

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 407**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

A61K 35/768 (2015.01)

C07K 16/08 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.06.2011 PCT/EP2011/003021**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.12.2011 WO11157447**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2011 E 11733567 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2582796**

54 Título: **Parvovirus modificado que tiene una eficacia antitumoral mejorada**

30 Prioridad:

17.06.2010 EP 10166332

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

27.02.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SALOME, NATHALIE;
DINSART, CHRISTIANE;
WEISS, NADINE y
ROMMELAERE, JEAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 603 407 T3

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

DESCRIPCIÓN

Parvovirus modificado que tiene una eficacia antitumoral mejorada

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una variante de parvovirus que muestra un mayor potencial antitumoral en comparación con el parvovirus de tipo silvestre, en donde dicha variante se caracteriza por (a) una sustitución de aminoácidos en la posición Lys96 de NS2 y/o la posición Leu103 de NS2 (esta última también induce una sustitución de aminoácidos en la posición Tyr595 de NS1), o (b) una delección en marco en la parte izquierda del genoma de H-1PV, es decir, una delección que produce la traducción de las proteínas NS1 y NS2 que tienen una delección de 38 aminoácidos en su parte C-terminal y central, respectivamente, para uso en un método de tratamiento del cáncer.

Los virus oncolíticos tales como parvovirus de roedor representan herramientas novedosas para el tratamiento del cáncer [1, 2, 31]. Además de destruir específicamente las células cancerosas (oncolisis), estos agentes también proporcionan señales de peligro que provocan que el sistema inmune elimine tumores infectados por virus [3]. Como consecuencia de los eventos oncolíticos, los sistemas inmunes innato y adaptativo logran tener acceso a antígenos tumorales, lo que puede dar como resultado unos efectos de cebado cruzado y de vacunación [4, 5]. Los parvovirus de roedores son virus de ADN monocatenario que poseen actividad oncolítica "intrínseca", es decir, que se replican preferentemente en células cancerosas y las destruyen, tanto las de origen murino como humano [6, 7]. Sin embargo, la eficacia anticancerígena de los candidatos más prometedores para aplicaciones clínicas en seres humanos (incluyendo H-1PV) requiere una mejora. Hasta ahora, se han aplicado las siguientes estrategias para la mejora:

(a) Creación de vectores basados en PV mediante la introducción de genes terapéuticos (por ejemplo, quimiocinas o citocinas) [8, 9, 10];

(b) Uso de PVs naturales de roedor en combinación con fármacos quimioterapéuticos (por ejemplo, gemcitabina) [11, 32]; y

(c) Creación de mutantes de PV que son portadores de mutaciones puntuales en sitios de fosforilación potencial de la proteína grande no estructural NS1 [12].

Sin embargo, los resultados obtenidos necesitan mejoras adicionales, en particular en lo que respecta a un mayor potencial antitumoral, en comparación con los PVs naturales utilizados en la actualidad, y la reducción del tiempo durante la etapa de producción.

Por lo tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar parvovirus mejorados para usos terapéuticos.

De acuerdo con la invención, esto se consigue mediante los contenidos definidos en las reivindicaciones.

La presente invención se basa en el aislamiento realizado por el solicitante de un mutante de H-1PV que suplanta el H-1PV convencional de tipo silvestre en cultivos de células coinfectadas [13]. La presente invención también se basa en el papel fundamental que desempeñan pequeñas proteínas no estructurales del PV de roedor y su interacción con ligandos celulares específicos para el estado físico del virus [14, 15] y la posibilidad de mejorar el estado físico de parvovirus ratón mediante ligeras modificaciones dentro de estas proteínas víricas [16].

Los inventores partieron de la suposición que la mejora de las actividades de las proteínas pequeñas no estructurales de PVs de roedor, también puede ser la causa de una mayor eficacia de estos virus para la producción vírica y su potencial antitumoral. Estas suposiciones se confirmaron mediante la introducción de estas mutaciones en el genoma de H-1PV y sometiendo a ensayo en relación con (a) la cantidad de viriones de la progenie recuperados a partir de las células productoras, y (b) su actividad onco-tóxica/lítica frente a modelos de tumores humanos. Los datos obtenidos con estos H-1PVs mejorados demostraron de hecho un brote más elevado de viriones en la progenie y un mayor índice de partículas infecciosas frente a las completas en la población vírica, una propagación más rápida en cultivos celulares y una actividad anticancerígena mejor frente a xenoinjertos tumorales.

En resumen, los PVs mejorados de la presente invención (a) muestran un mayor potencial antitumoral en comparación con los PVs naturales, utilizados actualmente en ensayos preclínicos, también conducen (b) a una reducción del tiempo durante la etapa de producción, y (c) al uso de dosis más bajas de viriones completos durante los ensayos (pre)clínicos. Por consiguiente, los virus de la presente invención no requieren la presencia de un gen terapéutico ni la combinación con fármacos quimioterapéuticos para una terapia eficaz.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Representación esquemática de clones moleculares infecciosos de (A) pPMut1H-1PV, (B) pPMut2H-1PV, (C) pPMut3H-1PV, (D) pPMut4H-1PV y (E) pDeIH-1PV

El genoma vírico se representa como un cuadro gris. Los promotores víricos P4 y P38 se muestran como flechas negras. "NS1/NS2" y "VP1/2" que se indican encima del cuadro gris, indican las regiones del genoma que codifican las proteínas NS1/NS2 no estructurales y VP1/VP2 de la cápside, respectivamente. El vector de expresión pUC19 se representa como una línea negra. Los sitios de mutaciones puntuales (A-D) se indican como barras grises, la dele-

ción (E) se indica como un triángulo gris. Las modificaciones de nucleótidos (nt) (A-D) o la delección (E) se indican en cursiva debajo del genoma. Las flechas grises debajo del genoma muestran las proteínas víricas resultantes, junto con las modificaciones de aminoácidos (aa) resultantes (A-D) o la delección (E) que se indica en gris cuando sea apropiado. *Leu, Pro, Tyr, His, Lys, Glu, Met*: aminoácidos leucina, prolina, tirosina, histidina, lisina, ácido glutámico y metionina, respectivamente.

Figura 2: Aumento de la infecciosidad de Del H-1PV en comparación con H-1PV de tipo silvestre e infecciosidad similar o incluso mejor de las variantes PMut1 H-1PV y PMut2 H-1PV en comparación con Del H-1PV

Los virus se produjeron mediante infección de células NB-324K y se analizaron mediante Ensayo en Placa (que proporciona el número de PFU = unidades formadoras de placa), Ensayo de Hibridación (que proporciona el número de RU = unidades de replicación) y Transferencia de puntos (que proporciona el número de partículas víricas completas).

Los números en gris indican los valores de P/I que son más bajos que el valor obtenido con H-1PV de tipo silvestre (wt, del inglés "wild type"). Los cuadros grises y estructurados con una flecha indican el factor de disminución (/) o de aumento (x) entre el índice P/I de H-1PV de tipo silvestre y el de la variante correspondiente de H-1PV por delección o por mutación puntual.

Figura 3: Aumento de la propagación de Del H-1PV en comparación con H-1PV de tipo silvestre en células NB-324K infectadas

(A) Poblaciones de virus wt H-1PV, Del H-1PV, PMut1 H-1PV, PMut2 H-1PV y PMut3 H-1PV preparadas recientemente se analizaron mediante Ensayo en Placa utilizando células NB-324K. Se muestra un ejemplo de las placas obtenidas con cada población de virus para ilustrar el tamaño de las placas.

(B) La proporción de placas que muestran un tamaño dado con la población de virus H-1PV de tipo silvestre (cuadros grises) o Del H-1PV (cuadros negros) se proporciona como un porcentaje de la cantidad total de placas examinadas ($n > 100$ placas) para cada caso. El tamaño promedio de las placas obtenidas con la población de virus H-1PV de tipo silvestre o Del H-1PV se indica en un cuadro gris o negro y se representa por una línea de puntos de color gris o negro, respectivamente.

Figura 4: Acumulación de proteína vírica en células NB-324K

Se infectaron $1,5 \times 10^5$ células NB-324K con wt H-1PV, Del H-1PV, PMut1 H-1PV o PMut2 H-1PV con una multiplicidad de infección (moi) de 3 pfu/célula. Se realizaron lisados de células completas a las horas indicadas (h) después de la infección (p.i.) y 10 µg de extractos proteicos totales migraron sobre un gel de poliacrilamida-SDS al 12% y posteriormente se analizaron por inmunotransferencia. Las proteínas no estructurales NS1 y NS2 y las proteínas de la cápside vírica VP se detectaron con los anticuerpos policlonales de conejo SP8, anti-NS2P y anti-VPpep, respectivamente. Las flechas blancas y negras indican una acumulación incrementada y/o previa de las proteínas NS1 y VP de la variante PMut, respectivamente, en comparación con la observada en extractos de células infectadas con H-1PV de tipo silvestre a las 8 h o 24 h p.i. La variación en la acumulación de proteínas NS2 de la variante Del o PMut en comparación con las proteínas NS2 de tipo silvestre, se destacan por cuadros negros. Los tamaños de los marcadores de proteínas se muestran en el lado derecho. *simulado*: células no infectadas tratadas con medio, *kD*: kiloDalton.

Figura 5: Aumento de la inhibición del crecimiento y la producción de virus de las variantes PMut1 H-1PV y PMut2 H-1PV en los primeros puntos de tiempo después de la infección en células NB-324K humanas

(A) Las células NB-324K fueron infectadas con (wt) H-1PV de tipo silvestre, Del H-1PV, PMut1 H-1PV o PMut2 H-1PV con una moi de 3 pfu/célula. La cantidad de células vivas se determinó los días indicados después de la infección (p.i.), usando un sistema de recuento de células CASY. La proporción de células vivas en las muestras infectadas se expresa como un porcentaje de la cantidad de células vivas en la muestra tratada de forma simulada. Barras gris claro: simulado (no infectado, tratado con medio), barra negra: de tipo silvestre, barra blanca: Del H-1PV, barra gris oscura: PMut1 H-1PV, barra gris discontinua: PMut2 H-1PV.

(B) Se infectaron $1,5 \times 10^5$ células NB-324K con wt H-1PV, Del H-1PV, PMut1 H-1PV o PMut2 H-1PV con una moi de 0,5 pfu/célula. El virus se recuperó los días indicados después de la infección (p.i.) y la cantidad total de unidades formadoras de placas (PFU) se determinó mediante ensayo en placa. Los datos obtenidos con wt H-1PV, Del H-1PV, PMut1 H-1PV y PMut2 H-1PV están representados por líneas negras o grises, como se indica en el gráfico.

Figura 6: Distribución de pfu en el núcleo y el citoplasma de células NB-324K infectadas

Se infectaron 5×10^5 células NB-324K con H-1PV de tipo silvestre (paneles superior e inferior), Del H-1PV (paneles superior e inferior), PMut1 H-1PV (paneles inferiores), PMut2 H-1PV (paneles inferiores) o PMut4 H-1PV (paneles inferiores) con una moi de 1 pfu/célula. Se añadió anticuerpo policlonal neutralizante de conejo de PV1 al medio de las células infectadas, 2 horas después de la infección (p.i.) con el fin de bloquear las infecciones secundarias. El

aislamiento de las fracciones nucleares y citoplásmicas de las células infectadas se realizó a las horas indicadas (h) después de la infección (p.i.). La cantidad total de unidades formadoras de placas (PFU) en cada fracción nuclear (A, C) y citoplásmica (B, D) se determinó mediante ensayo en placa.

Figura 7: Algunas etapas del ciclo de vida de Del H-1PV son más rápidas que las de wt H-1PV

- 5 Las células NB-324K se infectaron con el híbrido hH-1PV o el híbrido Del hH-1PV con una moi de 3 pfu/célula. Las células se fijaron a las horas indicadas (h) después de la infección (p.i.) y las proteínas de la cápside libres o ensambladas se detectaron mediante tinción con inmunofluorescencia, usando 3c3F12 como anticuerpo primario. Los números en blanco (con un círculo blanco para Del hH-1PV) representan el porcentaje de células positivas que muestra una tinción nuclear predominante. Las flechas blancas indican viriones resultantes de las células infectadas.
- 10 *3c3F12*: anticuerpo monoclonal de ratón que reconoce las proteínas VP de la cápside vírica y las cápsides completas. *DAPI*: 4',6-diamidino-2-fenilindol; una cepa fluorescente que se une al ADN.

Figura 8: Del H-1PV muestra citotoxicidad más baja que wt H-1PV

- 15 Las células NB-324K se infectaron con H-1PV de tipo silvestre (wt) o Del H-1PV con varias moi (véase B). Las células infectadas se recuperaron 4 horas después de la infección y se sembraron a baja densidad en placas de cultivo con células de nuevo aporte.

(A) Se realizó un seguimiento del crecimiento de las colonias de células durante varios días después de la siembra y las células se fijaron y se tiñeron con una solución de cristal violeta cuando las colonias se detectaban fácilmente con microscopía óptica.

- 20 (B) El porcentaje de células supervivientes después de la infección con H-1PV de tipo silvestre (wt) o Del H-1PV está representado con una línea gris o negra, respectivamente.

Figura 9: Aumento de la producción vírica de Del H-1PV en diferentes líneas celulares de cáncer de páncreas y células HeLa

- 25 Se infectaron 1×10^5 células NB-324K, MiaPaCa-2, Panc-1 o HeLa+ con Del H-1PV o H-1PV de tipo silvestre (wt) con una moi de 0,5 pfu/célula. El virus se recuperó los días indicados después de la infección (p.i.) y la cantidad total de unidades formadoras de placas (PFU) se determinó mediante ensayo en placa. Las cantidades de partículas infecciosas producidas por Del H-1PV y wt H-1PV se representan con una línea y puntos negros o rectángulos negros, respectivamente.

Figura 10: Del H-1PV es más eficaz en la supresión del crecimiento tumoral

- 30 (A) Se infectaron 4×10^7 células Panc-1 con H-1PV de tipo silvestre (wt) o Del H-1PV con una moi de 3 RU/célula (RU = unidades de replicación). Las células se recogieron 4 horas después de la infección y se inyectaron 5×10^6 células por vía subcutánea en ratones BALB/c sin pelaje.

- 35 (B) Se midió el tamaño de los tumores durante un período de 83 días después de la implantación de las células y se presentó en mm^3 . El tamaño de los tumores en animales que habían recibido células Panc-1 tratadas de modo simulado (es decir, no infectadas), infectadas con H-1PV de tipo silvestre o infectadas con Del-1PV, se muestra como una línea gris oscura y pequeños rectángulos, una línea negra y grandes rectángulos, o una línea gris claro y triángulos, respectivamente.

- 40 (C) Las mediciones se presentan como porcentaje de un tamaño tumoral mayor que 290 mm^3 . Los tamaños de los tumores en los animales que recibieron células Panc-1 tratadas de modo simulado (es decir, no infectadas), infectadas con H-1PV de tipo silvestre o infectadas con Del-1PV, se muestran como una línea gris oscura y pequeños rectángulos, una línea negra y grandes rectángulos, o una línea gris claro y triángulos, respectivamente.

Figura 11: Secuencia genómica completa de H-1PV (en nucleótidos) y secuencias proteicas de NSs y VPs de H-1PV (en aminoácidos)

La secuencia del genoma de H-1PV se recuperó a partir de Gene Databank - nº de orden X01457.1:

- 45 - gij60993|emb|X01457.1| Parvovirus h-1, genoma completo
- Rhode S.L.III., Paradiso P.R. "Parvovirus genome: nucleotide sequence of h-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation". J. Virol. 45:173-184(1983).

e incluye las correcciones de errores de la secuencia que se encuentran en las regiones codificantes de NS y publicadas más adelante:

- 50 - Faisst S, Faisst SR, Dupressoir T, Plaza S, Pujol A, Jauniaux JC, Rhode SL, Rommelaere J. "Isolation of a fully infectious variant of parvovirus H-1 supplanting the standard strain in human cells". J Virol., 1995, 69:

4538-4543.

nt a305c	NS1 aa T14: silencioso y NS2 T14 aa: silencioso
nt c634a	NS1 aa P124Q
nt g1101a	NS1 aa E280K

Estas correcciones están subrayadas en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de H-1PV. Ninguna de estas correcciones afecta a los aminoácidos y a la posición de los aminoácidos en las secuencias de las proteínas NS1 y NS2 como se describen en el documento.

Figura 12: La inyección intratumoral de Del H-1PV es más eficaz para la supresión del crecimiento de tumores obtenidos a partir de células HeLa, que en comparación con H-1PV de tipo silvestre

Se inyectaron 2×10^6 células HeLa por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones BALB/c sin pelaje. Nueve días después de la implantación, se inyectaron 10^8 PFU de Del H-1PV o de H-1PV de tipo silvestre por vía intratumoral. Se realizó un seguimiento del tamaño tumoral hasta 42 días después de la inyección.

(A) Porcentaje de ratones en cada grupo que son portadores de un tumor mayor que 1000 mm^3 .

(B) Porcentaje de ratones que son portadores de tumores menores de 3000 mm^3 lo que evitó que fueran sacrificados.

Figura 13: Aumento de la síntesis de nuevo y la labilidad de las proteínas Del NS2P en comparación con las proteínas NS2P de tipo silvestre

Se infectaron 8×10^5 células NB-324K con H-1PV de tipo silvestre (wt) o Del H-1PV con una moi de 10 PFU/célula, primero se incubaron durante 18 horas en medio completo frío (es decir, no radiactivo) y, además, se incubaron con pulsos de 30 min en presencia de medio marcado con Tran^{35}S (es decir, que contenía los aminoácidos cisteína y metionina marcados con ^{35}S). Las células se recogieron de forma inmediata (punto de captura 0 min) o después de un periodo de captura adicional de 20, 40, 60 o 240 min en medio sin marcar. Las proteínas se extrajeron en tampón RIPA y las proteínas NS1 o NS2 marcadas con ^{35}S -Cys/Met, inmunoprecipitaron con los anticuerpos policlonales de conejo de SP8 y anti-NS2P, respectivamente, y se separaron por electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%, se visualizaron mediante autorradiografía.

Figura 14: Del NS2P todavía es capaz de interactuar con el factor de exportación nuclear Crm1 y con miembros de la familia de proteínas 14-3-3

(A) Los lisados de las células NB-324K, previamente tratadas de forma simulada (\emptyset), o infectadas con wt H-1PV o Del H-1PV (moi = 10 PFU/célula) durante 18 horas y marcadas metabólicamente con Tran^{35}S -Cys/Met durante 2 horas, se prepararon en presencia (+) o ausencia (-) de SDS e inmunoprecipitaron con un antisuero contra CRM1 (panel izquierdo) o contra 14-3-3 (panel derecho). Los autorradiogramas muestran un material inmunoprecipitado después de la separación mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Las posiciones de NS2 de tipo silvestre (wt) (25 kDa), Del NS2 (-18 kDa), CRM1 (123 kDa) y 14-3-3 (30 kDa) se indican en los lados izquierdo y/o derecho de la figura. α : anti; kDa: tamaños moleculares en kilodalton.

(B) Los lisados de las células NB-324K, previamente tratadas de forma simulada (\emptyset), o infectadas con wt H-1PV o Del H-1PV (moi = 10 PFU/célula) durante 18 horas y marcadas metabólicamente con Tran^{35}S -Cys/Met durante 2 horas, se prepararon en presencia (+) o ausencia (-) de SDS e inmunoprecipitaron con un antisuero policlonal de conejo dirigido contra NS2P. El autorradiograma muestra material inmunoprecipitado después de la separación por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Las posiciones de NS2 de tipo silvestre (wt) (25 kDa) y Del NS2 (-18 kDa) se indican en la parte derecha de la figura. α : anti; kDa: tamaños moleculares en kilodaltons.

Figura 15: Los viriones de Del H-1PV son más susceptibles a la desnaturalización térmica que los viriones de H-1PV de tipo silvestre

Partículas víricas completas purificadas se expusieron a diversas temperaturas indicadas (generadas en un aparato de PCR) durante 10 minutos y la cantidad de genomas víricos que se volvieron accesibles después de este tratamiento se valoró mediante PCR en tiempo real cuantitativa después de tratamiento con ADNasa y lisis alcalina. El punto A (es decir, $59,11^\circ\text{C}$) y el punto B (es decir, $61,53^\circ\text{C}$) indican las temperaturas a las que se destruyó el 50% de los viriones de Del H-1PV (línea continua) y de los viriones de H-1PV de tipo silvestre (línea discontinua), respectivamente. Esto da como resultado una diferencia de temperatura de $2,42^\circ\text{C}$. Los datos mostrados en esta figura representan la media de dos experimentos independientes.

Figura 16: Unión celular y captación mejoradas con Del H-1PV.

(A) Se infectaron 5×10^5 células NB-324K durante 1 hora a 4°C con H-1PV de tipo silvestre o Del H-1PV con una multiplicidad de infección de 10^4 genomas víricos por célula. El medio de cultivo celular se retiró y las células se lavaron con PBS antes de recoger las células mediante raspado. La cantidad de partículas completas unidas a la membrana se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real después de la lisis celular y la purificación del ADN, y se expresó como el % de partículas víricas completas totales. Los datos representan las medias de mediciones por duplicado \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes. ***p <0,001.

(B) Se infectaron 8×10^4 células NB-324K con H-1PV de tipo silvestre o Del H-1PV con una multiplicidad de infección de 10^4 genomas víricos por célula y se incubaron durante 0,5 horas, 1 hora, 2 horas o 3 horas a 37°C. El medio de cultivo celular se retiró y las partículas víricas unidas a la membrana se separaron mediante tratamiento con tripsina/EDTA. La cantidad de partículas víricas dentro de las células se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real después de la lisis celular y la purificación del ADN. Los datos representan la media de un experimento representativo realizado por triplicado. *p <0,05; **p <0,01.

