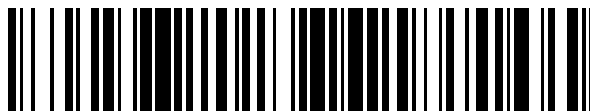


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 906**

21 Número de solicitud: 201431151

51 Int. Cl.:

A61K 39/23 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

30.07.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.03.2016

Fecha de la concesión:

07.12.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

15.12.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2015/070597

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (100.0%)
Ciudad Universitaria de Cantoblanco, Pabellón C
Calle Einstein, 13
28049 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**ALMENDRAL DEL RÍO, Jose María;
GIL-RANEDO, Jon y
IZQUIERDO, Marta**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **TRATAMIENTO DE GLIOMA O GLIOBLASTOMA CON EL PARVOVIRUS MVM**

57 Resumen:

Tratamiento de glioma o glioblastoma con el parvovirus MVM, mediante partículas virales que contienen ADN con una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en la secuencia de los virus MVMP y MVMI, o mediante composiciones farmacéuticas que contienen dichas partículas virales.

ES 2 561 906 B1

DESCRIPCIÓN

TRATAMIENTO DE GLIOMA O GLIOBLASTOMA CON EL PARVOVIRUS MVM

La presente invención se engloba en los campos de la biología molecular y la medicina, y se refiere al uso de un virus de ratón no patogénico en humanos, llamado virus diminuto del ratón (MVM), perteneciente a la familia *Parvoviridae*, para el tratamiento de glioma, especialmente glioblastoma.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Glioma

10 El glioma es un tipo de neoplasia que se produce en el cerebro o en la médula espinal. Se denomina glioma debido a que surge a partir de células gliales. Su ubicación más frecuente es el cerebro.

Existen diferentes clasificaciones para los gliomas; concretamente, se pueden clasificar por el tipo de células afectadas, por su grado, es decir su evaluación patológica, y por su
15 ubicación.

Por tipo de célula, los gliomas son nombrados de acuerdo con el tipo específico de células que más se asemejan a las células afectadas. De acuerdo con esta clasificación, los principales tipos de gliomas son:

- Ependimomas: células ependimarias.
- 20 - Astrocitomas: astrocitos; el glioblastoma multiforme es el astrocitoma más común.
- Oligodendrogliomas: oligodendrocitos.

Por el grado, los gliomas son clasificados en base la evaluación patológica del tumor.

De bajo grado, se referencian los gliomas bien diferenciados (es decir, no anaplásicos), benignos y auguran un mejor pronóstico para el paciente.

25 De alto grado, se referencian los gliomas indiferenciados o anaplásicos, malignos y de peor pronóstico.

El sistema más común para la clasificación de astrocitomas es el establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual asigna una calificación de 1 a 4, siendo 1 el menos agresivo y 4 es el más agresivo:

- 30 - OMS Grado 1 - por ejemplo, astrocitoma pilocítico.
- OMS Grado 2 - por ejemplo, astrocitoma difuso o de bajo grado.
- OMS Grado 3 - por ejemplo, astrocitoma anaplásico (maligno).
- OMS Grado 4 - por ejemplo, glioblastoma multiforme (el glioma más común en adultos).

Por ubicación, los gliomas se pueden clasificar en función de si están ubicados por encima o
35 por debajo de una estructura meníngea denominada tentorio, la cual cubre la superficie

superior del cerebelo y soporta el lóbulo occipital del cerebro, es decir, delimita dos secciones dentro de la cavidad craneana.

Supratentoriales (por encima del tentorio): 70% se da en adultos;

Infratentoriales (por debajo del tentorio): 70% se da en niños.

5

Glioblastoma y tratamientos de gliomas.

El peor pronóstico de los gliomas corresponde a los de grado 4. De ellos, el glioblastoma multiforme (GBM) es el tumor cerebral primario más frecuente y agresivo en adultos. La esperanza de vida de los pacientes con GBM es de entre 12 y 15 meses, a pesar del tratamiento multidisciplinar, con una tasa de supervivencia a 5 años menor del 5% (*Nature reviews* **10**(5): 319-331).

El tratamiento convencional de glioblastoma comprende cirugía, radio- y quimioterapia, y depende de la ubicación, el tipo de células y el grado de malignidad.

La primera estrategia terapéutica es la resección quirúrgica completa, aunque esta se ve limitada por la presencia de áreas elocuentes y la alta infiltración en el parénquima cerebral.

La cirugía se combina con la administración posterior o concomitante de radio- y/o quimioterapia, principalmente con temozolomida (*Expert Rev Neurother* (2010) **10**(4): 507-514), un fármaco quimioterapéutico alquilante, el cual es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica de manera efectiva.

No obstante lo anterior, hoy en día aún no se dispone de tratamientos específicos ni generales contra estos tipos de cáncer que demuestren beneficios claros en clínica.

Células troncales tumorales y terapia de glioblastoma.

Tradicionalmente se ha considerado que todas las células cancerosas tienen la misma capacidad de generar nuevos tumores, pero esta visión ha cambiado recientemente con la hipótesis de las células troncales tumorales (CSC). Esta idea establece que exclusivamente una subpoblación de células cancerosas con propiedades de células troncales aberrantes, las CSC, es capaz de generar y mantener el tumor (*Cancer research* (2006) **66**(19): 9339-9344).

Se ha demostrado la existencia de poblaciones de CSC en multitud de tipos tumorales, incluyendo GBM (*Nature* (2004) **432**(7015): 396-401), basándose en su capacidad de autorrenovación, diferenciación y capacidad de inducir tumores en modelos animales.

Concretamente, las células troncales de glioblastoma obtenidas de pacientes (en adelante hGSC), han demostrado su carácter troncal y tumorigénico.

Las propiedades de las hGSC explican la escasa eficacia de los tratamientos actuales (*Nat Biotechnol* (2007) **25**(2): 193-194), ya que la expresión de marcadores de CSC en GBM

correlaciona con la progresión tumoral, recidivas y supervivencia de los pacientes (*Clin Cancer Res* (2008) **14**(1): 123-129). Las terapias actuales se diseñan concibiendo al tumor como una población homogénea de células altamente proliferativas, ignorando que las hGSC son relativamente quiescentes y poseen mecanismos de radio y quimiorresistencia (*Nature* (2006) **444**(7120): 756-760; *Semin Radiat Oncol* (2009) **19**(2): 78-86). Este hecho explica las invariables recidivas sufridas por pacientes, los cuales han experimentado fuertes reducciones del volumen tumoral tras un tratamiento, debido a la eliminación del grueso del tumor, pero sin la eliminación de la subpoblación de hGSC, la cual posteriormente repuebla al tumor. Por lo tanto, sólo una terapia capaz de eliminar a las hGSC podría conseguir una disminución definitiva del volumen tumoral.

Debido a lo anterior, actualmente se considera que los modelos de terapias de cáncer han de demostrar su eficacia primariamente frente a CSC. Aquellos estudios basados en líneas celulares establecidas son insuficientes y sesgados, ya que estas células se adaptan gradualmente a un entorno no fisiológico debido a la selección clonal a la que se ven sometidas por el cultivo *in vitro*, alejando sus fenotipos y genotipos del de sus tumores de origen (*Nature reviews* (2003) **3**(12): 895-902). En cambio, los modelos basados en CSC reproducen fielmente las propiedades fenotípicas y genotípicas del tumor original, poseyendo un poder predictivo sobre la eficacia de las terapias ensayadas en ellas mucho mayor que las líneas establecidas (*Cancer cell* (2006) **9**(5): 391-403). De hecho, existen ejemplos claros de terapias que fueron aplicadas con éxito en modelos basados en líneas celulares establecidas (*Eur J Cancer Clin Oncol* (2006) **19**(6): 799-805; *Nat Med* (1995) **1**(9): 938-943), pero fracasaron tanto en la práctica clínica (*Gene Ther* (2000) **7**(10): 867-874; *PLoS Med* (2008) **5**(1): e8) como en modelos basados en CSC (*Clin Cancer Res* (2008) **14**(5): 1571-1580; *Journal of neuro-oncology* (2012) **108**(1): 53-58).

25

Los parvovirus

Los Parvovirus son virus icosaédricos de ADN de banda sencilla de 5 kb, que tienen un enorme interés potencial en terapia de cáncer debido a su oncotropismo natural, su ciclo vital lítico, y ser esencialmente no patógenos para humanos.

Parvoviridae es una familia de virus infectivos para insectos y vertebrados (perros, gatos, porcinos, pollos, gansos, conejos, equinos, etc), incluyendo humanos (Tijssen, P. et al, 2011, *Virus taxonomy 9th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV Ninth Report*). Estos virus poseen un genoma con ADN de cadena sencilla como ácido nucleico, de aproximadamente 5 kb. Se caracterizan por una cápsida de 25 nm de diámetro, de 60 subunidades de proteína estructuralmente definida por una simetría icosaédrica y carente de envoltura viral (desnuda). La cápsida está formada por dos proteínas

35

estructurales primarias, una mayoritaria, VP2, de 64-85 kD y otra minoritaria, la VP1, de 80-96 kD, pero esencial para la infectividad. Los viriones ensamblan su cápsida y maduran en el núcleo como compartimento celular (ver **Figura 2**).

5 **Parvovirus como agentes anti-cáncer.**

El oncotropismo natural de los parvovirus explica que fueran y continúan siendo aislados de tumores, líneas celulares tumorales, preparados de otros virus oncogénicos, o de animales de experimentación sometidos a tratamientos carcinogénicos (*Proc Natl Acad Sci U S A* (1960) **46**(9): 1256-1258).

10 La infección productiva de los Parvovirus requiere funciones expresadas durante la fase S del ciclo celular (*Adv Virus Res* (1987) **33**: 91-174), por lo que sólo se multiplican en tejidos proliferativos, y por tanto la hiperplasia de los tejidos pre-cancerosos y cancerosos favorece su multiplicación y efectos líticos. Además, estos virus cumplen requisitos de bioseguridad muy importantes en la perspectiva de su empleo en clínica, ya que son muy selectivos en su
 15 rango de huésped: en condiciones fisiológicas los Parvovirus de roedores no son patogénicos en absoluto para humanos. Pero los cambios genéticos y fenotípicos que se desencadenan en las transformación celular, levantan las barreras que delimitan el rango de hospedador de estos virus y permiten que parvovirus del ratón como el virus diminuto del ratón (MVM, la cepa prototipo (p) depositada en la ATCC como: ATCC® VR-1346™), uno
 20 de los modelos empleados en esta invención, puedan multiplicarse líticamente en células neoplásicas humanas (*Nature* (1982) **300**(5892): 537-539).

Parvovirus en terapias de glioblastoma.

El uso de Parvovirus en terapia oncolítica de Glioblastomas tiene un interés doble, por una
 25 parte las dificultades de tratamiento de estos tumores por terapias convencionales (expuestas anteriormente), y el hecho de que estos tumores se desarrollan en el entorno del cerebro, cuyas células diferenciadas no proliferativas no son permisivas a la infección por parvovirus.

En este sentido, se ha descrito el uso de Parvovirus en diferentes ensayos relacionados con
 30 células de glioblastoma o gliomas.

Se ha estudiado en detalle el comportamiento de dos cepas (p, i) del parvovirus de ratón MVM (*J Virol* (1988) **62**(8): 2605-2613) en líneas de glioblastoma humano establecidas (U87 y U373) en cultivo (*J Virol* (2001) **75**(23): 11573-11582; *J Virol* (2010) **84**(4): 2090-2099; *J Virol* (2010) **84**(10): 5043-5051. Nótese que ninguna de estas dos líneas celulares son
 35 células troncales.

En *J Virol* (2001) **75**(23): 11573-11582 se describe que la cepa MVMi no completó el ciclo productivo en ninguna de las células ensayadas. En las células U373 de glioblastoma, a pesar de que la síntesis macromolecular del virus fue completa, la producción de virones infecciosos maduros fue baja, y su salida de las células al medio ineficiente, impidiendo la proliferación de la infección en el cultivo.

Frente a la infección con MVMp, las células U87 de glioblastoma se comportaron esencialmente como resistentes a este virus. Para las células U373 no se proporcionan datos experimentales.

Asimismo, se han descrito ensayos preclínicos en cultivo y en animales (*J Biomed Biotechnol* **2010**: 350748; Geletneky, K. et al, Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models. *Neuro Oncol*; Kiprianova, I. et al, 2011, Regression of glioma in rat models by intranasal application of parvovirus H-1. *Clin Cancer Res*), con el parvovirus H-1 de rata. Ensayos similares son descritos en la publicación de patentes WO2012/003932, aunque se emplean líneas celulares establecidas y no hGSC primarias de glioblastoma. Además, es muy relevante destacar que, aunque pertenecen a la misma familia *Parvoviridae*, las propiedades biológicas de las distintas especies e incluso cepas es muy diferente, especialmente en lo que patogenicidad y tropismo se refiere, por lo que no son extrapolables las características de una cepa a otra.

Por otra parte, se ha iniciado el reclutamiento para la realización de ensayos clínicos en pacientes con glioblastoma con el parvovirus H-1 de rata (<http://clinicaltrials.gov/>).

Aunque en algunas de las publicaciones arriba mencionadas se describe una actividad citotóxica de los parvovirus en células derivadas de glioblastoma, ninguno de los documentos describe ni sugiere la posibilidad de que los parvovirus MVMp o MVMi infecten hGSC de glioblastoma, cuales son las características del ciclo vital del virus en estas células, o si poseen actividad citotóxica que pudiera ser empleada en terapias.

Además, ninguno de los ensayos realizados y descritos describe o proporciona un tratamiento efectivo de tumores humanos generados por hGSC, en concreto de glioblastoma, manteniéndose por tanto la necesidad de tal tratamiento.

RESUMEN DE LA INVENCION

Un primer objeto de la presente invención se refiere a una partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en:

a) la secuencia SEQ ID NO 1 (GenBank: J02275.1); o

b) la secuencia SEQ ID NO 2 (GenBank: M12032.1);

para su uso como medicamento.

Un segundo objeto de la presente invención se refiere al uso de una partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en:

- 5 a) la secuencia SEQ ID NO 1; o
b) la secuencia SEQ ID NO 2;
en la preparación de un medicamento para el tratamiento de glioma.

Otro objeto de la presente invención se refiere a una partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en:

- 10 a) la secuencia SEQ ID NO 1; o
b) la secuencia SEQ ID NO 2;
para su uso en el tratamiento de glioma.

Un objeto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende como principio activo una partícula viral tal y como se ha definido ésta anteriormente.

Otro objeto adicional de la presente invención es el uso de la composición farmacéutica tal y como se ha definido ésta anteriormente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de glioma.

De acuerdo con otro objeto más, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica tal y como se ha definido ésta anteriormente, para su uso en el tratamiento de glioma.

25

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Caracterización de células troncales de glioblastoma humano.

- A**, Fotografías de microscopía de campo claro de neuroesferas generadas por células troncales (CS5 a CS9) obtenidas de cuatro pacientes de glioblastoma.
- 30 **B**, Caracterización fenotípica de las CSs por tinción con anticuerpos específicos contra los marcadores de troncalidad CD133, nestina humana, Sox2 y GNL3. Las tinciones fueron cuantificadas por citometría de flujo e inmunofluorescencia.
- C**, Cinética de crecimiento de los cultivos CS5-9. Se muestra el número de células viables determinado cada cinco días por tinción con azul tripán.
- 35 **D**, Generación de tumores en ratas inmunodeficientes tras el xenotransplante ortotópico de las células troncales de glioblastoma humano del paciente #7. Se muestran imágenes de

MRI representativas de dos tumores en vista axial y sagital.

Figura 2. Propiedades principales del parvovirus MVM.

A. Estructura de la cápsida del parvovirus MVM.

5 B. Organización genética del MVM. Se ilustra la disposición de los genes no-estructurales (NS) y estructurales (VP) que forman la cápsida. La proteína NS1 es el componente citotóxico principal del virus.

C. Ciclo vital del MVM (basado en Valle et al. 2006). La cápsidas se ensamblan en el núcleo y en la replicación nuclear del genoma participa la proteína NS1.

10

Figura 3. El parvovirus MVM (p, i) replica su genoma y expresa la proteína citotóxica NS1 en células troncales de glioblastoma humano (hGSC).

A. Inmunofluorescencia de la expresión de la proteína NS1 en células hGSC, que expresan el marcador troncal CD133, analizadas por microscopía confocal.

15 B. Porcentajes de hGSC que expresan NS1 y replican ADN viral tras la infección con MVMp o con MVMi.

C. Análisis en blot de la acumulación de la proteína NS1, a los tiempos indicados, en cultivos de hGSC infectados con MVMp. Las muestras fueron de 15 µg de proteína en cada caso, además se muestra un control de carga de actina.

20 D. Análisis por Southern-blot de la replicación de MVMp y de MVMi en los cultivos de hGSC, y en controles de U373 y células troncales neurales humanas (hNSC). Se muestran las especies de replicación del genoma viral (dRF, mRF, ss).

Figura 4. Las dos cepas de parvovirus MVMp y MVMi matan eficazmente células de glioblastoma humano en cultivo.

25

A. Proporción de células hGSCs viables, derivadas de los pacientes #5, 7, 8 y 9, tras la infección con MVMp and MVMi, y análisis de la producción de virus infeccioso, determinados a lo largo de varios días post-inoculación.

30 B. Supresión del auto-mantenimiento de las hGSC, medido como potencial clonogénico, tras la infección con MVMp y MVMi. Las colonias se contaron a los 15 d.p. siembra (**p<0,05; ***p<0,001).

Figura 5. Las dos cepas de parvovirus MVMp y MVMi expresan proteínas estructurales y producen cápsidas en células troncales de glioblastoma humano (hGSC).

