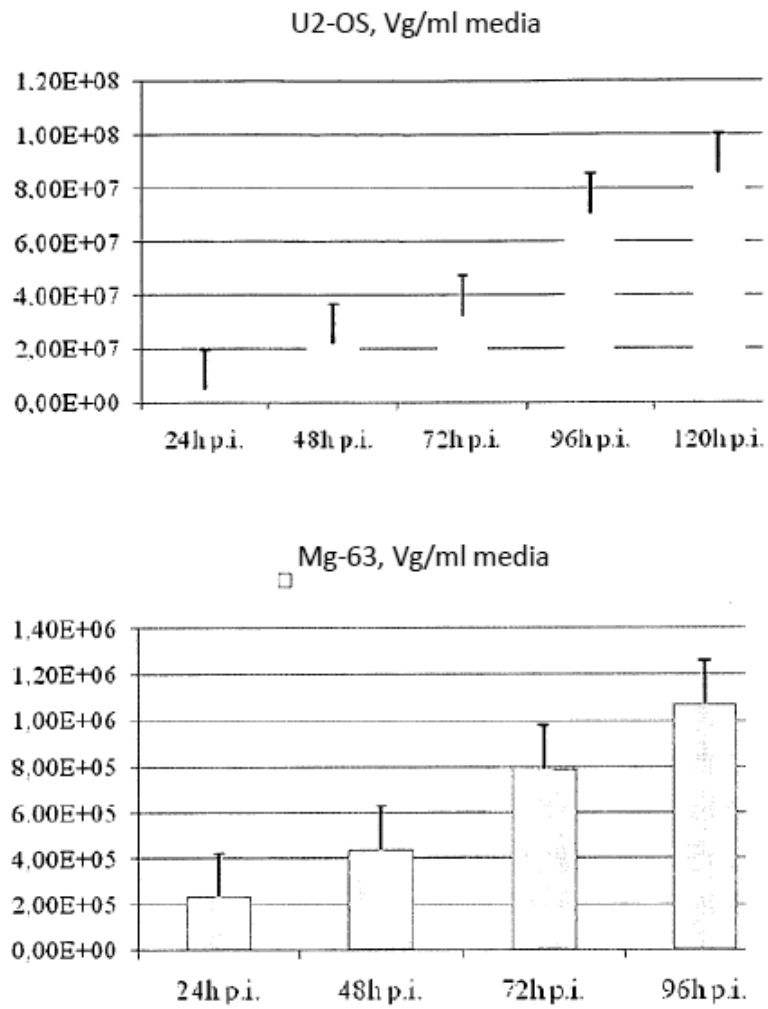


Figura 3:



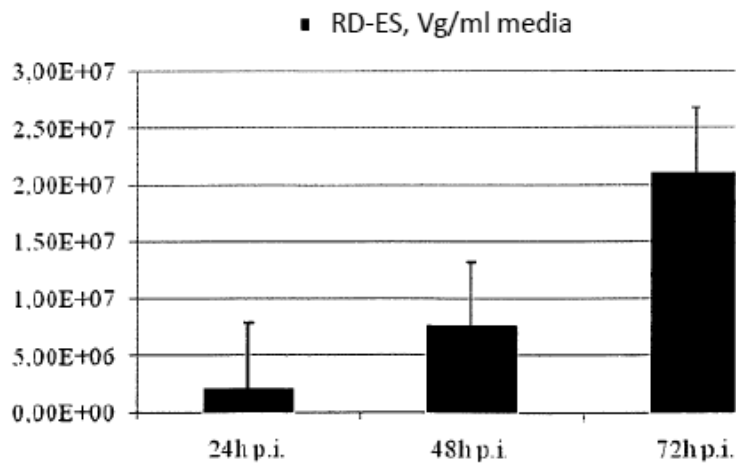
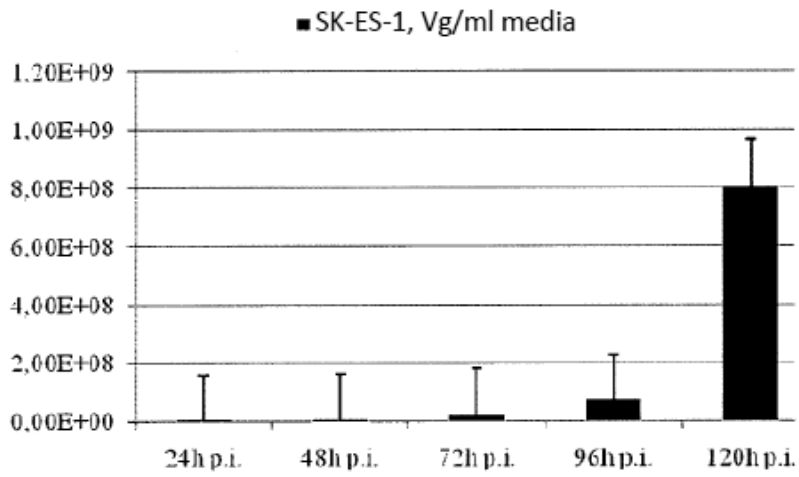
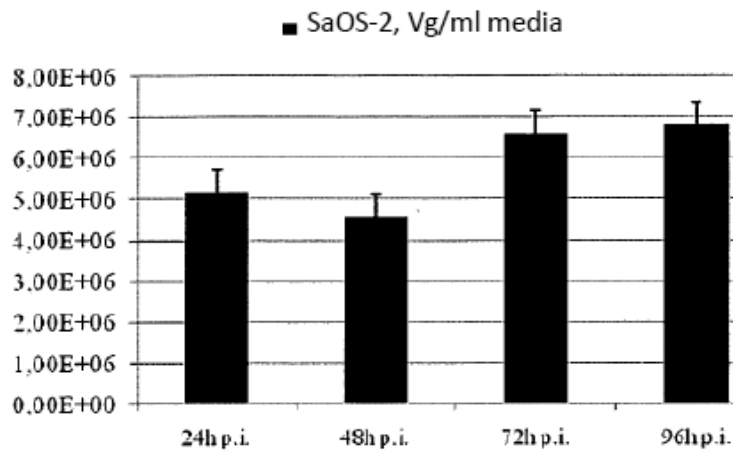