Figura 17: Replicación temprana del genoma de Del H-1PV y acumulación elevada de ADN monocatenario en células NB-324K infectadas

(A) Se infectaron 9×10^5 células NB-324K con H-1PV de tipo silvestre (wt) o Del H-1PV con una multiplicidad de infección de 6844 genomas víricos por célula, y se incubaron adicionalmente en presencia de anticuerpos neutralizantes de PV1 para evitar infecciones secundarias, antes de recogerlas en los puntos de tiempo indicados después de la infección (p.i.). Las formas replicativas de ADN vírico se extrajeron de los lisados celulares, se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se sometieron a análisis de transferencia Southern. Los formas intermedias replicativas víricas se revelaron mediante hibridación con una sonda marcada radiactivamente con ^{32}P , específica de NS1 y autorradiografía. Las posiciones de las formas replicativas dímeras (dRF), formas replicativas monómeras (mRF) y el genoma monocatenario (mc) se indican en la parte derecha de la figura.

(B) Las intensidades de la señal correspondientes a la forma replicativa monómera (mRF), forma replicativa dímera (dRF) y ADN monocatenario (mc) detectadas en muestras infectadas con Del H-1PV o H-1PV de tipo silvestre fueron cuantificadas mediante un análisis Phosfo Imager. Las intensidades de la señal se representaban como la relación entre Del H-1PV y H-1PV de tipo silvestre de la mRF, dRF y ADNmc, 9 horas, 12 horas, 16 horas y 24 horas después de la infección.

Figura 18: No hay diferencia en la acumulación de formas replicativas después de la transfección de células NB-324K, ya sea con Del H-1PV o con H-1PV de tipo silvestre

Se transfectaron 2×10^6 células NB-324K con 6 μg de la estructura artificial de plásmido pwtH-1PV o pDelH-1PV y el anticuerpo neutralizante de PV1 se añadió en el medio de cultivo celular, 4 h después de la transfección (p.t.) (+PV1) con el fin de evitar infecciones secundarias. Las células se recogieron en los puntos de tiempo indicados después de la transfección y las moléculas de ADN vírico se extrajeron a partir de los lisados celulares, sometidos a digestión con DpnI, analizados por transferencia Southern, usando una sonda marcada radiactivamente con ^{32}P , específica de la región que codificaba NS1 y se detectaron por autorradiografía. mRF: forma replicativa monómera; dRF: forma replicativa dímera.

Figura 19: Aumento y/o liberación más rápida de viriones completos de Del H-1PV en el medio de células NB-324K transfectadas, en comparación con la liberación de viriones completos de H-1PV de tipo silvestre

Se transfectaron 2×10^6 células NB-324K con 6 μg de la estructura artificial de plásmido pwtH-1PV o pDelH-1PV y se incubaron adicionalmente en presencia (+PV1) o no (-PV1) de anticuerpo neutralizante de PV1. El material sobrenadante del cultivo celular se recuperó en los puntos de tiempo indicados después de la transfección (p.t.). Las moléculas de ADN monocatenario (ADNmc) se aislaron a partir de material sobrenadante de cultivos celulares transfectados mediante extracción de Hirt y se analizaron por transferencia Southern mediante hibridación con una sonda marcada radiactivamente con ^{32}P , específica de NS1 y autorradiografía. Además, la cantidad de partículas víricas completas y de partículas víricas infecciosas presentes en el material sobrenadante de las células NB-324K transfectadas, 72 horas después de la transfección, se analizó midiendo la cantidad de genomas víricos (vg) después de un tratamiento con ADNasa y lisis alcalina mediante PCR en tiempo real cuantitativa en el primer caso y la cantidad de unidades formadoras de placas (pfu) mediante ensayo en placa en el último caso. Los títulos de virus y los índices de partículas frente a la infecciosidad (P/I) se proporcionan más abajo en el autorradiograma.

Figura 20: Aumento de la infecciosidad de Del H-1PV y de Del hH-1PV producido mediante transfección de células 293T humanas, en comparación con H-1PV de tipo silvestre y hH-1PV de tipo silvestre

Poblaciones de virus de nuevo aporte de Del H-1PV, Del hH-1PV, H-1PV de tipo silvestre y hH-1PV de tipo silvestre, generadas en células 293 T humanas transfectadas, se analizaron mediante ensayo en placa para determinar el título infeccioso de las poblaciones (proporcionado en PFU por ml) y mediante PCR cuantitativa en tiempo real para determinar el título de genoma vírico (proporcionado en vg por ml). Índice P/I: índice de partículas frente a infecciosidad.

Por tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable y

- 5 (a) una variante de parvovirus H-1 (H-1 PV) que muestra mayor potencial antitumoral en comparación con el parvovirus de tipo silvestre que comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en la Fig. 11, en donde dicha variante se caracteriza por (i) la o las sustituciones en la posición Lys96 de NS-2 por un aminoácido polar hidrófilo y/o en la posición Leu103 de NS-2 por un aminoácido no polar neutro, o (ii) una delección en marco en la parte izquierda del genoma de parvovirus que afecta tanto a las secuencias de la proteína de la parte central de NS2 como de la parte C-terminal de NS-1, en donde dicha delección es desde nt 2022 a 2135, en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la Fig. 11, dando como resultado la traducción de una proteína NS-1 que tiene una delección de los aa 587 - 624 y una proteína NS-2 que tiene una delección de los aa 96 - 133, o
- 10 (b) un ADN que codifica dicha variante de parvovirus de (a), o
- (c) un vector de expresión que comprende el ADN de (b), o
- 15 (d) una célula hospedadora que contiene el vector de expresión de (c) que produce dicha variante de parvovirus de (a)

para uso en un método de tratamiento de cáncer.

Las posiciones de aminoácidos proporcionadas anteriormente son en relación con H-1PV como punto de referencia, pero el experto en la materia puede determinar fácilmente las posiciones de aa correspondientes en cualquier parvovirus basándose en la homología de las proteínas NS1/NS2.

- 20 La variante mencionada en las reivindicaciones contiene una delección en marco desde nt 2022 a 2135 que da como resultado la traducción de una proteína NS1 que tiene una delección de los aa 587 - 624 y una proteína NS2 que tiene una delección de los aa 96 - 133 (por ejemplo, Del H-1PV).

- 25 La expresión "que muestra un mayor potencial antitumoral en comparación con el parvovirus de tipo silvestre" significa que la inhibición del crecimiento de las células NB-324K el día 1 después de la infección es mayor en al menos un factor 1,4, preferiblemente al menos 1,7 y, más preferiblemente al menos 2, en comparación con el tipo silvestre.

- 30 El término "parvovirus" tal y como se usa en el presente documento comprende derivados del mismo competentes para la replicación de tipo silvestre o modificados, así como virus o vectores relacionados, basados en tales virus o derivados. Los parvovirus, derivados, etc. adecuados, así como células que se pueden utilizar para la producción de dichos parvovirus, son fácilmente determinables dentro de la experiencia de la técnica, basándose en la descripción de este documento, sin un esfuerzo empírico indebido. El término "parvovirus" comprende cualquier parvovirus, particularmente un parvovirus de roedor, tal como el virus diminuto de ratón (MVM) y el virus H-1 (H-1PV). La persona experta en la técnica puede introducir alteraciones de aminoácidos en la posición Lys96 de NS2 y/o la posición Leu103 de NS2 (junto con una en la posición Tyr595 de NS1 en el último caso) o delecciones grandes en ambas posiciones 96-133 de secuencias de proteínas NS2 y 587-624 de secuencias de proteínas NS1, según procedimientos convencionales, partiendo de la secuencia de ácido nucleico y de secuencias de aminoácidos conocidas de las proteínas estructurales y no estructurales de parvovirus, por ejemplo, de parvovirus H-1PV (véase la Figura 11 y [17], véase también [13] y [18] para las correcciones de la secuencia). La persona experta en la técnica también puede analizar fácilmente si una variante particular presenta las propiedades biológicas deseadas indicadas, empleando los ensayos explicados en los ejemplos, a continuación, por ejemplo, mediante la comparación del aumento de la infecciosidad o la inhibición del crecimiento de células de mamífero, por ejemplo, células NB-324K comparadas con el tipo silvestre.
- 35
- 40

Se prefieren las variantes de parvovirus que tienen ya sea una mutación puntual en uno o varios de los sitios descritos anteriormente, que es una sustitución de aminoácidos, o una delección grande de aminoácidos en ambas secuencias de proteínas víricas NS1 y NS2 en los sitios descritos anteriormente.

- 45 De acuerdo con la presente invención, Lys en la posición 96 de NS2 se sustituye por otro aminoácido hidrófilo polar (por ejemplo, Arg, Glu, Asp, Gln o Asn) y/o Leu en la posición 103 de NS2 se sustituye por un aminoácido no polar neutro (por ejemplo, Pro o Gly), induciendo este último una sustitución de Tyr en la posición 595 de NS1 por un aminoácido polar neutro (por ejemplo, Ser, His o Thr).

- 50 En una realización aún más preferida de la presente invención, la variante de parvovirus comprende (a) la siguiente sustitución o sustituciones de aminoácidos NS2:Lys96Glu o NS2:Leu103Pr (esta última también induce la sustitución NS1:Tyr595His), o (b) la siguiente delección de aminoácidos NS2:Δ96-133 y NS1:Δ587-624.

Particularmente preferidas son las variantes de parvovirus que comprenden la o las modificaciones siguientes:

- (a) sustitución Lys96Glu de NS2 (variante PMut2 H-1PV);
- (b) sustituciones Leu103Pro de NS2 y Tyr595His de NS1 (variante PMut1 H-1PV); o

(c) deleciones de los aa 96-133 de NS2 y aa 587-624 de NS1 (variante Del H-1PV)

La variante de parvovirus de la invención se obtiene a partir de parvovirus H-1 (H-1PV).

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un ácido nucleico, particularmente un ADN, que codifica una variante de parvovirus anterior.

5 Un ADN de acuerdo con la invención puede estar presente en un vector y en un vector de expresión, respectivamente. Una persona experta en la técnica está familiarizada con ejemplos de los mismos. En el caso de un vector de expresión para *E. coli*, estos son por ejemplo, pGEMEX, derivados de pUC, pGEX-2T, pET3b, vectores de expresión basados en T7 y pQE-8. Para la expresión en levadura se puede mencionar, por ejemplo, pY100 y Ycpad1, mientras que, por ejemplo, pCMV, PCI, pKCR, pEFBOS, cDM8, pMSCND y pCEV4 deben indicarse para la expresión en
10 células animales. El vector de expresión de baculovirus pAcSGHisNT-A es especialmente adecuado para la expresión en células de insecto.

En una realización preferida, el vector que contiene el ADN de acuerdo con la invención es un virus, por ejemplo, un adenovirus, virus vaccinia, un virus AAV o un parvovirus, tal como MVM o H-1PV, prefiriéndose un parvovirus. El vector también puede ser un retrovirus, tal como MoMULV, MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV o GaLV.

15 Para la construcción de vectores de expresión que contienen el ADN de acuerdo con la invención, es posible utilizar métodos generales conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de recombinación *in vitro*, métodos sintéticos y métodos de recombinación *in vivo*.

Además, la presente invención se refiere a células hospedadoras que contienen los vectores descritos anteriormente. Estas células hospedadoras incluyen células de bacteria, levadura, insecto y animal, preferiblemente células de mamífero. Se prefieren las cepas de *E. coli* HB101, DH1, x1776, JM101, JM109, BL21, XL1Blue, SG 13009 y Sure[®], siendo esta última la preferida para vectores basados en el genoma completo de parvovirus, la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y las células animales L, A9, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, 293T y NB-324K, siendo las dos últimas preferidas para los vectores de H-1PV, y las células de insecto Sf9. Los métodos para transformar estas células hospedadoras, para seleccionar fenotípicamente transformantes y para expresar el ADN de acuerdo con la invención mediante el uso de los vectores descritos anteriormente, son conocidos en la técnica.
25

Por lo tanto, la presente solicitud proporciona también un método para producir la variante de parvovirus de la invención, que comprende el cultivo de un transformante de la invención en condiciones adecuadas y recoger la variante de parvovirus de las células o del medio.

Además, la presente solicitud se refiere a anticuerpos que reconocen específicamente una proteína NS1 o NS2 de la variante de parvovirus descrita anteriormente, es decir, la región de la proteína de la variante de parvovirus en donde se encuentra la mutación responsable del mayor potencial antitumoral, en comparación con el tipo silvestre. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, policlonales o sintéticos, o fragmentos de los mismos, por ejemplo fragmentos Fab, Fv o scFv. Preferiblemente, se trata de anticuerpos monoclonales. Para la producción es favorable inmunizar animales - particularmente conejos o cabras para un anticuerpo policlonal y ratones para un anticuerpo monoclonal - con la o las proteínas no estructurales de una variante de parvovirus anterior o con fragmentos de las mismas. Otros refuerzos de los animales pueden estar afectados con la o las mismas proteínas no estructurales de una variante de parvovirus o con fragmentos de las mismas. El anticuerpo policlonal se puede obtener entonces a partir del suero de los animales y se puede purificar adicionalmente. El anticuerpo monoclonal se puede obtener de acuerdo con métodos convencionales, haciendo referencia en particular al método de Kohler y Milstein [19 - Nature 256 (1975), 495] y Galfrè y Milstein [20 - Meth. Enzymol. 73 (1981), 3]. En este caso, se fusionan células de mieloma de ratón con células de bazo procedentes de los animales inmunizados. Los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden utilizar de muchas maneras, por ejemplo, para la inmunoprecipitación de proteínas no estructurales de la variante, expresadas desde las variantes de parvovirus descritas anteriormente, o para el aislamiento de las mismas. Los anticuerpos se pueden unir en inmunoensayos en fase líquida o a un soporte sólido. A este respecto, los anticuerpos se pueden marcar de varias maneras. La persona experta en la técnica está familiarizada con marcadores adecuados y métodos de marcación. Ejemplos de inmunoensayos son ELISA, RIA, así como (co)inmunoprecipitación, inmunofluorescencia e inmunotransferencia.
30
35
40
45

Por lo tanto, la presente invención proporciona productos que son adecuados para fines terapéuticos (y de diagnóstico). En particular, vectores de expresión de acuerdo con la invención, por ejemplo, parvovirus, se pueden utilizar para mediciones de genes terapéuticos. Por otra parte, las variantes de parvovirus de acuerdo con la invención son adecuadas como toxinas, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades tumorales.
50

Por lo tanto, también se proporciona un kit para la aplicación de la presente invención. Este kit comprende lo siguiente:

(a) una variante de parvovirus de acuerdo con la invención,

55 (b) un ADN de acuerdo con la invención, por ejemplo, un vector de expresión, particularmente un parvovirus,

(c) un anticuerpo de acuerdo con la invención, así como

(d) agentes auxiliares convencionales, tales como disolventes, tampones, vehículos, marcadores y controles.

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

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que contiene una variante de parvovirus de la invención, un vector o una célula que produce dicha variante de parvovirus ("agente parvoterapéutico" o "composición parvoterapéutica"), por ejemplo, células humanas 293 (T), NB-324K o RG2 de rata.

Para la administración, el agente parvoterapéutico se puede combinar con vehículos farmacéuticos adecuados. Los vehículos farmacéuticos adecuados de un tipo bien conocido en la técnica y fácilmente disponibles comercialmente, incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato (PBS), agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, agentes humectantes de varios tipos, medios de contraste (por ejemplo, Visipaque), soluciones estériles, etc. Tales vehículos se pueden formular con el o los agentes parvoterapéuticos mediante métodos de formulación convencionales para administrar al sujeto en una dosis adecuada.

Los vehículos farmacéuticamente compatibles adicionales pueden incluir geles, materiales de matriz bioabsorbible, elementos de implantación que contienen el agente terapéutico, o cualquier otro vehículo adecuado, medio o material(es) de entrega o dispersión.

Los pacientes que se pueden tratar con los agentes parvoterapéuticos de la invención incluyen seres humanos así como animales no humanos. Ejemplos de estos últimos incluyen, sin limitación, animales tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros y gatos.

La administración de las composiciones farmacéuticas parvoterapéuticas a un paciente, por ejemplo, un paciente con tumor cerebral, se puede efectuar según cualquiera de numerosas vías adecuadas, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intracraneal e intratumoral. La vía de administración depende, por supuesto, de la naturaleza de la enfermedad y del o de los agentes terapéuticos específicos contenidos en la composición farmacéutica.

Si uno o varios agentes parvoterapéuticos de este tipo comprenden partículas víricas infecciosas con capacidad de penetrar a través de la barrera hematoencefálica, el tratamiento se puede realizar o al menos iniciar mediante inyección intravenosa del agente terapéutico vírico, por ejemplo, una variante de H-1PV.

Dado que un tratamiento intravenoso a largo plazo es susceptible de convertirse en ineficaz debido a la formación de anticuerpos neutralizantes para el agente terapéutico vírico, se pueden adoptar diferentes modos de administración después de un régimen inicial de administración vírica intravenosa, o técnicas de administración diferentes de este tipo, por ejemplo, una administración intracraneal o intratumoral del virus, se puede utilizar alternativamente, a lo largo de todo el tratamiento con parvovirus.

Como otra técnica de administración específica, el agente parvoterapéutico (virus, vector y/o agente celular) se puede administrar al paciente a partir de una fuente implantada en el paciente. Por ejemplo, un catéter, por ejemplo, de silicona u otro material biocompatible, se puede conectar a un depósito subcutáneo pequeño (depósito Rickham) instalado en el paciente durante la extracción del tumor o por un procedimiento distinto, para permitir que la composición parvoterapéutica sea inyectada localmente en varias veces sin una intervención quirúrgica adicional. La variante de parvovirus o los vectores derivados también se pueden inyectar, por ejemplo, en un tumor, por técnicas quirúrgicas estereotácticas o por técnicas de neuronavegación dirigidas a la diana.

La administración de los agentes o las composiciones parvovíricas también se puede realizar mediante infusión continua de partículas víricas o fluidos que contienen partículas víricas a través de catéteres implantados, con caudales bajos utilizando sistemas de bombeo adecuados, por ejemplo, bombas de infusión peristáltica o bombas de entrega mejorada por convección (CED).

Aún otro método de administración de la composición parvoterapéutica es desde un dispositivo implantado construido y dispuesto para dispensar el agente parvoterapéutico en el lugar deseado, por ejemplo, un tumor. Por ejemplo, se pueden emplear obleas que han sido impregnadas con la composición parvoterapéutica, por ejemplo, una variante de parvovirus H-1, en donde la oblea se fija a los bordes de la cavidad de la resección al final de la extirpación quirúrgica del tumor. Se pueden emplear múltiples obleas en una intervención terapéutica de este tipo.

Las células que producen activamente el agente parvoterapéutico, por ejemplo, una variante H-1PV de parvovirus, o vectores de H-1PV, se pueden inyectar en el tejido deseado, por ejemplo, un tumor o en una cavidad tumoral después de la extirpación del tumor.

Las combinaciones de dos o más de los modos de administración descritos anteriormente, se pueden emplear en cualquier forma adecuada, por ejemplo, de forma simultánea, contemporánea o secuencial.

El régimen de dosificación del agente parvoterapéutico es fácilmente determinable dentro de la experiencia de la técnica, por el médico encargado, basándose en los datos del paciente, observaciones y otros factores clínicos,

incluyendo, por ejemplo, el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el sexo, el virus particular, el vector, la célula, etc. que se va a administrar, el tiempo y la vía de administración, el tipo de enfermedad, por ejemplo, tipo de tumor y sus características, la salud general del paciente y otros fármacos o terapias a las que está siendo sometido el paciente.

5 Por consiguiente, la presente invención también se refiere al uso de una variante de parvovirus de acuerdo con la presente invención, una célula que produce dicha variante de parvovirus, un ADN, un vector de expresión o un anticuerpo de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer. Los cánceres preferidos son carcinoma de páncreas, carcinoma de cuello uterino, hepatoma y linfoma y se espera que sean particularmente susceptibles de tratamiento con un agente de la presente invención.

10 Los ejemplos siguientes explican la invención más detalladamente.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

(A) Células y reactivos

15 Células NB-324K renales humanas de recién nacido, transformadas con virus 40 de simio [21] se propagaron en medio esencial mínimo de Eagle (Sigma-Aldrich), complementado con 5% de suero bovino fetal, glutamina y antibióticos (100 µg/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Alemania).

20 Líneas celulares PDAC humanas Panc-1 y MiaPaCa-2 (establecidas a partir de tumores primarios) fueron proporcionadas amablemente por A. Vecchi (Instituto Clínico Humanitas, Rozzano, Italia). La línea celular HeLa+ humana fue proporcionada amablemente por E. Schwarz (Centro Alemán de Investigación del Cáncer, Heidelberg, Alemania). Las células Panc-1, MiaPaCa-2 y HeLa+ se cultivaron en medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania) complementado con 10% de suero bovino fetal (PAA Laboratories, Pasching, Austria) y L-glutamina 2 mM (Gibco/Invitrogen).

25 La línea celular 293T de riñón embrionario humano transformada con Ad5, antígeno T de SV40 [28], fue cultivada en medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM, Sigma), complementado con 10% de FCS, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

(B) Infección vírica y producción

Las infecciones víricas se realizaron a 37°C durante 1 hora con un inóculo de 400 µl por placa de cultivo celular de 6 cm (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) de virus purificado, diluido en medio de cultivo celular sin complementos y oscilación periódica de la placa.

30 Las variantes Del H-1 PV y PMut H-1PV se produjeron principalmente mediante transfección de células 293T como se ha descrito anteriormente [18], utilizando la estructura artificial de plásmido apropiado. Las variantes H-1PV, así como H-1PV de tipo silvestre, fueron producidas posteriormente mediante infección de células NB-324K con una multiplicidad de infección (moi) baja, es decir, 10^{-3} PFU/célula. El día 3 después de la infección o en el momento de la aparición de efectos citopáticos, se recogieron las células y se lisaron en tampón VTE (Tris 50 mM pH 8,7, EDTA 0,5 mM) por medio de tres ciclos de congelación-descongelación. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación y las poblaciones de virus se purificaron mediante centrifugación en gradiente por etapas de iodixanol [22].