35 A. Análisis en blot de la acumulación de las proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3) del MVM en hGSCs infectadas, a los días indicados. Las muestras fueron de 15 µg de proteína

por carril. C, control no infectado.

B Análisis por citometría de flujo de la formación de cápsidas en los cultivos hGSC indicados, así como en las líneas controles NB324K y U87, tras la infección con MVM. Se muestran resultados representativos que demuestran la expresión de VPs y formación de cápsidas en CS5, 8 y 9.

Figura 6. El parvovirus MVM induce una respuesta de daño a DNA por la expresión de NS1 en GSC humanas.

A. Inducción de una respuesta de daño a ADN (DDR) en oncoesferas de hGSCs por la infección con MVM. Se muestra en las células infectadas la colocalización por microscopía confocal de la proteína NS1 viral con DDR y la replicación del virus (vDNA-Cy5).

B. DDR en hGSC y líneas establecidas de glioblastoma humanas inducidas por las dos cepas de MVM. Se muestran resultados representativos de colocalización de los marcadores indicados por microscopía confocal. **C.** Análisis en blot de la inducción de RPA32 (un marcador principal de DDR) en las líneas y hGSC indicadas en respuesta a la infección con MVM. Control de carga por tubulina.

Figura 7. Pulsos eléctricos incrementan la capacidad de MVM de expresar NS1 y matar hGSC.

A. Efecto de la electroporación de células hGSC infectadas por MVMp en la expresión relativa de NS1.

B. Incremento en la muerte de hGSC infectadas con MVMp por electroporación. Se muestran valores medios con desviaciones estándar.

C. Imágenes de microscopía confocal mostrando el incremento en el porcentaje de hGSC que expresan la proteína NS1 de MVM tras el tratamiento por electroporación (**p<0,001).

Figura 8. El parvovirus MVM daña e inhibe el crecimiento de glioblastoma humano basado en GSC implantado en cerebro de ratón.

Células de glioblastoma (paciente #7) fueron implantadas en modelo de rata y ratón inmunodeficiente y los glioblastomas generados tratados con MVM.

A. Daño tisular causado por la inoculación intratumoral de MVMp a los 14 dpi. Se muestra las diferencias estructurales de los tumores entre la inoculación de control salino (arriba) respecto a MVMp (abajo) monitorizadas por RMN, tinción por hematoxilina-eosina (H&E), tinción con nestina humana, expresión de proteína VP de MVM y tinción de núcleos.

B. El daño estructural causado por MVM en los tumores colocaliza con la expresión de NS1, la inducción de DDR (marcador ATM), y la replicación del genoma viral (vDNA-Cy5).

C. Arriba: esquema de cerebro de ratón mostrando el lugar de implantación de las hGSC.
Abajo: Imágenes representativas del desarrollo de los tumores en ratón tratados con control salino (PBS), o inoculados con MVMp o MVMi a los 60 dp trasplante.

D. Volúmenes medidos por resonancia magnética nuclear (RMN) de los tumores desarrollados en ratones trasplantados con hGSC y sometidos a los tratamientos indicados. Los virus fueron administrados: MVMp intratumoral, MVMi intranasal.

E. Análisis por Kaplan-Meyer de la supervivencia de los ratones sometidos a los tratamientos indicados (control salino n=7; MVMp n=5; MVMi n=6).

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un tratamiento útil contra el glioma, preferiblemente del tipo glioblastoma, mediante el uso de partículas virales que comprenden una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 1, correspondiente al genoma de la cepa de virus diminuto del ratón MVMp, o esencialmente en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 2, correspondiente al genoma de la cepa de virus diminuto del ratón MVMi.

En los ejemplos se muestra que estas cepas destruyen las células troncales de glioblastoma humano (hGSC) obtenidas recientemente de pacientes con glioblastoma, así como su efecto sobre tumores originados por hGSC en ratones.

MVMp es la cepa primitiva de parvovirus diminuto del ratón. Su genoma se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 1.

MVMi es la cepa inmunosupresiva de parvovirus diminuto del ratón. Su genoma se corresponde con la secuencia SEQ ID NO 2.

En el marco de la presente intención el término "consiste esencialmente en la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO 1 o 2", incluye no solo las secuencias SEQ ID NO 1 y 2, sino también incluye a todos los mutantes y variantes de la secuencia de nucleótidos del parvovirus MVM que pudieran obtenerse de forma natural o artificial, pero que no afecten a las características esenciales del parvovirus de interés en la presente invención, en especial que no alteren ninguna propiedad biológica relacionada con el tropismo o la actividad anti-cáncer, de las cepas originales MVM (p, i).

35

El genoma de ambas cepas de parvovirus diminuto del ratón MVMI y MVMP se ha secuenciado en su totalidad. Estas dos cepas tienen secuencias de nucleótidos con una identidad del 97% entre sí (J. Virology 1992, 66(5), 3118-3124; J. Virology 1986, 57, 656-669). De acuerdo con la publicación de referencia "Springer Index of Viruses" (2ª Edición, 2011, Editorial Springer), la cepa MVMP tiene un genoma de 5149 nucleótidos, detallada en J. Virol 1986, 57, 656-669, la cepa MVMI de 5087 nucleótidos, detallada en Nucl Acids Res 1985, 13, 3617-3633. En la presente invención se referencian respectivamente como SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2.

Tales secuencias SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2 corresponden a la información genética, en forma de ADN, de los parvovirus MVMP y MVMI es decir, son secuencias de nucleótidos.

En el marco de la presente invención, "partícula viral" se refiere a una unidad estructural formada por una cubierta de proteínas o una cubierta más compleja que contiene carbohidratos, lípidos y/o proteínas, y al menos una molécula de ácido nucleico, ya sea ARN o ADN. Así, "partícula viral" incluye viriones, virus, etc.

Asimismo, por "partícula viral" en el marco de la presente invención se entienden incluidos plásmidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en:

- a) la secuencia SEQ ID NO 1; o
- b) la secuencia SEQ ID NO 2.

También se entiende por "partícula viral" en el marco de la presente invención aquellos vectores que comprenden los plásmidos definidos anteriormente.

De esta manera, un primer objeto de la presente invención se refiere a una partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en:

- a) la secuencia SEQ ID NO 1; o
- b) la secuencia SEQ ID NO 2;

para su uso como medicamento.

Un segundo objeto de la presente invención se refiere al uso de una partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en:

- a) la secuencia SEQ ID NO 1; o
- b) la secuencia SEQ ID NO 2;

en la preparación de un medicamento para el tratamiento de glioma.

Un tercer objeto se refiere a una partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en:

- a) la secuencia SEQ ID NO 1; o
- b) la secuencia SEQ ID NO 2;

5 para su uso en el tratamiento de glioma.

En los objetos segundo y tercero anteriormente definidos, de acuerdo con una realización preferida, la partícula viral comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia SEQ ID NO 1.

10

De acuerdo con otra realización preferida, la partícula viral comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia SEQ ID NO 2.

15 En todo lo anterior, preferiblemente el glioma es un glioblastoma.

De acuerdo con una realización preferida, el glioblastoma es una recidiva, es decir, el paciente con glioma o glioblastoma ha sido tratado con tratamientos convencionales, pero no ha sido eliminado en su totalidad y vuelve a producirse.

20

Preferiblemente, el medicamento para el tratamiento de glioma comprende un vehículo adecuado para que el medicamento pueda ser administrado por vía intracerebral, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracutánea, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmica, más preferiblemente un

25 vehículo adecuado para que pueda ser administrado por vía intracraneal o nasal.

De acuerdo con una realización preferida, el glioma o glioblastoma se desarrolla a partir de células troncales de cáncer humanas.

30 Otro objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende como principio activo una partícula viral tal y como se ha definido ésta anteriormente.

Preferiblemente, las partículas virales estarán contenidas en el medicamento o en la composición farmacéutica anteriormente definidos en una cantidad terapéuticamente activa.

35

Preferiblemente, en dicha composición farmacéutica o en dicho medicamento la partícula viral se encuentra en una concentración de entre 10^6 y 10^{13} unidades pfu/ml (pfu= unidad formadora de placa de lisis), más preferiblemente entre 10^7 y 10^{13} pfu/ml, aún más preferiblemente entre 10^8 y 10^{13} pfu/ml.

5

Esta concentración de partículas virales en la composición farmacéutica puede referirse, en el marco de la invención, a la concentración de un solo tipo de partícula viral, no conteniendo la composición farmacéutica ningún otro tipo de partícula viral. Por ejemplo, la composición podrá contener únicamente partículas virales que comprenden una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en la secuencia SEQ ID NO 1 en la concentración indicada. Otro ejemplo sería una partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia SEQ ID NO 1, en la concentración indicada.

10

Alternativamente, la concentración indicada puede alcanzarse mediante mezclas de varios tipos de partículas virales como las definidas anteriormente, alcanzando conjuntamente la concentración indicada. En el marco de la presente invención se incluyen todas las combinaciones posibles que serán evidentes a un experto en la materia.

15

La pfu/ml es una medida cuantitativa habitualmente usada en virología, y corresponde al número de partículas víricas infecciosas capaces de formar placas de lisis en monocapas de células susceptibles por unidad volumétrica. Es una medida funcional más que una medida para el número absoluto de partículas: las partículas de virus defectuosas o que fallan en la infección de su célula diana, no producirán una placa y por lo tanto no serán contabilizadas. Por ejemplo, una composición que comprende MVM en una concentración de 10^6 pfu/ml indica que 1 mililitro de la composición contiene suficientes partículas de virus para producir 10^6 placas infecciosas en una monocapa celular, pero no es posible establecer una relación entre pfu y el número de partículas de virus por este ensayo. Mediante métodos complementarios, por ejemplo por hemaglutinación (ver Métodos más abajo) es posible determinar el número total de partículas víricas en un preparado sean o no infecciosas.

20

25

30

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo, tolerancia, inmunocompetencia, etc, del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a las concentraciones de partículas virales que comprenden una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en:

35

a) la secuencia SEQ ID NO 1;

b) la secuencia SEQ ID NO 2;

que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichas composiciones farmacéuticas y el efecto terapéutico a conseguir.

De acuerdo con una realización preferida, la composición farmacéutica comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con una realización preferida, la composición farmacéutica comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable

De acuerdo con otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende al menos un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, en la composición farmacéutica el vehículo o excipiente es tal que permita la administración de dicha composición por vía intracerebral, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracutánea, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmica. Más preferiblemente, la administración es por vía intracerebral, intravenosa, o intranasal.

De acuerdo con una realización preferida, la composición farmacéutica comprende al menos un principio activo adicional.

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “substancia activa”, “substancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” o “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales.

El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista, que proporciona la actividad específica o el efecto.

La composición de la invención se podrá administrar con pulsos eléctricos con el objetivo de aumentar la expresión de la proteína viral citotóxica NS1. Tales pulsos eléctricos podrán ser aplicados mediante técnicas similares a la electroquimioterapia o la electroporación

irreversible, que se están empleando actualmente con otros fines terapéuticos tanto en estudios preclínicos como en ensayos clínicos contra cánceres diversos (ESJO 34(2): 232-240; *Technol Cancer Res Treat* **10**(1): 73-83; <http://clinicaltrials.gov/>).

- 5 En la composición de la invención pueden estar contenidos uno o más tales principios activos, para así proporcionar una terapia combinada.

Preferiblemente, el “principio activo” será un ingrediente con actividad antitumoral, es decir, un agente antitumoral. Tal principio activo con actividad antitumoral puede seleccionarse, por ejemplo, pero no limitado a, un principio activo seleccionado de docetaxel, rituximab, carboplatin, cisplatin, paclitaxel, vinorelbine, gemcitabine, irinotecan, doxorubicin, dacarbazine, cytarabine, temozolomida o bevacizumab, 5-fluorouracilo, ácido folínico, irinotecan o paclitaxel. Más preferiblemente, será un fármaco utilizado habitualmente para el tratamiento de glioma o glioblastoma, por ejemplo temozolomida o bevacizumab. Temozolomida es un triazeno, indicado para el tratamiento de tumores cerebrales, más concretamente de glioblastoma multiforme. Bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado, indicado para el tratamiento de algunas enfermedades neoplásicas como el cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de pulmón no microcítico, carcinoma de células renales y glioblastoma.

20 Otra realización preferida se refiere a una composición farmacéutica tal y como se ha definido anteriormente, para su uso en el tratamiento de glioma en combinación con cualquier tipo de pulso eléctrico provocado en los tumores.

25 De acuerdo con otro objeto de la invención, ésta se refiere a la composición farmacéutica tal y como ésta ha sido definida anteriormente, para su uso como medicamento. Preferiblemente, el medicamento es para el tratamiento de glioma, más preferiblemente de glioblastoma.

30 Así, otro objeto de la invención es el uso de una composición farmacéutica tal y como ha sido definida anteriormente, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de glioma, más preferiblemente de glioblastoma.

35 El término “medicamento”, tal y como se usa en el marco de la presente invención, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o

curación de enfermedades en el hombre y los animales.

Tanto las partículas virales como las composiciones de la presente invención, pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo. Las partículas virales o las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administrados por cualquier vía, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada y con los excipientes farmacológicamente aceptables a la vía de administración elegida.

Tales composiciones o preparaciones combinadas y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intracerebral, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

35

EJEMPLOS

En la presente invención se muestran los mecanismos que explican la destrucción de células troncales de glioblastoma humano (hGSC) obtenidas recientemente de pacientes, producida por la infección con dos cepas del parvovirus MVM (p, i). Esta conclusión se demostró en cuatro grupos de experimentos:

- (i) Expresión de proteínas citotóxicas (NS1) y estructurales (VP) del virus en hGSC;
- (ii) muerte de las hGSC por infección con MVM;
- (iii) sinergia del MVM con pulsos eléctricos para matar hGSC;
- (iv) Efectividad de MVM en modelos de GBM humanos ortotópicos en ratones xenotransplantados con hGSC. En los ratones tratados con MVMi o MVMp se ralentizó el avance de los tumores y los animales sobrevivieron mas tiempos que los no tratados.

Ejemplo 1

Células de pacientes de glioblastoma, en forma de cultivos selectivos *in vitro* de hGSC en esferas, permitieron un análisis directo de su permisividad y susceptibilidad a la infección con el MVM. Como se muestra en la Figura 3, ambas cepas ensayadas de este virus (MVMp, MVMi) fueron capaces de expresar en hGSC de los distintos pacientes, la proteína principal no estructural NS1 (figura 3A), que es citotóxica y regula la replicación y otras etapas del ciclo vital del virus. La expresión de la NS1 viral sucedió en un porcentaje variable en los distintos hGSC, aunque es importante destacar que la NS1 fue detectable por inmunofluorescencia en todos los casos y con los dos cepas MVMp, MVMi (Figura 3B). La expresión de NS1 en todos los hGSC infectados fue también claramente demostrada en blot (Figura 3C) y la replicación viral por hibridación cuantitativa en southern-blots, que permite demostrar la síntesis de intermedios de replicación viral en las hGSC (Figura 3D).

Ejemplo 2

Los virus MVMp y MVMi demostraron su capacidad para matar células hGSC en cultivo. En particular, este ensayo se realizó en dos condiciones distintas. En un primer ensayo, las células se cultivaron en medio líquido en presencia o ausencia de MVM, y pudo observarse una marcada caída de células viables (medidas por azul tripan) en los cultivos por efecto de la infección del MVM (Figura 4A). En un segundo ensayo, las células se infectaron con virus y se midió su capacidad para formar colonias en días posteriores. Ambos virus MVMp y MVMi impidieron la formación de colonias en proporciones muy significativas (Figura 4B), demostrando la capacidad de ambos virus para inhibir el auto-mantenimiento de las hGSC, una propiedad esencial para generar tumores.

Ejemplo 3

Se ha determinado la síntesis de proteínas estructurales y la formación de cápsidas de los virus MVMp y MVMI en las hGSC. Como se muestra en la Figura 5, este ensayo permitió
5 concluir que todas las células hGSC se infectan productivamente por el MVM, ya que producen cápsidas virales.

Ejemplo 4

Se demuestra que los virus MVMI y MVMp inducen una respuesta a daño de ADN (DDR) en
10 las hGSC (Figura 6). Este ensayo es importante para entender el efecto tóxico de estos virus en estas células, ya que las respuesta DDR distorsionan la viabilidad celular y el potencial oncogénico de las hGSC.

Ejemplo 5

Se ha estudiado si pulsos eléctricos, que desorganizan comúnmente la expresión génica
15 celular, podrían incrementar la expresión de proteínas citotóxicas del parvovirus MVM en las hGSC. Como se muestra en la Figura 7, pulsos eléctricos transmitidos en milisegundos a las hGSC por electroporación, incrementan sensiblemente la expresión de la proteína citotóxica NS1 del MVM. Este resultado permite suponer que pulsos eléctricos aplicados *in situ*
20 deberían incrementar la eficacia anti-glioblastoma del MVM en pacientes.

Ejemplos 6 y 7: Se analizó la eficacia anti-glioblastoma real de los dos virus MVMp y MVMI en dos modelos murinos xenotransplantados en cerebro con hGSC:

Ejemplo 6

Cuando el virus MVMp fue aplicado por inyección intratumoral controlada (inoculación
25 potenciada por convección, CED) en cerebro de rata, se observó que producía un daño importante en la estructura tisular de glioblastomas que se habían inducido por implantación de hGSC 30 días antes (Figura 8A). En las regiones dañadas se detecta la expresión de la NS1, la proteína VP estructural, la replicación del genoma de MVMp, y una respuesta DDR
30 (Figura 8B). Por lo tanto, el MVMp es un agente tóxico efectivo contra glioblastoma humano en rata.

