

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 917**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/76** (2015.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2011 PCT/EP2011/002842**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2011 WO11154146**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2011 E 11730197 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2579885**

54 Título: **Parvovirus para el tratamiento de tumores por aplicación intranasal**

30 Prioridad:

**11.06.2010 EP 10006082**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.05.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ROMMELAERE, JEAN;  
KIPRIJANOVA, IRINA;  
SCHLEHOFER, JÖRG;  
AYACHE, ALI y  
FISCHER, MANUEL**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 610 917 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 para el tratamiento de tumores por aplicación intranasal

5 La presente invención se refiere a un parvovirus para su uso en un método de tratamiento de un tumor y/o metástasis tumoral por administración intranasal, en el que el tumor es un tumor cerebral y/o las metástasis son metástasis cerebrales.

10 Los parvovirus en roedores son virus de ADN de cadena simple que poseen actividad oncolítica intrínseca, es decir, preferentemente se replican en células cancerosas de origen tanto humano como murino y las destruye. En este sentido, los parvovirus oncolíticos, en particular los parvovirus de roedores representan herramientas novedosas para el tratamiento del cáncer. Aunque el virus puede entrar en la mayoría de las células no transformadas (normales), la infección es abortiva y no produce una progenie de viriones. Por el contrario, en muchas células malignas o en células transformadas por varios medios, la infección por parvovirus conduce a la muerte celular, la cual no se observa en las correspondientes células no transformadas, y puede ser productivo. Se ha demostrado  
15 que la permisividad aumentada de las células transformadas para los parvovirus se debe, al menos en parte, a cambios en factores asociados con (i) el ciclo y la diferenciación celular y (ii) el control de la replicación del ADN vírico y la expresión génica. Además de destruir de forma específica a las células cancerosas (oncolisis), estos parvovirus también proporcionan señales de alarma que hacen que el sistema inmunológico elimine los tumores infectados por virus. Como consecuencia de los procesos oncolíticos, el sistema inmunitario innato y adaptativo accede a los antígenos tumorales, lo que produce efectos de sensibilización cruzada y de vacunación.

20 El glioblastoma es una enfermedad devastadora con posibilidades de tratamiento únicamente limitadas. Evidentemente, pronóstico para pacientes requiere nuevas terapias. Los virus oncolíticos competentes para la replicación descritos anteriormente se consideran prometedores, ya que son capaces de propagarse a través de tejidos malignos e inducir respuestas inmunitarias antitumorales. Entre ellos, los parvovirus de roedores parecen ser excelentes candidatos, debido a su oncotropismo natural, a su capacidad de infectar las células humanas, a la toxicidad específica para las células neoplásicas y a la baja patogenicidad para los seres humanos. En un modelo de rata, el H1-PV fue capaz de causar una regresión completa de los gliomas establecidos sin ninguna recaída, y los virus demostraron ser capaces de actuar sobre varios gliomas humanos, destruyendo eficazmente a estas células, independientemente de su resistencia adquirida frente a inductores de muerte conocidos. Sin embargo, las vías de administración de parvovirus en cuanto a eficiencia y conveniencia necesitan mejoras.

25 El documento US 2004/0220124 A1 desvela un método para tratar un tumor cerebral en un paciente con administración de parvovirus por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica o intratumoral.

30 Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar una vía de administración para parvovirus oncolíticos superando los inconvenientes de la técnica anterior.

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

40 Sorprendentemente, se descubrió que los parvovirus administrados por vía intranasal pueden utilizarse con éxito para la supresión con alta eficacia de gliomas cerebrales en ratas. En el estudio que conduce a la presente invención, el concepto de terapia vírica para el glioma basada en el H-1PV por aplicación intranasal se ensayó en gliomas de rata (derivados de células RG-2) en modelos de rata inmunocompetentes. Las ratas se trataron con el H-1PV administrado por vía intranasal. La regresión tumoral se monitorizó mediante imagen de resonancia magnética, y la oncolisis se demostró mediante histología. En el cerebro se detectaron la presencia de ADN vírico y cápsides de virus. La replicación del virus en tumores puede contribuir a una infección secundaria por el virus de la progenie a la eficacia de la oncolisis. En ratas inmunocompetentes portadoras de tumores derivados del RG-2, una sola aplicación intranasal del H-1PV del virus fue suficiente para la remisión de gliomas intracraneales avanzados e incluso sintomáticos sin dañar el tejido cerebral normal u otros órganos. Además, la terapia del H-1PV dio como resultado una mejora significativa de la supervivencia (análisis de Kaplan-Meier) en los modelos de rata con glioma. Los resultados presentados en los ejemplos, a continuación, y la inocuidad del H-1PV para los humanos sostienen el uso  
45 del H-1PV como un medio poderoso para realizar la terapia oncolítica de tumores, en particular los gliomas malignos, por aplicación intranasal del parvovirus.

50 En resumen, la parvoterapia intranasal de acuerdo con la presente invención es útil para la terapia de tumores, en particular tumores cerebrales, y puede mejorar el pronóstico de dichos tumores. La infección por parvovirus H1 conduce a la destrucción de células tumorales, pero no daña a las células cerebrales normales. Por lo tanto, el uso intranasal de un parvovirus, como H1, o de vectores basados en dicho virus ofrecen la posibilidad de una terapia tumoral específica sin efectos secundarios neurológicos graves. Las ventajas de la aplicación intranasal también pueden facilitar muchas aplicaciones (si se requiere), por ejemplo, el uso de un pulverizador. A diferencia de las aplicaciones parenterales, la aplicación intranasal no induciría fácilmente los anticuerpos séricos, y si los anticuerpos séricos pudieran estar presentes, el virus aplicado por vía intranasal no sería neutralizado fácilmente. Es concebible que también el parvovirus oncolítico pueda alcanzar las metástasis de tumores cerebrales de origen no glial.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Regresión del glioma por administración intranasal del H-1PV.

Se dan imágenes de RM (resonancia magnética) de tres animales, cada uno de un grupo experimental, como ejemplos representativos. Las ratas portadoras de un glioma RG-2 intracraneal se trataron por vía intranasal con (A) PBS, (B) cápsides no infecciosas del H-1PV (cápsides vacías irradiadas con UV equivalentes a  $1 \times 10^{10}$  partículas), (C) H-1PV infeccioso ( $1 \times 10^8$  ufc) 7 días después de la implantación de células tumorales. Las imágenes de RM se realizaron (a) 7, (b) 12, (c) 17 o (d) 22 días después de la implantación de células tumorales. No hay imágenes del día (d) 22 para el grupo control debido a que las ratas tratadas con PBS o con cápsides vacías no sobrevivieron por mucho tiempo. La imagen de RM del grupo B (cápsides vacías) tuvo que realizarse el día 16 debido a la ausencia de supervivientes tiempo después. Los animales del grupo C sobrevivieron sin síntomas durante más de 80 días después de la implantación de las células tumorales. Nota: Probablemente debido a la regresión del tumor, las formas de los cerebros en las IRM cambian ligeramente (C, d).

Figura 2: Análisis Kaplan-Meyer de las ratas portadoras de glioma supervivientes tras la instilación intranasal del H-1PV.

(A) Ratas Wistar portadoras del glioma RG-2.

(B) Ratas RNU portadoras del glioma U87. Las barras verticales indican censura de animales para fines analíticos. Línea roja: PBS (A: n=6; B: n=5), línea negra: cápsides de H-1PV vacías (A: n=5; B: n=7), línea verde: viriones H-1PV infecciosos (A: n=15; B: n=11). La diferencia entre el grupo tratado con H-1PV y los controles fue estadísticamente significativa en ambos modelos (ensayo *logrank* (rango logarítmico): A:  $p=0,0021$ ; B:  $p=0,0038$ ). (En el grupo de ratas Wistar, 17 días después de la implantación de células tumorales, 2 animales del grupo infectado con H-1PV murieron por razones no relacionadas con el tumor).