Figura 4:

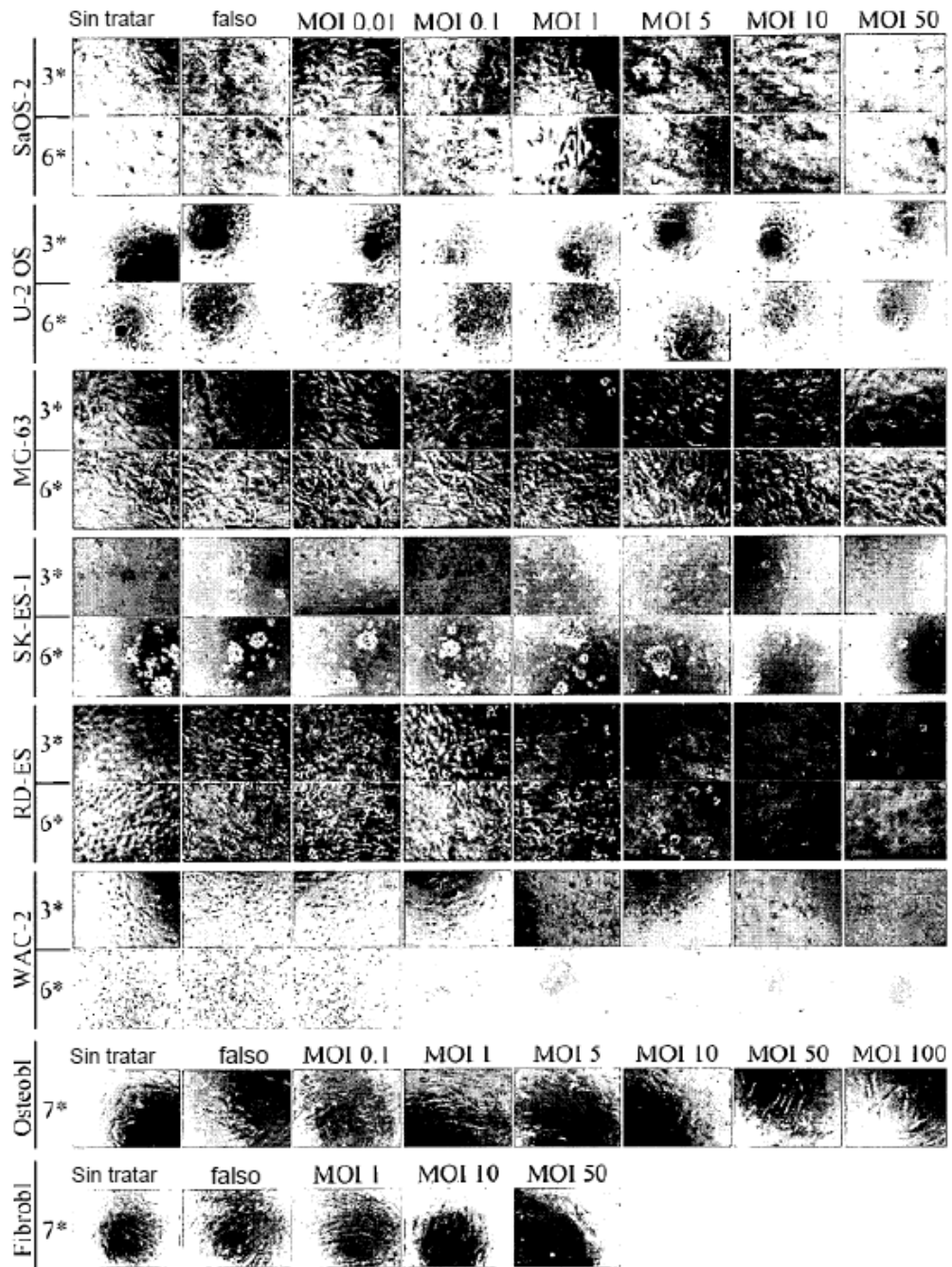