Ejemplo 7

Los virus MVMp y MVMI fueron inoculados a ratones inmunodeficientes implantados con
35 hGSC en cerebro varios días antes. El MVMp fue administrado por inoculación potenciada por convección, mientras que MVMI fue administrado por la vía intranasal. El crecimiento de

los tumores fue monitorizado en todos los casos de forma continua por RMN (Figura 8C), comparando con ratones control a los que se administró una solución salina (PBS). La tasa de crecimiento de los tumores (Figura 8D) mostró una clara inhibición en los ratones inoculados con los virus MVM, cuyo efecto inhibitorio fue ligeramente mayor en la inoculación intranasal de MVMi. El efecto terapéutico de ambos virus contra glioblastoma humano fue también patente cuando se observa la tasa de supervivencia de los ratones (Figura 8E), ya que mientras que en las administraciones con PBS los animales murieron de glioblastoma entre 60-67 días pos-implantación, la supervivencia de los animales infectados fue en torno a 50% (MVMp) o 90% (MVMi) superior. De hecho los animales infectados murieron de los síntomas conocidos que induce MVM en ratones inmunodeficientes (*J Virol* **73**(3): 1774-1784; *J Virol* **75**(23): 11573-11582; *J Virol* **82**(3): 1195-1203) y no de síntomas atribuibles a glioblastoma.

Por lo tanto, los virus MVMp y MVMi son agentes terapéuticos muy eficaces contra glioblastoma humano basados en hGSC *in vivo*.

15

En lo siguiente se detallan los materiales y métodos empleados en la realización de los ejemplos anteriormente descritos.

MATERIALES Y MÉTODOS

20 1.- Células troncales de glioblastoma humano.

1.1. Obtención. Las muestras de tejido tumoral humano fueron cedidas por el servicio de Neurocirugía del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, diagnosticadas como gliomas por el servicio del Anatomía Patológica del mismo hospital. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes y la aprobación del Comité Ético Institucional del Hospital Ramón y Cajal de Madrid y del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM). Las biopsias se recogieron a pie de quirófano en condiciones asépticas, se mantuvieron en PBS suplementado con 0,6% de glucosa a 4°C y se procesaron durante las dos horas siguientes a su recepción. El tejido fue lavado y disgregado mecánicamente hasta obtener fragmentos menores de 1 mm³. Posteriormente se disgregó enzimáticamente incubando con 0,1% de tripsina (Difco) y 0,04% de DNasa tipo I (Sigma) durante 45 minutos a 37°C. Se lavó tres veces con PBS 0,04% DNasa y se volvió a disgregar mecánicamente haciendo pasar el tejido por pipetas Pasteur de vidrio de diámetro decreciente hasta conseguir una suspensión celular homogénea. Finalmente, se filtró la suspensión celular (filtro de 40 µm de diámetro de poro, Becton-Dickinson).

35

1.2 Cultivo de células troncales de glioblastoma. Las células troncales de glioblastoma humano se obtuvieron cultivando las suspensiones celulares obtenidas de cada biopsia en medio de proliferación químicamente definido compuesto por DMEM:F12 (1:1) con glutamax (Invitrogen), suplementado con 0,5% albumax I (Invitrogen), 5 mM HEPES (Invitrogen), 0,915% glucosa (Sigma), N2 1x (Invitrogen), 20 ng/ml FGF-2 (Peprotech), 20 ng/ml EGF (Peprotech), 2 µg/ml heparina (Sigma), aminoácidos no esenciales (L-Ala 44 mM, L-Asn 45 mM, L-Asp 40 mM, L-Glu 40 mM, L-Pro 30 mM) y, de forma alterna, mezcla de antibióticos (penicilina 63,2 mg/ml y estreptomina 0,1 mg/ml) o gentamicina (0,055 mg/ml). Se añadió un 20% de medio fresco dos veces por semana. De esta forma se selecciona positivamente la proliferación como neuroesferas de células troncales derivadas del tejido neural. Cuando el tamaño de las neuroesferas alcanzó aproximadamente 250 µm, se procedió a su digestión enzimática con tripsina y EDTA (Merck) y mecánica, hasta conseguir una suspensión unicelular homogénea. Tras el proceso, la viabilidad celular típica, analizada por exclusión de azul de tripán, fue superior al 90%. La expansión de los cultivos se realizó a densidad de $1 \cdot 10^5$ células/ml. Los experimentos se realizaron con células en pase entre 6 y 10.

Las células obtenidas mostraron las características indicadas en la Figura 1.

1.3. Citometría de flujo. En todos los experimentos se adquirió un mínimo de 30.000 eventos por muestra en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences). Dichos eventos fueron pre-seleccionados mediante una región en base a su tamaño y complejidad (parámetros *FSC* y *SSC*, respectivamente) con el fin de excluir restos celulares u otras partículas contaminantes. Se utilizó el software CellQuest (BD Biosciences) para la adquisición de los eventos y el software FlowJo (Tree Star) para el análisis de los datos. Se resuspendieron las células en PBS (pH 7,2) con 0,5% BSA y 2 mM de EDTA y se añadieron 5 µl de anticuerpo anti-CD133 ó 10 ml del anticuerpo control de isotipo (IgG2b-APC, Immunostep) por cada $1 \cdot 10^6$ de células. Se incubó durante 15 minutos a 4 °C o 15 minutos a temperatura ambiente, respectivamente, y se realizaron dos lavados antes de analizar las muestras en el citómetro de flujo, excitando el fluoróforo con el láser de 488 nm y recogiendo la emisión a 661/16 nm (FL4). Para la tinción de cápsidas (B7) las células fueron permeabilizadas con PBS + 0,1% de triton durante 10 mi a RT. Posteriormente se bloquearon con PSB + 0,1% de triton + 1% FCS durante 20 min a RT. El anticuerpo primario y secundario se incubaron en las condiciones descritas (ver posteriormente), realizando un lavado con PBS entre ellos. Se analizaron las muestras en el citómetro de flujo, excitando el fluoróforo con el láser de 488 nm y recogiendo la emisión a 530/30 nm (FL1)

1.4. Análisis clonogénico de hGSC. Se estimó la capacidad clonogénica de autorrenovación de las células troncales tumorales mediante el ensayo de formación de colonias en agar blando. Se preparó la capa base de agar mezclando volúmenes iguales de agar estéril al 1% y medio de proliferación 2x, obteniendo una solución final de 0,5% de agar en medio de proliferación 1x. Para la capa superior, se mezcló en iguales proporciones agar al 0,7% y medio de proliferación 2x e, inmediatamente, se añadieron las células. De esta forma se obtuvo una solución de agar al 0,35% en medio de proliferación 1x, conteniendo 10.000 células/ml. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 14 días y las colonias viables fueron teñidas con 1 ml/pocillo de 600 µg/ml de MTT en medio de proliferación, fotografiadas y contadas empleando el software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para ello, se determinaron regiones de interés (ROIs) del mismo tamaño entre las diferentes condiciones y el número de colonias dentro de cada una de ellas fue cuantificado empleando el plugin *Nucleus Counter*.

1.5. Inducción de tumores por xenotransplante ortotópico de hGSC. Todos los ensayos con animales se realizaron siguiendo las normas del Decreto Real Español 1201/2005 BOE. Los animales se mantuvieron y manipularon en ambiente libre de patógenos, asegurando la contención de riesgo de nivel 2 (P2). Todos los ensayos que requirieron el uso de cirugía se realizaron en cabina de flujo laminar horizontal de nivel de bioseguridad P2. Los modelos animales inmunodeficientes empleados para el xenotransplante ortotópico fueron la rata nude (denominada Crl:NIH-Foxn1^{nu} por Charles River y Hsd:RH-Foxn1^{nu} por Harlan) de aproximadamente 4-5 semanas y 150 gramos de peso, o el ratón Scid (Charles River o Harlan) de 6-8 semanas y 20 g de peso. Las células hGS fueron inoculadas por cirugía estereotáxica en animales anestesiados por inhalación de un flujo constante (2-3 l/min) de isoflurano (Nicholas Piramal), O₂ (2 l/min) y N₂O (1 l/min), proporcionado por un equipo de anestesia gaseosa (McKinley). Las animales se inmovilizaron en un aparato estereotáxico (Kopf) y se realizó una incisión longitudinal sobre la piel del cráneo empleando un bisturí eléctrico (Diatermo MB122). Posteriormente se efectuó una craneotomía con un torno de dentista (Zénit Mod. 5750) en la zona de interés y se inyectaron 1-5·10⁵ células en 10 µl de PBS en el caudado putamen del hemisferio derecho, a 3,5 mm a la derecha de *bregma* y 4 mm de profundidad, a un flujo constante de 1 µl/min mediante un inyector motorizado (Stoelting Mod.310). El orificio del cráneo se cubrió con cemento de dentista (TAB 2000, Kern Pharma) y la incisión se suturó con grapas quirúrgicas (Stoelting). Se aplicó pomada antibiótica y polvos de sulfanilamida (Kern Pharma) sobre la herida.

35

1.6. Monitorización del desarrollo de los tumores por resonancia magnética (MRI). A

cada animal se le inyectó 0,4 ml (ratón) a 0,7 ml (rata) del agente de contraste gadolinio (Magnevist, Schering) por vía intraperitoneal. Los animales fueron anestesiados de la forma anteriormente descrita y colocados en posición prono en una sonda de radiofrecuencia adaptada a su tamaño. Se utilizó un espectrómetro Biospec BMT 47/40 (Bruker Ettlingen),
5 equipado con un sistema de gradiente de 12 cm apantallado, operando a 4,7 Teslas. Tras el ajuste global de homogeneidad y la adquisición de una imagen de eco de gradiente en dirección transversal, se seleccionó la dirección de los posteriores cortes y se obtuvieron imágenes de 1 mm de grosor de proyecciones axiales y sagitales del cerebro de los animales potenciadas en T1 (700 mseg tiempo de repetición y 15 mseg de tiempo de eco).
10 El tamaño de las imágenes fue de 256x256 píxeles y el campo de visión fue de 4 cm. Para calcular el volumen, se determinó de forma manual el contorno tumoral de cada sección empleando el software ParaVision (Bruker Ettlingen) y sus áreas fueron sumadas para obtener el volumen total. Las imágenes obtenidas se procesaron con el programa ImageJ. En determinados casos se realizó la reconstrucción tridimensional del tumor mediante la
15 obtención de una serie de imágenes en las que queda comprendido la totalidad del cerebro a lo largo del eje Z.

2. Parvovirus MVM. En nuestro laboratorio se han construido plásmidos que contienen el genoma completo de las cepas MVMp y MVMi, incluidas las secuencias palindrómicas de
20 los extremos, lo que permite obtener partículas virales por transfección de células. Las cepas tienen las características indicadas en la Figura 2.

2.1. Producción de Parvovirus MVM en cultivo. Los preparados de parvovirus MVM se obtuvieron generalmente en células NB324K. Se infectaron 10 placas P100 confluentes
25 (5×10^7 células) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,005 unidades formadoras de placa/célula (PFU/célula) en 1 ml de PBS completo (PBSc; PBS con CaCl_2 0,9 mM y MgCl_2 0,5 mM) con 0,1 % de FCS. Tras 1 h a 37 °C, se retiró el inóculo y se incubaron en DMEM con 5 % de FCS durante 5 h para permitir la internalización del virus. Posteriormente las células adheridas se levantaron con tripsina-EDTA, se diluyeron en 400 ml de DMEM con 5
30 % de FCS y se sembraron en 40 placas P100, incubándose hasta la aparición de efecto citopático (5 días aproximadamente).

2.2. Purificación del parvovirus MVM. El virus presente en el medio se recuperó por precipitación con polietilenglicol 6000 al 3,4 % y NaCl 0,5 M durante toda la noche a 4 °C y
35 posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 30 min en un rotor angular Sorvall GSA. Para recuperar el virus intracelular, el sedimento de células se resuspendió en Tris-HCl 50

mM pH 7.5, EDTA 1 mM (TE) y se sometió a tres ciclos consecutivos de congelación/descongelación, tras los cuales, se añadió SDS al 0,2 % final y se clarificó a 8000 rpm, 10 min a 4 °C en el rotor flotante Sorvall HB4. El virus procedente del medio y el virus intracelular recuperado se reunieron y centrifugaron a través de un colchón de sacarosa (Merck) al 20 % en Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, NaCl 0,1 M y 0,2 % de SDS durante 18 h a 16000 rpm en un rotor TST 28.38 y el sedimento se resuspendió en TE con 0,2 % de Sarkosil (Sigma) y se centrifugó por gradiente de equilibrio de CsCl ($n_i=1,371$) hasta equilibrio, durante 24 h a 50000 rpm y 15 °C, en un rotor TFT 80.13. Desde la parte superior del gradiente se recogieron con jeringa fracciones de 0,5 ml y se determinó en ellas la presencia de cápsidas vacías y virus llenos de ADN mediante hemaglutinación (ver mas abajo). Por último, se reunieron las fracciones que contenían los virus por un lado y las cápsidas por otro y se dializaron frente a PBSi.

2.3. Valoración de virus por Hemaglutinación. Para el ensayo de hemaglutinación (HA) de MVM se empleó sangre de ratón adulto. Esta sangre se lavó tres veces con PBSi, recogiendo los eritrocitos por centrifugación en centrífuga de mesa a 1500 rpm durante 5 min. Tras los lavados se resuspendió el sedimento de eritrocitos al 50 % (v/v) en PBSi y se conservó a 4 °C hasta el momento de su uso. La HA se llevó a cabo en placas de microtest de perfil en U (Nunc). Las muestras a valorar se aplicaron en un volumen final de 100 µl en PBSi y se realizaron diluciones seriadas 1:2 en PBSi. Finalmente se añadieron 50 µl de eritrocitos al 2 % en PBSi en cada pocillo, se agitó suavemente la placa y se mantuvo a 4 °C en oscuridad durante al menos dos horas. El título se obtuvo del inverso de la dilución más elevada que mantiene la capacidad hemaglutinante.

2.4. Ensayo de parvovirus MVM por formación de placas de lisis. Se infectaron monocapas de células NB324K sembradas 24 h antes en placas P60 a una densidad de 220000 células/placa. Se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS completo (PBSc) y se añadió el inóculo viral en 400 µl por P60, diluido en PBSc con 0,1 % de FCS. Tras una hora de adsorción a 37 °C con agitación suave, se retiró el inóculo y se añadieron 7 ml de medio de plaqueo (DMEM 10 % de FCS, 0,6 % agarosa LM-GQT de Pronadisa) equilibrado a 37 °C. Tras una incubación de 6 días, las placas se fijaron en formaldehído (Panreac) al 10 % en PBSi y se tñeron con cristal violeta (Panreac) al 0,2 % en formaldehído al 10 % en PBSi. El recuento del número de placas de lisis multiplicado por la dilución permite obtener el título en unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/ml).

35

2.5. Obtención de ADN viral. El ADN de bajo peso molecular proveniente de los extractos de las células electroporadas, se obtuvo mediante el método de Hirt adaptado para MVM con 20 µg/ml de ARNt *carrier* para asegurar la recuperación. Brevemente, las células transfectadas se lisaron en la solución de Hirt (50 mM Tris pH 7,5, 0,5 % SDS, 10 mM EDTA) y fueron digeridas con proteinasa K (100 µg/ml) (Merck) durante 2 horas a 37 °C. Se ajustó la reacción a 1M de NaCl y se precipitó el ADN genómico durante una noche a 4 °C. La fracción enriquecida de ADN viral, se obtuvo en el sobrenadante tras centrifugar la muestra a 4 °C y 14 K rpm durante 30 min en una minífuga. Este ADN se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol absoluto, se lavó con etanol al 70 % para eliminar las sales y se resuspendió en agua o en Tris 50 mM pH 7,5 y EDTA 10 mM (TE_{ADN}).

2.6. Electroforesis de ADN y transferencia a membrana. Las muestras se sometieron a electroforesis 2-3 horas a 60V en un gel de agarosa al 0,8 % (Gibco) en buffer Tris-Bórico-EDTA (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA) con 5µg/ml de bromuro de etidio (Boehringer) junto con marcadores de peso molecular (HindIII, Ø29) y controles de formas replicativas y ADN viral. La transferencia se realizó a una membrana de Nylon (Hybond-N+, Amersham Pharmacia) en una solución de NaOH 0,4 M durante toda la noche. Finalmente, se lava la membrana en una solución 2X de SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente (20X SSC es: 3 M NaCl, 0,3 M citrato sódico) y se deja secar.

2.7. Hibridación con sonda específica de MVM. La membrana se incubó en solución de prehibridación (5X SSC, 5X Denhardts's [Ficoll (Ty400), Polivinilpirrolidona, BSA], 10 mM Tris 7,5, 0,5% SDS, 50% Formamida), para eliminar las posibles uniones inespecíficas, durante cuatro horas a 42° C. A continuación se añade la solución de hibridación, que está formada por los mismos componentes de la solución de pre-hibridación además de la sonda, que es DNA total del virus MVM marcado *in vitro* a alta actividad específica con ³²p por "random priming". Se incubó a 42° C durante uno o dos días. Por último, el filtro se lava con una solución de 0,1X SSC y 0,5% SDS a 50°C durante tres horas, antes de la exposición.

3. Células eucariotas establecidas en cultivo.

3.1. Cultivo. Se han utilizado las siguientes líneas celulares de mamífero: NB324K: fibroblastos de riñón humano de recién nacido transformadas con el antígeno T grande de SV40. A9: línea derivada de fibroblastos L de ratón seleccionados por el fenotipo HGPR. U-373 MG: glioblastoma-astrocitoma humano (ATCC:HTB 17). Estas células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) tamponado con 0,3 % de NaHCO₃ y en atmósfera de 5 % de CO₂. El medio fue suplementado con antibióticos (75 U/ml de

estreptomicina, 75 µg/ml de penicilina G), 2 mM de L-Glutamina y 5 % de suero fetal bovino (FCS) descomplementado a 56 °C durante 30 minutos.