35 Para la medición de la producción de virus en la progenie, se infectaron 1×10^5 células con variantes H-1PV o H-1PV de tipo silvestre, con una moi de 0,5 PFU/célula. En varios puntos de tiempo después de la infección, se recogió el medio y el cultivo infectado se extrajo y se sometió a tres ciclos de congelación-descongelación en tampón VTE. Los títulos de virus se determinaron tanto para el extracto celular como para el medio de cultivo mediante ensayo en placa.

(C) Titulación de virus infecciosos

45 Las poblaciones de virus se titularon mediante ensayo en placa [23] o ensayo de hibridación de células infectadas [24] sobre células NB-324K indicadoras. Los títulos de virus se expresan como unidades formadoras de placas (PFU) o unidades de replicación (RU) por mililitro de suspensión de virus, tal y como se describe en otra parte [18, 23, 25].

(D) Titulación de partículas víricas completas

50 La cantidad de partículas víricas completas presentes en una población de virus se determinó mediante ensayos de hibridación cuantitativa de transferencia de puntos, tal y como se ha descrito anteriormente [26] y se expresó como partículas víricas completas por mililitro de suspensión de virus.

(E) Medición de la inhibición del crecimiento

La cinética del crecimiento de las células NB-324K infectadas se controló mediante análisis de área con pulsos electrónicos, utilizando un sistema de recuento de células Casy (Casy, Reutlingen, Alemania).

(F) Inmunotransferencia

5 Se infectaron $1,5 \times 10^5$ células NB-324K con Del H-1PV, PMut1 H-1PV, PMut2 H-1PV o H-1PV de tipo silvestre con una moi de 3 PFU/célula. Las células se recogieron 6, 8, 24 y 48 horas después de la infección y se lisaron en tampón RIPA (NaCl 150 mM, Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM pH 8,0, 1% de NP-40, 0,5% de desoxicolato de sodio, 0,1% de SDS) complementado con inhibidores de proteasa (Roche, Alemania). Después de la cuantificación de proteínas (ensayo de proteínas de Bio-Rad, Bio-Rad Laboratories, Múnich, Alemania), 10 μ g de proteínas totales se separaron por electroforesis en gel de SDS y poli(acrilamida al 12% (SDS-PAGE) y se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa Protran (PerkinElmer Life Sciences, Überlingen, Alemania). Las membranas se incubaron primero con antisuero policlonal de conejo dirigido contra NS1 (SP8, [27]), contra NS2 (α -NS2p, [18]) o contra proteínas de la cápside vírica (α -VPpep, [25]) y segundo con el anticuerpo secundario apropiado acoplado a peroxidasa de rábano (Promega, Mannheim, Alemania). Las proteínas inmunorreactivas se revelaron además mediante un aumento de la quimioluminiscencia (GE Healthcare Europe, Friburgo, Alemania).

15 (G) Fraccionamiento de proteínas nucleares y citoplasmáticas de células cultivadas infectadas

Se infectaron 5×10^5 células NB-324K con una moi de 1 PFU/célula con Del H-1PV, PMut1 H-1PV, PMut2 H-1PV, PMut4 H-1PV o H-1PV de tipo silvestre. Las células se recogieron 16, 20, 24 y 42 horas después de la infección, y se realizó un fraccionamiento de las proteínas nucleares y citoplasmáticas mediante el kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific, Rockford, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. El número de partículas infecciosas presente en cada fracción se determinó mediante ensayo en placa y se expresó como PFU total.

20 (H) Medición de la clonogenicidad celular

Las células NB-324K se infectaron con H-1PV de tipo silvestre o Del H-1PV con varias moi. Cuatro horas después de la infección, las células se recogieron mediante tripsinización y se sembraron de nuevo en placas de cultivo celular de 6 cm como células individuales, es decir, 100 a 200 células por placa. Después de 13 a 17 días de incubación en medio completo que contenía 2,5% de suero de PV1 anti-cápside H-1, las células se fijaron y se tiñeron con solución de cristal violeta (1 g de cristal violeta diluido en 100 ml de EtOH al 70%). Las colonias celulares se contaron y se expresaron para cada moi como un porcentaje de células supervivientes, en comparación con células tratadas de forma simulada.

30 (I) Inmunofluorescencia

Se cultivaron $1,5 \times 10^4$ células NB-324K sobre cubreobjetos (portaobjetos de microscopio para diagnóstico, Erie Scientific Company, Portsmouth, EE.UU.) y se infectaron con Del H-1PV o H-1PV de tipo silvestre con una moi de 3 PFU/célula. Las células se fijaron en 3,7% de formaldehído 15 y 21 horas después de la infección durante 10 min, se trataron con metanol frío durante 5 min, acetona fría durante 2 minutos y se permeabilizaron con 0,2% de Triton X-100 ([4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenol]etoxilato) durante 10 min. Después de lavar con PBS, las células se trataron con una solución de bloqueo que contenía suero bovino fetal al 10% durante aproximadamente 30 min. Las células se incubaron después sucesivamente con el anticuerpo monoclonal de ratón 3C3F12 (dilución 1:100) (C. Dinsart, sin publicar) como anticuerpo primario, y con un anticuerpo de burro conjugado con Alexa Fluor 488 anti-ratón (dilución 1:600; Santa Cruz Biotechnology, Eugene, Oregon, EE.UU.) como anticuerpo secundario, durante 1 hora cada uno a temperatura ambiente, seguido de tres lavados con solución salina tamponada con fosfato. Todas las soluciones y diluciones se prepararon en solución salina tamponada con fosfato. Después de una tinción rápida del ADN con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), los cubreobjetos se secaron con etanol y se montaron sobre portaobjetos de vidrio en presencia de poli(alcohol vinílico) (Elvanol; Serva, Heidelberg, Alemania). Las muestras se examinaron con un microscopio Leica DMRBE con x63 aumentos con un objetivo de inmersión en aceite y las imágenes se capturaron con una cámara digital Hamamatsu Orca y se procesaron utilizando los programas informáticos Openlab2 (Improvision, Reino Unido) y Adobe Photoshop CS2. Con el fin de determinar el porcentaje de un determinado fenotipo, se examinaron 200 células por fenotipo.

45 (J) Medición *in vivo* de la supresión tumoral

Se infectaron 4×10^7 células Panc-1 *in vitro*, bien con Del H-1PV o con H-1PV de tipo silvestre con una moi de 3 RU/célula. Cuatro horas después de la infección, se implantaron 5×10^6 células por ratón por vía subcutánea (s.c.) en el flanco derecho de ratones Balb/c sin pelaje. A 7 ratones sin pelaje se inyectaron células tratadas de forma simulada (es decir, tratadas con tampón), a 7 ratones sin pelaje se inyectaron células infectadas con H-1PV de tipo silvestre, mientras que a 6 ratones sin pelaje se inyectaron células infectadas con Del H-1PV.

Los ratones (hembras de 6 a 7 semanas de edad, cinco animales por jaula) se mantuvieron en unidades de aislamiento a 21-24°C, 40-60% de humedad. Los tamaños de los tumores se midieron con un calibre dos a tres veces a la semana durante un período de tiempo de aproximadamente 3 meses. El volumen del tumor se calculó según la fórmula $V = 1/2 \times \text{longitud} \times (\text{anchura})^2$ y se expresó como la media del volumen total (mm^3) o como el porcentaje de

ratones de un grupo que eran portadores de un tumor más grande que 290 mm³.

Se inyectaron 2 x 10⁶ células HeLa por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones Balb/c sin pelaje. Nueve días después de la implantación, a 5 ratones sin pelaje se inyectaron 100 µl de PBS a cada uno, a 5 ratones sin pelaje se inyectaron 10⁸ pfu de Del H-1PV (en 100 µl de PBS) a cada uno, a 5 ratones sin pelaje se inyectaron 10⁸ pfu de H-1PV de tipo silvestre (en 100 µl de PBS) a cada uno. Los ratones (hembras de 6 a 7 semanas de edad, 5 animales por jaula) se mantuvieron en unidades de aislamiento a 21°C-24°C, 40-60% de humedad. Los tamaños de los tumores se midieron con un calibre dos a tres veces a la semana durante un período de tiempo de aproximadamente 6 semanas. El volumen del tumor se calculó según la fórmula $V = 1/2 \times \text{longitud} \times (\text{anchura})^2$ y se expresó como la media del volumen total (mm³) o como el porcentaje de ratones de un grupo que eran portadores de un tumor más grande que 1000 mm³.

(K) Radiomarcado metabólico por captura de un pulso radiactivo (del inglés "pulse-chase") y extractos celulares

Se infectaron 9 x 10⁵ células NB-324K con Del H-1PV o H-1PV de tipo silvestre con una moi de 3 PFU/célula o se trataron de forma simulada (es decir, tratadas con tampón). Los cultivos se marcaron metabólicamente 18 h después de la infección, durante 30 minutos con 200 µCi de marcador Tran³⁵S (1175 Ci/mmol; MP Biomedicals) en medio de Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) exento de Met y Cys, complementado con 5% de suero de ternera fetal dializado, 1% de L-glutamina y 1% de gentamicina. Después el medio de marcado se aspiró y las células se lavaron una vez con MEM sin suero. Las células se lisaron posteriormente o se incubaron de nuevo a 37°C en medio completo sin marcar (captura) y se lisaron adicionalmente en varios puntos de tiempo posteriores a la incubación, con el fin de investigar la degradación de proteínas sintetizadas, marcadas. La lisis se llevó a cabo utilizando tampón RIPA (NaCl 150 mM, Tris 10 mM [pH 7,5], EDTA 1 mM [pH 8,0], 1% [v/v] de Nonidet P-40, 0,5% de desoxicolato de sodio, 0,1% [p/v] de dodecilsulfato sódico (SDS)) complementado con una mezcla de inhibidores de proteínasa (Complete, Roche, Mannheim, Alemania). Las proteínas se recogieron después de eliminar los restos celulares mediante centrifugación en una centrífuga de Eppendorf a velocidad máxima durante 10 min a 4°C.

(L) (Co-)inmunoprecipitación de proteínas celulares y víricas

Se incubaron 5 x 10⁶ cpm de extractos de proteínas marcadas a 4°C durante 1 hora con rotación continua (Reax 2, Heidolph) y en presencia de 8 a 10 µl de antisuero policlonal de conejo dirigido contra proteínas NS1 de H-1PV, NS2 de H-1PV, CRM1 humano o 14-3-3 y además se incubaron durante 1 hora a 4°C después de la adición de 100 µl de proteína A Sefarosa (6MB, GE Healthcare) a cada muestra. Las muestras se centrifugaron durante 5 min a 5500 rpm y 4°C (Sigma 2K15). A continuación, los complejos de perlas de proteína-anticuerpo se lavaron tres veces, cada vez con 1 ml de tampón RIPA (+/- SDS). El sedimento de las muestras se resuspendió en un volumen apropiado de 2x SDS-colorante de carga (80 - 100 µl) y las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% [p/v]. Después de 30 min de incubación con Amplify (Amersham), los geles se secaron y se expusieron adicionalmente a películas de autorradiografía (BioMax, MS Film, Kodak).

(M) Termodesnaturalización de virus y detección de ADN vírico empaquetado mediante PCR cuantitativa en tiempo real

Una dilución de ADNasa-tampón (Tris-HCl 400 mM [pH 8,0], MgSO₄ 100 mM, CaCl₂ 10 mM; Promega, Mannheim, Alemania) que contenía 10⁹ partículas víricas completas de Del H-1PV purificado o H-1PV de tipo silvestre purificado, se calentó a una temperatura definida (las temperaturas variaron desde 50°C a 70°C y se generaron con un aparato de PCR) durante 10 minutos. Las muestras se trataron posteriormente con ADNasa [0,1 U/µl; Promega, Mannheim, Alemania] durante 1 hora a 37°C. Con el fin de poder determinar el número de cápsides intactas, las partículas víricas se destruyeron por lisis alcalina y el ADN vírico empaquetado se detectó mediante PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otra parte [29], utilizando Mastercycler[®] ep realplex (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Las mezclas de reacción individuales (20 µl) contenían 1x TaqMan Universal PCR Master MixTM (Applied Biosystems), sonda de NS1-TagManTM marcada 0,28 µM, 0,28 µM de cada cebador directo e inverso y 2,85 µl de molde. Los títulos de virus se expresaron como genomas víricos por ml de suspensión de virus (vg/ml) y se calcularon de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Título de virus [vg/ml]} = I_Q [1/\text{ml}] \cdot 35000$$

$$\text{Factor 35000} = [46,7 \mu\text{l} / (6,7 \mu\text{l} \times 20 \mu\text{l})] \times (100 \mu\text{l} / 10 \mu\text{l}) \times 1000 \mu\text{l}$$

IQ indica la intensidad de la fluorescencia cuantificada de una muestra y el factor 35000 es necesario para calcular la cantidad por pocillo (46,7 µl/(6,7 µl x 20 µl), por cada 10 µl de suspensión de virus utilizado para la lisis alcalina (1000 µl/10 µl) y por ml (1000 µl) con el fin de expresar el título de virus por ml de la solución de población de virus.

(N) Unión del virus a células NB-324K humanas

Se infectaron 5 x 10⁵ células NB-324K humanas con H-1PV de tipo silvestre o Del H-1PV con una moi de 104 vg/célula y se incubaron después durante 1 hora a 4°C. Las células se lavaron con 1x PBS helado, se rasparon en 500 µl de 1x PBS, y se sedimentaron por centrifugación durante 5 min a 3500 rpm y 4°C (centrífuga 5417R, Eppendorf). El material sobrenadante se guardó en tubos Eppendorf. Las células se resuspendieron después en 200 µl de

1x PBS helado y el ADN se purificó después de la lisis celular utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Los lisados celulares se incubaron a 85°C durante 30 min (HBT 130, Haep Labor Consult) con el fin de desnaturalizar las partículas víricas, y el ADN vírico liberado se recuperó por extracción de Hirt. La cuantificación de los genomas víricos presentes en la fracción sobrenadante o unidos a las células se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otra parte [28].

(O) Captación de virus

Se infectaron 8×10^4 células NB-324K con H-1PV de tipo silvestre o Del H-1PV con una moi de 104 vg/célula y se incubaron adicionalmente a 37°C. En los puntos de tiempo posteriores a la infección (en el intervalo de 0,5 a 3 h), las células se lavaron con 1xPBS y las partículas víricas unidas a la membrana se separaron mediante tratamiento con tripsina/EDTA (Invitrogen). A continuación, las células se sedimentaron por centrifugación durante 5 min a 3500 rpm a temperatura ambiente (centrífuga 5417R, Eppendorf). Las células se lisaron empleando el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) según las instrucciones del fabricante y el ADN vírico internalizado se extrajo por extracción de Hirt. La cuantificación de los genomas víricos internalizados se determinó por PCR cuantitativa en tiempo real como se describe en otra parte [28].

(P) Extracción de ADN vírico de bajo peso molecular a partir de células de mamíferos (extracción de Hirt)

La extracción de ADN vírico de bajo peso molecular a partir de células infectadas o transfectadas o a partir de material sobrenadante celular se llevó a cabo por extracción de Hirt como se describe en otra parte [30] o con el kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen).

(Q) Transferencia Southern

Las formas replicativas de ADN vírico se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Después de dos tratamientos de desnaturalización de 30 min cada uno y dos tratamiento de neutralización de 15 min en cada uno de los geles, las moléculas de ADN se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa (Protran, GE Healthcare) durante 15-20 horas a temperatura ambiente, mediante acción capilar en presencia de 10x tampón SSC. La membrana se retiró de la transferencia y las moléculas de ADN se inmovilizaron por tratamiento con UV de la membrana. La membrana se hibridó después con una sonda específica de NS marcada radiactivamente con ^{32}P y se expuso adicionalmente a películas de autorradiografía (película BioMax, MS, Kodak) a -80°C.

(R) Transfección

- Transfección utilizando CaPO_4

6 μg de ADN plasmídico de pwtH-1PV y pDelH-1PV precipitaron en una mezcla de una solución salina tamponada con HEPES y una solución de cloruro de calcio (CaCl_2), como se describe en otra parte [28] y se añadieron adicionalmente a 2×10^6 células 293T cultivadas en una placa de 10 cm en medio completo, antes de la incubación a 37°C y 5% de CO_2 .

- Transfección utilizando Lipofectamina 2000

El medio de cultivo celular completo se intercambié 30 - 60 min antes de la transfección por medio fresco desprovisto de complementos. Mientras tanto, se diluyeron 6 μg de ADN plasmídico de pwtH-1PV y pDelH-1PV en OPTI-MEM (Invitrogen) y se preparó una mezcla de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y OPTI-MEM, como se describe en el protocolo del fabricante. Las dos soluciones se mezclaron y después de una incubación a temperatura ambiente durante 25 min, la mezcla se añadió gota a gota al medio de cultivo celular de células NB-324K subconfluentes. Cuatro horas después de la transfección (p.t.), el medio de transfección se substituyó por medio de cultivo celular completo de nuevo aporte.

Ejemplo 2

Construcción de variantes de parvovirus

(A) Variante Del H-1PV

La deleción en la secuencia que codifica NS del genoma de H-1PV (es decir, $\Delta 2022-2135\text{nts}$) se construyó mediante PCR con la ayuda del plásmido pSR19 [13] y los cebadores indicados en la Tabla 1. El fragmento *ApoI-HindIII* que contenía la región delecionada se escindió del ADN mutado y posteriormente se substituyó por el fragmento *ApoI-HindIII* de tipo silvestre equivalente en el vector deseado, para generar la estructura artificial del plásmido pDelH-1PV. La estructura artificial se verificó mediante secuenciación de todo el fragmento *ApoI-HindIII* substituido (GATC Biotech, Constance, Alemania).

Tabla 1

Estructura artificial	Molde	Secuencia del cebador (5' → 3')
-----------------------	-------	---------------------------------

Estructura artificial	Molde	Secuencia del cebador (5' → 3')
pDelH-1PV	pSR19	¹ ctataaattcgctaggttcaatgcgctcaccatctctgactc cgagccaaaacactggggaggctgggtcc (SEQ ID NO:1)
		² gaaagcttaggtgcaaagctcgctgg (SEQ ID NO:2)
Cebadores ¹ directos e ² inversos.		

(B) Variantes PMut H-1PV

5 La introducción de mutaciones puntuales individuales y dobles en el clon de H-1PV infeccioso pSR19, se realizó por mutagénesis dirigida al sitio usando el kit de QuickChange® Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, Amsterdam, Países Bajos) según las instrucciones del fabricante y los cebadores descritos en la Tabla 2. Todas las estructuras artificiales se verificaron por secuenciación (GATC Biotech, Constance, Alemania).

Tabla 2

Estructura artificial	Molde	Secuencia del cebador (5' → 3')
pPMut1H-1PV	pSR19	¹ cgctctcagccaaaaccgctcttactccac (SEQ ID NO:3)
		² gtggagtaagagcgtcjtgttgctgagaggcg (SEQ ID NO:4)
pPMut2H-1PV	pSR19	¹ atctctgactccgaggagtacgcctctcagc (SEQ ID NO:5)
		² gctgagaggcgtactcctcggagtcagagat (SEQ ID NO:6)
pPMut3H-1PV	pSR19	¹ caacggagcccaacatggtccgagatcga (SEQ ID NO:7)
		² tcgatctcggaccatggtggctccgttg (SEQ ID NO:8)
pPMut4H-1PV	pPMut1H-1PV	¹ atctctgactccgaggagtacgcctctcagc (SEQ ID NO:9)
		² gctgagaggcgtactcctcggagtcagagat (SEQ ID NO:10)
Cebadores ¹ directos e ² inversos. Los nucleótidos mutados están subrayados.		

Ejemplo 3

10 **Aumento de la infecciosidad de Del H-1PV en comparación con H-1PV de tipo silvestre e infecciosidad similar o incluso mejor de las variantes PMut1 H-1PV y PMut2 H-1PV en comparación con Del H-1PV**

La infecciosidad de una población de virus se define por el índice de partículas víricas completas (P) frente a partículas infecciosas (I), es decir, el índice P/I. Por lo tanto, cuanto menor es el índice P/I, mayor es la infecciosidad de la población de virus.

15 La Figura 2 muestra el índice P/I (índice de partículas frente a infecciosidad) de diferentes variantes por delección y mutación puntual de H-1PV, en comparación con el de H-1PV de tipo silvestre procedente de poblaciones de virus recién generadas en células NB-324K. Para cada población de virus, la cantidad de partículas completas se determinó de acuerdo con el título del genoma de esa población, mientras que la cantidad de partículas infecciosas se determinó de acuerdo con la capacidad de las partículas completas (i) para formar placas (proporcionada en plaques-forming unit o PFU), y (ii) para replicar su genoma (proporcionada en "replicative unit" o RU) en la línea celular de referencia NB-324K. Se determinaron adicionalmente dos índices P/I mediante una comparación de la cantidad de partículas completas (es decir, cápsides que contenían un genoma vírico):

- primero con la cantidad de pfu (que caracteriza viriones completos capaces de difundirse en el cultivo a través de la lisis celular) (Figura 2 índice 1), y
- 25 - segundo con la cantidad de ru (que caracteriza viriones completos capaces de amplificar su genoma) (figura 2 índice 2).

30 Como se muestra en la Figura 2, las variantes por mutación puntual PMut1 H-1PV y PMut2 H-1PV, así como la variante por delección Del H-1PV, mostraban un índice P/I inferior que H-1PV de tipo silvestre, en lo que respecta a la capacidad de las partículas completas para amplificar su genoma (Fig. 2; índice 2) o para propagarse en el cultivo celular (Fig. 2; índice 1). De hecho, el índice P/I de Del H-1PV y de PMut2 H-1PV y el de PMut1 H-1PV era menor en al menos un factor 5 y 8, respectivamente, en comparación con el índice P/I de H-1PV de tipo silvestre. Esto indica

una mayor infecciosidad de estas variantes, mostrando PMut1 H-1PV el nivel más alto.