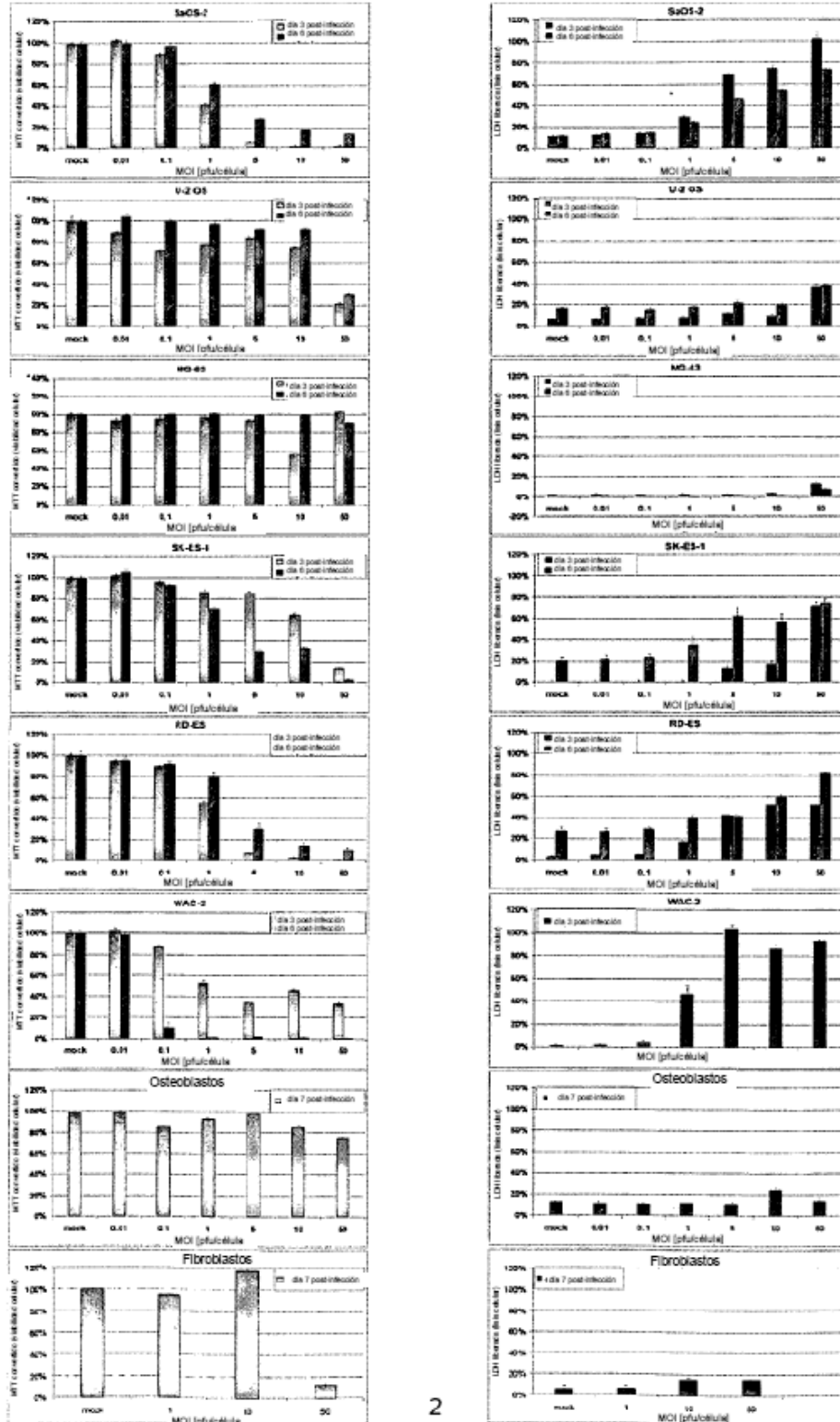


Figura 5



2

Figura 6