3.2. Tratamiento de células por pulsos eléctricos. Las células se tripsinizaron, se centrifugaron en una centrífuga de mesa durante 5 min a 1200 rpm, se resuspendieron en DMEM con 5 % de FCS a una concentración de 2×10^7 células/ml y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Para los pulsos eléctricos (o electroporación) se añadieron 150 µl de la suspensión celular sobre la mezcla de 20 µg de ADN "carrier" de esperma de salmón en 26 µl de DMEM con 5 % de FCS y 10 µl de NaCl 1,5 M. Tras una suave agitación, se transfirieron a la cubeta de electroporación (Biorad, 0,4 cm de anchura) y se dio un pulso a 250 V y 450 µF en un electroporador Biorad Gene Pulser con extensor de capacidad. Tras el pulso eléctrico, las células se sembraron en el medio de cultivo especificado mas arriba, compuesto de DMEM:F12 (1:1) con glutamax (Invitrogen), suplementado con 0,5% albumax I (Invitrogen), 5 mM HEPES (Invitrogen), 0,915% glucosa (Sigma), N2 1x (Invitrogen), 20 ng/ml FGF-2 (Peprotech), 20 ng/ml EGF (Peprotech), 2 µg/ml heparina (Sigma), aminoácidos no esenciales (L-Ala 44 mM, L-Asn 45 mM, L-Asp 40 mM, L-Glu 40 mM, L-Pro 30 mM) y, de forma alterna, mezcla de antibióticos (penicilina 63,2 mg/ml y estreptomicina 0,1 mg/ml) o gentamicina (0,055 mg/ml), precalentado a 37 °C.

4. Técnicas inmunológicas

4.1. Antisueros. Los anticuerpos primarios y secundarios empleados fueron:

Anticuerpo	Dilución	Incubación	Casa comercial	Referencia	
Inmunofluorescencia y Citometría de Flujo					
p-(S/T) AMT/ATR Substrates	pAc	1:100	1 h RT	Cell Signaling No comercial	2851S C.R.
B7	mAc	1:50	1 h RT	comercial	Parrish
CD133	pAc	1:100	12 h 4° C	Abcam	ab16518
CD133 stem cell marker	pAc	1:100	12 h 4° C	Abcam	ab19898
pHistone H2A.X	pAc	1:100	1 h RT	Cell	2577S

Anticuerpo		Dilución	Incubación	Casa comercial	Referencia
Nestina	mAc	1:500	1 h RT	Chemicon	MAB5326
				No	J. M.
NS1 (SP7)	pAc	1:2000	1 h RT	comercial	Almendral
				No	J. M.
NS1 (b-Gal)	mAc	1:100	1 h RT	comercial	Almendral
Nucleostemina (GNL3)	pAc	1:500	1 h RT	Chemicon	AB5689
Nucleostemina (GNL3)	pAc	1:200	1 h RT	R&D	AF1638
pRPA32 (S4/S8)	pAc	1:50	1 h RT	Bethyl	A300-245A
Sox2	pAc	1:300	1 h RT	Chemicon	AB5603
				No	J. M.
VP (VPB)	pAc	1:100	1 h RT	comercial	Almendral
				No	J. M.
VP (VBK)	pAc	1:20	1 h RT	comercial	Almendral
Anticuerpo Alexa 555 frente a IgG de conejo	pAc	1:500	45 min RT	Invitrogen	A-31572
Anticuerpo Alexa 647 frente a IgG de conejo	pAc	1:500	45 min RT	Invitrogen	
Anticuerpo Alexa488 frente a IgG de ratón	pAc	1:500	45 min RT	Invitrogen	A-31570
Western Blot					
Actina	pAc	1:1000	1 h RT	Sigma	A2066
				No	J. M.
NS1 (SP7)	pAc	1:20000	1 h RT	comercial	Almendral
				No	J. M.
VP (VPB)	pAc	1:10000	1 h RT	comercial	Almendral
Tubulina	mAc	1:5000	1 h RT	Sigma	T9026
Ig-HRP de ratón	pAc	1:3000	1 h RT	DAKO	P0161
Ig-HRP de conejo	pAc	1:3000	1 h RT	DAKO	P0448

4.2.- Inmunofluorescencia indirecta (IF). Se realizaron análisis mediante inmucitofluorescencia de neuroesferas y células individuales, así como mediante inmunohistofluorescencia de tejido cerebral. En el caso de las preparaciones con esferas se utilizó un microscopio de barrido láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) o un microscopio de barrido láser confocal multifotón LSM710 acoplado a un microscopio invertido AxioObserver (Zeiss). Para las preparaciones con células individuales se empleó un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color o un microscopio de barrido láser confocal multifotón LSM710 acoplado a un microscopio invertido AxioObserver (Zeiss), según se indique en cada caso. Las imágenes se procesaron con los programas Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated) e ImageJ/FIJI (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) tomando como referencia de señal cero las mismas muestras sin emplear anticuerpos (control de autofluorescencia) o únicamente con anticuerpos secundarios (control de autofluorescencia más inespecificidad de los anticuerpos secundarios).

Neuroesferas completas: las esferas se adhirieron a cubreobjetos recubiertos de una matriz de poli-lisina (0,005% en PBS) y laminina (10 µg/ml) (ambos de Sigma) y se fijaron durante 30 minutos con paraformaldehído al 4%. Se permeabilizaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con 0,1% de SDS (Sigma) en PBS y se bloquearon incubando 20 minutos con 0,1% de SDS y 10% de suero fetal bovino (Sigma) en PBS. Los núcleos se tiñeron con To-Pro-3 (Invitrogen) y se montaron con Fluoromount G (Southern Biotech). Antes de las incubaciones de los anticuerpos secundarios, el To-Pro-3 y el montaje, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS.

Células individuales: para analizar las hGSC como células individuales desdiferenciadas, se les aplicó el tratamiento correspondiente, se adhirieron a cubreobjetos recubiertos de una matriz de poli-lisina (0,005% en PBS) y laminina (10 µg/ml) (Sigma) durante 30 minutos y se fijaron durante 30 minutos con paraformaldehído al 4%. Las líneas celulares se sembraron sobre cubreobjetos, fueron tratadas y se fijaron durante 30 min con paraformaldehído al 4%. Se permeabilizaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con 0,1% de Tritón X-100 (Merck) en PBS y se bloquearon incubando 20 minutos con 0,1% de Tritón X-100 y 10% de suero fetal bovino (Sigma) en PBS. Para la tinción nuclear se utilizó DAPI (Calbiochem) y el montaje se realizó con Fluoromount G (Southern Biotech). Antes de las incubaciones de los anticuerpos secundarios, el DAPI y el montaje, se realizaron 4 lavados de 5 minutos con PBS

FISH más inmunofluorescencia: esta técnica se empleó para complementar la inmunodetección de proteínas con el reconocimiento específico de secuencias de DNA. En

este trabajo se utilizó para confirmar la replicación del parvovirus en las células, por lo que la sonda empleada fue una mezcla de tres oligos de DNA, complementarios a distintas secuencias del genoma del virus, marcados con Texas Red. Las células adheridas de la forma anteriormente descrita se permeabilizaron durante 10 minutos con 0,2% de Tritón X-100 (Merck) en PBS y se equilibraron durante 5 minutos a temperatura ambiente en SSC 2x (NaCl 0,3 M; $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 30 mM; pH 7) suplementado con 15% de formamida. Se hibridaron 500 ng de cada oligo en tampón FISH durante 2,5 horas a 37°C. Las preparaciones se lavaron dos veces con SSC 2x + 15% formamida durante 30 minutos. Se bloquearon con 0,1% Triton X-100 y 1% FBS en PBS durante 20 min a temperatura ambiente y se prosiguió con el protocolo de inmunofluorescencia anteriormente descrito.

5.- Análisis de proteínas

5.1.- Electroforesis y transferencia a membrana. Las muestras de proteína, una vez desnaturalizadas por ebullición durante cinco minutos en tampón de carga (glicerol 10 % v/v (Merck), SDS 2,3 % p/v, β -mercaptoetanol 5 % (Merck), azul de bromofenol 0,002 % (Merck) en Tris-HCl 0,5 M pH 6.3 con SDS 0,4 %), fueron separadas por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5 % para detectar la presencia de oligómeros o al 8 % para comprobar la presencia de proteínas virales. Las electroforesis se llevaron a cabo en Tris-Glicina (25 mM de Tris (Serva), 192 mM de Glicina (Gibco), SDS 0,1 %) durante toda la noche a 10 mA (sin limitar el voltaje) en el caso de maxigeles (20x16x0,2 cm) o durante cuatro horas a 100 V (sin limitar amperaje) para los minigeles (10x10x0,1 cm). Los marcadores de masa molecular empleados fueron: "Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range" (Biorad) y "Protein Molecular Weight Standards, Broad Range" (Amersham). Las muestras se transfirieron a nitrocelulosa (Schleicher y Schuel) en tampón de transferencia (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, 0,1 % SDS y 20 % metanol) durante una hora a 100 V utilizando un sistema de transferencia húmedo (Trans-blot Electroforetictransfer Cell, Biorad).

5.2.- Detección en membrana ("western blot"). Una vez transferidas las muestras, la membrana se hidrató en tampón TBS-T (Tris pH 7.5 20 mM, 140 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) y se incubó con agitación una hora a temperatura ambiente en TBS-T con 5 % de leche no grasa en polvo. Después de lavar con TBS-T se incubó con el anticuerpo primario diluido en TBS-T con 1 % leche en polvo y 1 % NP40 durante una hora a temperatura ambiente. Tras lavar exhaustivamente se trató con el anticuerpo secundario en las mismas condiciones que el primario. Finalmente se lavó con TBS-T y TBS (sin Tween 20), se reveló con el

sistema ECL ("Enhanced Chemiluminescence", Amersham) siguiendo las recomendaciones del fabricante, y se expuso la membrana en películas de autorradiografía de Kodak.

6. Administración de parvovirus MVM para terapia de tumores en animales.

- 5 **6.1. Inoculación intracraneal de MVMp mediante instilación potenciada por convección (CED).** Se procedió a la inoculación estereotáxica de $1 \cdot 10^7$ pfu de MVMp en 10 μ l de PBS. Las condiciones de la operación, incluyendo las coordenadas de inoculación, fueron idénticas a las descritas anteriormente. Los virus se inocularon mediante administración
- 10 potenciada por convección (CED) a un flujo constante de 0,5 μ l/min empleando un inyector motorizado (Stoelting Mod.310). La cánula empleada consistió en un tubo de sílice de 431 μ m de diámetro externo (319 μ m de diámetro interno) en el que se insertó otro tubo, del mismo material, de 236 μ m de diámetro externo (99 μ m de diámetro interno). El tubo interior sobresale 1 mm del extremo del tubo de soporte (diseño escalonado).
- 15 **6.2. Inoculación intranasal por MVMi.** Se procedió a la inoculación intranasal de 10 μ l ($1 \cdot 10^7$ pfu) de MVMi en ratones previamente xenotransplantados ortotópicamente con hGSC en las condiciones descritas.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO 1

attttagaa ctgaccaacc atgttcacgt aagtgcgctg atgacgcgcg ctgcgcgcg 60
 gccttcggac gtcacacgtc acttacgttt cacatgggtg gtcagttcta aaaatgataa 120
 5 gcggttcagg gagtttaaac caaggcgcga aaaggaagtg ggcgtggttt aaagtatata 180
 agcaactact gaagtcagtt acttatcttt tctttcattc tgtgagtcga gacgcacaga 240
 aagagagtaa ccaactaacc atggctggaa atgcttactc tgatgaagtt ttgggagcaa 300
 ccaactggtt aaaggaaaaa agtaaccagg aagtgtctc attgttttt aaaaatgaaa 360
 atgttcaact gaatggaaaa gatatcggat ggaatagtta caaaaaagag ctgcaggagg 420
 10 acgagctgaa atctttacaa cgaggagcgg aaactacttg ggaccaaagc gaggacatgg 480
 aatgggaaac cacagtggat gaaatgacca aaaagcaagt attcattttt gattctttgg 540
 ttaaaaaatg ttatttgaa gtgcttaaca caaagaatat atttctggt gatgtaatt 600
 ggtttgtgca acatgaatgg ggaaaagacc aaggctggca ctgcatgta ctaattggag 660
 gaaaggactt tagtcaagct caagggaaat ggtggagaag gcaactaaat gttactgga 720
 15 gcagatggtt ggtaacagcc tgtaatgtgc aactaacacc agctgaaaga attaaactaa 780
 gagaaatagc agaagacaat gagtgggtta ctctacttac ttataagcat aagcaaacca 840
 aaaaagacta taccaagtgt gttcttttg gaaacatgat tgcttactat ttttaacta 900
 aaaagaaaat aagcactagt ccaccaagag acggaggcta ttttcttagc agtgactctg 960
 gctggaaaac taactttta aaagaaggcg agcgccatct atgagcaaaa ctataactg 1020
 20 atgacatgcg gccagaaacg gttgaaacca cagtaaccac tgcgcaggaa actaagcgcg 1080
 gcagaattca aactaaaaaa gaagtttcta ttaaaactac acttaaagag ctggtgcata 1140
 aaagagtaac ctaccagag gactggatga tgatgcagcc agacagttac attgaaatga 1200
 tggctcaacc aggtggagaa aacctgctga aaaatacgtc agagatttgt acactaactc 1260
 tagccagaac caaacagca ttgacttaa ttttagaaaa agctgaaacc agcaaaactaa 1320
 25 ccaacttttc actgcctgac acaagaacct gcagaatttt tgctttcat ggctggaact 1380
 atgttaaagt ttgccatgct atttgctgtg ttttaaacag acaaggaggc aaaagaaata 1440
 ctgtttatt tcatggacca gccagcacag gcaaatctat tattgcacaa gccatagcac 1500
 aagcagttgg caatgttgg tgctataatg cagccaatgt aaactttcca ttaatgact 1560
 gtaccaaca gaacttgatt tgggtagaag aagctggtaa ctttgacag caagtaaacc 1620
 30 agtttaaagc catttgctct ggtcaaaacta ttcgattga tcaaaaagga aaaggcagca 1680
 aacagattga accaacacca gtcacatga ccacaaatga gaacattaca gtggtcagaa 1740
 taggctcga agaaagacca gaacacactc aaccaatcag agacagaatg ctaacattc 1800
 atctaacaca taccttgctt ggtgactttg gtttggttga caaaaatgaa tggcccatga 1860
 tttgtgctg gttgtaaag aatggttacc aatctacat ggcaagctac tgtgctaaat 1920
 35 ggggcaaagt tctgattgg tcagaaaact gggcggagcc aaaggtgcca actcctataa 1980
 atttactagg ttcggcacgc tcaccattca cgacaccgaa aagtacgcct ctacgccaga 2040

actatgcact aactccactt gcatcggatc tcgaggacct ggctttagag ccttgagca 2100
 caccaaatac tctgttgcg ggcactgcag aaaccagaa cactggggaa gctggtcca 2160
 aagcctgcc aagatgtcaa ctgagccca cttggtcaga gatcaggag gatttgagag 2220
 cgtgctcgg tgcggaaccg ttgaagaaag acttcagcga gccgctgaac ttgactaag 2280
 5 gtacgatggc gcctccagct aaaagagcta aaagaggtaa gggtttaagg gatggttgg 2340
 tgggtgggta ttaatgttta attacctgt ttacaggcct gaaatcactt ggttttaggt 2400
 tgggtgcctc ctggctacaa gtacctggga ccaggaaca gcctgacca aggagaacca 2460
 accaatccat ctgacgccg tgcgaagag cagcagagg cctatgatca atacatcaa 2520
 tctggaaaaa atccttacct gtacttctct gctgctgac aacgctttat tgaccaaacc 2580
 10 aaggacgcca aagactggg aggcaaggt ggtcactact ttttagaac caagcgcgt 2640
 tttgaccta agcttctac tgactctgaa cctggaactt ctggtgtaag cagagctgg 2700
 aaacgacta gaccactgc ttacattttt attaaccaag ccagagctaa aaaaaactt 2760
 acttctctg ctgcacagca aagcagtaa accatgagtg atggcaccag ccaacctgac 2820
 agcggaaacg ctgtccactc agctgcaaga gttgaacgag cagctgacgg ccctggaggc 2880
 15 tctgggggtg ggggctctg cgggggtgg gttggtgtt ctactgggtc ttatgataat 2940
 caaacgcatt atagattctt ggtgacggc tgggtagaaa ttactgact agcaactaga 3000
 ctagtacatt taaacatgcc taaatcagaa aactattgca gaatcagagt tcacaatata 3060
 acagacacat cagtaaagg caacatggca aaagatgatg ctcatgagca aatttgaca 3120
 ccatggagct tggtgatgc taatgcttg ggagttggc tccagccaag tgactggcaa 3180
 20 tacattgca acaccatgag ccagctaac ttggtatcac ttgatcaaga aatattcaat 3240
 gtagtgctga aaactgtac agagcaagac ttaggaggtc aagctataaa aatatacaac 3300
 aatgacctta cagctgcat gatggtgca gtagactcaa acaacattt gccatacaca 3360
 cctgcagcaa actcaatgga aacacttgg ttctaccctt ggaaccaac catagcatca 3420
 ccatacaggt actattttg cgtgacaga gatcttcag tgacctacga aatcaagaa 3480
 25 ggcacagttg aacataatgt gatgggaaca ccaaaggaa tgaattctca atttttacc 3540
 attgagaaca cacaacaaat cacattgctc agaacagggg acgaattgc cacaggtact 3600
 tactactttg acacaaatc agttaaactc acacacacgt ggcaaacca cgtcaactt 3660
 ggacagcctc cactgctgc aaccttct gaagctgaca ctgatgcagg tacacttact 3720
 gctcaaggga gcagacatgg aacaacaca atgggggtta actgggtgag tgaagcaatc 3780
 30 agaaccagac ctgctcaagt aggattttgt caaccacaca atgacttga agccagcaga 3840
 gctggacat ttgctgccc aaaagttcca gcagatatta ctcaaggagt agacaaagaa 3900
 gccaatggca gtgtagata cagttaggc aacagcatg tgaaaattg ggcttccat 3960
 ggaccagcac cagagcgtc cacatgggat gaaacaagct ttggtcagg tagagacacc 4020
 aaagatggtt ttattcaatc agcaccacta gttgtccac caccactaaa tggcattctt 4080
 35 acaaatgcaa accctattgg gactaaaaat gacattcatt ttcaaatgt ttttaacagc 4140
 tatgtccac taactgcatt ttacaccca agtctgtat acctcaagg acaaatatgg 4200