Figura 3: Histología de los cerebros de animales infectados con el H-1PV.

Tinción con hematoxilina y eosina de secciones de áreas del cerebro, como se indica, 5 días después de la infección intranasal con H-1PV. La morfología de los cerebros infectados no se alteró tras la infección (comprobado por un neuropatólogo) excepto en el área de glioma de los animales portadores de tumores (tumor derivado de células RG-2 en ratas Wistar o tumor derivado de células U87 en ratas RNU, como se indica). Cinco días después de la infección, la destrucción de las células tumorales fue más pronunciada en el glioma RG-2 en comparación con el glioma U87.

Figura 4: Presencia de ADN vírico en cerebros de animales portadores de glioma infectados por vía intranasal con H-1PV.

(A) Detección de ADN vírico en diferentes secciones de cerebros de ratas portadoras de glioma de células RG-2. Se indican las posiciones de la sección cerebral: 1: bulbos olfativos, 2: corteza frontal/ área de putamen y núcleo caudado, 3: área tumoral/hipocampo, 4: corteza perirrinal/subículo, 5: cerebelo. Se extrajo ADN de estas secciones a las 24 o 72 h tras la infección y el ADN fue detectado por PCR. El producto amplificado (516 pb) se visualizó tras una electroforesis con gel de agarosa. El glioma se localizó en la sección 3, que está dividida en partes que contienen tumor (3t) y partes que no lo tienen (3). N = control negativo (tejido de animales infectados de manera simulada); P= control positivo (ADN de células RG-2 infectadas con H-1PV).

(B) Ensayo de células dispersas de cerebros de ratas RNU inmunodeficientes infectadas. Las células NBK se inocularon con tejido cerebral de filtrado estéril de animales infectados y se transfirieron a una membrana seguida de hibridación con una sonda radiactiva del marcador específico NS-1. Los resultados del hemisferio cerebral portador del tumor y el correspondiente hemisferio de un animal que no es portador de tumor se muestran para ser comparados, 1 y 5 días después de la infección. Los controles incluyen células infectadas con H-1PV y células infectadas de manera simulada.

Figura 5: Restricción de la expresión de la proteína no estructural 1(NS-1) del H-1PV en el área de glioma de los cerebros de rata después de la infección intranasal.

Cinco días después de la infección, la expresión del NS-1 se detecta en secciones cerebrales por inmunohistoquímica, utilizando anticuerpos anti-NS-1 y marcador de contraste DAPI como se indica.

(A) Área tumoral de un cerebro portador de glioma RG-2 (señal NS-1, rojo fluorescente);

(B) Área tumoral de un cerebro portador de glioma U87 (señal NS-1, verde fluorescente);

(C) Área no tumoral del cerebro de una rata infectada portadora de glioma RG-2 (también en ratas RNU infectadas y portadoras del glioma U87, no hubo señal NS-1 en las áreas no tumorales del cerebro).

Figura 6. Detección de proteínas de la cápside del H-1PV en cerebro de rata después de la instilación nasal del H-1PV. Una rata Wistar representativa fue sacrificada 10 días después de la implantación de células RG-2 (es decir, 3 días después de la instilación intranasal del virus). Las proteínas de la cápside del H-1PV se detectaron por inmunotinción de secciones cerebrales utilizando un antisuero VP específico y el marcador DAPI (VP, señales verdes).

- (A) Área del bulbo olfativo  
 (B) Área tumoral  
 (C) Cerebelo. Se obtuvieron resultados similares en secciones de cerebros portadores de tumor derivado de células U87 y en ratas no portadoras de tumores. La VP también se pudo detectar después de la instilación de cápsidas virales vacías.

Figura 7. Aparición de anticuerpos séricos neutralizantes del H-1PV después de la infección intranasal del virus. Las muestras de sangre se obtuvieron de un animal representativo (rata Wistar) en diferentes días después de la infección del H-1PV (como se indica), y se determinaron los títulos de los anticuerpos neutralizantes de los virus mediante la prueba de MTT. Los títulos se dan como recíprocos de la dilución del suero, definida como la dilución, que reduce el efecto citotóxico viral del H-1PV en un 50%.

La presente invención se refiere a un parvovirus para su uso en un método de tratamiento de un tumor y/o metástasis tumoral mediante administración intranasal, en el que el tumor es un tumor cerebral y/o las metástasis son metástasis cerebrales.

El término "parvovirus", tal y como se usa en el presente documento, comprende los virus de tipo silvestre o sus derivados competentes modificados por replicación, así como vectores, por ejemplo, vectores de expresión, basados en tales virus o en sus derivados. El experto en la técnica está familiarizado con estos ejemplos. En una realización preferida, el vector que contiene el ADN de un parvovirus es un virus, por ejemplo, un adenovirus, un virus vacuna, un virus adeno-asociado (AAV, por sus siglas en inglés), o un parvovirus como MVM o H-1, el parvovirus preferido. El vector también puede ser un retrovirus como MoMULV, MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV o GaLV. Además, el parvovirus puede aplicarse como ADN desnudo o puede acoplarse o incrustarse dentro de una superficie de liposoma, lo que permite una mejor administración.

Para construir vectores (expresión) que contengan ADN parvovírico, es posible utilizar métodos generales conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de recombinación in vitro, métodos de síntesis y métodos de recombinación in vivo.

Los parvovirus y derivados más adecuados los conoce el experto en la técnica.

Preferiblemente, los parvovirus que se utilizan son los capaces de propagarse y extenderse a través de células tumorales humanas. El término "propagarse" tal y como se utiliza en el presente documento significa que la progenie de viriones de la variedad del parvovirus muestra una amplificación significativa sobre los niveles de entrada (es decir, > 5 veces). El término "extenderse" tal y como se usa en el presente documento significa que la progenie de viriones de la variedad del parvovirus son capaces no solo de destruir las poblaciones de células primariamente infectadas, sino que son capaces de causar infecciones secundarias de células vírgenes (*naive*) con partículas producidas durante la primera etapa de la infección.

Preferiblemente, el parvovirus utilizado en la presente invención es un parvovirus de roedores que preferiblemente sea un parvovirus de rata o un parvovirus relacionado con roedores. Son ejemplo preferidos de parvovirus relacionados con roedores el virus Lulll, el virus diminuto del ratón (MMV), el parvovirus de ratón (MPV), el virus diminuto de la rata (RMV), el parvovirus de rata (RPV) o el virus de la rata (RV). Un parvovirus de rata particularmente preferido es el parvovirus H-1 (H-1PV).

En principio, cualquier tumor cerebral (o posiblemente también metástasis cerebral de otro tumor primario original) con gliomas, siendo particularmente preferidos los glioblastomas, pueden curarse mediante aplicación intranasal de un parvovirus.

Para la administración intranasal, el parvovirus puede combinarse con transportadores farmacéuticos adecuados. Un tipo de transportadores farmacéuticos bien conocidos en la técnica y fácilmente disponible en el mercado incluye soluciones salinas tamponadas con fosfato (PBS, del inglés *phosphate buffered saline*), agua, emulsiones tales como aceite/agua, agentes humectantes de varios tipos, soluciones estériles, etc. Tales transportadores pueden elaborarse con el parvovirus mediante métodos convencionales de elaboración para la administración de la dosis adecuada a los pacientes.

El régimen de dosificación del parvovirus puede determinarse fácilmente dentro de las competencias de la técnica, mediante atención física basada en los datos del paciente, las observaciones y otros factores clínicos que incluyen, por ejemplo, el tamaño del paciente, la superficie corporal, la edad, el sexo, el virus en particular, el vector, la célula, etc., a administrar, el tipo de tumor, el grado, el tamaño, etc., el estado general de salud del paciente y otros fármacos o terapias a los que esté siendo sometido el paciente.