En contraste, las variantes por mutación puntual PMut3 H-1PV y PMut4 H-1PV mostraron un índice P/I más alto, y por lo tanto peor, que las otras tres variantes (Del H-1PV, PMut1 H-1PV y PMut2 H-1PV) con respecto a la capacidad de los viriones completos para amplificar su genoma y propagarse. Estas dos variantes también mostraron un índice P/I peor (es decir, 2 veces mayor) que el de H-1PV de tipo silvestre, al menos en función de su capacidad para propagarse en el cultivo celular. Estos datos indican una infecciosidad reducida de ambas variantes por mutación puntual, PMut3 H-1PV y PMut4 H-1PV. Vale la pena señalar que las mutaciones puntuales que se introdujeron en PMut1 y PMut2 H-1PV, solamente incrementaban la infecciosidad de la variante, mientras que una combinación de ambas mutaciones puntuales, como en PMut4 H-1PV, parecía tener un efecto opuesto y daba lugar a más partículas completas no infecciosas que infecciosas.

Resumiendo, la infecciosidad de la variante por mutación puntual PMut1 H-1PV (NS2 Leu103Pro y NS1 Tyr595His) es aún mejor que la de la variante por delección Del H-1PV (Δ nt 2022 - 2135) o la variante por mutación puntual PMut2 H-1PV (NS2 Lys96Glu), en donde la infecciosidad de las dos últimas ya estaba significativamente incrementada (es decir, en al menos un factor 5) en comparación con la de H-1PV de tipo silvestre.

15 Ejemplo 4

Propagación incrementada y/o más rápida de Del H-1PV en comparación con H-1PV de tipo silvestre en células NB-324K infectadas

La producción de virus de la variante por delección Del H-1PV y de las variantes por mutación puntual PMut1 H-1PV, PMut2 H-1PV y PMut3 H-1PV, así como H-1PV de tipo silvestre se analizaron mediante ensayo en placa. Además de permitir la determinación de un título, este método muestra la capacidad de un virus para formar placas, lo que significa su capacidad para infectar células vecinas y de ese modo propagarse en un cultivo celular monocapa. Vale la pena señalar que un ensayo en placa siempre da lugar a una mezcla de placas pequeñas y grandes, independientemente de la población de virus, debido probablemente al hecho de que las células se encuentran en diferentes etapas del ciclo celular cuando se infectan, aunque el ciclo de replicación de parvovirus solo puede comenzar en la fase S del ciclo celular. Sin embargo, cuanto más grande es la placa y mayor es la cantidad de placas grandes producidas por un virus, mejor será la capacidad de este virus para propagarse en un cultivo celular.

La Figura 3A ilustra el tamaño de las placas formadas por diversas variantes de H-1PV y H-1PV de tipo silvestre en la línea celular de referencia NB-324K. PMut3 H-1PV producía claramente placas más pequeñas que H-1PV de tipo silvestre, lo que sugiere una menor eficacia de la propagación de este mutante, al menos en células NB-324K humanas. Estos datos también están de acuerdo con la menor infecciosidad descrita anteriormente de esta variante en células NB-324K (véase el ejemplo 3 y la figura 2).

Por el contrario, las placas producidas por las otras tres variantes PMut1 H-1PV, PMut2 H-1PV y Del H-1PV eran en general más grandes que las obtenidas con PMut3 H-1PV, lo que sugiere una mejor eficacia de la propagación con estas variantes. Sin embargo, PMut2 H-1PV y PMut1 H-1PV parecían producir placas más pequeñas y más grandes, respectivamente, que las obtenidas con H-1PV de tipo silvestre. Otros experimentos se realizaron con el fin de determinar los diferentes tamaños de las placas formadas por estas dos variantes por mutación puntual y su proporción, en comparación con los obtenidos con H-1PV de tipo silvestre o Del H-1PV.

Como se muestra en la Figura 3A, la variante por delección Del H-1PV producía placas más grandes que las de H-1PV de tipo silvestre. De hecho, Como se muestra en la Figura 3B, se formó una mayor proporción de placas grandes, es decir, mayores de 25 mm², después de la infección con la variante Del H-1PV, mientras que H-1PV de tipo silvestre producía una mayor proporción de placas pequeñas, es decir, de hasta 20 mm². Por otra parte, Del H-1PV dio lugar a un tamaño mayor promedio y máximo de las placas (19 mm² y 118 mm², respectivamente), en comparación con H-1PV de tipo silvestre (13 mm² y 67 mm², respectivamente). En otras palabras, el tamaño promedio de las placas obtenidas con la variante Del H-1PV es mayor en un factor de 1,5, comparado con el obtenido con H-1PV de tipo silvestre, lo que sugiere una mejor eficacia de la propagación y/o un ciclo infeccioso más rápido de la variante Del H-1PV. Estos datos también están de acuerdo con la mayor infecciosidad descrita anteriormente para esta variante Del H-1PV en las células NB-324K (véase el Ejemplo 3 y la Figura 2).

Resumiendo, la propagación de la variante por delección Del H-1PV (Δ nt 2022-2135) se incrementa y/o es más rápida, que en comparación con H-1PV de tipo silvestre en las células NB-324K. Si la variante por mutación puntual PMut1 H-1PV (NS2 Leu103Pro y NS1 Tyr595His) se propaga de manera similar o mejor que H-1PV de tipo silvestre, se determinará adicionalmente.

Ejemplo 5

Acumulación de proteína vírica en células NB-324K infectadas

La acumulación de las proteínas víricas se determinó por ensayos de inmunotransferencia en células NB-324K infectadas con Del H-1PV, PMut1 H-1PV, PMut2 H-1PV o H-1PV de tipo silvestre. La Figura 4 muestra la acumulación de proteínas NS1 y NS2 no estructurales y VP de la cápside, 6 horas, 8 horas, 24 horas y 48 horas después de la infec-

ción. Todos los virus sometidos a ensayo eran capaces de expresar proteínas no estructurales y de la cápside; sin embargo, el patrón de acumulación de estas proteínas era diferente para cada virus.

En todas las células NB-324K infectadas, las proteínas de la cápside VP1 y VP2 eran detectables 24 h y 48 h después de la infección pero no en los puntos de tiempo 6 h y 8 h anteriores. Las células infectadas con las variantes por delección y mutación puntual mostraban 24 h después de la infección mayores cantidades de proteínas VP que en comparación con las células infectadas con H-1PV de tipo silvestre (Figura 4, flechas negras). Entre 24 h y 48 h después de la infección, Del H-1PV dio lugar a un fuerte aumento de la acumulación de proteínas VP, mientras que no se observó ninguno o solo un ligero aumento de las proteínas VP con las variantes PMut1 H-1PV y PMut2 H-1PV o con H-1PV de tipo silvestre.

En contraste con la infección con H-1PV de tipo silvestre y Del H-1PV, la proteína no estructural NS1 ya era detectable 8 h después de la infección, con PMut1 H-1PV o PMut2 H-1PV (Figura 4, flechas rojas). Por otra parte, estas dos variantes por mutación puntual también condujeron a un mayor nivel de acumulación de NS1, tal y como se observó 24 h y/o 48 h después de la infección, en comparación con el obtenido con H-1PV de tipo silvestre o Del H-1PV, pareciendo que este último daba lugar al menor nivel de acumulación de NS1, al menos dentro del período de tiempo analizado después de la infección.

A pesar de que en todos los casos no se pudo detectar ninguna proteína NS2 de forma temprana en la infección, es decir, 6 h u 8 h después de la infección, el patrón de acumulación de NS2 era notablemente diferente entre los 4 virus más tarde en la infección (Figura 4, cuadros negros). Entre 8 h y 24 h después de la infección, NS2 se acumulaba hasta un nivel detectable con todos los virus excepto Del H-1PV. En los puntos de tiempo 24 h y 48 h después de la infección, el nivel de acumulación de NS2 era similar en las células infectadas con H-1PV de tipo silvestre, pero aumentaba o disminuía significativamente después de la infección con PMut1 H-1PV o PMut2 H-1PV, respectivamente. En las células infectadas con Del H-1PV, NS2 solo se podía detectar con dificultad en el último punto de tiempo analizado, es decir, 48 h después de la infección.

Resumiendo, las variantes por mutación puntual PMut1 H-1PV (NS2 Leu103Pro y NS1 Tyr595His) y PMut2 H-1PV (NS2 Lys96Glu), que parecían ser ambas altamente citotóxicas (véanse el ejemplo 6 y la figura 5), producían una acumulación más temprana y mayor de la proteína no estructural NS1, mientras que la variante por delección Del H-1PV (Δ nt 2022-2135), que parecía propagarse más rápido (véanse el ejemplo 4 y la figura 3), dio lugar a una mayor acumulación de las proteínas de la cápside VP1 y VP2 y una menor acumulación de la proteína no estructural NS2, al menos en la línea celular NB-324K humana de referencia y en el período de tiempo analizado.

Ejemplo 6

Incremento de la inhibición del crecimiento del cultivo celular e incremento de la producción de viriones infecciosos en la progenie con las variantes PMut1 H-1PV y PMut2 H-1PV

Las propiedades citotóxicas y productoras de las variantes por mutación puntual PMut1 H-1PV y PMut2 H-1PV se compararon con las de la variante por delección Del H-1PV y H-1PV de tipo silvestre en NB-324K humanas infectadas. Por lo tanto, se hizo un seguimiento tanto del crecimiento del cultivo celular como de la producción de viriones infecciosos en la progenie durante un período de tiempo de 4 días. Por una parte, se midió la cantidad de células vivas y muertas usando un sistema de recuento de células de Casy y la Figura 5A muestra el porcentaje promedio de células vivas, basándose en el promedio de células vivas obtenido en células con tratamiento simulado. Por otro lado, la cantidad de viriones producidos de nuevo, capaces de formar placas, se determinó por ensayo en placa y la Figura 5B muestra la cantidad de unidades formadoras de placas total, obtenida los días 1, 2, 3 y 4 después de la infección.

Como se muestra en la Figura 5A, todos los virus eran capaces de inhibir el crecimiento del cultivo celular, mostrando la variante por delección Del H-1PV y H-1PV de tipo silvestre niveles similares de inhibición del crecimiento celular, por lo menos 1 día después de la infección. Sin embargo, un efecto citotóxico mucho mayor, es decir, una inhibición más fuerte del crecimiento de la población celular, con un factor de aproximadamente 1,5 y 2, se observó claramente después de la infección de las células NB-324K con las variantes por mutación puntual PMut1 H-1PV y PMut2 H-1PV, respectivamente, en comparación con células infectadas con Del H-1PV o H-1PV de tipo silvestre, al menos 1 día después de la infección.

Como se muestra en la Figura 5B, todos los virus eran capaces de producir viriones infecciosos en la progenie en las células NB-324K humanas. Sin embargo, las variantes por mutación puntual PMut1 H-1PV y PMut2 H-1PV, así como la variante por delección Del H-1PV, dieron lugar a una mayor producción de viriones infecciosos en la progenie, en comparación con H-1PV de tipo silvestre, mostrando un aumento de aproximadamente 12 veces, 7,5 veces y 5 veces, respectivamente, de la cantidad de unidades formadoras de placa totales, al menos 1 día después de la infección.

Resumiendo, las variantes por mutación puntual PMut1 H-1PV (NS2 Leu103Pro y NS1 Tyr595His) y PMut2 H-1PV (NS2 Lys96Glu) inhiben el crecimiento de la población de células NB-324K incluso más que la variante por delección Del H-1PV (Δ nt 2022-2135) y H-1PV de tipo silvestre. Las tres variantes, es decir, PMut1 H-1PV, PMut2 H-1PV y Del H-1PV, también dieron lugar a una mayor producción de viriones infecciosos en la progenie que la que propor-

cionaba H-1PV de tipo silvestre, al menos en las células NB-324K humanas.

Ejemplo 7

Distribución de pfu en el núcleo y el citoplasma de células NB-324K humanas infectadas

5 La Figura 6 muestra la producción y la distribución intracelular de viriones infecciosos de la progenie en células NB-324K infectadas con H-1PV de tipo silvestre o con la variante Del H-1PV, PMut1 H-1PV o PMut2 H-1PV y en ausencia de infecciones secundarias. Los viriones infecciosos de la progenie presentes en las fracciones nucleares y citoplasmáticas de las células se cuantificaron 16 horas, 20 horas, 24 horas y 42 horas después de la infección, mediante ensayo en placa y se representan como unidades formadoras de placas (es decir, partículas o viriones que forman placas).

10 Como se muestra en la Figura 6a, la cantidad de formación de placas, es decir, viriones infecciosos de la progenie, que se recuperaba a partir de la fracción nuclear de las células NB-324K, era equivalente y se incrementaba de manera similar a lo largo del tiempo después de la infección, con Del H-1PV o H-1PV de tipo silvestre en todos los puntos de tiempo sometidos a ensayo.

15 Por el contrario y como se muestra en la Figura 6b, una cantidad significativamente mayor de viriones formadores de placas se recuperó a partir de la fracción citoplasmática, 24 h y 42 h después de la infección en Del H-1PV, en comparación con células NB-324K infectadas con H-1PV de tipo silvestre. Estos datos mostraban claramente un aumento de la producción de viriones de la progenie como resultado de una infección primaria, junto con una exportación temprana y/o incrementada de viriones infecciosos recién formados, desde el núcleo al citoplasma de las células NB-324K después de una infección con Del H-1PV, en comparación con las células infectadas con H-1PV de tipo silvestre.

20 El patrón de acumulación de los viriones de la progenie formadores de placas en la fracción nuclear de las células NB-324K infectadas con PMut1 H-1PV, PMut2 H-1PV o PMut4 H-1PV, era diferente del obtenido después de la infección con H-1PV de tipo silvestre o Del H-1PV.

25 Como se muestra en la Figura 6c, la variante por mutación puntual doble PMut4 H-1PV dio lugar a una cantidad mucho mayor de partículas formadoras de placas en la fracción nuclear de las células NB-324K, es decir, con un factor incrementado 7 veces a las 20 h y 5 veces a las 24 horas después de la infección, en comparación con todos los otros virus sometidos a ensayo. PMut1 H-1PV también dio lugar a una cantidad significativamente mayor de partículas formadoras de placas en la fracción nuclear de las células NB-324K 24 h después de la infección, en comparación con PMut2 H-1PV, Del H-1PV y H-1PV de tipo silvestre. Es interesante observar que las cantidades de partículas formadoras de placas encontradas en el núcleo después de la infección con PMut1 H-1PV, PMut2 H-1PV o PMut3 H-1PV, disminuyeron entre los puntos de tiempo 24 h y 42 h después de la infección, en contraste con la variante por delección Del H-1PV o H-1PV de tipo silvestre.

35 En la fracción citoplasmática y tal y como se muestra en la Figura 6d, la variante por mutación puntual doble PMut4 H-1PV mostraba un claro aumento de la cantidad de partículas formadoras de placas 20 h, 24 h y 42 h después de la infección, en comparación con el tipo silvestre, cuya cantidad incluso se aproximaba a la obtenida con Del H-1PV, al menos 42 h después de la infección. La variante por mutación puntual sencilla PMut1 H-1PV también dio lugar a una mayor cantidad de viriones de la progenie formadores de placas, en comparación con H-1PV de tipo silvestre, al menos 24 horas y 42 h después de la infección, pero no tan alta como la obtenida con Del H-1PV. En contraste con las otras variantes, la cantidad de partículas formadoras de placas encontrada en el citoplasma de las células NB-324K infectadas con PMut2 H-1PV, se mantuvo prácticamente constante en todos los puntos de tiempo sometidos a ensayo y de este modo se mantuvo más baja que la encontrada en las muestras infectadas con H-1PV de tipo silvestre. Los últimos datos sugieren que alguna o algunas etapas del ciclo infeccioso que permiten un aumento de la acumulación citoplasmática de viriones de la progenie, podrían verse afectadas por la variante PMut2 H-1PV, en contraste con las otras variantes.

45 Resumiendo, tanto la variante por delección Del H-1PV (Δ nt 2022-2135) como la variante por mutación puntual doble PMut4 H-1PV (NS2 Lys96Glu, Leu103Pro y NS1 Tyr595His) mostraban un aumento claro de la producción de viriones de la progenie en comparación con el tipo silvestre, PMut4 H-1PV también mostraba una acumulación temprana en el núcleo y Del H-1PV mostraba una exportación nuclear temprana de viriones infecciosos formados recientemente, en comparación con el tipo silvestre. La variante por mutación puntual sencilla PMut1 H-1PV (NS2 Leu103Pro y NS1 Tyr595His) parece comportarse de manera similar a la variante por mutación puntual doble PMut4 H-1PV, aunque con menores cantidades de partículas formadoras de placas al menos en los puntos de tiempo sometidos a ensayo, mientras que la variante por mutación puntual sencilla PMut2 H-1PV (NS2 Lys96Glu) parece estar afectada en su capacidad para acumular viriones infecciosos de la progenie en el citoplasma de las células infectadas.

55 Ejemplo 8

Algunas etapas del ciclo de vida de Del H-1PV son más rápidas que las de H-1PV de tipo silvestre

La Figura 7 muestra la acumulación y la localización subcelular de partículas víricas en un único nivel celular en NB-324K infectadas, como se detectaba por ensayos de inmunofluorescencia 15 horas y 21 horas después de la infección. En este experimento, las células NB-324K humanas se infectaron con la variante por delección híbrida (h) Del hH-1PV o hH-1PV híbrido de tipo silvestre, en el que la parte izquierda del genoma de H-1PV se había sustituido por la región equivalente, es decir, desde el nucleótido 1 hasta el nucleótido 990, del genoma procedente del parvovirus muy relacionado, MVMP (recuperado a partir de la estructura artificial pdB-MVP, [25]). Esto significa que el promotor vírico P34, así como los primeros 244 aminoácidos de NS1 y 85 aminoácidos de NS2 en sus extremos amino terminales, son originarios de MVMP, mientras que los extremos carboxi terminales de ambas proteínas NS1 y NS2, así como el promotor vírico P38 y las proteínas VP completas son originarios de H-1PV.

Se observó un mayor número de células que muestran partículas ensambladas recientemente en sus núcleos entre la población de células infectadas con Del H-1PV, en comparación con la infectada con H-1PV de tipo silvestre, en los puntos de tiempo 15 h y 21 h. Además, también se observó un mayor número de células que mostraban viriones de la progenie que ya se habían liberado desde el núcleo hasta el citoplasma, entre la población de células infectadas con Del H-1PV, en comparación con la infectada con H-1PV de tipo silvestre, 21 h después de la infección (Figura 7, flechas blancas). Aunque estos datos se obtuvieron con el híbrido Del hH-1PV y el híbrido de tipo silvestre hH-1PV, están de acuerdo con la acumulación más rápida descrita anteriormente de la progenie de viriones infecciosos en la fracción citoplásmica de las células NB-324K infectadas con Del H-1PV, en comparación con las infectadas con H-1PV de tipo silvestre (véanse el Ejemplo 7 y la Figura 6).

Resumiendo, una salida nuclear más temprana de las partículas víricas de la progenie tiene lugar en las células productoras de la variante por delección Del hH-1PV (Δ nt 2022 a 2135), en comparación con las productoras de hH-1PV de tipo silvestre, lo que sugiere que algunas etapas del ciclo infeccioso de Del hH-1PV avanzan más rápido que las del ciclo infeccioso de H-1PV de tipo silvestre, al menos en la línea celular NB-324K humana de referencia.

Ejemplo 9

El mutante por delección Del H-1PV muestra menor citotoxicidad que H-1PV de tipo silvestre

La citotoxicidad del mutante por delección Del H-1PV se comparó con la de H-1PV de tipo silvestre en las células NB-324K, utilizando un ensayo de clonogenicidad seguido de una tinción con cristal violeta.

Como se muestra en la Figura 8A, la cantidad de células capaces de formar colonias, es decir, de crecer, después de la infección con la variante por delección H-1PV, es de alguna manera más alta que la cantidad de colonias de células detectadas después de la infección con H-1PV de tipo silvestre.

Como se muestra en la Figura 8B, este efecto se observa particularmente cuando las células se infectaban con una multiplicidad baja o moderada de la infección (es decir, 0,5 pfu/célula o 2,5 pfu/célula). En conjunto estos datos indican una toxicidad disminuida del mutante por delección Del H-1PV, en comparación con la toxicidad de H-1PV de tipo silvestre. Estos son datos preliminares; sin embargo, la toxicidad disminuida de la variante por delección Del H-1PV se puede correlacionar con su mejor producción de viriones de la progenie al menos en las células NB-324K humanas. De hecho, estos datos están de acuerdo con las observaciones realizadas previamente en nuestro laboratorio de que las líneas celulares que son buenas productoras de viriones de la progenie, no mueren muy rápido durante el proceso de infección.

Resumiendo, la variante por delección Del H-1PV (Δ nt 2022-2135) presenta una toxicidad menor en comparación con H-1PV de tipo silvestre, lo que parece estar a favor de un aumento de la producción de virus.

Ejemplo 10

Aumento de la producción de virus de Del H-1PV en diferentes líneas celulares de cáncer de páncreas y en células HeLa

Como se ha descrito anteriormente, se observó una ventaja significativa de la variante por delección Del H-1PV sobre H-1PV de tipo silvestre convencional, con respecto a las tasas de infecciosidad y de producción en la línea celular NB-324K humana de referencia. Este efecto de la variante Del H-1PV se confirmó en varias líneas de células tumorales humanas.