ES 2 561 906 B1

gacaaagaac tagatcttga acacaaacct agacttcaca taactgctcc attgtttgt 4260
 aaaaacaatg cacctggaca aatgttggtt agattaggac caaacctaac tgaccaatat 4320
 gatccaaacg gagccacact ttctagaatt gttacatacg gtacattttt ctggaaagga 4380
 aaactaacca tgagagcaaa acttagagct aacaccactt ggaacccagt gtaccaagta 4440
 5 agtgctgaag acaatggcaa ctacatactg agtgtaacta aatggttacc aactgctact 4500
 ggaaacatgc agtctgtgcc gcttataaca agacctgttg ctagaaatac ttactaacta 4560
 accatgcttt tctttctgt acttcatata ttattaagac taataaagat acaacataga 4620
 aatataatat tacgtataga ttaagaaat agaataatat ggtacttagt aactgttaa 4680
 aataatagaa cctttggaat aacaagatag ttagtgggtt aatgtagat agaataagaa 4740
 10 gatcatgtat aatgaataaa agggtggaag ggtgggtggg aggttaatgt tagatagaat 4800
 aagaagatca tgtataatga ataaaagggt ggaagggtgg ttggtagga ttccctaga 4860
 ctgatgtta aggacaaaa aaataataaa acttttttaa aactcaacca agactactgt 4920
 ctattcagtg aaccaactga accattagta ttactatgtt ttagggtgg gaggggtgga 4980
 gatacatgtg ttcgctatga gcgaactggt actggttggg tgctctgctc aaccaaccag 5040
 15 accggcaaag ccggtctggt tgggtgagcg caaccaacca gtaccagttc gctcatagcg 5100
 aacacatgta tctcccacc tcccacccta aaaacatagt aataactaat 5149

SEQ ID NO 2

attttagaa ctgaccaacc atgttcacgt aagtgacgtg atgacgcgcg ctcgcgcg 60
 20 tgccttcgga cgtcacacgt cacttacgtt tcacatggtt ggtcagttct aaaaatgata 120
 agcggttcag agagtttaga ccaaggcgcg aaaaggaagt gggcgtggtt taaagtatat 180
 aagcaaatgc tgaagtcagt tactatcct ttcttcatt ctgtgagtcg agacgcgcag 240
 aaagagagta accaactaac catggctgga aatgcttact ctgatgaagt tttgggaaca 300
 accaactggt taaaggaaaa aagtaaccag gaagtgttct cattgtttt taaaactgag 360
 25 gatgttcaac taaatggaaa agatatcgga tgaataatt acaaaaagga gctgcaggag 420
 gacgagctga aatctttaca acgaggagcg gaaactacct gggaccaaag cgaggacatg 480
 gaatgggaat ctacagtga tgaatgacc aaaagcaag tattcattta tgactcttta 540
 gttaaaaaat gttgtttga agtgcttagc acaaaaaata tagctcctgc tgatgttact 600
 tggttgtgc agcatgaatg ggggaaagac caaggctggc actgcatgt actaattgga 660
 30 ggcaaggact ttagtcaagc tcaaggaaaa tgggtggagaa ggcagctaaa tgtttactgg 720
 agcagatggt tggtaacagc ctgtaatgtg cagctaacac cagctgaaag aattaaacta 780
 agagaaatag cagaagacag tgagtgggtt actttactca ctataaaca taagcaaacc 840
 aaaaaggact atactaaatg tgttctttt ggaaatatga ttgcttacta cttttaacc 900
 aaaaagaaaa taagcaccag tccgccaagg gacggaggct attttctaag cagtgactct 960
 35 ggctggaaaa ctaactttt aaaagagggc gaacgccatc tagtgagcaa attatacact 1020
 gatgacatgc ggccagaaac ggttgaaacc acagtaacca ctgcgagga aactaagcgc 1080

ES 2 561 906 B1

ggcagaattc aactaaaaa agaggtttct attaaaacca cacttaaaga gctagtgcac 1140
 aaaagagtaa cctcaccaga agactggatg atgatgcagc cagacagtta cattgaaatg 1200
 atggctcaac caggtggaga aaacctgctg aaaaatacgc tagagatttg tacgctaact 1260
 ctagccagaa caaaaacagc attgacttg attttagaaa aagctgaaac cagcaaacta 1320
 5 accaactttt cactgcctga cacaagaacc tgcaagattt ttgcttttca tggctggaac 1380
 tatgttaaag ttgcatgc tatttgctgt gttctaaaca gacaaggagg caaaagaaat 1440
 actgtttat ttcacggacc agccagtaca ggcaaatcta ttattgcaca agccatagca 1500
 caggcagtg gtaatgttg ttgctataat gcagctaagc tgaacttcc attaatgac 1560
 tgtaccaaca agaactgat ttggtagaa gaagctggta actttggaca gcaagtaaac 1620
 10 cagtttaaag ccatttgctc tggcaaaact attgcattg atcaaaaagg aaaaggcagc 1680
 aaacaaattg aaccaacacc agtcatcatg accacaaatg agaacattac agtggtcaga 1740
 ataggctgcg aagagagacc agaacacact caaccaatta gagacagaat gctcaacatt 1800
 catctaacac atacattgcc tggtagcttt gggttggtg acaagaatga atggcccatg 1860
 atttgtgctt gggtgtaaa gaatggttac caatctacca tggcaagcta ctgcgctaaa 1920
 15 tggggcaaag ttctgattg gtcagaaaac tggcgaggc caaaggtgcc gactcctata 1980
 aattcactag gttcggcacg ctcaccattc acgacaccga aaagtacgcc ttcagccag 2040
 aactatgcaa taactccact tgcacggat ctcgaggacc tggctttaga gccttggagc 2100
 acaccaaata ctctgttgc gggcactgca gaaaccaga aactgggga agctggttcc 2160
 aaagcctgcc aagatgtca actgagccca acttggtcag agatcgagga ggattgaga 2220
 20 gcgctctcg gtgcggaacc gttgaagaga gacttcagcg agccgctgaa ctggactaa 2280
 ggtacgatg gcctccagc taaaagagct aaaagagga agggtttaag ggatggttg 2340
 ttggtgggtt attaatgtt aattacctgt ttacaggcc tgaatcact tggtttagg 2400
 ttgggtgcct cctggctata agtacctgg accaggaac agccttgacc aaggagaacc 2460
 aaccaatcca tctgacgcc ctgccaaga gcacgacgag gcctatgatc aatacatcaa 2520
 25 atctggaaaa aatccttacc tgtacttctc tgctgctgat caacgctta ttgaccaaac 2580
 caaggacgcc aaagactggg gaggcaaggi tggctactac tttttagaa ccaagcgcgc 2640
 tttgcacct aagctgcta ctgactctga acctggaact tctggtgtaa gcagagctgg 2700
 taaacgact agaccacctg ctacatttt taaaaccaa gccagagcta aaaaaaact 2760
 tacttctct gctgcacagc aaagcagtca aacctgagt gatggacca gccaacctga 2820
 30 cggcggaaac gctgtccact cagctgcaag agttgaacga gcagctgacg gccttggagg 2880
 ctctgggggt gggggctctg gcgggggtgg ggttgggtt tctactgggt cttatgataa 2940
 tcagacgcat tatagattct tgggtgacgg ctggtagaa attactgcac tagcaactag 3000
 actagtacat taaacatgc ctaaatcaga aactattgc agaataagag ttcacaacac 3060
 aacagacact tcagtcaaag gcaacatggc aaaagatgat gctcatgagc aaatttgac 3120
 35 gccatggagc ttagtggatg ctaatgctg gggagtttg ctccagccaa gtgactggca 3180
 atacattgc aacacatga gccagcttaa ctgggtctca ctgatcaag aaatattaa 3240

ES 2 561 906 B1

thtagtgctg aaaactgtta cagagcaaga ctgaggagt caagctataa aaatatacaa 3300
 caatgacctc acagcttgca tgatgggtgc agtagactca aacaacattc tgccatacac 3360
 acctgcagca aactcaatgg aaacacttgg tttctaccct tggaaaccaa ctatagcatc 3420
 gccatacagg tactatttct gcggtgacag agatctttca gtaacctatg aaaatcaaga 3480
 5 aggcacaatt gagcataatg taatgggaac accaaaagga atgaattctc aattttttac 3540
 cattgagaac acacaacaaa tcacattgct cagaactggg gatgagttg ctactggaac 3600
 ctactacttt gacacaaacc cagftaaact tacacacaca tggcaaacta accgtcaact 3660
 tggacagcct cactgctgt caacctttcc tgaagctgac actgatgcag gtacacttac 3720
 tgctcaaggg agcagacatg gagcaacaca gatggagggt aactgggtga gtgaagcaat 3780
 10 tagaaccaga cctgctcaag taggattttg tcagccacac aatgactttg aagccagcag 3840
 agctggacca tttgctgctc caaaagtcc agcagatgtt actcaaggag tggacagaga 3900
 agccaatggc agtgttagat acagttagg caaacagcat ggtgaaaatt gggctgcaca 3960
 cggaccagca ccagagcgtc acacatggga tgaacaaaac tttggtcag gaagagacac 4020
 cagagatggg tttattcaat cagcacctct agttgttcca ccaccactaa atgggattct 4080
 15 tacaatgca aacctattg gaactaaaaa tgacattcat tttcaaag ttttaacag 4140
 ctatgggtcca ctaactgcat tttcacacc aagtctgta taccctcaag gacaaatag 4200
 ggacaaagaa ctatgcttg aacacaaacc tagacttcac ataactgctc cattgtctg 4260
 taaaaacaat gcacctggac aaatgttggg tagattagga ccaaatctaa ctgaccagta 4320
 tgatccaaac ggagccacac tttctagaat tgtgactat ggtacattt tctggaaagg 4380
 20 aaaactaacc atgagagcaa aacttagagc taacaccact tggaaaccag tgtaccaagt 4440
 aagtgtgaa gacaatggca actcatacat gagtgttact aaatggctac caactgctac 4500
 tggaaacatg caatctgtac cgcttataac aagacctgtt gctagaaata ctactaact 4560
 aacctgttt ttccttctg tacttcatat attattaaga ctaataaaga tacaacataa 4620
 aaataataa ttacataag atttaagaaa tagaataata tggacttag taactgttag 4680
 25 aaataataga accttgaaa taacaagata attagttgtt taatgttaga tagaataaga 4740
 agattatgta taatgggtaa aagggtggaa ggggtggtgg ttggtattcc ctagacatg 4800
 atgttaagga ccaaaaaaat aataaaatt ttaaaaacta aaccaagact actgtctatt 4860
 cagttgaacc aactgaacca tcagtatcac tatgtttta gggggggggg gtgggagata 4920
 catgtgttcg ctatgagcga actggtactg gttggtgct ctgctcaacc aaccagaccg 4980
 30 gctttgccgg tctggttggg tgagcgcaac caaccagtac cagttcgctc atagcgaaca 5040
 catgtatctc ccaccccc accctaaaaa catagtgata ctgat 5085

REIVINDICACIONES

1. Partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos:
- a) la secuencia de SEQ ID NO 1; o
 - 5 b) la secuencia de SEQ ID NO 2; o
- un mutante o variante de SEQ ID NO1 o SEQ ID NO 2, que no afecte a las características esenciales del parvovirus MVM, en especial que no alteren ninguna propiedad biológica relacionada con el tropismo o la actividad anti-cáncer de las cepas originales MVM (p, i); para su uso como medicamento.
- 10
2. Partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en:
- a) la secuencia de SEQ ID NO 1; o
 - b) la secuencia de SEQ ID NO 2;
- para su uso como medicamento.
- 15
3. Uso de una partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos:
- a) la secuencia de SEQ ID NO 1; o
 - b) la secuencia de SEQ ID NO 2; o
- un mutante o variante de SEQ ID NO1 o SEQ ID NO 2, que no afecte a las características esenciales del parvovirus MVM, en especial que no alteren ninguna propiedad biológica relacionada con el tropismo o la actividad anti-cáncer de las cepas originales MVM (p, i); en la preparación de un medicamento para el tratamiento de glioma.
- 20
4. Uso según la reivindicación 3, donde la partícula viral comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia de SEQ ID NO 1.
- 25
5. Uso según la reivindicación 3, donde la partícula viral comprende una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia de SEQ ID NO 2.
- 30
6. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, donde el glioma es un glioblastoma.
7. Uso según la reivindicación 6, donde el glioblastoma es una recidiva.
- 35
8. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, donde el medicamento comprende un vehículo adecuado para su administración por vía intracraneal o nasal.

9. Composición farmacéutica que comprende como principio activo una partícula viral tal y como se ha definido ésta en cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2.
- 5 10. Composición farmacéutica según la reivindicación 9, donde la partícula viral se encuentra en una concentración de entre 10^6 y 10^{13} unidades infecciosas (pfu) por mililitro.
11. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10, la cual comprende al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable, un excipiente
10 farmacéuticamente aceptable y/o un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
12. Composición farmacéutica según la reivindicación 11, donde el vehículo o excipiente es tal que permita la administración de dicha composición por vía intracerebral, intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intracutánea, intracecal,
15 intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmica.
13. Composición farmacéutica según la reivindicación 12, donde la administración es por vía intracerebral, intravenosa, o intranasal.
- 20 14. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, la cual comprende al menos un principio activo adicional.
15. Composición farmacéutica según la reivindicación 14, donde el principio activo adicional es un agente antitumoral.
25
16. Composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 14 y 15, donde el principio activo adicional es temozolomida o bevacizumab.
17. Uso de partícula viral según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2 para la
30 preparación de una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16 para el tratamiento de glioma.
18. Uso según la reivindicación 17, donde el glioma es un glioblastoma.

Figura 1:

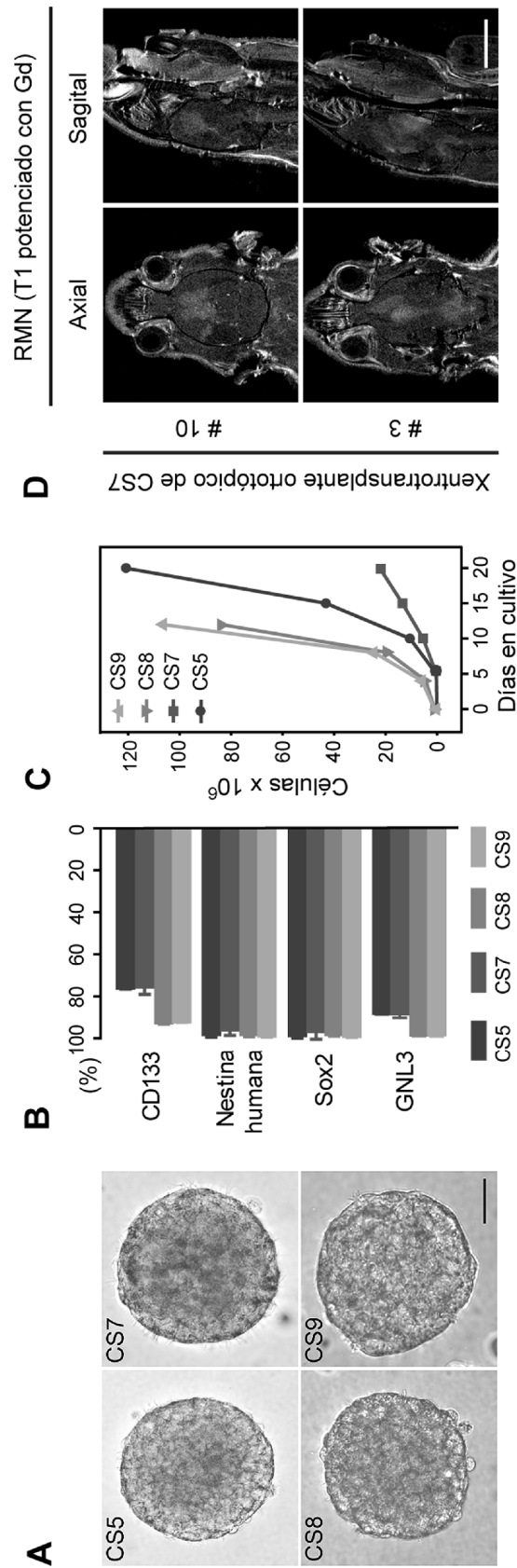


Figura 2:

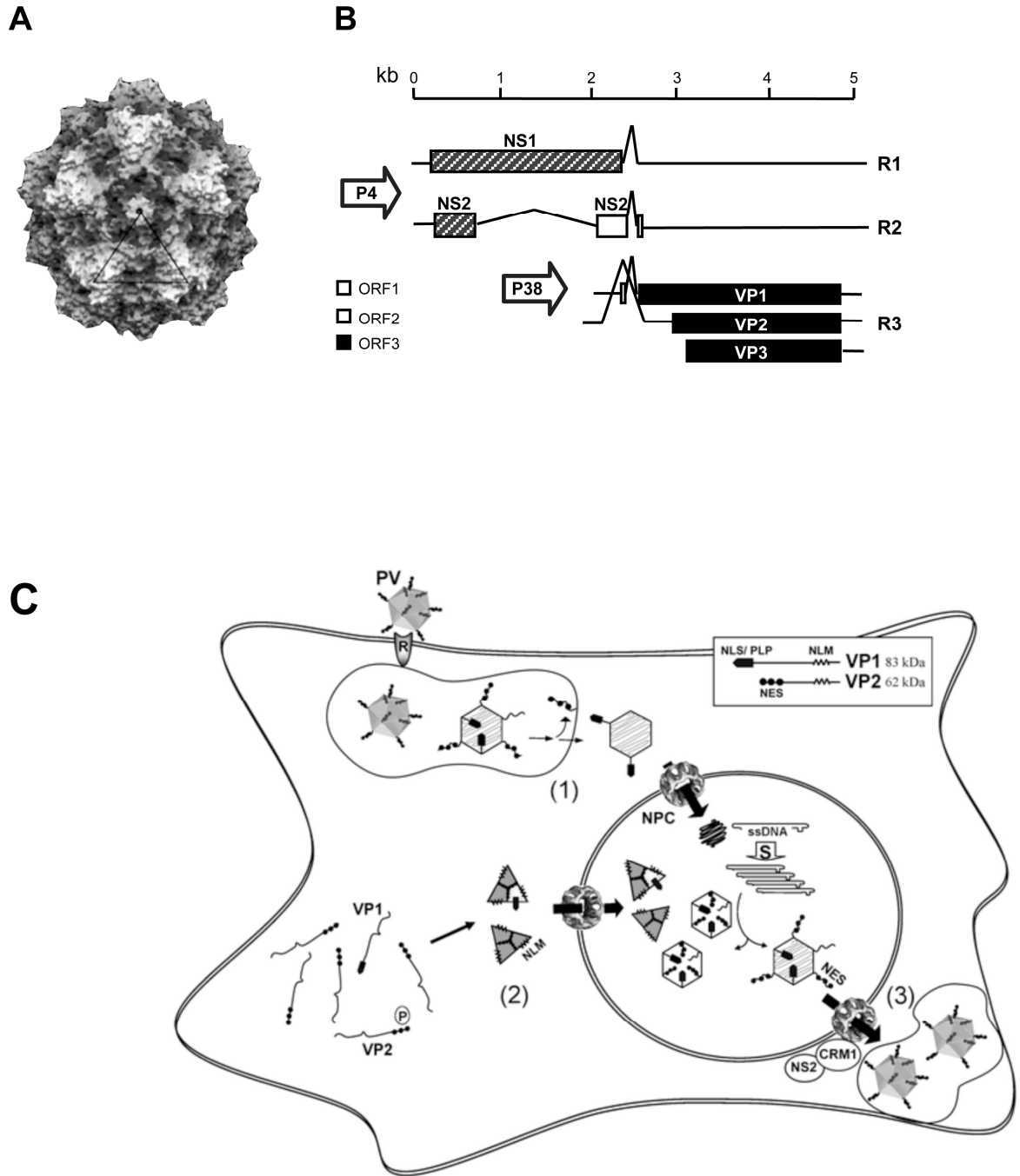


Figura 3:

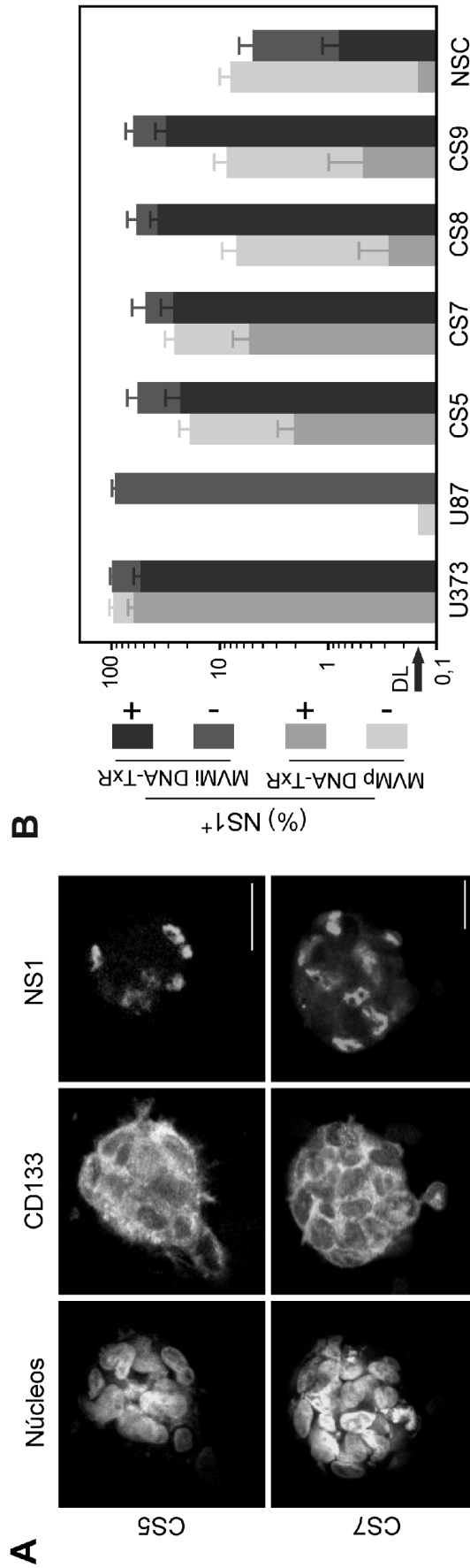


Figura 3 continuación:

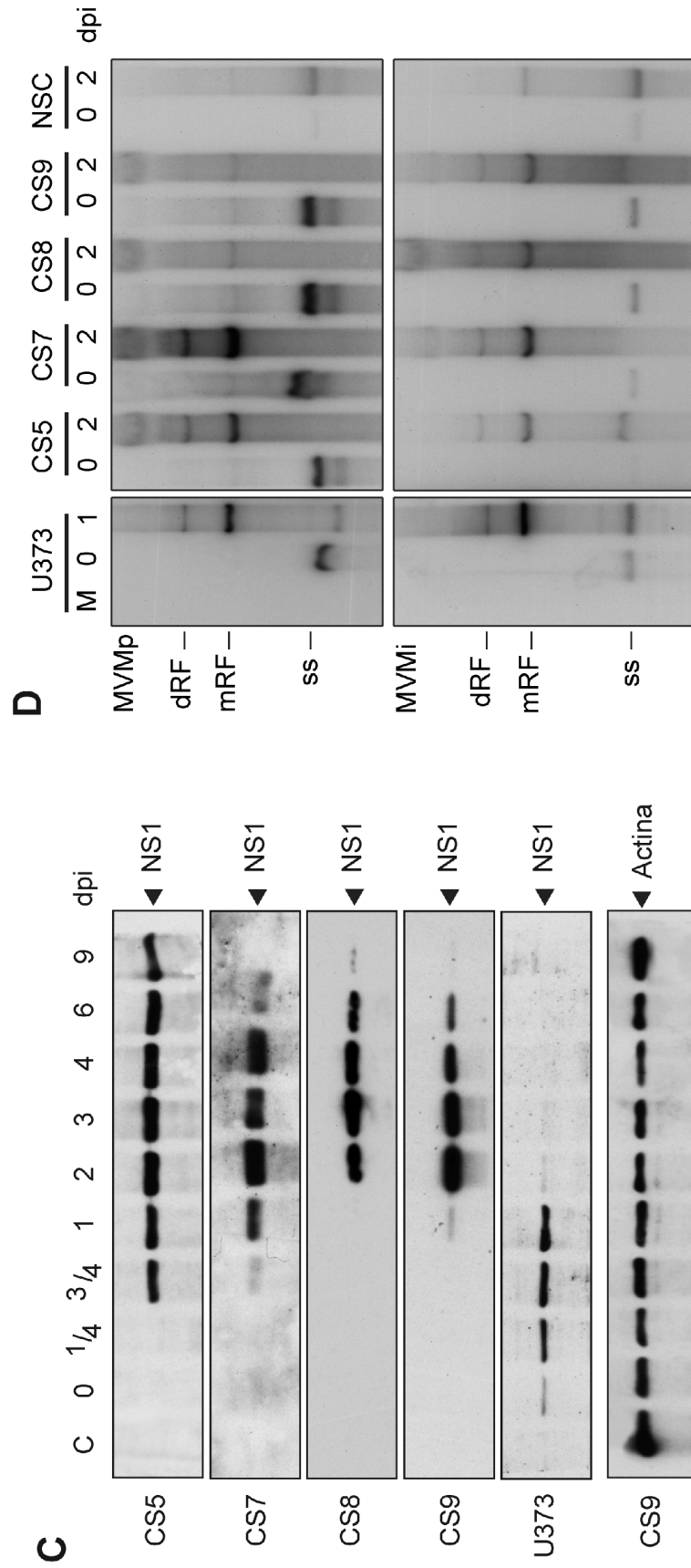


Figura 4:

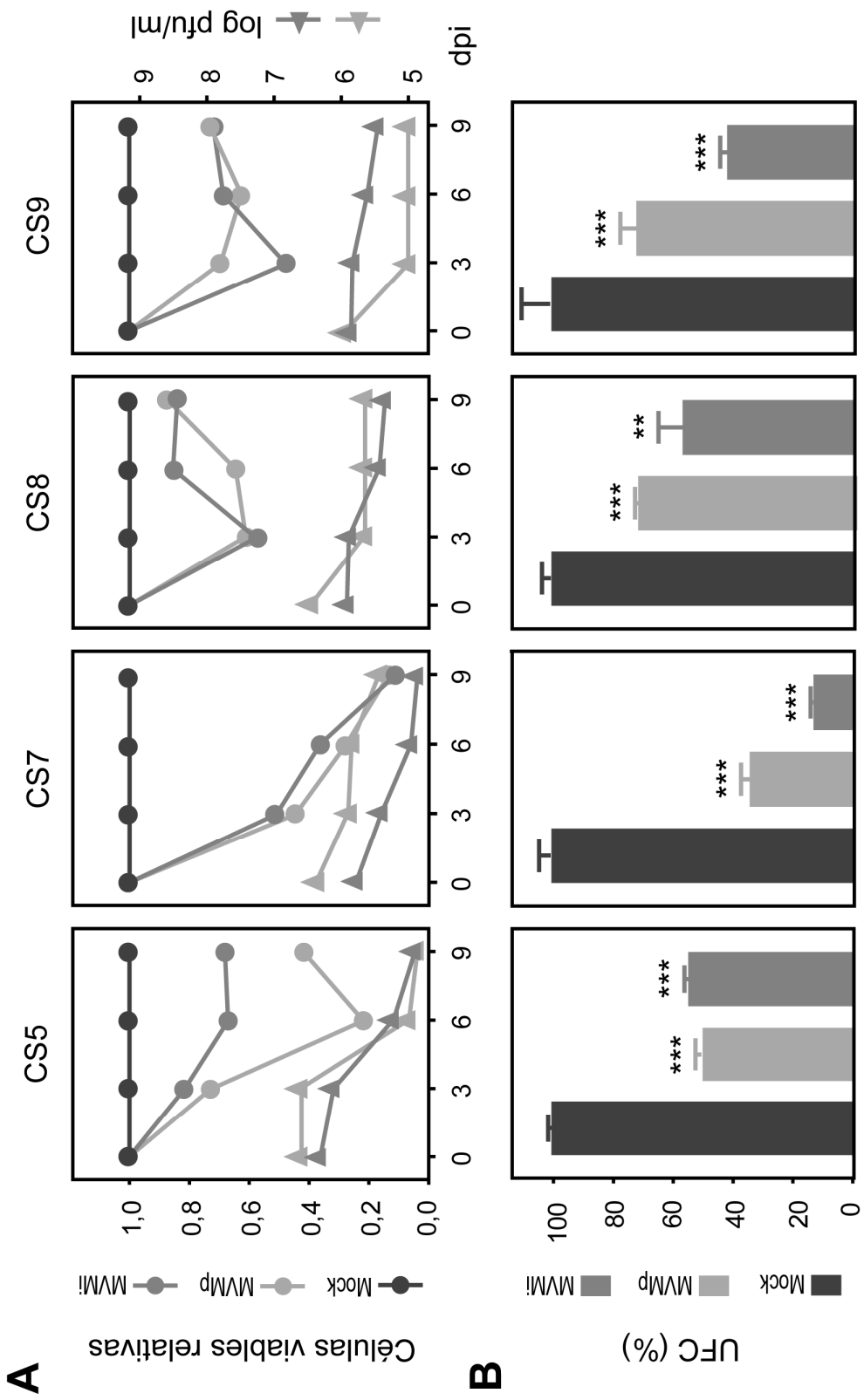


Figura 5:

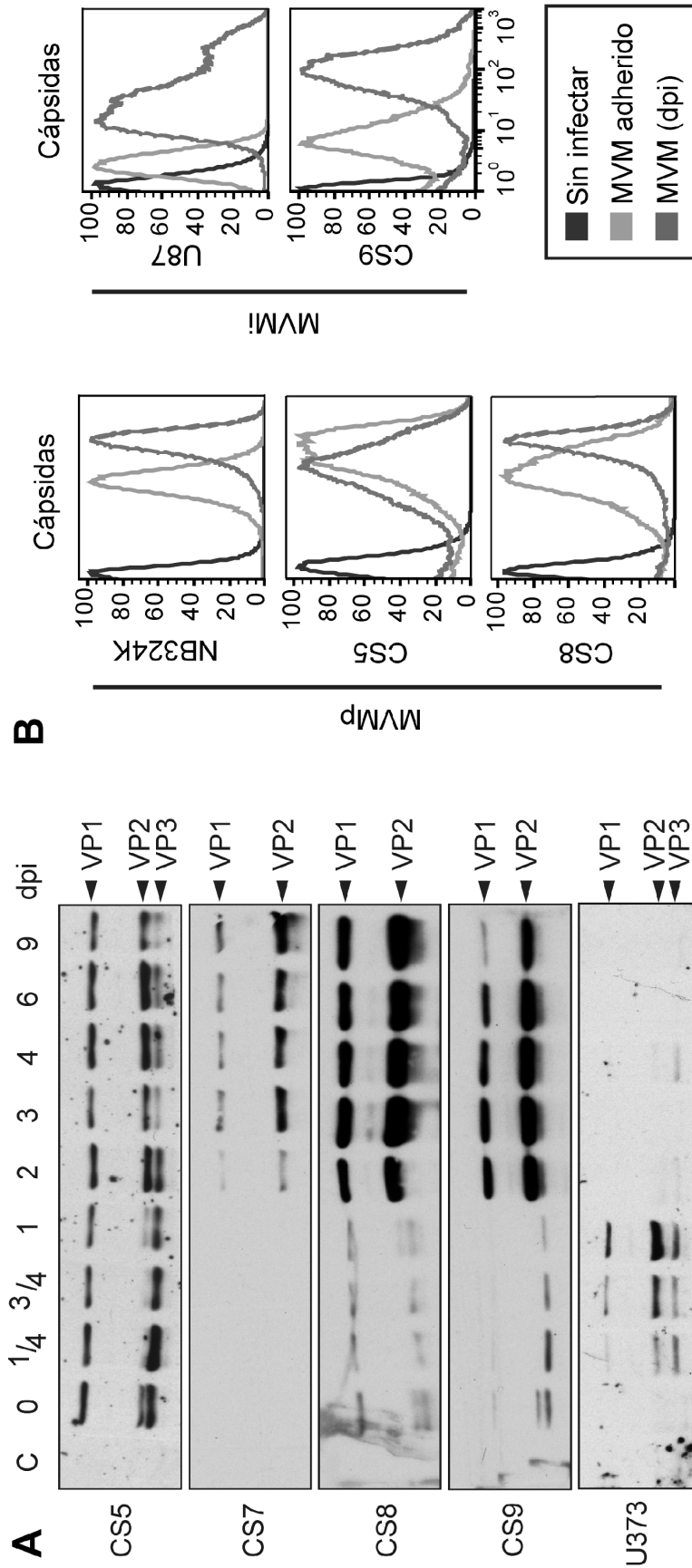


Figura 6:

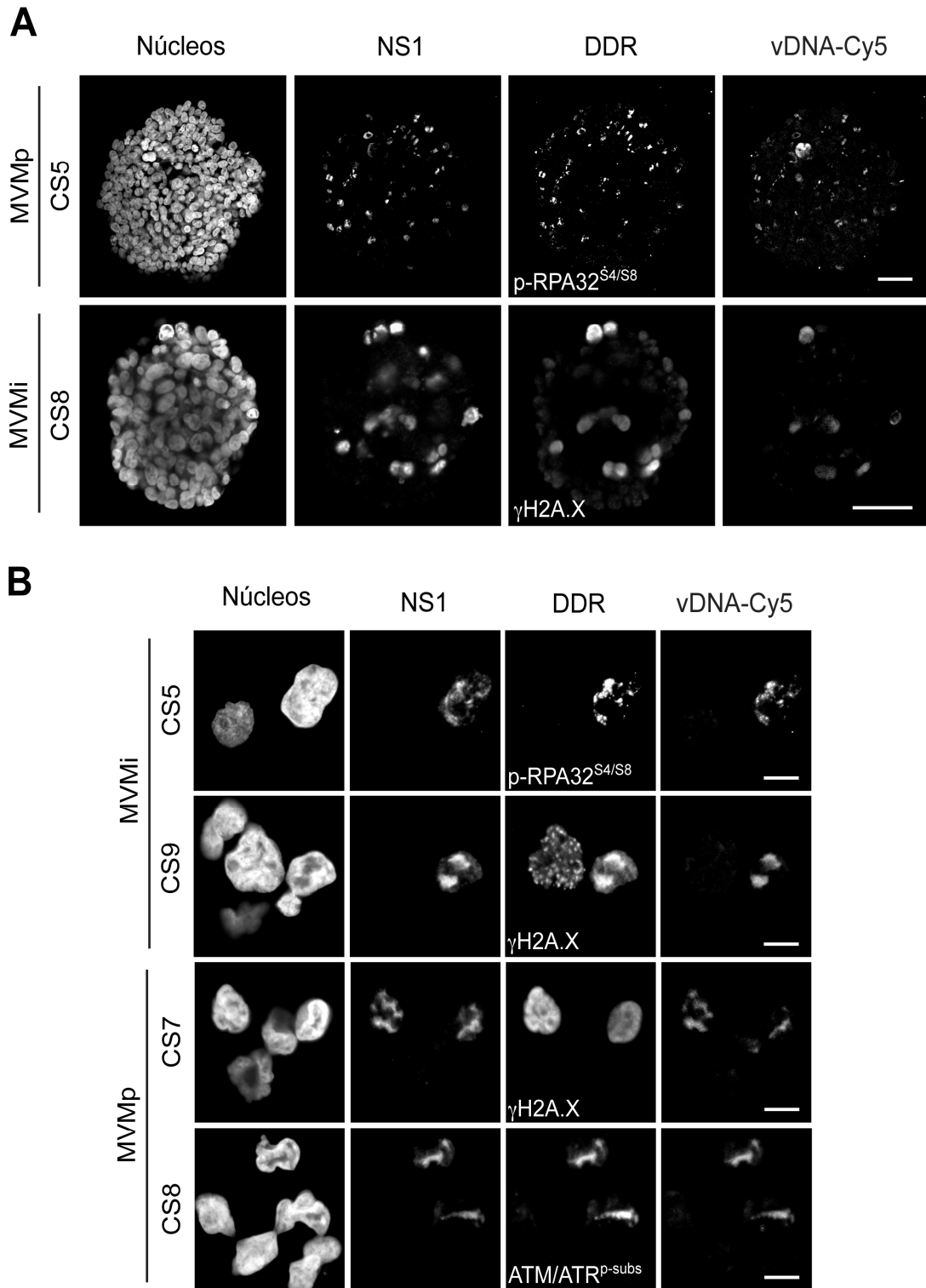


Figura 6 continuación:

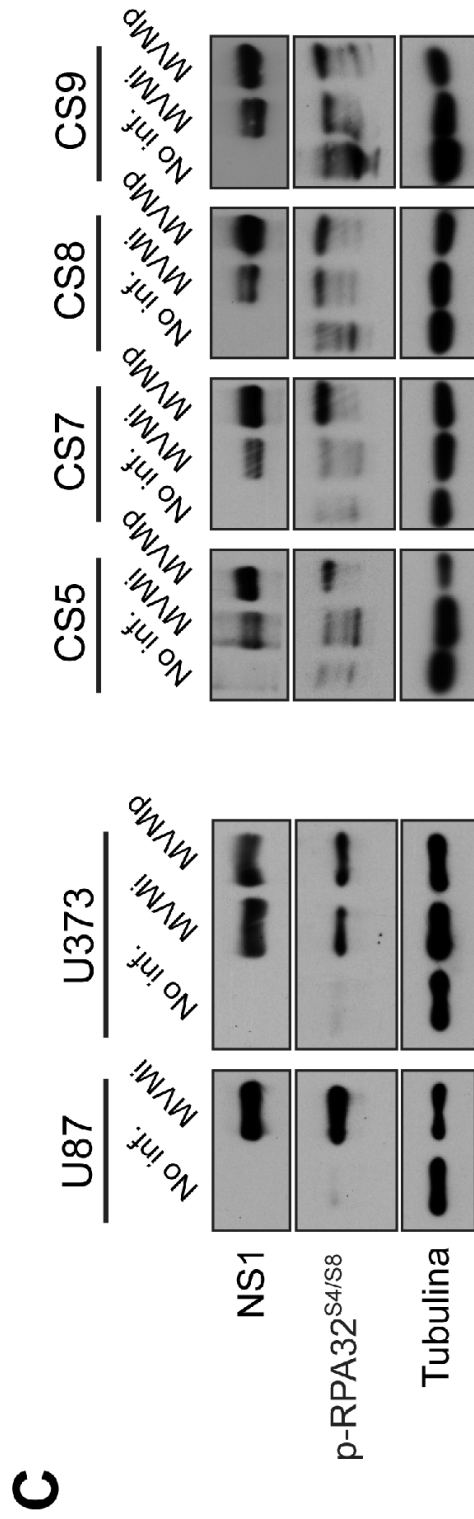


Figura 7:

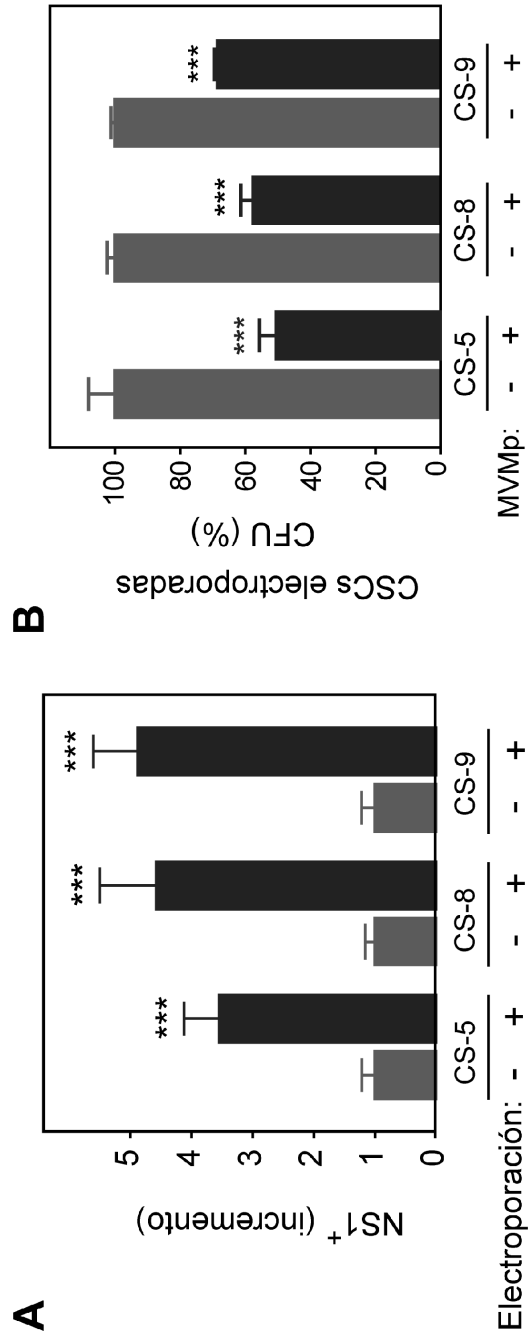


Figura 7 continuación:

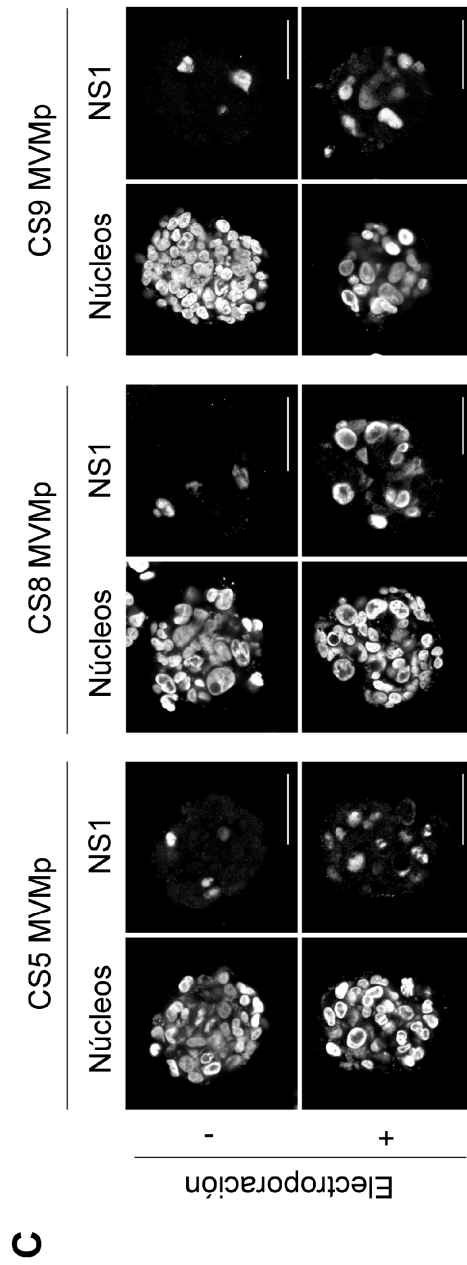


Figura 8:

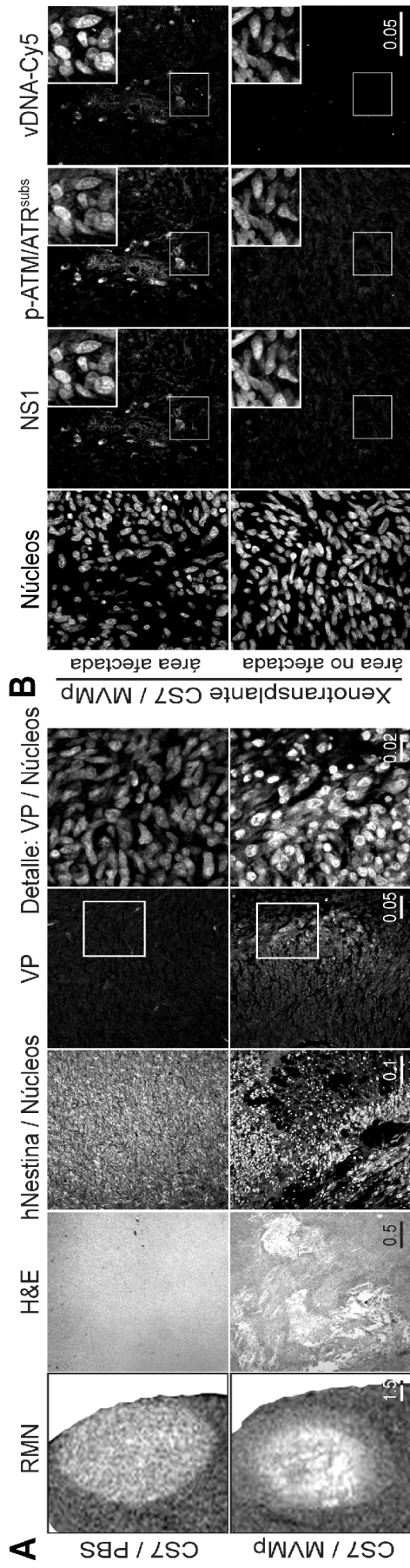
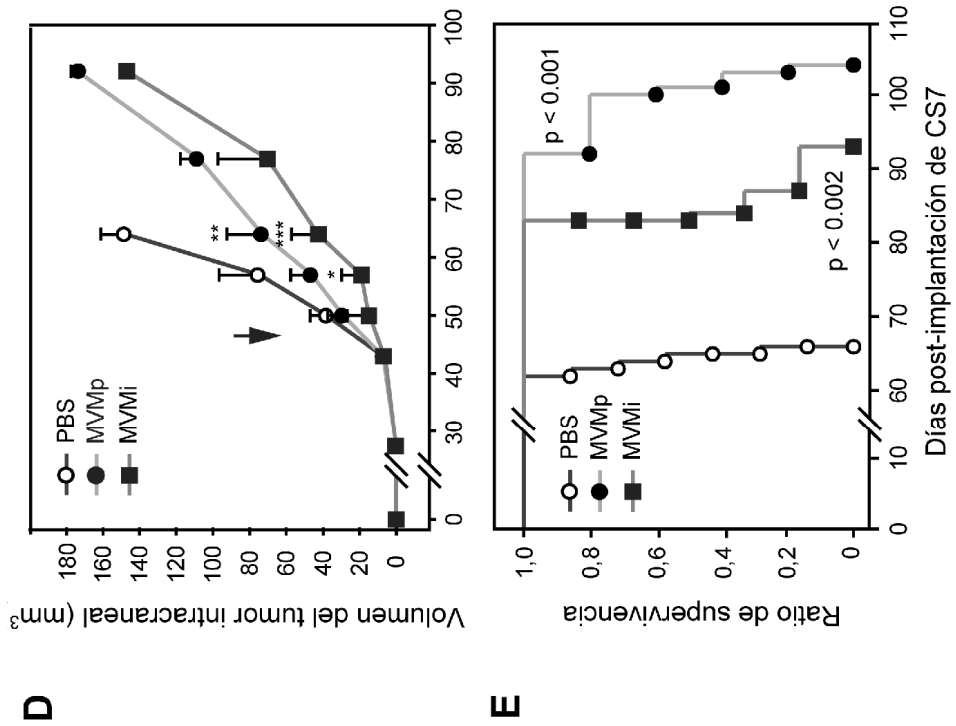
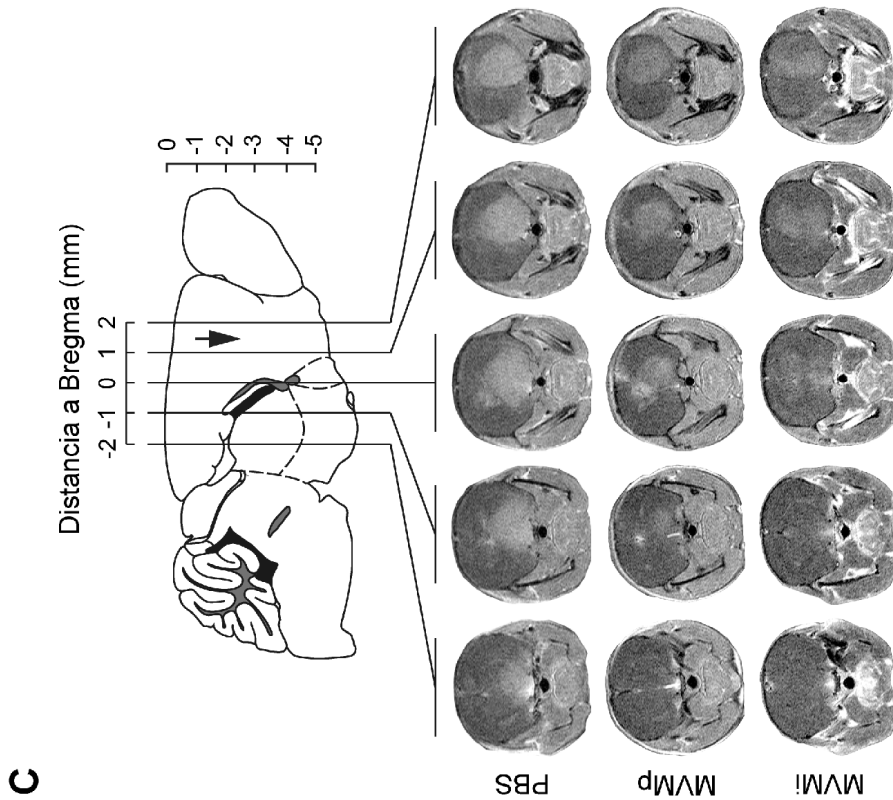


Figura 8 continuación:



D

E



C

ES 2 561 906 B1

Listado de secuencias

<110> UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
 <120> Tratamiento de glioma o glioblastoma con el parvovirus MVM
 <130> 900208
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 5149
 <212> DNA
 <213> Parvovirus
 <400> 1

atTTTTtagaa ctgaccaacc atgttcacgt aagtgacgtg atgacgcgcg ctgCGCGCGC	60
gccttcggac gtcacacgtc acttacgttt cacatggttg gtcagttcta aaaatgataa	120
gCGGttcagg gagtttaaac caaggcgcga aaaggaagtg ggcgtggttt aaagtatata	180
agcaactact gaagtcagtt acttatcttt tctttcattc tgtgagtcga gacgcacaga	240
aagagagtaa ccaactaacc atggctgaa atgcttactc tgatgaagtt ttgggagcaa	300
ccaactggtt aaaggaaaa agtaaccagg aagtgttctc atttgttttt aaaaatgaaa	360
atgttcaact gaatggaaaa gatatcggat ggaatagtta caaaaagag ctgcaggagg	420
acgagctgaa atctttaca cgaggagcgg aaactacttg ggaccaaagc gaggacatgg	480
aatgggaaac cacagtggat gaaatgacca aaaagcaagt attcattttt gattctttgg	540
ttaaaaaatg tttatttgaa gtgcttaaca caaagaatat atttcctggt gatgttaatt	600
ggtttgtgca acatgaatgg ggaaaagacc aaggctggca ctgccatgta ctaattggag	660
gaaaggactt tagtcaagct caagggaaat ggtggagaag gcaactaat gtttactgga	720
gcagatgggt ggtaacagcc tgtaatgtgc aactaacacc agctgaaaga attaaactaa	780
gagaaatagc agaagacaat gagtgggtta ctctacttac ttataagcat aagcaaacca	840
aaaaagacta taccaagtgt gttctttttg gaaacatgat tgcttactat tttttaacta	900
aaaagaaaat aagcactagt ccaccaagag acggaggcta ttttcttagc agtgactctg	960
gctggaaaac taacttttta aaagaaggcg agcgccatct agtgagcaaa ctatacactg	1020
atgacatgCG gccagaaacg gttgaaacca cagtaaccac tgcgcaggaa actaagcgcg	1080
gcagaattca aactaaaaa gaagtttcta ttaaaactac acttaaagag ctggtgcata	1140
aaagagtaac ctaccagag gactggatga tgatgcagcc agacagttac attgaaatga	1200
tggctcaacc aggtggagaa aacctgctga aaaatacgct agagatttgt acactaactc	1260
tagccagaac caaacagca tttgacttaa ttttagaaaa agctgaaacc agcaaactaa	1320
ccaactttc actgcctgac acaagaacct gcagaatttt tgcttttcat ggctggaact	1380
atgttaaagt ttgccatgct atttgctgtg ttttaaacag acaaggaggc aaaagaaata	1440
ctgttttatt tcatggacca gccagcacag gcaaatctat tattgcacaa gccatagcac	1500
aagcagttgg caatgttgggt tgctataatg cagccaatgt aaactttcca tttaatgact	1560