Preferiblemente, la administración intranasal es una dosis única o tres dosis diarias durante tres días.

Preferiblemente, una dosis única contiene entre  $10^7$  y  $10^{10}$  ufc.

Los intervalos entre  $10^8$  y  $10^9$  ufc son particularmente preferidos.

A continuación, los ejemplos explican la invención con más detalle.

5 **Ejemplo 1**

Material y Métodos

(A) Células

10 La línea celular de glioblastoma RG-2 de rata (proporcionada amablemente por C. Walz, Universidad de Magdeburgo, Alemania) fue crecida en DMEM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) enriquecido con 10% de FCS (Biochrom, KG Berlín, Alemania) y un 1% de antibióticos (penicilina, estreptomina; Gibco, Invitrogen Corporation Karklsruhe, Alemania) en una atmósfera humidificada al 5% de  $CO_2$ , a 37 °C. Las células en crecimiento exponencial  
15 que se administraron a las ratas fueron tripsinizadas y centrifugadas (146g/10 min) y el sedimento celular fue resuspendido en DMEM sin suplementos.

(B) Producción del H-1PV e infección

20 El H-1PV se amplificó en células NB-K humanas y se purificó con gradientes de iodixanol (5-{N-[3-(N-{3,5-bis[(2,3-dihidroxi)propil]carbamoil]-2,4,6-triyodofenil]acetamido)-2-hidroxi]propil]acetamido)-1-N,3-N-bis(2,3-dihidroxi)propil)-2, 4,6-triyodobenceno-1,3-dicarboxamida, GE Healthcare Canadá Inc. Mississauga, ON) como se describe  
25 previamente (1). El H-1PV se tituló en células NB-K indicadoras mediante ensayo en placa y se utilizó adicionalmente en múltiples infecciones expresadas en unidades formadoras de cultivo (ufc) por célula (2). Las partículas vacías de H-1PV se aislaron mediante centrifugación en gradiente de CsCl, y las partículas infecciosas residuales se desactivaron mediante radiación UV como se describe (3,4).

(C) Experimentos en animales

30 Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo conforme a las directrices institucionales y estatales. Las ratas Wistar hembras consanguíneas (10 semanas de edad; 26 en total) y las ratas RNU inmunodeficientes (10 semanas de edad; 24 en total) se obtuvieron de Charles River (Sulzfeld, Alemania).

(i) Implantación intracerebral de células tumorales

35 Las ratas se anestesiaron con isoflurano (5 % y 2,5 % como dosis inicial y de mantenimiento, respectivamente), y se pusieron en un marco estereotáctico. Tras la incisión lineal del cuero cabelludo, se hizo una perforación en el cráneo de 0,5 mm a 2 mm a la derecha de la línea media y 1 mm anterior a la sutura coronal. Se introdujo la aguja de una jeringa Hamilton de 10 ml de manera estereotáctica a través de la perforación a la parte posterior del lóbulo frontal a una profundidad de 5 mm por debajo del nivel de duramadre, y se inyectaron durante 7 minutos células RG-2 de glioma o células U87 de glioma humano, respectivamente (en cada caso, 50.000 células en un volumen de 7 ml). La aguja se retiró lentamente para minimizar la propagación de células tumorales a lo largo del trayecto de la aguja.

(ii) Infección intranasal con H-1PV en ratas Wistar inmunocompetentes portadoras de glioma

45 Siete días después de la implantación de las células RG-2, las ratas portadoras de tumores se infectaron con el H-1PV por aplicación intranasal. Se anestesió brevemente a los animales, como se ha indicado anteriormente, y se instilaron una vez con  $10^8$  ufc de H-1PV en 100 µl de PBS, 50 µl en cada una de las fosas nasales. Los animales control recibieron PBS o un número equivalente ( $1 \times 10^{10}$ ) de partículas no infecciosas (cápsidas de H-1PV vacías irradiadas con UV) en el mismo volumen. Los animales infectados se mantuvieron separados de las ratas control no infectadas mediante condiciones de aislamiento. El crecimiento tumoral se monitorizó cada 4-5 días mediante RM (ver más abajo). Las señales clínicas y el peso de los animales se monitorizaron diariamente. Los animales que desarrollaron síntomas relacionados con tumores o una pérdida de peso corporal (> 20 %) se sacrificaron según las directrices institucionales.

(iii) Imagen de resonancia magnética

60 Los animales se examinaron en un escáner de RMN 2,45-T (Bruker BioSpin MRI GmbH, Ettlingen, Alemania) utilizando imagen ponderada en T1 antes y después de inyectar 0,4 ml de medio de contraste (Gadodiamida, Omniscan, Amersham, Freiburg) en la vena de la cola. La imagen T1 con contraste mejorado se realizó 5 minutos después de la inyección. Durante el examen por RM, las ratas se anestesiaron mediante insuflación de isoflurano (dosis inicial de 5 %, mantenimiento con 2 %, como anteriormente).

(iv) Infección intranasal con H-1PV en ratas RNU inmunodeficientes portadoras de glioma

65

Las ratas con xenoinjertos U87 se trataron con H-1PV a través de instilaciones intranasales múltiples, a los días 8, 11, 14, 17 y 20 después de la implantación de células tumorales. La dosis total de H1-PV por animal fue de  $5 \times 10^8$  ufc.

5 (D) Análisis de muestras de tejido

Los animales de cada grupo (animales portadores de glioma tratados con PBS o con H-1PV no infeccioso (control) o H-1PV infeccioso) se sacrificaron 1, 3, y 5 días después de la infección como placebo o la infección vírica. La sangre, el cerebro y otros órganos (riñón, pulmón, corazón, bazo, hígado e intestino) se analizaron en busca de ADN vírico.

10 (i) Extracción de ADN de las muestras de tejido

Se extrajo ADN de criosecciones (10  $\mu\text{m}$  de espesor) de especímenes congelados por choque de diferentes partes de ambos hemisferios (uno portador de tumor y otro no) y de muestras de órganos periféricos (ver más arriba; 25 mg de tejido) utilizando el Mini Kit de ADN Genómico PureLink™ (Invitrogen, Darmstadt, Alemania). De la sangre completa, el ADN se extrajo con el kit QIA amp DSP de sangre (Quiagen, Hilden, Alemania).

15 (ii) Detección con PCR del DNA H-1PV

20 Las reacciones de PCT se realizaron utilizando 50 ng de ADN total en 40  $\mu\text{l}$  de Supermix (Invitrogen, Darmstadt, Alemania) y los cebadores siguientes (0,2  $\mu\text{l}$  de una reserva de 100 nM de cada cebador): sentido del cebador, 5'-TCAATGCGCTCACCATCTCTG-3' (Posición nt 1996-2016 dentro de la región del gen NS del genoma H-1PV) y antisentido 5'-TCGTAGGCTTCGTCGTGTTCT-3' (posición nt 2490-2510), produciendo un fragmento amplificado de 516 pb. La amplificación (34 ciclos) fue la siguiente: 3 min, reacción de partida a 95°C; Ciclo: 30 seg, 94 °C; 30 segundos, 58 °C; 1 minuto, 72 °C; elongación final 7 min, 72 °C. Los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1,7 %) a 120 V. El ADN de células RG2 infectadas sirvió como un control positivo. Los controles negativos incluyeron H<sub>2</sub>O y los correspondientes tejidos de una rata infectada de manera simulada.