La Figura 9 muestra la cantidad de partículas infecciosas producidas por la variante por delección Del H-1PV en comparación con la obtenida con H-1PV de tipo silvestre, en las líneas celulares NB-324K humana, de carcinoma pancreático humano Panc-1 y MiaPaCa-2, y de cáncer de cuello uterino humano HeLa+, tal como se determinó mediante ensayo en placa en varios puntos de tiempo después de la infección.

Como se muestra en la Figura 9, se observó un aumento de la producción de viriones infecciosos de la progenie después de la infección con Del H-1PV, en comparación con H-1PV de tipo silvestre en todas las líneas celulares humanas analizadas.

Resumiendo, la variante por delección Del H-1PV (Δ nt 2022-2135) presenta una ventaja significativa sobre H-1PV de

tipo silvestre con respecto a la tasa de producción no solo en la línea celular humana de referencia NB-324K, sino también en diferentes células cancerosas de páncreas o de cuello uterino, obtenidas a partir de tumores humanos.

Ejemplo 11

5 El mutante por delección Del H-1PV presenta una eficacia mejorada en la supresión del crecimiento tumoral que H-1PV de tipo silvestre

Además de los experimentos *in vitro* descritos anteriormente, la acción de la variante por delección Del H-1PV sobre el crecimiento tumoral también se investigó en ensayos *in vivo*.

10 La Figura 10A muestra una representación esquemática que se realizó del ensayo *in vivo*. Células de carcinoma pancreático humano Panc-1 fueron tratadas con tampón (células tratadas de forma simulada) o infectadas con Del H-1PV o wt H-1PV con una multiplicidad de infección de 1 RU/célula (RU, es decir, unidad de replicación, se corresponde a una partícula de virus completa que es capaz de entregar y amplificar su genoma vírico en una célula hospedadora). Las células Panc-1 tratadas de forma simulada o infectadas con parvovirus se inyectaron además por vía subcutánea en ratones Balb/c sin pelaje de la siguiente manera: 7 ratones sin pelaje recibieron células Panc-1 tratadas de forma simulada, 7 ratones sin pelaje recibieron células Panc-1 infectadas con H-1PV de tipo silvestre y 6 ratones sin pelaje recibieron células Panc-1 infectadas con la variante Del H-1PV.

Se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral durante un período de tiempo de 83 días después de la inyección (Figura 10B) y el porcentaje de tumores con un tamaño más grande que 290 mm³ también se determinó (Figura 10C).

20 Los datos mostraban un fuerte retraso en la aparición y el crecimiento de los tumores Panc-1 infectados con parvovirus, en comparación con los tumores tratados de forma simulada. Por otra parte, también se observó un crecimiento tumoral claramente reducido en ratones sin pelaje que recibieron células tumorales Panc-1 infectadas con Del H-1PV, en comparación con las células tumorales Panc-1 infectadas con H-1PV de tipo silvestre. De hecho, los tumores Panc-1 humanos que tenían un tamaño mayor que 290 mm³ se detectaron aproximadamente 10 días más tarde, cuando las células Panc-1 recibieron Del H-1PV, en comparación con las que recibieron H-1PV de tipo silvestre, y menos del 20% en comparación con más del 55% de los tumores humanos Panc-1 mostraron un tamaño más grande que 290 mm³ cuando se infectaron con Del H-1PV, en comparación con H-1PV de tipo silvestre, respectivamente, 83 días después de la implantación (Figura 10C).

Resumiendo, la variante por delección Del H-1PV (Δ nt 2022-2135) presenta una eficacia mayor que H-1PV de tipo silvestre para suprimir el crecimiento de tumores humanos en animales.

30 Ejemplo 12

Una inyección intratumoral de Del H-1PV es más eficaz en la supresión del crecimiento de tumores derivados de células HeLa en comparación con H-1PV de tipo silvestre

35 En un ensayo *in vivo*, se inyectaron 2×10^6 células HeLa por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones BALB/c sin pelaje. Cuando los ratones desarrollaron tumores derivados de las células HeLa, 9 días más tarde se inyectaron 10^8 PFU por ratón (en un volumen de 100 μ L de PBS) de Del H-1PV o H-1PV de tipo silvestre cerca del sitio de crecimiento del tumor, es decir, por vía intratumoral. El crecimiento tumoral se controló hasta el día 42 después de la implantación. La Figura 12 muestra la acción de la variante por delección Del H-1PV sobre el crecimiento de tumores de carcinoma de cuello uterino humano derivados de células HeLa cuando se inyectaban por vía intratumoral.

40 Se observó un crecimiento acelerado del tumor en esas condiciones, lo que se debía probablemente a la ruptura de la masa de células tumorales por la inyección intratumoral del virus. La presión del líquido del inóculo contribuyó más probablemente a una dispersión de las células tumorales, participando de este modo en un crecimiento tumoral fuertemente acelerado. Sin embargo, una supresión tumoral mejorada aún era observable en estas condiciones con Del H-1PV en comparación con H-1PV de tipo silvestre. Como se muestra en la Figura 12A, el número de ratones que desarrollaron tumores más grandes que 1000 mm³ se retrasó después de la inyección de Del H-1PV, en comparación con los ratones tratados de forma simulada (tampón) o los ratones inyectados con H-1PV de tipo silvestre. De hecho, 60% de los ratones (es decir, 3 ratones de cada 5) desarrollaron tumores más grandes que 1000 mm³ ya el día 6 después de la inyección, cuando se inyectaba H-1PV de tipo silvestre por vía intratumoral y solo el día 25 después de la inyección (es decir, casi 20 días después) cuando se inyectaba Del H-1PV por vía intratumoral.

50 La Figura 12B muestra la supervivencia de los ratones dada en porcentaje de ratones portadores de tumores más pequeños que 1000 mm³ (evitando de este modo el sacrificio del animal) en cada grupo. El 80% de los ratones (es decir, 4 ratones de cada 5) que fueron tratados con Del H-1PV, sobrevivió hasta el día 35 después de la inyección, mientras que solo el 40% de los ratones (es decir, 2 de cada 5) de los que fueron tratados con H-1PV de tipo silvestre sobrevivió ya a partir de 17 días después de la inyección.

55 Resumiendo, la variante por delección Del H-1PV (Δ nt 2022-2135) presenta mayor capacidad que H-1PV de tipo silvestre para suprimir el crecimiento de tumores humanos derivados de células HeLa *in vivo*.

Ejemplo 13**Aumento de la síntesis de nuevo y la labilidad de las proteínas Del NS2P en comparación con las proteínas NS2P de tipo silvestre**

5 La síntesis de nuevo y la estabilidad de las proteínas no estructurales víricas se determinaron mediante el marcado por captura de pulsos radiactivos (del inglés, "pulse-chase labeling") y ensayos de inmunoprecipitación a partir de células NB-324K infectadas con Del H-1PV o H-1PV de tipo silvestre. La Figura 13 muestra la cantidad de proteínas NS1 y NS2P no estructurales, sintetizadas de nuevo, después de un período de marcación de 30 min, así como la cantidad restante de estas proteínas víricas dentro de un período de tiempo de hasta 240 min después de su síntesis.

10 Se ha detectado una mayor cantidad de Del NS1 sintetizada de nuevo, en comparación con NS1 de tipo silvestre sintetizada de nuevo (Figura 13, panel superior, 0 minutos de captura). Sin embargo, la forma truncada de NS1 (Del NS1) parecía ser tan estable como la forma de tipo silvestre, al menos hasta un período de captura de 60 minutos. En el caso de NS1 de tipo silvestre, una banda adicional y de migración más lenta era ligeramente detectable al comienzo del período de captura (puntos 0 y 20 min) y se hizo claramente visible al menos desde un período de 40 min hasta un período de 240 min de captura, en donde la cantidad aumentaba con el tiempo de forma concomitante frente a una disminución progresiva de la forma que migraba más rápido de NS1. Esto indica la aparición de ciertas modificaciones posteriores a la traducción de NS1 de tipo silvestre que parecen tener lugar de manera progresiva y/o temporal. Aunque no era tan claramente visible como para NS1 de tipo silvestre, Del NS1 también parecía que migraba como un doblete al menos hasta un período de 120 minutos de captura, mientras que solo se detectó la forma de migración más lenta de Del NS1 después de un período de 240 minutos de captura, lo que sugiere modificaciones de la proteína Del NS1 posteriores a la traducción diferentes y/o que tienen lugar de forma más rápida cuando se compara con NS1 de tipo silvestre.

25 Como se muestra en la Figura 13 (panel inferior), de forma sorprendente, tanto la síntesis como la degradación de la proteína Del NS2P estaban muy estimuladas, en comparación con las de NS2P de tipo silvestre. De hecho, aunque la cantidad de proteína Del NS2P sintetizada de nuevo era mucho mayor que la de la proteína de tipo silvestre después del período de marcado (punto 0 min de captura), la mayor parte de Del NS2P desapareció después de un período de 60 min de captura y no se detectó más NS2P sintetizada de nuevo después de un período de captura de 240 minutos, mientras que NS2P de tipo silvestre sintetizada de nuevo todavía era detectable.

30 Resumiendo, la síntesis y el remplazo de Del NS2P están claramente mejorados en comparación con NS2P de tipo silvestre. Las modificaciones posteriores a la traducción de NS1 también podrían estar alteradas en la forma truncada (Del) en comparación con la forma de tipo silvestre de la proteína. En conjunto, estos datos sugieren fuertemente que la delección en marco de 114 nt de longitud, en el genoma de Del H-1PV y/o el truncamiento resultante de 37 aminoácidos en las proteínas Del NS1 y Del NS2 no estructurales afectan a algún mecanismo de regulación de estas proteínas víricas. Si estas alteraciones pueden ser un tema clave en la mayor infecciosidad observada y/o en la salida nuclear más temprana de los viriones de la progenie de Del H-1PV, se investigará adicionalmente.

Ejemplo 14**Del NS2P todavía es capaz de interactuar con el factor de exportación nuclear Crm1 y con miembros de la familia de proteínas 14-3-3**

40 La capacidad de las proteínas víricas para interactuar con proteínas celulares específicas se determinó mediante ensayos de coimmunoprecipitación, utilizando extractos de proteínas marcadas metabólicamente con ³⁵S de células NB-324K infectadas con Del H-1PV o H-1PV de tipo silvestre.

45 Como se muestra en la Figura 14A, cantidades equivalentes de las proteínas celulares Crm1 (panel izquierdo) y 14-3-3 (panel derecho) se detectaron en todas las muestras analizadas después de la inmunoprecipitación con el anticuerpo apropiado. Además, se encontró que cantidades equivalentes de proteínas NS2 de tipo silvestre y Del NS2 precipitaban conjuntamente, ya sea con Crm1 o con 14-3-3 en las muestras preparadas en ausencia de SDS (Figura 14A, pistas 3 y 5, y pistas 7 y 9, respectivamente). La precipitación conjunta de las proteínas víricas Del NS2 y NS2 de tipo silvestre tanto con Crm1 como con 14-3-3 era específica ya que no se detectó Del NS2 ni NS2 de tipo silvestre en muestras de células tratadas de forma simulada (Figura 14A, pistas 1 y 10) o en muestras preparadas en presencia de SDS, que interrumpía la interacción proteína-proteína (Figura 14A, pistas 2 y 4, y pistas 6 y 8).

50 La Figura 14B muestra que cantidades similares de proteínas Del NS2 y NS2 de tipo silvestre inmunoprecipitaban a partir de muestras infectadas, utilizando un antisuero específico de NS2P. Estos datos también indican que solo una fracción de la cantidad total de las proteínas Del NS2 y NS2 de tipo silvestre presentes en las muestras, era capaz de interactuar con Crm1 o 14-3-3.

55 Resumiendo, la proteína vírica Del NS2 interactúa tanto con los productos celulares de Crm1 como con 14-3-3 de forma tan eficaz como NS2 de tipo silvestre, lo que indica que la delección de 37 aminoácidos en la secuencia de la proteína NS2 H-1PV no anulaba las propiedades de unión de la proteína vírica a sus ligandos celulares y que algunas estructuras conformacionales de H-1PV NS2 todavía se conservan en la forma truncada (Del).

Ejemplo 15**Viriones de Del H-1PV son más susceptibles a la desnaturalización térmica que los viriones de H-1PV de tipo silvestre**

5 El proceso de descapsidación del genoma vírico en las células infectadas se puede imitar *in vitro* mediante un ensayo de desnaturalización térmica. La susceptibilidad de las partículas de H-1PV a la desnaturalización térmica se analizó *in vitro* sometiendo viriones completos a diversas temperaturas antes de determinar la cantidad de genomas víricos todavía presentes en las muestras mediante PCR cuantitativa en tiempo real, después de un tratamiento con ADNasa, seguido de una lisis alcalina de los viriones intactos restantes. Como se muestra en la Figura 15, la estabilidad de los viriones de Del H-1PV y de H-1PV de tipo silvestre se investigó mediante una exposición de partículas completas mostraba una diferencia de 2,42°C entre Del H-1PV y H-1PV de tipo silvestre, siendo de 59,11°C en el primer caso y de 61,53°C en el último caso.

15 La Figura 15 muestra que la cantidad de genomas de Del H-1PV (expresada en % de la cantidad total) que se recuperaba después de la desnaturalización térmica, era inferior a todas las temperaturas analizadas, en comparación con la de los genomas de tipo silvestre. La temperatura que dio lugar a la desnaturalización del 50% de las partículas completas mostraba una diferencia de 2,42°C entre Del H-1PV y H-1PV de tipo silvestre, siendo de 59,11°C en el primer caso y de 61,53°C en el último caso.

20 Resumiendo, las partículas de Del H-1PV eran más susceptibles a la desnaturalización térmica que las partículas de H-1PV de tipo silvestre. Esto sugiere que los genomas víricos de Del H-1PV se podrían descapsidar de forma más eficaz que los genomas de H-1PV de tipo silvestre, lo que también estaría a favor de un aumento de la infecciosidad de los primeros.

Ejemplo 16**Unión celular y captación mejoradas con Del H-1PV**

25 La unión de partículas completas a la superficie celular se determinó midiendo mediante PCR cuantitativa en tiempo real la cantidad de genomas víricos recuperados a partir de células NB-324K infectadas después de una incubación durante 1 hora a 4°C para evitar la internalización de virus.

30 La captación de partículas completas se investigó midiendo mediante PCR cuantitativa en tiempo real la cantidad de genomas víricos internalizados en varios puntos de tiempo después de la infección (oscilando desde 0,5 horas a 3 horas) a partir de células infectadas previamente incubadas a 37°C para permitir la entrada del virus y tratadas con tripsina/EDTA para eliminar las partículas víricas unidas a la membrana plasmática. La Figura 16A muestra el porcentaje de partículas completas unidas a la membrana celular, mientras que la Figura 16B muestra la cantidad de genomas víricos internalizados después de la infección de células NB-324K, tanto con Del H-1PV como con H-1PV de tipo silvestre.

35 Como se muestra en la Figura 16A, el porcentaje de partículas completas unidas a la membrana celular era 9,7 veces más alto después de la infección con Del H-1PV, que en comparación con H-1PV de tipo silvestre, lo que indica que los viriones de Del H-1PV son más susceptibles a unirse a la membrana plasmática de células infectadas que los viriones de H-1PV de tipo silvestre.

40 Como se muestra en la Figura 16B, se recuperaron cantidades significativamente mayores de genomas víricos en todos los lisados celulares sometidos a ensayo, es decir, en todos los tiempos de incubación analizados, después de la infección con Del H-1PV, en comparación con H-1PV de tipo silvestre. Un aumento de casi 9 veces ya se observó después de 30 minutos de infección. Estos datos se correlacionan con la mejor eficacia de la unión descrita anteriormente para los viriones de Del H-1PV, en comparación con los de H-1PV de tipo silvestre.

45 Resumiendo, la unión en la membrana plasmática de Del H-1PV, y como una consecuencia probable, su captación en el interior de las células infectadas, mejoran significativamente en comparación con el virus de tipo silvestre. Si el incremento de la unión/captación junto con la mayor susceptibilidad descrita anteriormente para la desnaturalización térmica (Ejemplo 15, Figura 15), y la salida nuclear más temprana/rápida de la progenie de viriones infecciosos (Ejemplo 7, Figura 6 y Ejemplo 8, Figura 7) de este variante por delección Del H-1PV (Δ nt 2022-2135) pueden ser debidos a alguna modificación sutil de las partículas víricas de Del H-1PV, se investigará adicionalmente.

Ejemplo 17**Replicación temprana del genoma de Del H-1PV y acumulación elevada de ADN monocatenario en las células NB-324K infectadas**

50 La acumulación de las formas replicativas víricas se analizó mediante ensayos de transferencia Southern, usando extractos celulares de células NB-324K infectadas con Del H-1PV o con H-1PV de tipo silvestre. La Figura 17A muestra la acumulación de formas víricas monómeras replicativas (mRF), formas replicativas dímeras (dRF), 3 horas, 9 horas, 12 horas, 16 horas y 24 horas después de la infección como consecuencia de una infección primaria,

ya que la infección de las células se había realizado en presencia de anticuerpos neutralizantes para prevenir infecciones secundarias durante el ensayo. La intensidad de la señal de cada una de estas formas de ADN vírico se cuantificó mediante análisis de Phosfo Imager y la Figura 17B muestra el índice entre Del H-1PV y el tipo silvestre de la intensidad de la señal de cada una de estas formas, en los puntos de tiempo indicados posteriores a la infección.

- 5 Ambos virus eran capaces de acumular todas las formas replicativas víricas; sin embargo, el patrón de acumulación de estas formas replicativas estaba algo retrasado después de la infección con H-1PV de tipo silvestre en comparación con Del H-1PV.

En todas las células NB-324K infectadas, ninguna forma vírica replicativa era detectable en el punto de tiempo temprano de 3 horas. Nueve horas después de la infección, tanto mRF como dRF eran claramente visibles y tenían una intensidad más alta después de la infección con Del H-1PV, en comparación con H-1PV de tipo silvestre (Figura 17A). De hecho, un aumento de 7 y 11 veces en la acumulación de mRF y dRF de Del H-1PV, respectivamente, se midió 9 horas después de la infección en comparación con H-1PV de tipo silvestre (Figura 17B). Doce horas después de la infección, tanto mRF como dRF de Del H-1PV todavía estaban presentes en cantidades más altas que mRF y dRF de H-1PV de tipo silvestre, pero en un grado menor (en al menos un factor 5), mientras que la acumulación de ADNmc, que es un producto de una escisión dependiente de NS1 de moléculas dRF, se volvió significativamente detectable en muestras infectadas con Del H-1PV, alcanzando un aumento de 19 veces en comparación con la acumulación de ADNmc de H-1PV de tipo silvestre. Estos datos indican una actividad replicativa mucho más intensa en células infectadas con Del H-1PV, 9 horas después de la infección, la cual duró al menos hasta 12 horas después de la infección en comparación con las células infectadas con H-1PV de tipo silvestre.

20 En puntos de tiempo posteriores a la infección, las tres formas replicativas eran claramente visibles en ambas muestras infectadas (Figura 17A) con una acumulación elevada de menos de 4 veces (16 h pi) y 2 veces (20 h pi) de las formas replicativas de Del H-1PV, en comparación con el tipo silvestre. Estos datos indican una actividad replicativa en las muestras infectadas con H-1PV de tipo silvestre que se hizo más intensa entre 12 horas y 16 horas después de la infección, aunque todavía no era tan alta como en muestras de Del H-1PV, que las observadas en los puntos de tiempo tempranos después de la infección.

Resumiendo, la replicación del genoma de la variante por delección Del H-1PV (Δ nt 2022-2135) se lleva a cabo antes, en comparación con la replicación del genoma de H-1PV de tipo silvestre en las células NB-324K. Estos datos están de acuerdo con la mejor eficacia descrita anteriormente de los viriones de Del H-1PV para unirse y entrar en las células NB-324K (Ejemplo 16 y Figura 16), así como la mayor susceptibilidad de los viriones de Del H-1PV a la desnaturalización térmica (Ejemplo 15, Figura 15) en comparación con H-1PV de tipo silvestre.

Ejemplo 18

No hay diferencias en la acumulación de formas replicativas después de la transfección de las células NB-324K con Del H-1PV o H-1PV de tipo silvestre

La acumulación de formas replicativas de Del H-1PV y de H-1PV de tipo silvestre se evaluó después de la transfección de células NB-324K humanas con la estructura artificial de plásmido pDelH-1PV o pwtH-1PV en presencia de anticuerpos neutralizantes, seguida de un análisis de las muestras transfectadas mediante ensayos de transferencia Southern. Este experimento fue diseñado para comparar la actividad replicativa del genoma de Del H-1PV y H-1PV de tipo silvestre en ausencia de cualquier etapa temprana del ciclo de vida de parvovirus, que se mejoró con Del H-1PV en comparación con H-1PV de tipo silvestre, como se ha descrito anteriormente, en particular, la unión celular (captación) (Ejemplo 16 y Figura 16). La Figura 18 muestra la acumulación de formas víricas replicativas monómeras (mRF) y formas víricas replicativas dímeras (dRF) 12 horas, 16 horas y 24 horas después de la transfección.

Como se muestra en la Figura 18, no se observó ninguna diferencia significativa en la aparición y la acumulación de moléculas mRF y dRF víricas en puntos de tiempo tempranos después de la transfección con la estructura artificial de plásmido pDelH-1PV, en comparación con pwtH-1PV. Ninguna de las formas replicativas víricas mRF y dRF eran detectables 12 horas después de la transfección. mRF y dRF procedentes tanto del genoma de Del H-1PV como de H-1PV de tipo silvestre, empezaron a ser visibles 16 horas después de la transfección y la cantidad de ambas se incrementó significativamente 24 horas después de la transfección.

Resumiendo, la replicación del genoma de Del H-1PV de por sí, no tiene lugar antes y/o no está mejorada en las células NB-324K transfectadas, en comparación con la replicación del genoma de H-1PV de tipo silvestre.