ES 2 561 906 B1

gtaccaacaa	gaacttgatt	tgggtagaag	aagctggtaa	ctttggacag	caagtaaacc	1620
agtttaaagc	catttgctct	ggtcaaacta	ttcgattga	tcaaaaagga	aaaggcagca	1680
aacagattga	accaacacca	gtcatcatga	ccacaaatga	gaacattaca	gtggtcagaa	1740
taggctgcga	agaaagacca	gaacacactc	aaccaatcag	agacagaatg	cttaacattc	1800
atctaacaca	taccttgctt	ggtgactttg	gtttggttga	caaaaatgaa	tggcccatga	1860
tttgtgcttg	gttggtaaag	aatggttacc	aatctaccat	ggcaagctac	tgtgctaaat	1920
ggggcaaagt	tcctgattgg	tcagaaaact	gggcggagcc	aaaggtgcca	actcctataa	1980
atttactagg	ttcggcacgc	tcaccattca	cgacaccgaa	aagtacgcct	ctcagccaga	2040
actatgcact	aactccactt	gcatcggatc	tcgaggacct	ggcttttagag	ccttggagca	2100
caccaaatac	tcctgttgcg	ggcactgcag	aaaccagaa	cactggggaa	gctggttcca	2160
aagcctgcca	agatgggtcaa	ctgagcccaa	cttggtcaga	gatcgaggag	gatttgagag	2220
cgtgcttcgg	tgcggaaccg	ttgaagaaag	acttcagcga	gccgctgaac	ttggactaag	2280
gtacgatggc	gcctccagct	aaaagagcta	aaagaggtaa	gggtttaagg	gatggttggt	2340
tgggtgggta	ttaatgttta	attacctggt	ttacaggcct	gaaatcactt	ggtttttaggt	2400
tgggtgcctc	ctggctacaa	gtacctggga	ccagggaaca	gccttgacca	aggagaacca	2460
accaatccat	ctgacgccgc	tgccaaagag	cacgacgagg	cctatgatca	atacatcaaa	2520
tctggaaaaa	atccttacct	gtacttctct	gctgctgatc	aacgctttat	tgaccaaac	2580
aaggacgcca	aagactgggg	aggcaagggt	ggtcactact	tttttagaac	caagcgcgct	2640
tttgaccta	agcttgctac	tgactctgaa	cctggaactt	ctggtgtaag	cagagctggt	2700
aaacgcacta	gaccacctgc	ttacatTTTT	attaaccaag	ccagagctaa	aaaaaacctt	2760
acttcttctg	ctgcacagca	aagcagtcaa	accatgagtg	atggcaccag	ccaacctgac	2820
agcggaaacg	ctgtccactc	agctgcaaga	gttgaacgag	cagctgacgg	ccctggaggc	2880
tctgggggtg	ggggctctgg	cgggggtggg	gttgggtgtt	ctactgggtc	ttatgataat	2940
caaacgcatt	atagattcct	gggtgacggc	tgggtagaaa	ttactgcact	agcaactaga	3000
ctagtacatt	taaacatgcc	taaatcagaa	aactattgca	gaatcagagt	tcacaataca	3060
acagacacat	cagtcaaagg	caacatggca	aaagatgatg	ctcatgagca	aatttgagca	3120
ccatggagct	tgggtgatgc	taatgcttgg	ggagtttggc	tccagccaag	tgactggcaa	3180
tacatttgca	acaccatgag	ccagcttaac	ttggtatcac	ttgatcaaga	aatattcaat	3240
gtagtgctga	aaactgttac	agagcaagac	ttaggaggtc	aagctataaa	aatatacaac	3300
aatgacctta	cagcttgcat	gatggttgca	gtagactcaa	acaacatTTT	gccatacaca	3360
cctgcagcaa	actcaatgga	aacacttggt	ttctaccctt	ggaaaccaac	catagcatca	3420
ccatacaggt	actatTTTTg	cgttgacaga	gatctttcag	tgacctacga	aaatcaagaa	3480
ggcacagttg	aacataatgt	gatgggaaca	caaaaaggaa	tgaattctca	atTTTTtacc	3540
attgagaaca	cacaacaaat	cacattgctc	agaacagggg	acgaatttgc	cacaggtact	3600

ES 2 561 906 B1

tactactttg acacaaattc agttaaactc acacacacgt ggcaaaccaa ccgtaactt 3660
 ggacagcctc cactgctgtc aacctttcct gaagctgaca ctgatgcagg tacacttact 3720
 gctcaaggga gcagacatgg aacaacacaa atgggggtta actgggtgag tgaagcaatc 3780
 agaaccagac ctgctcaagt aggatthttgt caaccacaca atgactttga agccagcaga 3840
 gctggaccat ttgctgcccc aaaagtcca gcagatatta ctcaaggagt agacaaagaa 3900
 gccaatggca gtgttagata cagttatggc aaacagcatg gtgaaaattg ggcttcacat 3960
 ggaccagcac cagagcgcta cacatgggat gaaacaagct ttggttcagg tagagacacc 4020
 aaagatgggt ttattcaatc agcaccacta gttgtttccac caccactaaa tggcattctt 4080
 acaaatgcaa accctattgg gactaaaaat gacattcatt tttcaaatgt ttttaacagc 4140
 tatggtccac taactgcatt ttcacacca agtcctgtat accctcaagg acaaatatgg 4200
 gacaaagaac tagatcttga acacaaacct agacttcaca taactgctcc atttgtttgt 4260
 aaaaacaatg cacctggaca aatgttgggt agattaggac caaacctaac tgaccaatat 4320
 gatccaaacg gagccacact ttctagaatt gttacatacg gtacatthttt ctggaaagga 4380
 aaactaacca tgagagcaaa acttagagct aacaccactt ggaaccaggt gtaccaagta 4440
 agtgctgaag acaatggcaa ctcatacatg agtgtaacta aatggttacc aactgctact 4500
 ggaaacatgc agtctgtgcc gcttataaca agacctgttg ctagaaatac ttactaacta 4560
 accatgcttt ttctttctgt acttcatata ttattaagac taataaagat acaacataga 4620
 aatataatat tacgtataga ttttaagaaat agaataatat ggtacttagt aactgttaaa 4680
 aataatagaa cttttggaat aacaagatag ttagttgggt aatgttagat agaataagaa 4740
 gatcatgtat aatgaataaa aggggtggaag ggtggttgggt aggttaatgt tagatagaat 4800
 aagaagatca tgtataatga ataaaagggt ggaagggtgg ttggtaggta ttcccttaga 4860
 cttgatgta aggacaaaa aaataataaa actthtttaaa aactcaacca agactactgt 4920
 ctattcagtg aaccaactga accattagta ttactatggt tttagggtgg gaggggtggga 4980
 gatacatgtg ttcgctatga gcgaactgggt actggttgggt tgctctgctc aaccaaccag 5040
 accggcaaag ccggtctggt tggttgagcg caaccaacca gtaccagttc gctcatagcg 5100
 aacacatgta tctcccacc tcccacccta aaaacatagt aataactaat 5149

<210> 2
 <211> 5085
 <212> DNA
 <213> Parvovirus

<400> 2
 atthtttagaa ctgaccaacc atgttcacgt aagtgacgtg atgacgcgcg cttcgcgcbc 60
 tgccttcgga cgtcacacgt cacttacgtt tcacatgggt ggtcagttct aaaaatgata 120
 agcggttcag agagthttaga ccaaggcgcg aaaaggaagt gggcgtgggt taaagtatat 180
 aagcaaatgc tgaagtcagt tacttattcct ttctthcatt ctgtgagtcg agacgcgcag 240
 aaagagagta accaactaac catggctgga aatgcttact ctgatgaagt tttgggaaca 300

ES 2 561 906 B1

accaactggt taaaggaaaa aagtaaccag gaagtgttct ctttgtttt taaaactgag 360
 gatgttcaac taaatggaaa agatatcgga tggaataatt acaaaaagga gctgcaggag 420
 gacgagctga aatctttaca acgaggagcg gaaactacct gggaccaaaag cgaggacatg 480
 gaatgggaat ctacagtgga tgaaatgacc aaaaagcaag tattcattta tgactcttta 540
 gttaaaaaat gtttgtttga agtgcttagc acaaaaaata tagctcctgc tgatgttact 600
 tggtttgtgc agcatgaatg ggggaaagac caaggctggc actgccatgt actaattgga 660
 ggcaaggact ttagtcaagc tcaaggaaaa tggtaggaga ggcagctaaa tgtttactgg 720
 agcagatggt tggtaacagc ctgtaatgtg cagctaacac cagctgaaag aattaaacta 780
 agagaaatag cagaagacag tgagtgggtt actttactca cttataaaca taagcaaacc 840
 aaaaaggact atactaaatg tgttcttttt ggaaatatga ttgcttacta ctttttaacc 900
 aaaaagaaaa taagcaccag tccgccaagg gacggaggct attttctaag cagtgactct 960
 ggctggaaaa ctaacttttt aaaagagggc gaacgccatc tagtgagcaa attatacact 1020
 gatgacatgc ggccagaaac ggttgaaacc acagtaacca ctgcgagga aactaagcgc 1080
 ggcagaattc aaactaaaa agaggtttct attaaaacca cacttaaaga gctagtgcat 1140
 aaaagagtaa cctcaccaga agactggatg atgatgcagc cagacagtta cattgaaatg 1200
 atggctcaac caggtggaga aaacctgctg aaaaatacgc tagagatttg tacgctaact 1260
 ctagccagaa caaaaacagc atttgacttg attttagaaa aagctgaaac cagcaaacta 1320
 accaactttt cactgcctga cacaagaacc tgcaagattt ttgcttttca tggctggaac 1380
 tatgttaaag tttgccatgc ttttgctgt gttctaaca gacaaggagg caaaagaaat 1440
 actgttttat ttcacggacc agccagtaca ggcaaatcta ttattgcaca agccatagca 1500
 caggcagttg gtaatgttg ttgctataat gcagctaatg tgaactttcc atttaatgac 1560
 tgtaccaaca agaacttgat ttgggtagaa gaagctggta actttggaca gcaagtaaac 1620
 cagtttaaag ccatttgctc tgggtcaact attcgcattg atcaaaaagg aaaaggcagc 1680
 aaacaaattg aaccaacacc agtcatcatg accacaaatg agaacattac agtggtcaga 1740
 ataggctgcg aagagagacc agaacacact caaccaatta gagacagaat gctcaacatt 1800
 catctaacac atacattgcc tggtgacttt ggtttggttg acaagaatga atggcccatg 1860
 atttgtgctt ggttggtaaa gaatggttac caatctacca tggcaagcta ctgagctaaa 1920
 tggggcaaag ttctgattg gtcagaaaac tgggaggagc caaagggtgcc gactcctata 1980
 aattcactag gttcggcacg ctcaccattc acgacaccga aaagtacgcc tctcagccag 2040
 aactatgcaa taactccact tgcacggat ctcaggacc tggctttaga gccttggagc 2100
 acaccaaata ctctgttgcc gggcactgca gaaaccaga aactgggga agctggttcc 2160
 aaagcctgcc aagatggtca actgagccca acttggtcag agatcgagga ggatttgaga 2220
 gcgtgcttcg gtgcggaacc gttgaagaga gacttcagcg agccgctgaa cttggactaa 2280
 ggtacgatgg cgcctccagc taaaagagct aaaagaggta agggtttaag ggatggttg 2340
 ttggtggggt attaattgtt aattacctgt tttacaggcc tgaaatcact tggttttagg 2400

ES 2 561 906 B1

ttgggtgcct	cctggctata	agtacctggg	accaggaac	agccttgacc	aaggagaacc	2460
aaccaatcca	tctgacgccg	ctgccaaaga	gcacgacgag	gcctatgatc	aatacatcaa	2520
atctggaaaa	aatccttacc	tgtacttctc	tgctgctgat	caacgcttta	ttgaccaaac	2580
caaggacgcc	aaagactggg	gaggcaaggt	tggtcactac	tttttagaa	ccaagcgcgc	2640
ttttgcacct	aagcttgcta	ctgactctga	acctggaact	tctgggtgtaa	gcagagctgg	2700
taaacgcact	agaccacctg	cttacatfff	tataaaccaa	gccagagcta	aaaaaaaaact	2760
tacttcttct	gctgcacagc	aaagcagtca	aaccatgagt	gatggcacca	gccaacctga	2820
cggcggaaac	gctgtccact	cagctgcaag	agttgaacga	gcagctgacg	gccctggagg	2880
ctctgggggt	gggggctctg	gcgggggtgg	ggttgggtgt	tctactgggt	cttatgataa	2940
tcagacgcat	tatagattct	tgggtgacgg	ctgggtagaa	attactgcac	tagcaactag	3000
actagtacat	ttaaactatgc	ctaaatcaga	aaactattgc	agaataagag	ttcacaacac	3060
aacagacact	tcagtcaaag	gcaacatggc	aaaagatgat	gctcatgagc	aaatttggac	3120
gccatggagc	ttagtggatg	ctaagtcttg	gggagtttgg	ctccagccaa	gtgactggca	3180
atacatttgc	aacacatga	gccagcttaa	cttggctctca	cttgatcaag	aaatatttaa	3240
tgtagtgctg	aaaactgtta	cagagcaaga	ctcaggaggt	caagctataa	aaatatacaa	3300
caatgacctc	acagcttga	tgatggttgc	agtagactca	aacaacattc	tgccatacac	3360
acctgcagca	aactcaatgg	aaacacttgg	tttctaccct	tggaaaccaa	ctatagcatc	3420
gccatacagg	tactatttct	gcgttgacag	agatctttca	gtaacctatg	aaaatcaaga	3480
aggcacaatt	gagcataatg	taatgggaac	accaaagga	atgaattctc	aattttttac	3540
cattgagaac	acacaacaaa	tcacattgct	cagaactggt	gatgagtttg	ctactggaac	3600
ctactacttt	gacacaaacc	cagttaaact	tacacacaca	tggcaaacta	accgtcaact	3660
tggacagcct	ccactgctgt	caacctttcc	tgaagctgac	actgatgcag	gtacacttac	3720
tgctcaaggg	agcagacatg	gagcaacaca	gatggagggt	aactgggtga	gtgaagcaat	3780
tagaaccaga	cctgctcaag	taggattttg	tcagccacac	aatgactttg	aagccagcag	3840
agctggacca	tttgctgctc	caaaagttcc	agcagatggt	actcaaggag	tggacagaga	3900
agccaatggc	agtgttagat	acagttatgg	caaacagcat	ggtgaaaatt	gggctgcaca	3960
cggaccagca	ccagagcgct	acacatggga	tgaacaaac	tttggttcag	gaagagacac	4020
cagagatggt	tttattcaat	cagcacctct	agttgttcca	ccaccactaa	atgggattct	4080
tacaaatgca	aaccctattg	gaactaaaaa	tgacattcat	ttttcaaatg	tttttaacag	4140
ctatggtcca	ctaactgcat	tttcacacc	aagtcttgta	taccctcaag	gacaaatatg	4200
ggacaaagaa	ctagatcttg	aacacaaacc	tagacttcac	ataactgctc	catttgtctg	4260
taaaaacaat	gcacctggac	aatgtttggt	tagattagga	ccaaatctaa	ctgaccagta	4320
tgatccaaac	ggagccacac	tttctagaat	tgtgacttat	ggtacatfff	tctggaaagg	4380
aaaactaacc	atgagagcaa	aacttagagc	taacaccact	tggaaccag	tgtaccaagt	4440

ES 2 561 906 B1

aagtgttgaa gacaatggca actcatacat gagtggtact aaatggctac caactgctac	4500
tggaaacatg caatctgtac cgcttataac aagacctggt gctagaaata cttactaact	4560
aaccatgttt ttcctttctg tacttcatat attattaaga ctaataaaga tacaacataa	4620
aaatataata ttacatatag atttaagaaa tagaataata tgggtacttag taactggttag	4680
aaataataga acctttgaaa taacaagata attagttggt taatgttaga tagaataaga	4740
agattatgta taatgggtaa aagggtggaa ggggtggttg ttggtattcc cttagacatg	4800
atgttaagga ccaaaaaaat aataaaattt tttaaaacta aaccaagact actgtctatt	4860
cagttgaacc aactgaacca tcagtatcac tatgttttta ggggtggggg gtgggagata	4920
catgtgttcg ctatgagcga actggtactg gttggttgct ctgctcaacc aaccagaccg	4980
gctttgccgg tctggttggt tgagcgcaac caaccagtac cagttcgctc atagcgaaca	5040
catgtatctc ccaccccccc accctaaaaa catagtgata ctgat	5085