25 (iii) Ensayo de células dispersas

30 Se inocularon por triplicado filtrados homogéneos de muestras de cerebro y sangre de animales infectados con H-1PV en células NB-K semiconfluentes, sembradas en placas de 48 pocillos. Al producirse el efecto citopático mediado por virus (CPE), las células se cultivaron mediante tripsinización y se agruparon con el sobrenadante del cultivo y se atraparon por succión sobre una membrana de transferencia GeneScreen (Perkin Elmer, Rodgau, Alemania) o análisis de amplificación de ADN vírico utilizando el ensayo de células dispersas como se ha descrito previamente (5). Tras reticular con UV (usando el UV Stratalinker 1800 a 254 nm, Stratagene/Agilen, Waldbronn, Alemania; programa de reticulación automática), los filtrados se hibridaron con una sonda de ADN vírico radiomarcada, proporcionada amablemente por J.F.P. Nüesch y se expusieron a una película de rayos X (Amersham HyperFilm ECL, GE, Healthcare, Múnich, Alemania).

35 (E) Análisis de replicación vírica

40 Los cerebros se extrajeron de los animales sacrificados 1 y 5 días después de la infección con H-1PV, y los dos hemisferios se analizaron por separado. Después de pesarlos, los tejidos se homogeneizaron en 6 ml de PBS en presencia de perlas de Matrix-D (Q-Biogene [Heidelberg, Alemania]). Se centrifugó un ml de esta mezcla, y el sobrenadante se filtró a través de filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  y se utilizó para diluciones seriadas (etapas 1:10) para inocularlas en células indicadoras de NB-K y RG-2. Cuando los controles alcanzaron (4 días después de la infección), las células se fijaron con una mezcla de acetato/etanol (1:3) y se tiñeron con cristal violeta. El virus en el tejido se determinó como la dilución más alta que causó un CPE (los títulos se normalizaron a 1 g de tejido cerebral).

45 (F) Inmunohistoquímica

50 Para la inmunodetección de proteínas parvovirales, se permeabilizaron secciones congeladas de 20 micrómetros montadas en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Roth, Karlsruhe, Alemania) con Triton X-100 al 0,1% en PBS y se incubaron con suero de cabra al 5% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente para bloquear la tinción no específica. Las secciones se incubaron a continuación durante 36 horas a 4 °C con el anticuerpo específico NS-1 de ratón monoclonal 3d9 (cortesía del Dr. N. Salome) y/o el antisuero específico de conejo H-1PV-VP (cortesía del Dr. C. Dinsart (6)). Después de enjuagar, se añadieron anticuerpos secundarios (anti-IgG de ratón conjugado con Cianina3 [rojo; Jackson ImmunoResearch, West Grove, EE.UU.], anti-IgG de ratón conjugado con cianina2 [verde; GE Healthcare, Freiburg, Alemania], o anti-IgG de conejo conjugado con cianina2 [Jackson ImmunoResearch, West Grove, EE.UU.]) que se aplicaron a las secciones (3 h a temperatura ambiente) para revelar las proteínas virales NS-1 y VP, respectivamente. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron intensamente y se montaron con medio que contenía DAPI (VESTASHIELD, Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.) para visualizar los núcleos. Las imágenes se digitalizaron utilizando un microscopio fluorescente Leica DMRBE (Leica, Bensheim, Alemania) equipado con una cámara digital y un software de análisis de imágenes (analySIS, Olympus, Alemania).

(G) Análisis histológicos (tinción con Hematoxilina y Eosina)

Las secciones congeladas del cerebro en las placas se incubaron durante 3 minutos en hematoxilina (Sigma-Aldrich, Hamburgo, Alemania), se lavaron con agua de grifo, se expusieron durante 5 minutos en eosina (Sigma-Aldrich) y se incubaron en concentraciones crecientes de etanol (70 %, 80 %, 90 % y 100 %; 10 minutos por cada concentración) seguido de inmersión en xilol (Merck, Darmstadt, Alemania), cubierto con Eukitt (Kindler, Freiburg, Alemania), y secado al aire.

(H) Anticuerpos neutralizantes del virus

Se obtuvieron muestras de sangre de animales en diferentes momentos temporales después de la infección por H-1PV. Se prepararon diluciones seriadas de los sueros en MEM y se mezclaron con un volumen igual de suspensión de H-1PV (correspondiente a  $8 \times 10^4$  ufc / pocillo). Después de la incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente, se inoculó la mezcla de suero-virus en células NB-K puestas en placas de 96 pocillos ( $8 \times 10^3$  células/pocillo). Después de una incubación de 20 minutos, los cultivos fueron suplementados con MEM (que contenía 5 % de FCS inactivado por calor y penicilina-estreptomicina al 1 %), se mantuvieron durante 72 horas a 37 °C y se procesaron para la determinación del número de células vivas (en relación con los cultivos infectados de manera simulada) utilizando el ensayo MTT. Brevemente, el MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-Il]-2,5-difeniltetrazolio, proporcionado por Sigma - Aldrich, EE.UU.) en la solución madre (5 mg/ml) se añadió a cada cultivo (10 µl por 100 µl). Después de la incubación durante 3,5 h a 37 °C, se retiró el medio, se solubilizó el colorante incorporado con isopropanol ácido (100 ml / pocillo) y se midieron los valores de extinción con un aparato Multiskan EX (Thermo Electron Corporation, Dreieich, Alemania) a 570 nm. El título de anticuerpo neutralizante de virus se definió como la dilución de suero, que redujo el efecto citotóxico viral (es decir, la fracción de células vivas en relación con los cultivos infectados simuladamente) en un 50%.

(I) Estadísticas

Se calculó la significancia estadística de las diferencias en las tasas de supervivencia entre los animales portadores de tumores infectados con H-1PV frente a los tratados de manera simulada utilizando el ensayo *logrank* (rango logarítmico), del tipo ensayo de suma de rangos de Wilcoxon (7), modificado para datos de supervivencia censurados (animales sacrificados), y se expresaron como valores de p. En las curvas de Kaplan-Meier, los momentos de sacrificio (es decir, de censura) se indican mediante barras verticales.

**Ejemplo 2**

Tratamiento del glioma en un modelo de rata utilizando aplicación intranasal del parvovirus oncolítico H-1 (H-1PV)

Recientemente se demostró que la infección intratumoral o intravenosa con parvovirus H-1PV inducía la regresión completa de gliomas experimentales en un modelo de rata (8). Dado que hay indicios de que el epitelio nasal podría ser un posible sitio de entrada de virus en la infección natural con parvovirus (9), se probó si la supresión de glioma similar podría lograrse instilando H-1PV en la cavidad nasal de los animales. Esto se investigó en ratas Wistar que portaban gliomas derivados de células RG-2 intracraneales (ratas) y en ratas RNU (inmunodeficientes) con gliomas humanos establecidos a partir de células U87. Cincuenta mil células se implantaron estereotácticamente en la parte posterior del lóbulo frontal de los cerebros de 26 ratas Wistar y 24 ratas RNU, respectivamente, dando lugar a la formación de tumores. En ausencia de tratamiento adicional, los animales tuvieron que ser sacrificados debido a síntomas relacionados con tumores: la supervivencia de los animales después de la implantación de células tumorales fue de 22 días (glioma RG-2) o 27 días (glioma U87) al máximo.

En el tratamiento de los experimentos, los animales fueron infectados con H-1PV por la vía intranasal ( $10^8$  ufc en 100 µl, 50 µl en cada fosa nasal; una inoculación en ratas Wistar, inoculaciones múltiples en 11 ratas RNU) 7 días (ratas Wistar) u 8, 11, 14, 17 y 20 días (ratas RNU) después de la implantación de células tumorales. Los grupos de control se trataron instilando cápsides virales vacías ( $10^{10}$  partículas en 100 µl, Wistar: n = 5, RNU: n = 7) o PBS (100 µl, Wistar, n = 6, RNU, n = 5) en las fosas nasales de los animales.