50 Ejemplo 19

Aumento y/o liberación más rápida de viriones completos de Del H-1PV en el medio de células NB-324K transfectadas, en comparación con la liberación de viriones completos de H-1PV de tipo silvestre

Se realizó un seguimiento de la liberación de viriones de la progenie a partir de material sobrenadante de cultivos celulares recogidos 10 horas, 17 horas y 72 horas después de la transfección de las células NB-324K, con pDelH-1PV o pwtH-1PV en presencia (+PV1) o no (-PV1) de anticuerpos neutralizantes. Las moléculas de ADNmc vírico se recuperaron a partir de las muestras de material sobrenadante mediante extracción de Hirt y se detectaron por análisis

sis de transferencia Southern. Las partículas completas e infecciosas que estaban presentes en las muestras de material sobrenadante 72 horas después de la transfección, se cuantificaron mediante medición de la cantidad de genomas víricos (vg) mediante PCR cuantitativa en tiempo real y la cantidad de unidades formadoras de placas (pfu) por ensayo en placa, respectivamente.

- 5 La Figura 19 muestra que no se podía detectar ADNmc en las muestras de material sobrenadante recuperado 10 horas y 17 horas después de la transfección. Se recuperaron cantidades detectables de ADNmc 72 horas después de la transfección, a partir de todas las muestras de material sobrenadante sometidas a ensayo, sin embargo en una medida mucho menor a partir de muestras de transfección realizadas en presencia de anticuerpos neutralizantes, lo que impedía infecciones secundarias, en comparación con las que se realizaron en ausencia de anticuerpos neutralizantes, lo que permitía que tuvieran lugar infecciones secundarias. Sin embargo, en ambos casos, la intensidad de la señal del ADNmc de la progenie de Del H-1PV obtenido a partir del material sobrenadante de las células 293T transfectadas, era mayor en comparación con la del ADNmc de la progenie de H-1PV de tipo silvestre. Estos datos indican que la liberación de viriones de la progenie de Del H-1PV mejora en comparación con H-1PV de tipo silvestre, esto incluso en ausencia de las primeras etapas del ciclo de vida del virus (unión del virus a la superficie celular e internalización, descapsidación del genoma vírico y conversión).

Como también se muestra en la Figura 19, los viriones de la progenie de Del H-1PV presentes en el material sobrenadante 72 horas después de la transfección, mostraron un índice P/I inferior si se comparaba con H-1PV de tipo silvestre. De hecho, el índice P/I de los viriones de la progenie de Del H-1PV, que se producían en presencia de anticuerpos neutralizantes, se redujo en un factor de hasta 21 veces en comparación con H-1PV de tipo silvestre.

- 20 Resumiendo, los viriones de la progenie de Del H-1PV son liberados antes y/o con una mejor eficacia en el medio de cultivo celular de las células transfectadas, en comparación con los viriones de la progenie de H-1PV de tipo silvestre. Por otra parte, incluso cuando se producían mediante transfección, los viriones de la progenie de la variante por delección Del H-1PV (Δ nt 2022-2135) mostraban una infecciosidad mejorada en comparación con H-1PV de tipo silvestre.

25 Ejemplo 20

Aumento de la infecciosidad de Del H-1PV y Del hH-1PV producidos mediante transfección de células 293T humanas en comparación con H-1PV de tipo silvestre y hH-1PV de tipo silvestre

- El índice de partículas frente a infecciosidad (P/I) de Del H-1PV, Del hH-1PV, H-1PV de tipo silvestre, hH-1PV de tipo silvestre se determinó a partir de poblaciones de virus que se habían generado después de la transfección de células 293T humanas con las estructuras artificiales de plásmido apropiadas y se recuperaron a partir de los sedimentos celulares, 3 días después de la transfección. Para cada población de virus, la cantidad de partículas completas se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real, realizada después de un tratamiento con ADNasa y lisis alcalina de las poblaciones, con el fin de determinar el número de partículas víricas que contenían el genoma (proporcionado como genoma vírico (vg) por ml). Para cada población de virus, la cantidad de partículas infecciosas se midió mediante ensayo en placa con el fin de determinar la capacidad de las partículas completas para formar placas (proporcionado en unidades formadoras de placas (pfu) por ml) en la línea celular NB-324K de referencia.

- Como se muestra en la Figura 20, Del H-1PV y Del hH-1PV mostraban un índice P/I 4,5 veces y 5,8 veces menor que H-1PV de tipo silvestre y hH-1PV de tipo silvestre, respectivamente. Esto indica que las partículas más infecciosas eran producidas por las poblaciones de virus generadas después de la transfección de células 293T humanas cuando el virus contiene una delección de 114 nt de longitud en la secuencia que codifica NS de su genoma.

Resumiendo, las variantes por delección Del H-1PV y Del hH-1PV (Δ nt 2022-2135) muestran una mejor infecciosidad, incluso cuando se producen mediante transfección, en comparación con H-1PV y hH-1PV de tipo silvestre.

Lista de referencias

- 45 1 Rommelaere J, Geletneky K, Angelova AL, Daeffler L, Dinsart C, Kiprianova I, Schlehofer JR, Raykov Z. Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2010, 21: 185-195.
- 2 Cornelis JJ, Salomé N, Dinsart C, Rommelaere J. Vectors based on autonomous parvoviruses: novel tools to treat cancer? *J Gene Med.*, 2004, 6: S193-202.
- 3 Bhat R, Dempe S, Dinsart C y Rommelaere J. Enhancement of NK cell anti-tumor responses using an oncolytic parvovirus. *International Journal of Cancer*, 2010, en prensa [EPub publicación electrónica antes de impresión]
- 50 4 Raykov Z, Grekova S, Galabov AS, Balboni G, Koch U, Aprahamian M, Rommelaere J. Combined oncolytic and vaccination activities of parvovirus H-1 in a metastatic tumor model. *Oncol Rep.*, 2007, 17: 1493-1499.
- 5 Raykov Z, Grekova S, Leuchs B, Aprahamian M, Rommelaere J. Arming parvoviruses with CpG motifs to improve their oncosuppressive capacity. *Int J Cancer*, 2008, 122: 2880-2884.
- 6 Rommelaere J, Giese N, Cziepluch C, Cornelis JJ. Parvoviruses as anticancer agents. En: Sinkovics JG, Horvath

- JC, compiladores Viral therapy of human cancers. New-York: Marcel Dekker, 2005, 627p.
- 7 Rommelaere J, Cornelis JJ. Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods*, 1991, 33: 233-251.
- 8 Cornelis JJ, Lang SI, Stroh-Dege AY, Balboni G, Dinsart C, Rommelaere J. Cancer gene therapy through autonomous parvovirus-mediated gene transfer. *Curr Gene Ther.*, 2004, 4: 249-261.
- 5 9 Wetzel K, Struyf S, Van Damme J, Kayser T, Vecchi A, Sozzani S, Rommelaere J, Cornelis JJ, Dinsart C. MCP-3 (CCL7) delivered by parvovirus MVMp reduces tumorigenicity of mouse melanoma cells through activation of T lymphocytes and NK cells. *Int J Cancer*, 2007, 120: 1364-1371.
- 10 10 Enderlin M, Kleinmann EV, Struyf S, Burrachi C, Vecchi A, Kinscherf R, Kiessling F, Paschek S, Sozzani S, Rommelaere J, Cornelis JJ, Van Damme J, Dinsart C. TNF-alpha and IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL-10) delivered by parvoviral vectors act in synergy to induce antitumor effects in mouse glioblastoma. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16: 149-160.
- 11 Angelova A, Aprahamian M, Grekova S, Hajri A, Leuchs B, Giese N, Herrmann A, Dinsart C, Balboni G, Rommelaere J, Raykov Z. Improvement of gemcitabine-based therapy of pancreatic carcinoma by means of oncolytic parvovirus H-1PV. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15: 511-519.
- 15 12 Daeffler L, Hörlein R, Rommelaere J, Nüesch JP. Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *J Virol.*, 2003, 77: 12466-12478.
- 13 Faisst S, Faisst SR, Dupressoir T, Plaza S, Pujol A, Jauniaux JC, Rhode SL, Rommelaere J. Isolation of a fully infectious variant of parvovirus H-1 supplanting the standard strain in human cells. *J Virol.*, 1995, 69: 4538-4543.
- 20 14 Engelsma D, Valle N, Fish A, Salomé N, Almendral JM, Fornerod M. A supraphysiological nuclear export signal is required for parvovirus nuclear export. *Mol Biol Cell*, 2008, 19: 2544-2552.
- 15 Eichwald V, Daeffler L, Klein M, Rommelaere J, Salomé N. The NS2 proteins of parvovirus minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells. *J Virol.*, 2002, 76: 10307-10319.
- 25 16 López-Bueno A, Valle N, Gallego JM, Pérez J, Almendral JM. Enhanced cytoplasmic sequestration of the nuclear export receptor Crm1 by NS2 mutations developed in the host regulates parvovirus fitness. *J Virol.*, 2004, 78: 10674-10684.
- 17 Rhode SL 3rd, Paradiso PR. Parvovirus genome: nucleotide sequence of H-1 and mapping of its genes by hybrid-arrested translation. *J Virol.*, 1983, 45: 173-184.
- 30 18 Wrzesinski C, Tesfay L, Salomé N, Jauniaux JC, Rommelaere J, Cornelis J, Dinsart C. Chimeric and pseudotyped parvoviruses minimize the contamination of recombinant stocks with replication-competent viruses and identify a DNA sequence that restricts parvovirus H-1 in mouse cells. *J Virol.*, 2003, 77: 3851-3858.
- 19 Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256: 495-497.
- 20 Galfrè G, Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.*, 1981, 73: 3-46.
- 35 21 Tattersall P, Bratton J. Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J Virol.*, 46: 944-955.
- 22 Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, Summerford C, Smulski RJ, Muzyczka N. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Ther*, 1999, 6: 973-985.
- 40 23 Cornelis JJ, Spruyt N, Spegelaere P, Guetta E, Darawshi T, Cotmore SF, Tal J, Rommelaere J. Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J Virol.*, 1988, 62: 3438-3444.
- 45 24 Haag A, Menten P, Van Damme J, Dinsart C, Rommelaere J, Cornelis JJ. Highly efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by means of autonomous parvovirus vectors: generation of antitumor responses in recipient mice. *Hum Gene Ther.*, 2000, 11: 597-609.
- 25 Kestler J, Neeb B, Struyf S, Van Damme J, Cotmore SF, D'Abramo A, Tattersall P, Rommelaere J, Dinsart C, Cornelis JJ. Cis requirements for the efficient production of recombinant DNA vectors based on autonomous parvoviruses. *Hum Gene Ther.*, 1999, 10: 1619-1632.
- 50 26 Lang SI, Boelz S, Stroh-Dege AY, Rommelaere J, Dinsart C, Cornelis JJ. The infectivity and lytic activity of minute virus of mice wild-type and derived vector particles are strikingly different. *J Virol.*, 2005, 79: 289-298.

- 27 Brockhaus K, Plaza S, Pintel DJ, Rommelaere J, Salomé N. Nonstructural proteins NS2 of minute virus of mice associate in vivo with 14-3-3 protein family members. *J Virol.*, 1996, 70: 7527-7534.
- 28 Graham FL, Van Der Eb AJ. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology*, 1973, 54 (2): 536-539.
- 5 29 Lacroix J, Leuchs B, Li J, Hristov G, Deubzer HE, Kulozik AE, Rommelaere J, Schlehofer JR, Witt O. Parvovirus H1 selectively induces cytotoxic effects on human neuroblastoma cells. *International Journal of Cancer*, 2010, 127(5): 1230-1239.
- 30 Arad U. Modified Hirt Procedure for Rapid Purification of Extrachromosomal DNA from Mammalian Cells. *BioTechniques*, 1998, 24(5), 760-762.
- 10 31 Wollmann G., Tattersall P., van den Pol A., Targeting Human Glioblastoma Cells: Comparison of Nine Viruses with Oncolytic Potential *J. of Virology*, 2005, 79(10), 6005-6022.
- 32 Documento WO 2009/083232 A1.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable y

5 (a) una variante de parvovirus H-1 (H-1 PV) que muestra mayor potencial antitumoral en comparación con el parvovirus de tipo silvestre que comprende las secuencias de aminoácidos mostradas en la Fig. 11, en donde dicha variante se caracteriza por (i) la o las sustituciones en la posición Lys96 de NS-2 por un aminoácido polar hidrófilo y/o en la posición Leu103 de NS-2 por un aminoácido no polar neutro, o (ii) una delección en marco en la parte izquierda del genoma de parvovirus que afecta tanto a las secuencias de la proteína de la parte central de NS2 como de la parte C-terminal de NS-1, en donde dicha delección es desde nt 2022 a 2135, en la secuencia de nucleótidos que se muestra en la Fig. 11, dando como resultado la traducción de una proteína NS-1 que tiene una delección de los aa 587 - 624 y una proteína NS-2 que tiene una delección de los aa 96 - 133, o

(b) un ADN que codifica dicha variante de parvovirus de (a), o

(c) un vector de expresión que comprende el ADN de (b), o

15 (d) una célula hospedadora que contiene el vector de expresión de (c) que produce dicha variante de parvovirus de (a)

para uso en un método de tratamiento de cáncer.

2. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1 (a) (i), que comprende la o las sustituciones de aminoácidos Lys96Glu y/o Leu103Pro de NS-2.

20 3. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 2, que comprende la o las siguientes sustituciones:

(a) Lys96Glu de NS-2; o

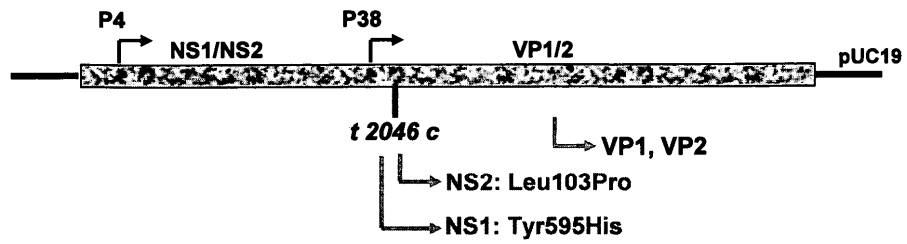
(b) Leu103Pro de NS-2 y Tyr595His de NS-1.

4. La composición farmacéutica para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho cáncer es carcinoma de páncreas, carcinoma de cuello uterino, hepatoma o linfoma.

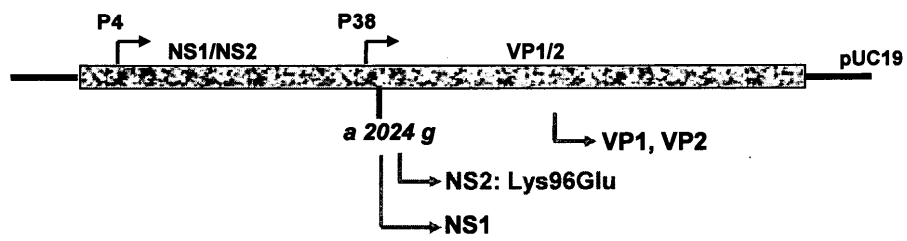
25

Figura 1

A- pPMut1H-1PV



B- pPMut2H-1PV



C- pPMut3H-1PV

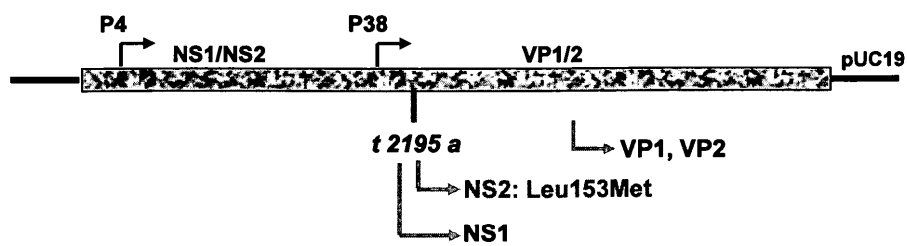
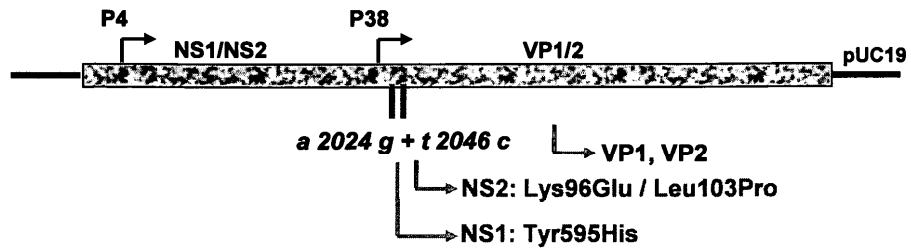


Figura 1 (cont.)

D- pPMut4H-1PV



E- pDel1H-1PV

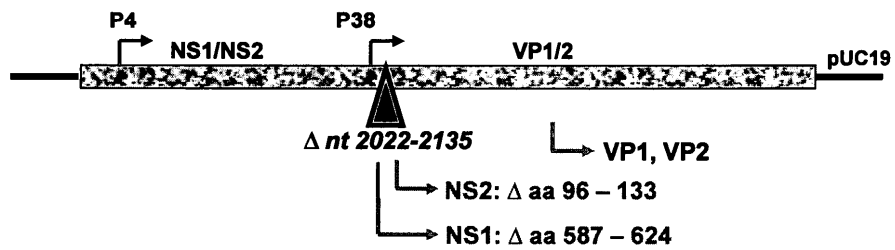
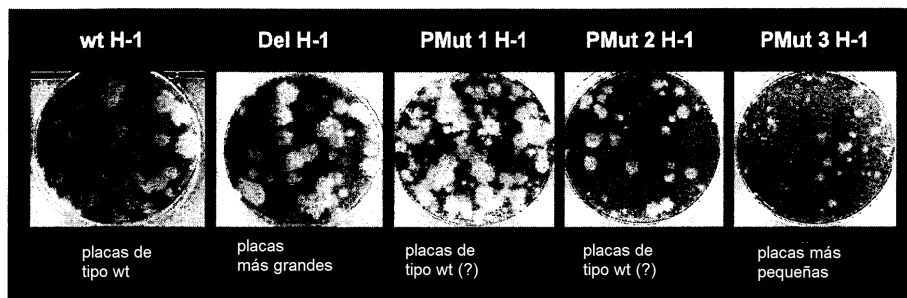


Figura 2

	P/I – índice 1 Partículas completas PFU	P/I – índice 2 Partículas completas RU
wt H-1 PV	1050	3438
Del H-1 PV	223 ↓ / 5	566 ↓ / 6
PMut1 H-1PV	139 ↓ / 8	151 ↓ / 23
PMut2 H-1PV	207 ↓ / 5	189 ↓ / 18
PMut3 H-1PV	2125 ↓ x 2	1932 ↓ / 2
PMut4 H-1PV	2351 ↓ x 2	5000 ↓ x 1.6

Figura 3

A-



B-

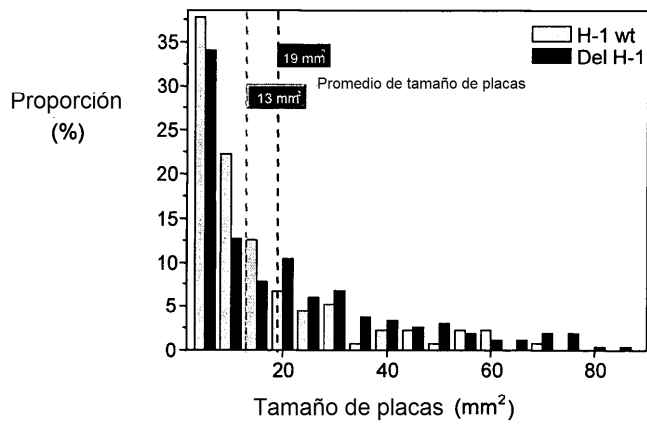


Figura 4

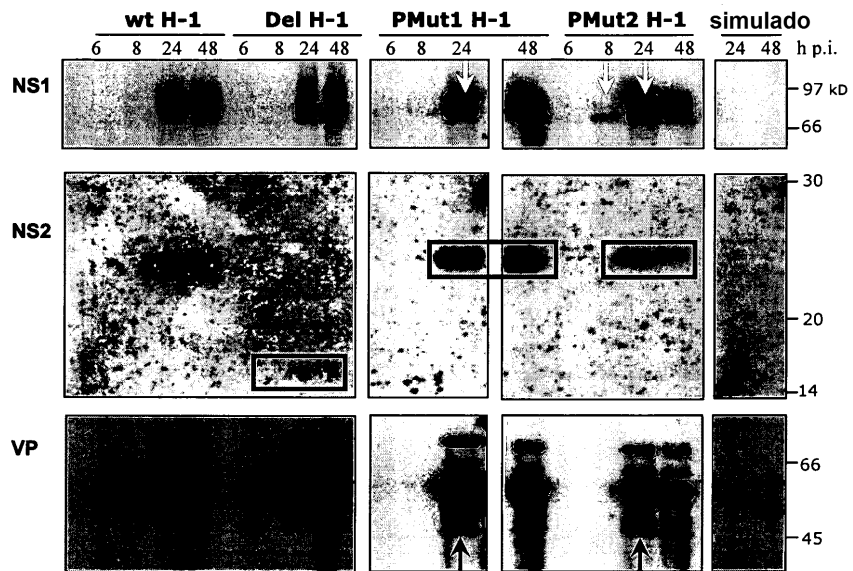
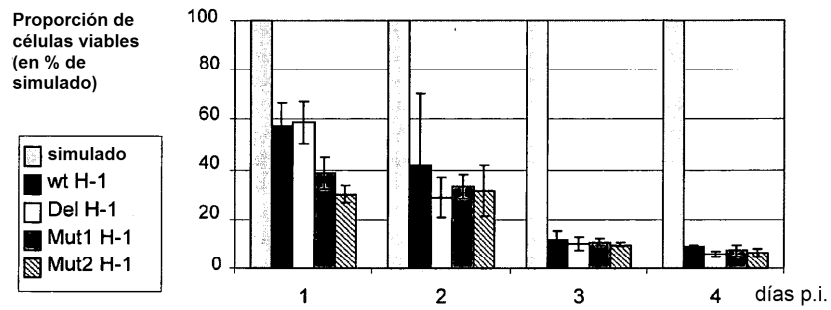