Como se deduce a partir de las imágenes de RM en la Figura 1, una única instilación intranasal de H-1PV fue suficiente para lograr la remisión completa de gliomas intracraneales en 13 de los 15 animales portadores de gliomas derivados de RG-2 (ratas Wistar). Este efecto llamativo requirió viriones infecciosos ya que las cápsides vacías no protegieron a las ratas del crecimiento de glioma, con los animales muriendo de su tumor después del mismo intervalo que los controles tratados con PBS, es decir, entre 12 y 22 días después de la implantación de las células de glioma (Figura 2A). En el caso de ratas RNU con tumores derivados de células U87, el efecto supresor tumoral de H-1PV fue menos pronunciado, pero los animales infectados sobrevivieron una semana más que los no infectados (ninguno de los animales sobrevivió más de 32 días después de la implantación de células tumorales Fig 2B). Por lo tanto, en los animales tratados por vía intranasal con infección del H-1PV, la supervivencia fue significativamente prolongada (gliomas RG-2 en ratas Wistar, p = 0,0021, gliomas U87 en ratas RNU, p = 0,0038) en comparación con animales que recibieron PBS o partículas virales inactivas Fig. 2 A,B). La probabilidad de supervivencia se calculó mediante análisis de Kaplan-Meier para el grupo control tratado con PBS (ratas Wistar, n =

6, ratas RNU, n = 5) y para ratas inoculadas con partículas virales vacías (ratas Wistar, n = 5, ratas RNU, N = 7) o viriones infecciosos de H-1PV (ratas Wistar, n = 15, ratas RNU, n = 11). En los grupos control, se sacrificaron 2 animales para análisis adicionales al día 3 tras la infección. En el grupo tratado con viriones H-1PV infecciosos, los animales se sacrificaron para análisis el día 1 (2 ratas Wistar, 1 RNU rata), 3 (4 Wistar Ratas, rata 1 RNU), 5 (2 ratas Wistar, 2 ratas RNU) y 45 (2 ratas Wistar) después de la infección. Se sacrificaron tres ratas Wistar sobrevivientes al día 78 tras la infección. Para finalizar la experimentación (Figura 2 A, 2 animales del grupo infectado murieron por razones no relacionadas con el tumor, 18 días después de la implantación de células tumorales). Los animales sacrificados se incluyeron en el cálculo de Kaplan-Meier como animales censurados. La regresión altamente eficiente del glioma derivado de RG-2 se pudo confirmar en 3 experimentos independientes adicionales. La regresión tumoral después de la infección por H-1PV no fue acompañada por ningún efecto secundario adverso en los animales (véase también más adelante). En el grupo tratado con viriones H-1PV infecciosos, se sacrificaron los animales para los análisis al día 1 (2 ratas Wistar, 1 rata RNU), 3 (4 ratas Wistar, 1 rata RNU), 5 (2 ratas Wistar, 2 RNU), y 45 (2 ratas Wistar) después de la infección. Se sacrificaron tres ratas Wistar sobrevivientes al día 78 tras la infección. Para finalizar la experimentación (Figura 2 A, 2 animales del grupo infectado murieron por razones no relacionadas con el tumor, 18 días después de la implantación de células tumorales). Los animales sacrificados se incluyeron en el cálculo de Kaplan-Meier como animales censurados. La regresión altamente eficiente del glioma derivado de RG-2 se pudo confirmar en 3 experimentos independientes adicionales. La regresión tumoral después de la infección por H-1PV no vino acompañada de ningún efecto secundario adverso en los animales (véase también más adelante).

Paralelamente a los resultados previos con inoculación intratumoral o intravenosa de virus (8), la infección intranasal con H-1PV indujo la destrucción del tejido tumoral (oncolisis) sin conllevar alteraciones morfológicas en el tejido cerebral adyacente (Fig. 3) ni en ningún otro órgano. Sin embargo, hay que señalar que la destrucción fue más efectiva en los tumores derivados de células RG-2 en animales inmunocompetentes en comparación con los xenoinjertos humanos (células U87) en animales inmunodeficientes (Figura 3). Esto también se observó en estudios previos que utilizaron vías de infección distintas de las intranasales (8).

Veinticuatro horas después de la infección con viriones H-1PV completos, se pudo detectar ADN vírico mediante PCR o ensayo de células dispersas en el cerebro (Figura 4 A, B), lo que demuestra que el virus inoculado por vía intranasal puede llegar al tejido cerebral, con una acumulación predominante en el área tumoral. También se detectó una señal positiva en los órganos periféricos enumerados en la Tabla 1 con señales relativamente altas en hígado y bazo.

Tabla 1

Detección de ADN vírico en sangre y en varios órganos de ratas infectadas por vía intranasal con H-1PV								
Cepa de rata	Días después de la infección*	Sangre	Riñón	Pulmón	Corazón	Bazo	Hígado	Intestino
Wistar, con glioma RG-2	1	+	+	-	-	+	+	+
	3(5)	-	T	+	+	+	+	+
Wistar, sin tumor	1	-	-	-	+	+	+	+
	3(5)	-	+	-	-	+	+	+
RNU, con glioma U87	1	+	+	+	+	+	+	+
	3(5)	-	+	+	-	+	+	-
RNU, sin tumor	1	-	+	-	+	+	+	+
	3(5)	-	+	+	+	+	+	-

El ADN se extrajo de los órganos y de la sangre, y el ADN vírico se detectó mediante análisis de PCR o ensayos de células dispersas.  
\*En el caso de la sangre, la presencia de ADN vírico se analizó los días 1 y 5, para órganos los días 1 y 3 después de la infección.

Esto demuestra que también después de la aplicación intranasal, el virus se distribuyó ampliamente como se informó para el tratamiento intravenoso e intracraneal (8) independientemente de la presencia de tejido tumoral en los animales. En la sangre, el ADN vírico se pudo detectar en los animales portadores de tumor 1 día después de la infección pero no a los días 3 y 5, lo que indica viremia transitoria. En las criosecciones de tejido cerebral, la proteína no estructural citotóxica vírica NS-1 que se requiere para la replicación del ADN vírico llegó a ser detectable por inmunohistoquímica a partir del día 5 tras la infección, pero exclusivamente en el área de células tumorales (Fig. 5), y nunca en secciones de órganos periféricos (datos no mostrados). Las proteínas de la cápside vírica (VP, *viral capsid proteins*) podrían detectarse en etapas tempranas después de la infección (3 días) en diversas secciones cerebrales, en particular en el área tumoral (ejemplificado para gliomas RG-2 en la Figura 6) confirmando la transferencia al cerebro de viriones de entrada ya que también se detectaron en secciones cerebrales de animales que habían recibido cápsides víricas vacías (datos no mostrados). Los viriones infecciosos pudieron detectarse inoculando muestras de tejido cerebral a células indicadoras. En comparación con la entrada de virus por las fosas

nasales, los títulos de virus en el cerebro disminuyeron con el tiempo debido a la rápida distribución a todo el cuerpo del animal, independientemente de la presencia de tejido tumoral (datos no mostrados).

5 El tratamiento intranasal de animales con viriones infecciosos indujo una respuesta inmunitaria antiviral como es evidente por la aparición de anticuerpos séricos neutralizantes de H-1PV en ratas inmunocompetentes (Wistar), detectables alrededor de 10 días después de la infección (Figura 7).

10 Los datos demuestran que la vía intranasal de administración de H-1PV tiene tanto éxito en la cura del glioma de rata en el modelo de glioma RG-2 como la aplicación intracraneal (8), y superior al tratamiento intravenoso que requiere múltiples inyecciones del virus (8). También se pudo demostrar un efecto favorable de la infección intranasal de H-1PV en animales inmunodeficientes con gliomas derivados de células U87 humanas.

#### Conclusión

15 Los presentes experimentos demuestran que la H-1PV administrada por vía intranasal indujo la regresión completa de los gliomas de rata (derivados celulares de RG-2) en aproximadamente dos semanas tras la infección. Aunque este intervalo de tiempo fue aproximadamente una semana más largo en comparación con la infección intracraneal o intravenosa (8), los animales inmunocompetentes tratados mostraron una supresión completa del tumor, resultando en su supervivencia a largo plazo como es evidente a partir del análisis de Kaplan-Meier (significativamente [ $p = 0,0021$ ] duración de vida extendida en comparación con las ratas con tumores tratados con tumores). En ratas RNU inmunodeficientes con un glioma humano (derivado de células U87), se observó una supervivencia significativamente prolongada después de la infección con H-1PV en comparación con animales no infectados ( $p = 0,0038$ )

25 El virus llegó al cerebro y se distribuyó a otros órganos después de la instilación intranasal de H-1PV, como se informó previamente para la administración intracraneal e intravenosa. Esto se evidenció mediante inmunohistoquímica utilizando un antisuero (VP)-específico de la proteína de la cápside H-1PV, así como por análisis PCR del ADN vírico. Se observó un enriquecimiento de las cápsides H-1PV de entrada en el área tumoral, que también se ha encontrado para viriones infecciosos en animales infectados por vía intravenosa. La presencia de ADN vírico fue transitoria con la notable excepción del tejido tumoral. La expresión de la proteína vírica reguladora y tóxica NS-1 que también es necesaria para la replicación del virus solo se pudo detectar dentro del tejido tumoral y no se detectó en otras áreas del cerebro u órganos de animales infectados. Debido a la distribución temprana y eficiente del virus en todo el cuerpo de los animales, los títulos de virus infeccioso disminuyeron rápidamente en áreas específicas en comparación con la cantidad de virus aplicada inicialmente. Por lo tanto, es difícil evaluar a qué tasa se replica el virus produciendo una progenie de viriones que permanecen en el sitio de producción. Sin embargo, dado que las proteínas víricas necesarias para la replicación se encuentran exclusivamente en las células tumorales, es más probable que la replicación tenga lugar en estas células, extendiendo el virus dentro del área del tumor y siendo distribuido a otros sitios. La viremia parece tener lugar en etapas tempranas tras la infección (en las primeras 24 horas), y puede reaparecer en los animales portadores de tumores en etapas posteriores, lo que indica la replicación del virus en las células tumorales, lo que se apoya en la detección de la proteína NS-1 vírica en estas células. En conjunto, estos hallazgos confirman el oncotropismo previamente referido de la replicación del parvovirus. La detección de la proteína NS-1 en los gliomas se retrasó en 2 días en comparación con la aplicación intravenosa o intracraneal (8), en consonancia con el retraso en el inicio de la regresión tumoral observada por RM.

45 La infección intranasal de ratas inmunocompetentes condujo a la inducción de anticuerpos neutralizantes de H-1PV después de 10 días, lo que representa un retraso de 3-4 días en comparación con la aparición de anticuerpos séricos después de la administración intravenosa o intracerebral (8). Esto podría ser una ventaja en las aplicaciones clínicas del virus cuando se prevén múltiples infecciones.

50 En el presente estudio se pudo demostrar por primera vez que el H-1PV es capaz de alcanzar el cerebro (y el tumor en sí mismo), así como otros órganos cuando se deposita sobre la mucosa nasal. Curiosamente, el virus de una rata infectada portadora de glioma podría transmitirse a un animal alojado en otra jaula en el mismo aislador, correlacionando con la infección y la regresión completa del glioma transportado por este último. Esta observación sugiere que el virus (excretado a través de saliva o de la orina) puede transmitirse por el aire para infectar a ratas vecinas. Es tentador especular que la mucosa nasal puede ser un sitio de entrada del virus.

60 La eficacia de la aplicación intranasal del H-1PV, demostrada en el presente documento, en viroterapia oncolítica, presenta una ventaja en el ámbito clínico porque es un tratamiento fácil y seguro de realizar que no requiere medidas invasivas. Como se mencionó anteriormente, la aparición relativamente tardía de anticuerpos séricos contra el virus puede permitir un marco de tiempo más amplio para que múltiples aplicaciones alcancen una dosis de virus total más alta.

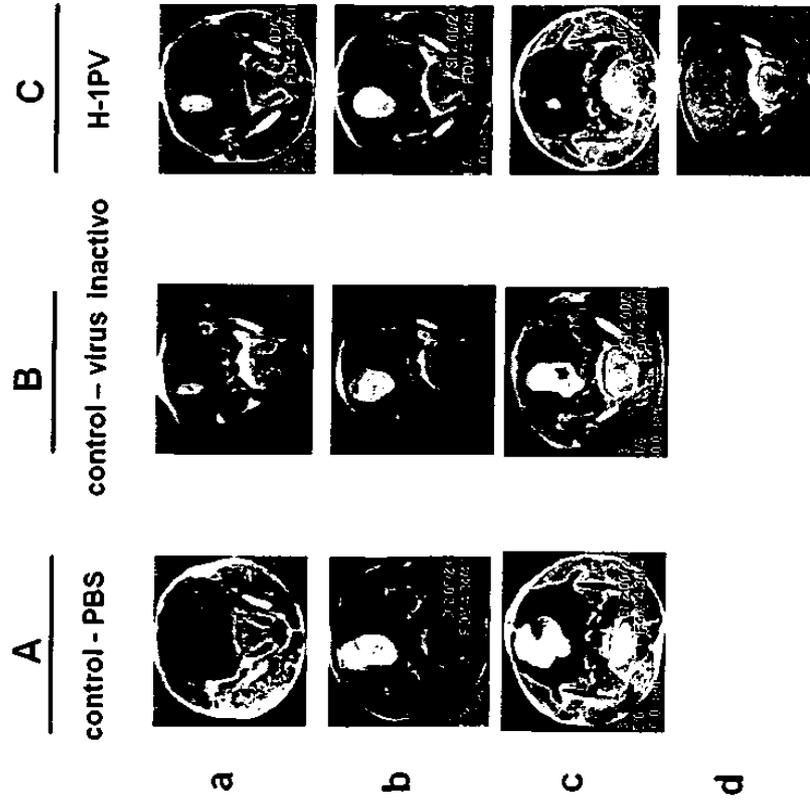
Lista de referencias

- 5 1. Wrzesinski C, Tesfay L, Salome N, Jauniaux JC, Rommelaere J, Cornelis J, et al. 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;77:3851-8.
- 10 2. Di Piazza M, Mader C, Geletneky K, Herrero YCM, Weber E, Schlehofer J, et al. Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *J Virol.* 2007;81:4186-98.
- 15 3. Paradiso PR. Analysis of the protein-protein interactions in the parvovirus H-1 capsid. *J Virol.* 1983;46:94-102.
4. Rayet B, Lopez-Guerrero JA, Rommelaere J, Dinsart C. Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J Virol.* 1998;72:8893-903.
- 20 5. Schlehofer JR, Gissmann L, Matz B, zur Hausen H. Herpes simplex virus-induced amplification of SV40 sequences in transformed Chinese hamster embryo cells. *Int J Cancer.* 1983;32:99-103.
6. Kestler J, Neeb B, Struyf S, Van Damme J, Cotmore SF, D'Abramo A, et al. cis requirements for the efficient production of recombinant DNA vectors based on autonomous parvoviruses. *Hum Gene Ther.* 1999;10:1619-32.
- 25 7. Gart JJ, Krewski D, Lee PN, Tarone RE, Wahrendorf J. The Design and Analysis of Long-term Animal Experiments. In: IACR, editor. *Statistical Methods in Cancer Research.* Lyon: IARC; 1986.
8. Geletneky K, Kiprianova I, Ayache A, Koch R, Herrero y Calle M, Deleu L, et al. Regression of advanced rat and human gliomas by local or systemic treatment with oncolytic parvovirus H-1 in rat models. *Neuro-Oncology.* 2010;12:804-14.
- 30 9. Zee YC, MacLachlan NJ. Parvoviridae and Circoviridae. In: Hirsh DC, MacLachlan NJ, Walker RL, editors. *Veterinary Microbiology.* 2nd ed: Blackwell Publishing; 2004. p. 301-11.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un parvovirus para su uso en un método de tratamiento de un tumor y/o metástasis tumoral por administración intranasal, en el que el tumor es un tumor cerebral y/o las metástasis son metástasis cerebrales.
2. Un parvovirus para su uso en un método según la reivindicación 1, en el que la administración intranasal es una dosis única una vez al día durante 3 días.
- 10 3. Un parvovirus para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que una dosis única contiene entre  $10^7$  y  $10^{10}$  ufc.
4. Un parvovirus para su uso en un método según la reivindicación 3, en el que una dosis única contiene entre  $10^8$  y  $10^9$  ufc.
- 15 5. Un parvovirus para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el parvovirus es un parvovirus de roedor.
6. Un parvovirus para su uso en un método según la reivindicación 5, en el que el parvovirus de roedor es un parvovirus de rata.
- 20 7. Un parvovirus para su uso en un método según la reivindicación 6, en el que el parvovirus de rata es H1-PV.
8. Un parvovirus para su uso en un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el tumor cerebral es un glioma.
- 25 9. Un parvovirus para su uso en un método según la reivindicación 8, en el que el glioma es un glioblastoma.