Figura 5

A- Inhibición del crecimiento de células NB-324K infectadas



B- Cinética de la producción de virus en células NB-324K infectadas

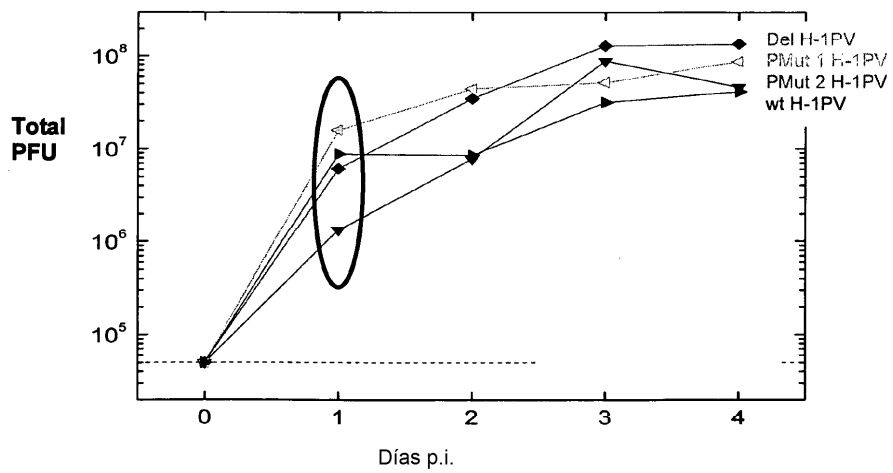
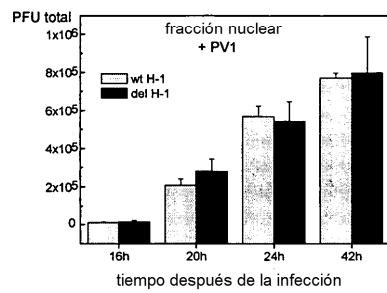
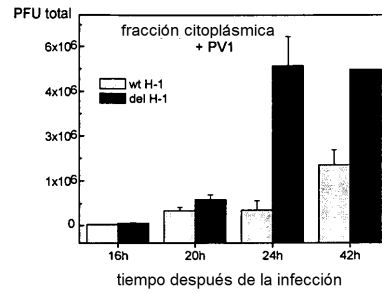


Figura 6

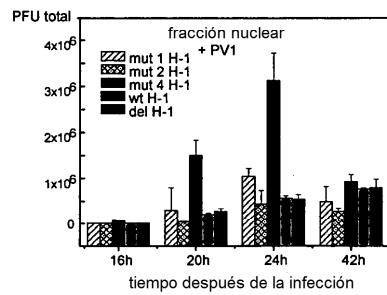
a)



b)



c)



d)

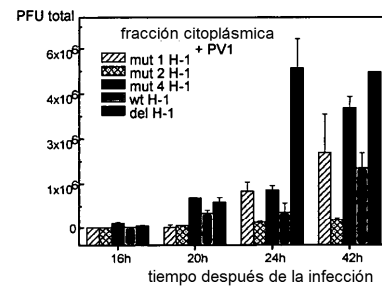


Figura 7

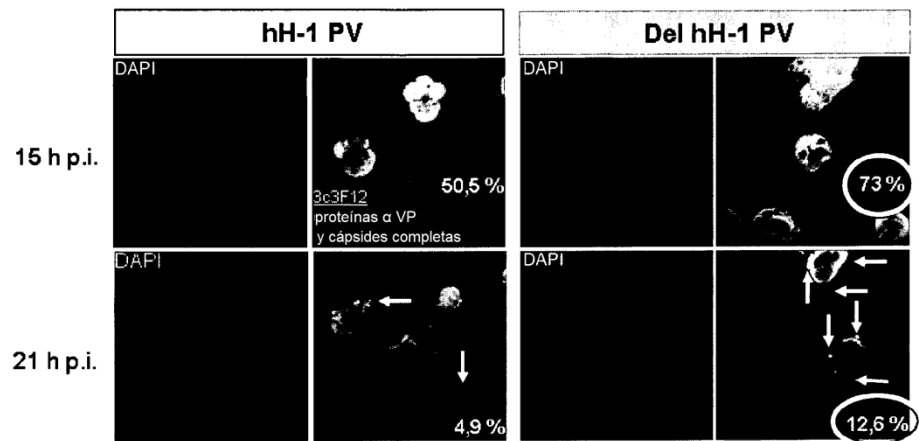
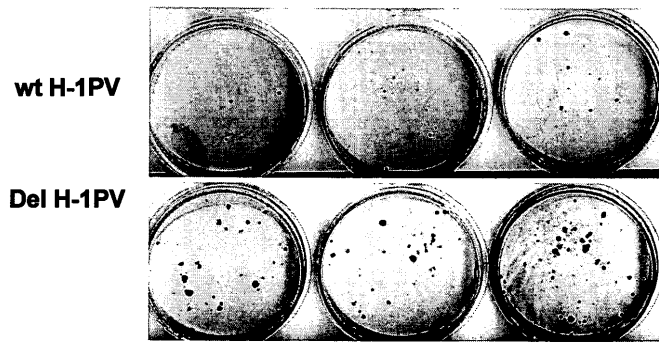


Figura 8

A-



B-

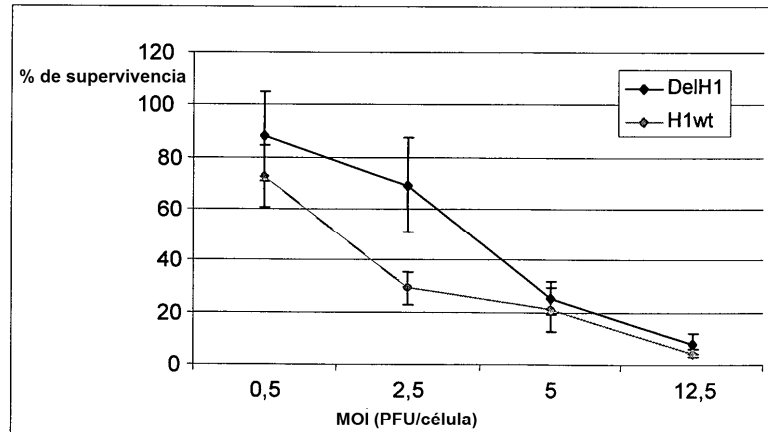


Figura 9

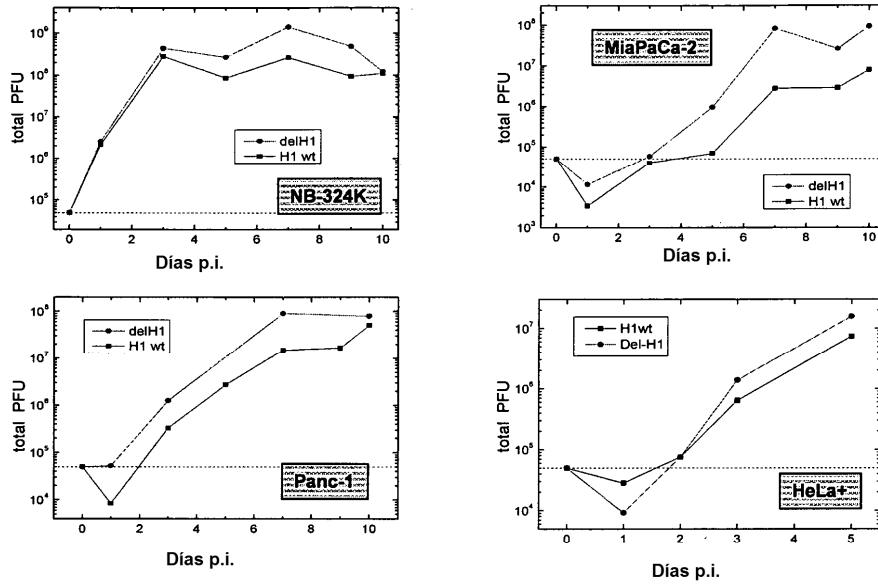
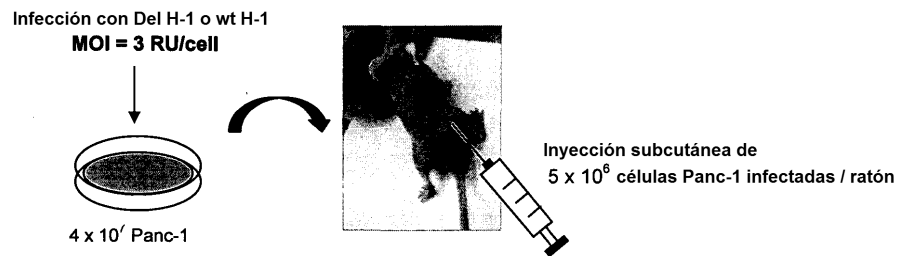


Figura 10

A-



B-

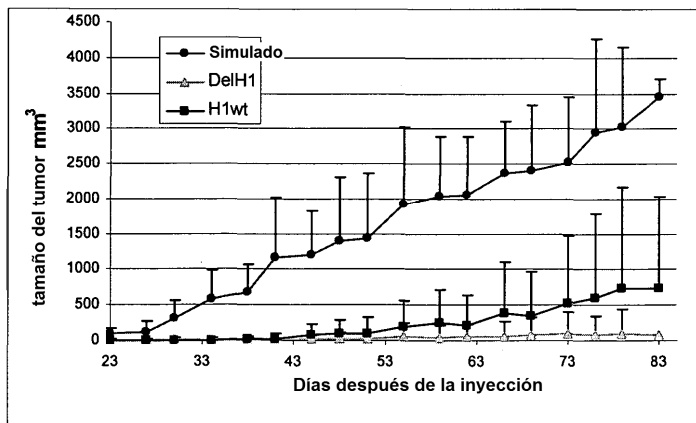


Figura 10 (cont.)

c-

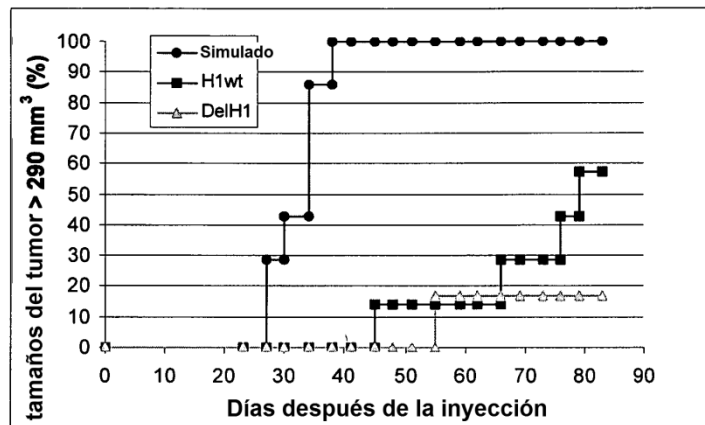


Figura 11

secuencia completa del genoma de H-1PV (en nucleótidos) (SEQ ID NO: 11)
 &
 H-1PV NS1 (SEQ ID NO:12), NSs (NS2P (SEQ ID NO:13), NS2Y (SEQ ID
 NO:14), VP1 (SEQ ID NO:15) y VP2 (SEQ ID NO:16) secuencias
 de proteínas (en aminoácidos)

```

CATTTTTAGAACTGACCAACCATGTTACGCAAGTGACGTGATGACGCGCGCTGCGCGG  nt 60

CTGCCTTCGGCAGTCACACGTCAGTACGTTTCACATGGTTGGTCAGTTCTAAAAATGAT  nt 120

AAGCGGTTTACAGAGTTTGAACCAAGCGGAAACGGAAGTGGCGTGGCTAACTGTAT  nt 180

ATAAGCAGTCACTCTGGTCGGTTACTCACTCTGCTTTCATTTCTGAGTTTGTGAGACACA  nt 240

GGAGCGAGACTAACCAACTAACCATGGCTGGAACGCTTACTCCGATGAGGTTTTGGGAG  nt 300
      M A G N A Y S D E V L G V  aa 13 NS1
      M A G N A Y S D E V L G V  aa 13 NS2

TAACCAACTGGCTGAAGGACAAAAGTAGCCAGGAGGTGTCTCATTGTTTTAAAAATG  nt 360
      T N W L K D K S S Q E V F S F V F K N E  aa 33 NS1
      T N W L K D K S S Q E V F S F V F K N E  aa 33 NS2

AAAACGTCCAATAAATGGAAGGACATCGGTTGGAATAGTTACAGAAAGGAGCTACAAG  nt 420
      N V Q L N G K D I G W N S Y R K E L Q D  aa 53 NS1
      N V Q L N G K D I G W N S Y R K E L Q D  aa 53 NS2

ATGACGAGCTGAAGTCTCTACAACGAGGGCGGAGACCCTTGGGACCAAGCGAGGACA  nt 480
      D E L K S L Q R G A E T T W D Q S E D M  aa 73 NS1
      D E L K S L Q R G A E T T W D Q S E D M  aa 73 NS2

TGGAATGGGAGAGCGCAGTGGATGACATGACCAAAAAGCAAGTATTTATTTTATTCTT  nt 540
      E W E S A V D D M T K K Q V F I F D S L  aa 93 NS1
      E W E S A V D D M T K K  aa 85 NS2
    
```

ES 2 603 407 T3

<p>TGGTTAAGAAGTGTGGTTTGAAGTGCTCAGCACAAAGAACATAGCTCCTAGTAATGTTA V K K C L F E V L S T K N I A P S N V T</p>	<p>nt 600 aa 113 NS1</p>
<p>CTTGGTTCGTGCAGCATGAATGGGAAAGGACCAAGGCTGGCACTGTCATGTGCTGATTG W F V Q H E W G K D <u>Q</u> G W H C H V L I G</p>	<p>nt 660 aa 133 NS1</p>
<p>GAGCAAGGACTTTAGTCAACCTCAAGGAAAATGGTGGAGAAGGCAGCTAAATGTGTACT G K D F S Q P Q G K W W R R Q L N V Y W</p>	<p>nt 720 aa 153 NS1</p>
<p>GGAGTAGATGGTGGTGACTGCCTGTAATGTTCAACTAACACCAGCTGAAAGAATTAAC S R W L V T A C N V Q L T P A E R I K L</p>	<p>nt 780 aa 173 NS1</p>
<p>TGAGAGAAATAGCAGAGGACAGTGAATGGGTCACTTTGCTTACCTATAAGCATAAGCACA R E I A E D S E W V T L L T Y K H K H T</p>	<p>nt 840 aa 193 NS1</p>
<p>CCAAGAAGGACTATACCAAGTGTGTTCTTTTTGGAAACATGATTGCTTATTACTTTTTAA K K D Y T K C V L F G N M I A Y Y F L S</p>	<p>nt 900 aa 213 NS1</p>
<p>GCAAAAAGAAAATATGTACCAGTCCACCAAGGGACGGAGGCTATTTTCTTAGCAGTGA K K K I C T S P P R D G G Y F L S S D S</p>	<p>nt 960 aa 233 NS1</p>
<p>CTGGCTGGAAAACAACTTTTTGAAAGAGGGCGAGCGCCATCTAGTGAGCAAACTGTATA G W K T N F L K E G E R H L V S K L Y T</p>	<p>nt 1020 aa 253 NS1</p>
<p>CTGATGAGATGAAACCAGAAACGGTCGAGACCACAGTGACCACTGCACAGGAAGCTAAGC D E M K P E T V E T T V T T A Q E A K R</p>	<p>nt 1080 aa 273 NS1</p>
<p>GCGGCAGATTCAAACCTAGAAAGGAGGTCTCGATTAAAACCACTCAAAGAGTTGGTAC G R I Q T R <u>K</u> E V S I K T T L K E L V H</p>	<p>nt 1140 aa 293 NS1</p>
<p>ATAAAAGAGTAACCTCACCAGAAGACTGGATGATGATGCAGCCAGACAGTTACATTGAAA K R V T S P E D W M M M Q P D S Y I E M</p>	<p>nt 1200 aa 313 NS1</p>
<p>TGATGGCTCAACCAGGTGGAGAAAACCTTGCTTAAAATACACTAGAGATCTGTACTGA M A Q P G G E N L L K N T L E I C T L T</p>	<p>nt 1260 aa 333 NS1</p>

ES 2 603 407 T3

CTCTAGCAAGAACCAAAACAGCCTTTGACTTGATTCTGGAAAAAGCTGAAACCAGCAAAC nt 1320
L A R T K T A F D L I L E K A E T S K L aa 353 NS1

TAGCCAACCTTTCCATGGCTAGCACCAGAACCTGTAGAATCTTTGCTGAGCATGGCTGGA nt 1380
A N F S M A S T R T C R I F A E H G W N aa 373 NS1

ACTATATTAAGTCTGCCATGCCATCTGTTGTGTGCTGAATAGACAAGGAGGCAAAGGA nt 1440
Y I K V C H A I C C V L N R Q G G K R N aa 393 NS1

ACACTGTGCTCTTTCACGGACCAGCCAGCACAGGCAAATCTATTATTGCACAAGCCATAG nt 1500
T V L F H G P A S T G K S I I A Q A I A aa 413 NS1

CACAAGCAGTTGGTAATGTTGGTTGTTACAATGCTGCCAATGTGAACTTCCATTTAATG nt 1560
Q A V G N V G C Y N A A N V N F P F N D aa 433 NS1

ACTGTACCAACAAAACTTGATTGGGTGGAAGAAGCTGGTAACTTTGGCCAGCAAGTAA nt 1620
C T N K N L I W V E E A G N F G Q Q V N aa 453 NS1

ACCAATTCAAAGCTATTTGTTCTGGCCAAACCATACGCATTGATCAAAAAGGAAAAGGCA nt 1680
Q F K A I C S G Q T I R I D Q K G K G S aa 473 NS1

GCAAACAGATTGAACCAACACCACTTATTATGACCACCAACGAGAACATTACCGTGGTTA nt 1740
K Q I E P T P V I M T T N E N I T V V R aa 493 NS1

GAATAGGCTGTGAGGAAAGACCAGAACACACTCAACCAATCAGAGACAGAATGCTCAACA nt 1800
I G C E E R P E H T Q P I R D R M L N I aa 513 NS1

TTCACCTGACACGTACTACTACCTGGTGACTTTGGTTTGGTGGATAAGCACGAATGGCCTC nt 1860
H L T R T L P G D F G L V D K H E W P L aa 533 NS1

TGATCTGTGCTTGGTTGGTGAAGAATGGTTACCAATCTACCATGGCTTGTACTGTGCTA nt 1920
I C A W L V K N G Y Q S T M A C Y C A K aa 553 NS1

AATGGGGCAAAGTTCCTGATTGGTCAGAGGACTGGGCGGAGCCGAAGCTAGACACTCCTA nt 1980
W G K V P D W S E D W A E P K L D T P I aa 573 NS1

ES 2 603 407 T3

TAAATTCGCTAGGTTCAATGCGCTCACCATCTCTGACTCCGAGAAGTACGCCTCTCAGCC	nt 2040
N S L G S M R S P S L T P R S T P L S Q	aa 593 NS1
F N A L T I S D S E K Y A S Q P	aa 101 NS2
AAACTACGCTCTTACTCCACTTGCATCGGACCTTGCAGCTAGCTCTAGAGCCTTGGG	nt 2100
N Y A L T P L A S D L A D L A L E P W S	aa 613 NS1
K L R S Y S T C I G P C G P S S R A L E	aa 121 NS2
GCACACCAATACTCCTGTTGCGGGCACTGCAGCAAGCCAAAACACTGGGGAGGCTGGTT	nt 2160
T P N T P V A G T A A S Q N T G E A G S	aa 633 NS1
H T K Y S C C G H C S K P K H W G G W F	aa 141 NS2
CCACAGCCTGCCAAGGTGCTCAACGGAGCCCAACCTGGTCCGAGATCGAGGCGGATTTGA	nt 2220
T A C Q G A Q R S P T W S E I E A D L R	aa 653 NS1
H S L P R C S T E P N L V R D R G G F E	aa 161 NS2
GAGCTTGCTTCAGTCAAGAACAGTTGGAGAGCGACTTCAACGAGGAGCTGACCTTGGACT	nt 2280
A C F S Q E Q L E S D F N E E L T L D *	aa 672 NS1
S L L Q S R T V G E R L Q R G A D L G L	aa 181 NS2
AAGGTACAATGGCACCTCCAGCTAAAAGAGCTAAAAGAGGTAAGGGGCTAAGGGATGGTT	nt 2340
R Y N G T S S *	aa 188 NS2Y
M A P P A K R A K R G	aa 11 VP1
GGTTGGTGGGGTACTAATGTATGACTACCTGTTTTACAGGCCTGAAATCACTTGGTTCTA	nt 2400
P E I T W F *	aa 188 NS2P
GGTTGGTGCCTCCTGGCTACAAGTACCTGGGACCAGGGAACAGCCTTGACCAAGGAGAA	nt 2460
W V P P G Y K Y L G P G N S L D Q G E	aa 30 VP1
CCAACCAACCCTTCTGACGCCGCTGCCAAGAACACGACGAAGCCTACGACCAATACATC	nt 2520
P T N P S D A A A K E H D E A Y D Q Y I	aa 50 VP1
AAATCTGGAAAAATCCTTACCTGTACTTCTCTCCTGCTGATCAACGCTTCATTGACCAA	nt 2580
K S G K N P Y L Y F S P A D Q R F I D Q	aa 70 VP1
ACCAAAGACGCCAAGGACTGGGGCGGCAAGGTTGGTCACTACTTTTTTAGAACCAAGCGA	nt 2640
T K D A K D W G G K V G H Y F F R T K R	aa 90 VP1