Figura 1



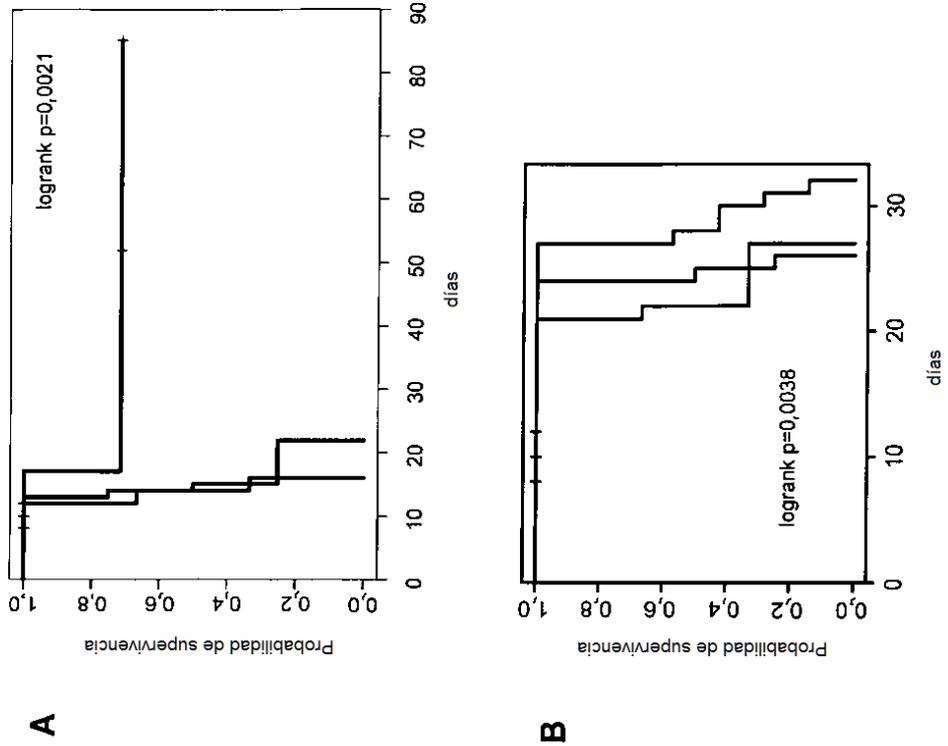


Figura 2

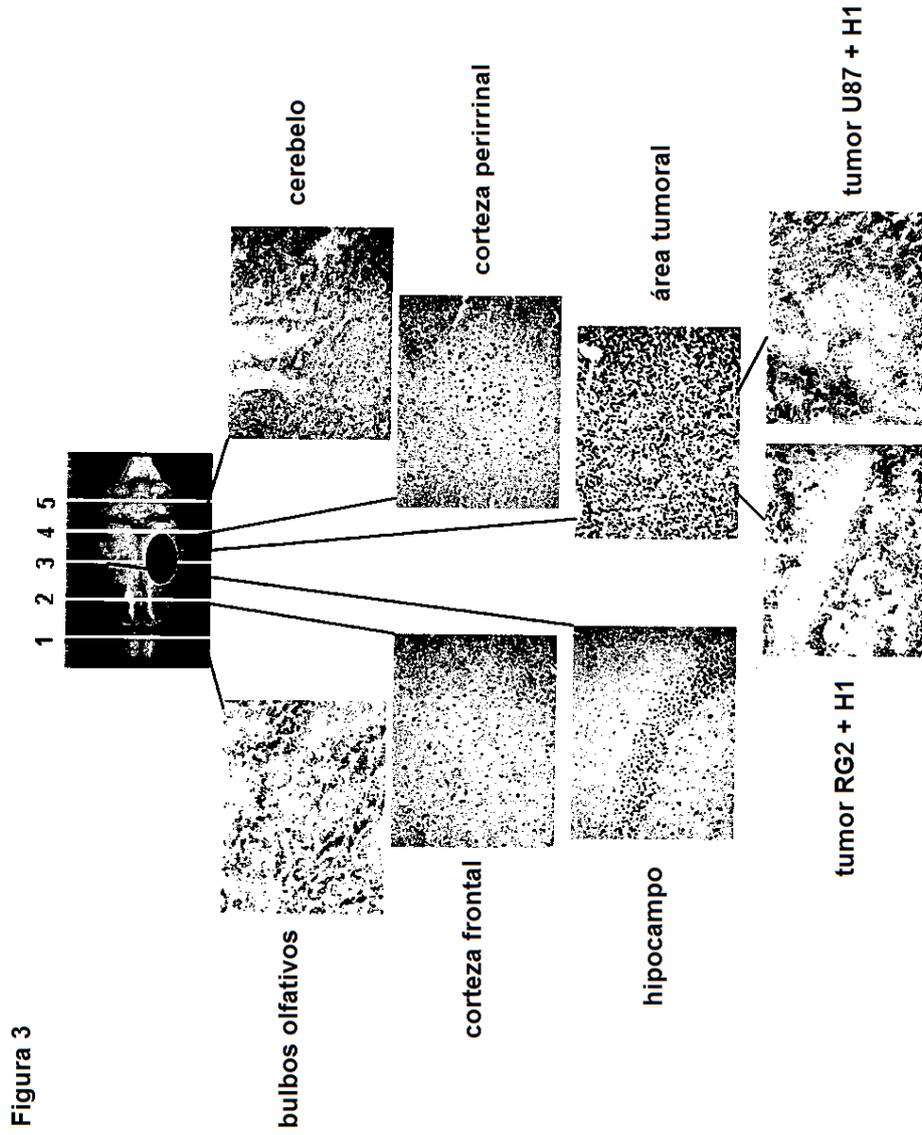


Figura 4

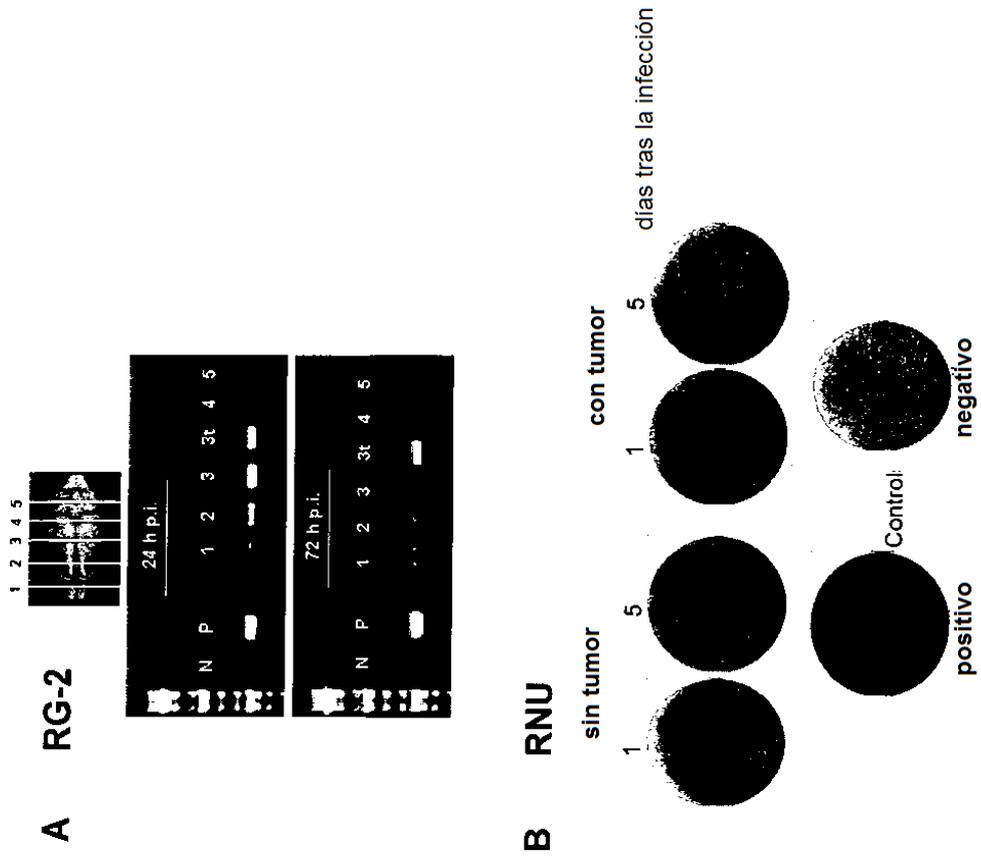
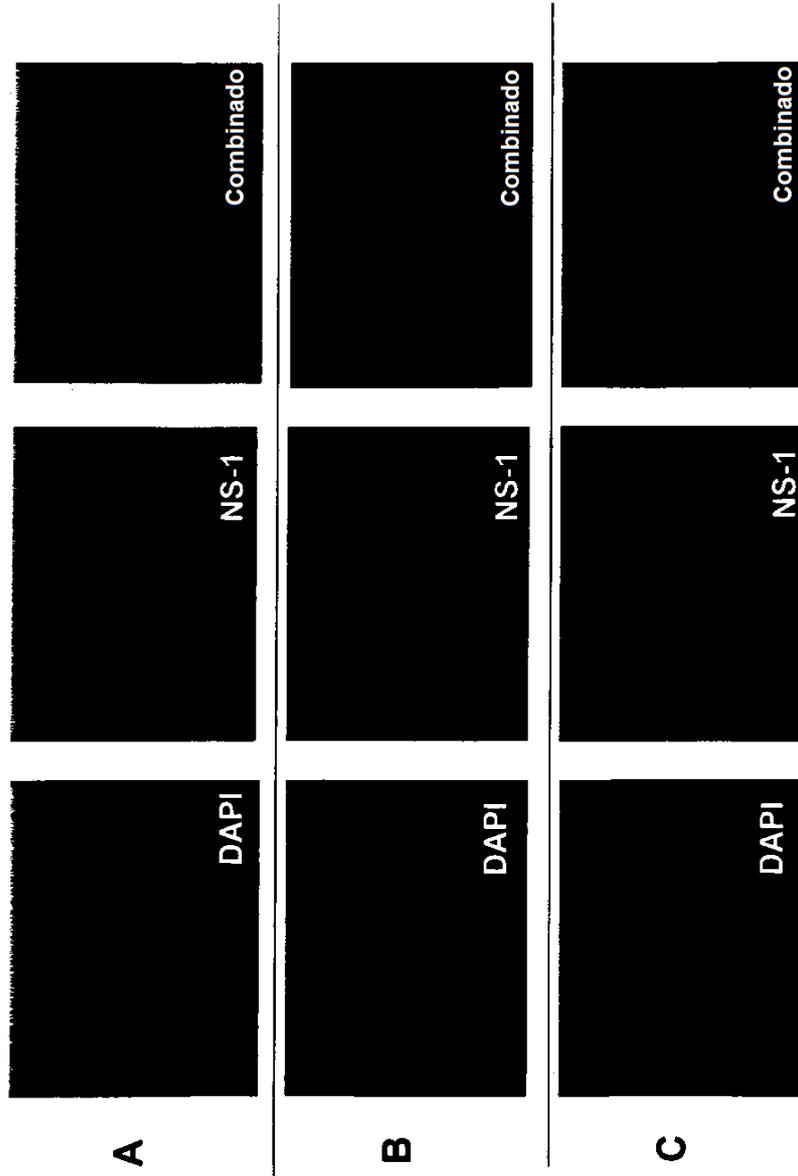


Figura 5



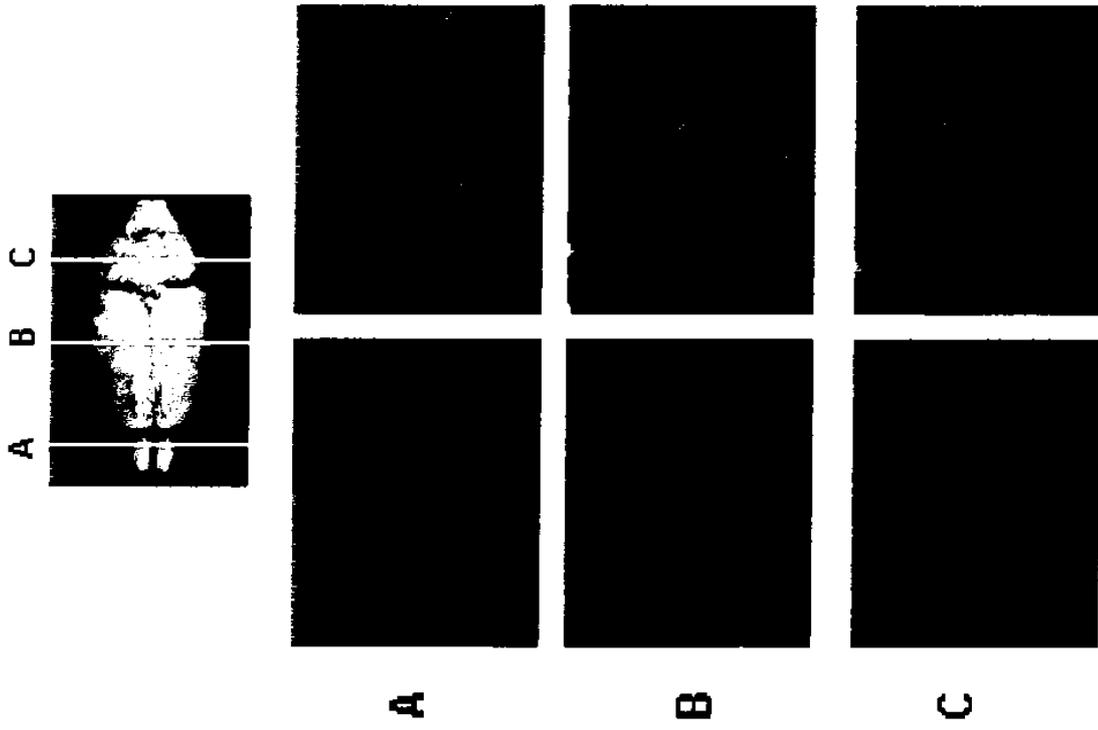


Figura 6

Figura 7