ES 2 603 407 T3

GCTTTTGACCTAAGCTTTCTACTGACTCTGAACCTGGCACTTCTGGTGTGAGCAGACCT nt 2700
 A F A P K L S T D S E P G T S G V S R P aa 110 VP1

GGTAAACGAATAAACCACTGCTCACATTTTGTAAATCAAGCCAGAGCTAAAAAAAAA nt 2760
 G K R T K P P A H I F V N Q A R A K K K aa 130 VP1

CGCGCTTCTCTTGTGCACAGCAGAGGACTCTGACAAATGAGTGATGGCACCGAAACAAAC nt 2820
 R A S L A A Q Q R T L T M S D G T E T N aa 150 VP1
 M S D G T E T N aa 8 VP2

CAACCAGACACTGGAATCGCTAATGCTAGAGTTGAGCGATCAGCTGACGGAGGTGGAAGC nt 2880
 Q P D T G I A N A R V E R S A D G G G S aa 170 VP1
 Q P D T G I A N A R V E R S A D G G G S aa 28 VP2

TCTGGGGTGGGGCTCTGGCGGGGTGGGATGGTGTCTACTGGGACTTATGATAAT nt 2940
 S G G G G S G G G G I G V S T G T Y D N aa 190 VP1
 S G G G G S G G G G I G V S T G T Y D N aa 48 VP2

CAAACGACTTATAAGTTTTGGGAGATGGATGGGTAGAAATAACTGCACATGCTTCTAGA nt 3000
 Q T T Y K F L G D G W V E I T A H A S R aa 210 VP1
 Q T T Y K F L G D G W V E I T A H A S R aa 68 VP2

CTTTTGCACTTGGGAATGCCTCCTTCAGAAAATACTGCCGCGTCACCGTTCACAATAAT nt 3060
 L L H L G M P P S E N Y C R V T V H N N aa 230 VP1
 L L H L G M P P S E N Y C R V T V H N N aa 88 VP2

CAAACAACAGGACACGGAATAAGGTAAGGGAAACATGGCCTATGCACACATCAACAA nt 3120
 Q T T G H G T K V K G N M A Y D T H Q Q aa 250 VP1
 Q T T G H G T K V K G N M A Y D T H Q Q aa 108 VP2

ATTGGACACCATGGAGCTTGGTAGATGCTAATGCTTGGGGAGTTGGTTCCAACCAAGT nt 3180
 I W T P W S L V D A N A W G V W F Q P S aa 270 VP1
 I W T P W S L V D A N A W G V W F Q P S aa 128 VP2

GACTGGCAGTTCATTCAAACAGCATGGAATCGCTGAATCTTGACTCATTGAGCCAAGAA nt 3240
 D W Q F I Q N S M E S L N L D S L S Q E aa 290 VP1
 D W Q F I Q N S M E S L N L D S L S Q E aa 148 VP2

ES 2 603 407 T3

CTATTTAATGTAGTAGTCAAACAGTCACTGAACAACAAGGAGCTGGCCAAGATGCCATT nt 3300
 L F N V V V K T V T E Q Q G A G Q D A I aa 310 VP1
 L F N V V V K T V T E Q Q G A G Q D A I aa 168 VP2

AAAGTCTATAATAATGACTTGACGGCCTGTATGATGGTTGCTCTGGATAGTAACAACATA nt 3360
 K V Y N N D L T A C M M V A L D S N N I aa 330 VP1
 K V Y N N D L T A C M M V A L D S N N I aa 188 VP2

CTGCCTTACACACCTGCAGCTCAAACATCAGAAACACTTGGTTTCTACCCATGGAACCA nt 3420
 L P Y T P A A Q T S E T L G F Y P W K P aa 350 VP1
 L P Y T P A A Q T S E T L G F Y P W K P aa 208 VP2

ACCGCACCAGTCCCTTACAGATACTACTTTTTTCATGCCTAGACAACCTCAGTGTAACTCT nt 3480
 T A P A P Y R Y Y F F M P R Q L S V T S aa 370 VP1
 T A P A P Y R Y Y F F M P R Q L S V T S aa 228 VP2

AGCAACTCTGCTGAAGGAACCTCAAATCACAGACACCATTGGAGAGCCACAGGCACTAAAC nt 3540
 S N S A E G T Q I T D T I G E P Q A L N aa 390 VP1
 S N S A E G T Q I T D T I G E P Q A L N aa 248 VP2

TCTCAATTTTTTACTATTGAGAACACCTTGCCTATTACTCTCCTGCGCACAGGTGATGAG nt 3600
 S Q F F T I E N T L P I T L L R T G D E aa 410 VP1
 S Q F F T I E N T L P I T L L R T G D E aa 268 VP2

TTTACAACCTGGCACCTACATCTTTAACACTGACCCACTTAACTTACTCACACATGGCAA nt 3660
 F T T G T Y I F N T D P L K L T H T W Q aa 430 VP1
 F T T G T Y I F N T D P L K L T H T W Q aa 288 VP2

ACCAACAGACACTTGGCATGCCTCCAAGGAATAACTGACCTACCAACATCAGATACAGCA nt 3720
 T N R H L A C L Q G I T D L P T S D T A aa 450 VP1
 T N R H L A C L Q G I T D L P T S D T A aa 308 VP2

ACAGCATCACTAACTGCAAAATGGAGACAGATTTGGATCAACACAACACAGAATGTGAAC nt 3780
 T A S L T A N G D R F G S T Q T Q N V N aa 470 VP1
 T A S L T A N G D R F G S T Q T Q N V N aa 328 VP2

TATGTCACAGAGGCTTTGCGCACCAGGCTGCTCAGATTGGCTTCATGCAACCTCATGAC nt 3840
 Y V T E A L R T R P A Q I G F M Q P H D aa 490 VP1
 Y V T E A L R T R P A Q I G F M Q P H D aa 348 VP2

ES 2 603 407 T3

AACTTTGAAGCAAACAGAGGTGGCCCATTTAAGGTTCCAGTGGTACCGCTAGACATAACA nt 3900
 N F E A N R G G P F K V P V V P L D I T aa 510 VP1
 N F E A N R G G P F K V P V V P L D I T aa 368 VP2

GCTGGCGAGGACCATGATGCAAACGGAGCCATACGATTTAACTATGGCAAACAACATGGC nt 3960
 A G E D H D A N G A I R F N Y G K Q H G aa 530 VP1
 A G E D H D A N G A I R F N Y G K Q H G aa 388 VP2

GAAGATTGGGCCAAACAAGGAGCAGCACCAGAAAGGTACACATGGGATGCAATTGATAGT nt 4020
 E D W A K Q G A A P E R Y T W D A I D S aa 550 VP1
 E D W A K Q G A A P E R Y T W D A I D S aa 408 VP2

GCAGCTGGGAGGACACAGCTAGATGCTTTGTACAAAGTGCACCAATATCTATTCCACCA nt 4080
 A A G R D T A R C F V Q S A P I S I P P aa 570 VP1
 A A G R D T A R C F V Q S A P I S I P P aa 428 VP2

AACCAAACCAGATCTTGCAGCGAGAAGACGCCATAGCTGGCAGAACTAACATGCATTAT nt 4140
 N Q N Q I L Q R E D A I A G R T N M H Y aa 590 VP1
 N Q N Q I L Q R E D A I A G R T N M H Y aa 448 VP2

ACTAATGTTTTTAAACAGCTATGGTCCACTTAGTGCATTTCTCATCCAGATCCCATTAT nt 4200
 T N V F N S Y G P L S A F P H P D P I Y aa 610 VP1
 T N V F N S Y G P L S A F P H P D P I Y aa 468 VP2

CCAAATGGACAAATTTGGGACAAAGAATTGGACCTGGAACACAAACCTAGACTACCGTA nt 4260
 P N G Q I W D K E L D L E H K P R L H V aa 630 VP1
 P N G Q I W D K E L D L E H K P R L H V aa 488 VP2

ACTGCACCATTGTTTGTAAAAACAACCACCAGGTCAACTATTTGTTCACTTGGGGCCT nt 4320
 T A P F V C K N N P P G Q L F V H L G P aa 650 VP1
 T A P F V C K N N P P G Q L F V H L G P aa 508 VP2

AATCTGACTGACCAATTTGACCCAAACAGCACAACACTGTTTCTCGCATTGTTACATATAGC nt 4380
 N L T D Q F D P N S T T V S R I V T Y S aa 670 VP1
 N L T D Q F D P N S T T V S R I V T Y S aa 528 VP2

ACTTTTTACTGGAAGGGTATTTTGAATTCAAAGCCAACTAAGACCAAAATCTGACCTGG nt 4440
 T F Y W K G I L K F K A K L R P N L T W aa 690 VP1
 T F Y W K G I L K F K A K L R P N L T W aa 548 VP2

ES 2 603 407 T3

AATCCTGTATACCAAGCAACCACAGACTCTGTTGCCAATCTTACATGAATGTTAAGAAA	nt 4500
N P V Y Q A T T D S V A N S Y M N V K K	aa 710 VP1
N P V Y Q A T T D S V A N S Y M N V K K	aa 568 VP2
TGGCTCCCATCTGCAACTGGCAACATGCACTCTGATCCATTGATTTGTAGACCTGTGCCT	nt 4560
W L P S A T G N M H S D P L I C R P V P	aa 730 VP1
W L P S A T G N M H S D P L I C R P V P	aa 588 VP2
CACATGACATACTAACCAACCAACTATGTTTCTGTTGCTTCACATAATACTTAAACT	nt 4620
H M T Y *	aa 734 VP1
H M T Y *	aa 592 VP2
AACTAGACTACAACATAAAAAATATACACTTAATAATAGATTATTAATAAACATAATAT	nt 4680
GGTAGGTTAACTGTAAAAATAATAGAACTTTTGAATAAATATAGTTAGTTGGTTAATG	nt 4740
TTAGATAGAATATAAAAAAGATTTTGTATTTTAAATAAATATAGTTAGTTGGTTAATGTT	nt 4800
AGATAGAATATAAAAAAGATTTTGTATTTGGGAAATAAAAAGGGTGGTTGGGTGGTTGGTT	nt 4860
GGTACTCCCTTAGACTGAATGTTAGGGACCAAAAATAATAAATAATTAATAATGAACA	nt 4920
AGGACTACTGTCTATTTCAGTTGACCAACTGAACCTATAGTATCACTATGTTTTTAGGGTG	nt 4980
GGGGGGTGGGAGATACATACGTTTCGCTATGGACCAAGTGGTACCGGTTGGTTGCTAAGCT	nt 5040
CGAACAAGACGGCTAAGCCGGTCCGGTTGGTTGAGCGCAACCAACCGGTACCCTTGCTC	nt 5100
CATAGCGAACGTATGTATCTCCCACCCCCACCCTAAAAACATAGTGATACTATAGGTT	nt 5160
CAGTTGGTCAACTGAA	nt 5176

Figura 12

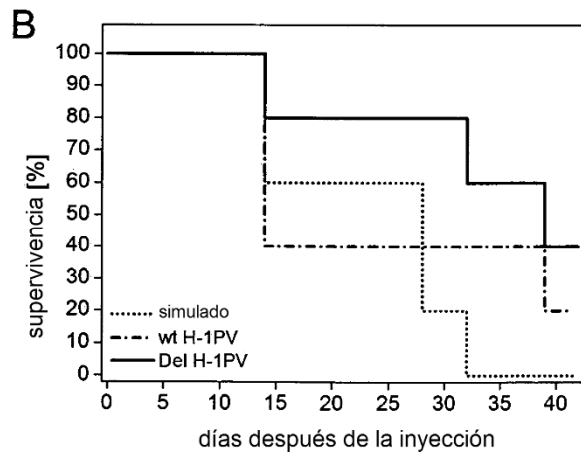
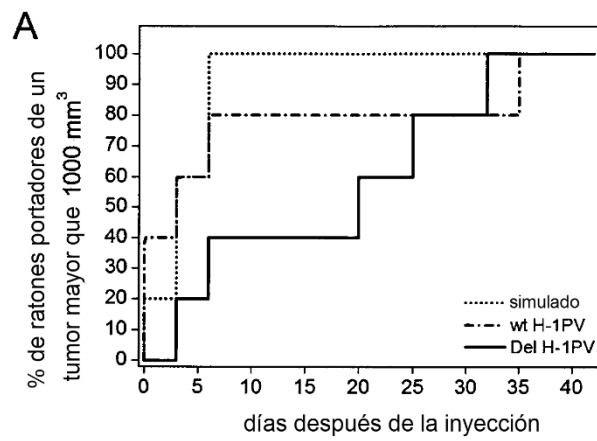


Figura 13

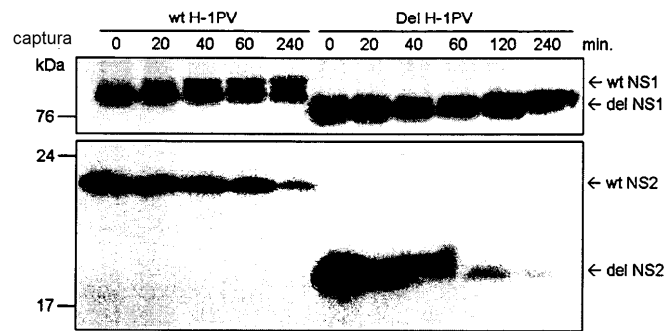
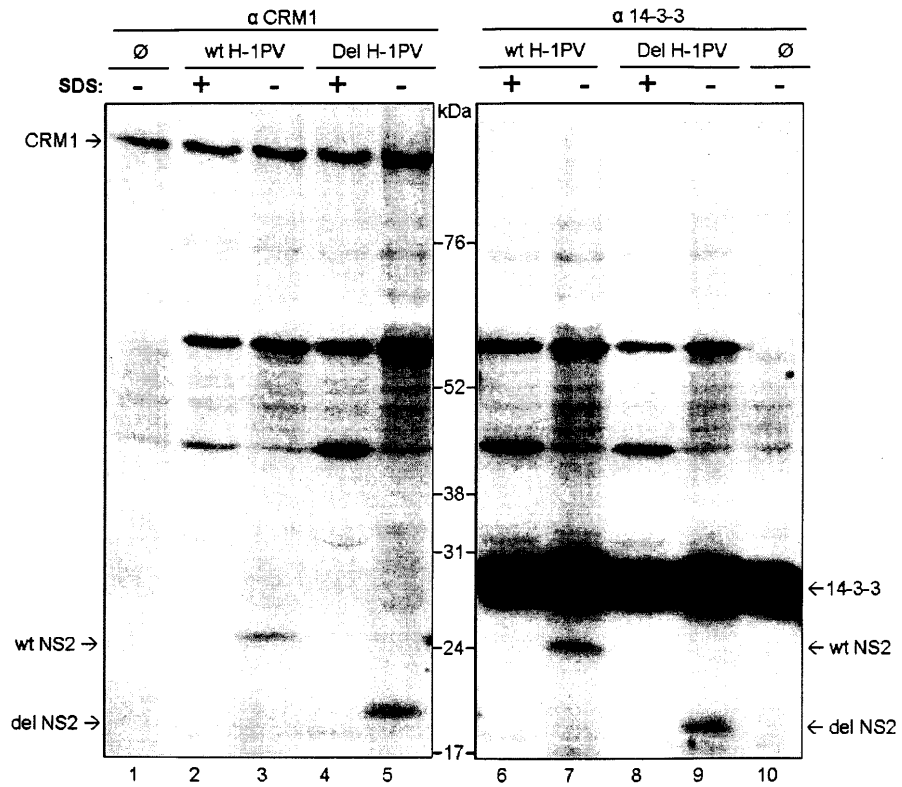


Figura 14

A-



B-

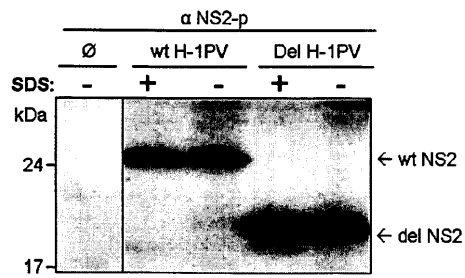


Figura 15

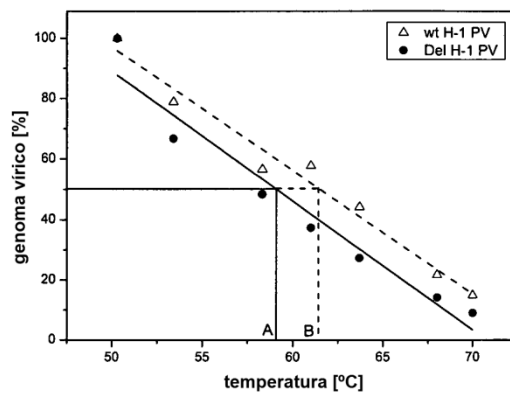
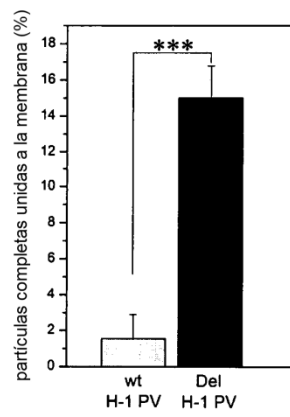


Figura 16

A-



B-

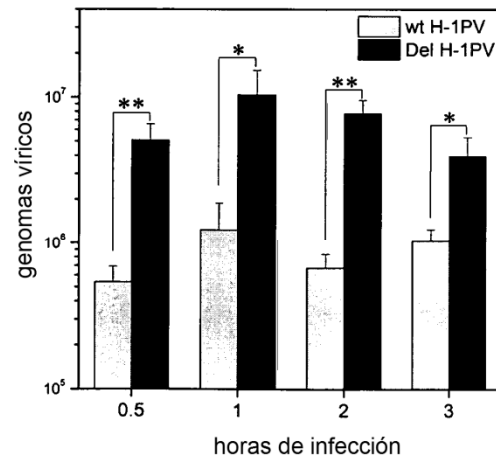
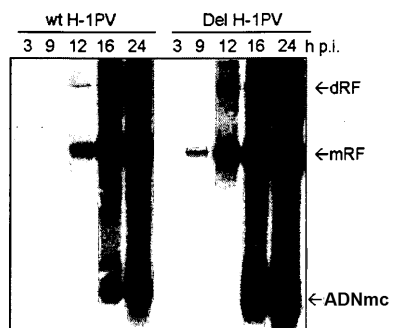


Figura 17

A-



B-

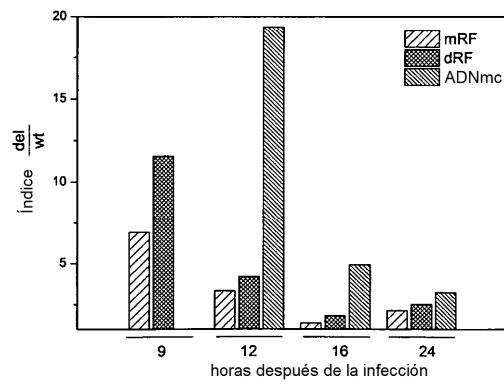


Figura 18

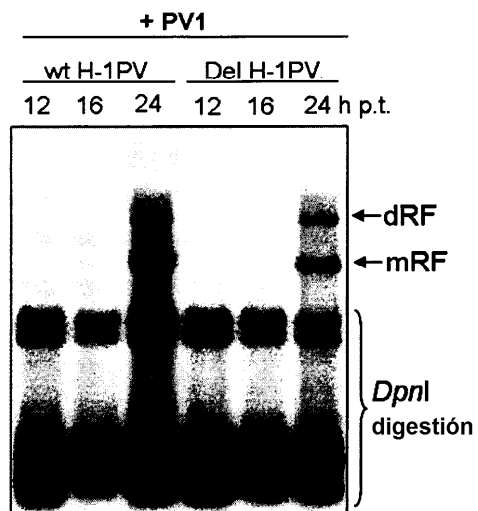


Figura 19

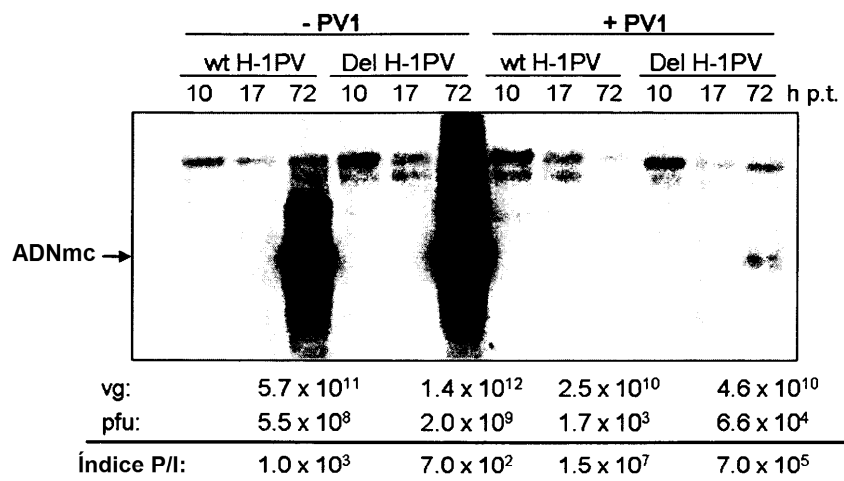


Figura 20

transfección	pfu / ml	vg / ml	Índice P / I	wt / del
phH-1	2.82×10^8	4.58×10^{11}	1624	5.8
pdelH-1	2.17×10^9	6.06×10^{11}	279	
pwtH-1	9.80×10^8	1.46×10^{11}	149	4.5
pdelH-1	2.18×10^{10}	7.29×10^{11}	33	