

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 513**

51 Int. Cl.:

C12N 15/861 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2012 PCT/EP2012/002860**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13004396**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12740044 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.09.2017 EP 2729574**

54 Título: **Quimera de adeno-parvovirus con potencial oncolítico incrementado**

30 Prioridad:

07.07.2011 EP 11005568

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.01.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**EL-ANDALOUSSI, NAZIM;
MARCHINI, ANTONIO y
ROMMELAERE, JEAN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Francisco

ES 2 651 513 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

Quimera de adeno-parvovirus con potencial oncolítico incrementado

La presente invención se refiere a un vector de adeno-parvovirus quimérico caracterizado porque comprende el genoma completo de parvovirus insertado en un genoma de adenovirus, en donde: (a) el genoma de adenovirus se caracteriza por la delección de E1 y E3, y (b) la actividad biológica de al menos una proteína parvovírica NS, en particular NS1, está reprimida (preferiblemente: transitoriamente) o incluso bloqueada durante el procedimiento de producción de la quimera pero es completamente funcional en células de cáncer.

Se necesitan urgentemente nuevos enfoques dirigidos para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Los virus oncolíticos son prometedores para el tratamiento de cánceres, debido a que se pueden dirigir a células cancerosas sin dañar las células normales. Entre ellos, dos grupos de virus provocan bastante interés como agentes antineoplásicos alternativos: los adenovirus y los parvovirus autónomos. Los adenovirus (Ad) han sido modificados genéticamente para funcionar como vectores para la entrega de genes terapéuticos para la terapia génica, y como agentes citotóxicos directos para la terapia vírica oncolítica. Los parvovirus autónomos (PVs) de roedor, por otro lado, muestran propiedades oncolíticas y oncosupresoras y no son patógenos en los seres humanos.

Los adenovirus (Ads) son virus de ADN de doble cadena, icosaédricos, sin envuelta. A día de hoy, se han descrito más de 50 serotipos humanos diferentes en donde la mayoría de ellos infecta el tracto respiratorio o gastrointestinal y el ojo [1]. Las infecciones con Ad son muy comunes y generalmente no están asociadas a ninguna patogenicidad grave. El genoma de Ad comprende 30-38 kpb, y se entrega en el núcleo de células hospedadoras infectadas. Los Ads representan los vectores de terapia génica más populares, y se han utilizado en aproximadamente el 25% de las fases I a III de ensayos clínicos, aprobados para vacunas y transferencia de genes terapéuticos durante las 2 últimas décadas [2, 3]. Esto es debido en gran parte a la capacidad de estos vectores para entregar eficazmente transgenes a una amplia gama de diferentes tipos celulares [1]. Además, los Ads son herramientas muy versátiles con una capacidad notable para el empaquetamiento del ADN, lo que ofrece una gran cantidad de posibilidades para manipulaciones genéticas. El genoma de Ad se puede modificar de diferentes maneras con el fin de restringir su replicación o expresión a células tumorales específicas [4]. Además, es posible reorientar la entrada de Ad y hacer que sea más específica de células cancerosas, mediante el uso de adaptadores moleculares o ingeniería genética de la cápside de Ad [5, 6]. Además, los Ads se pueden producir con un título y calidad elevados en condiciones de producción correctas [6]. Como resultado, ONYX-015, un híbrido de serotipo vírico Ad2 y Ad5 con delecciones en las regiones E1B-55K y E3B fue el primer virus de replicación selectiva, modificado genéticamente, para utilizar en ensayos clínicos contra diversas entidades tumorales, y una modificación de este vector, el adenovirus H101 con E1B-55K delecionado, recibió la aprobación para comercializarse en China en 2005 para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello [7, 8].

Los parvovirus (PVs) de roedor autónomos son virus pequeños de ADN de cadena sencilla, icosaédricos, sin envuelta. Su genoma tiene una longitud de aproximadamente 5,1 kb y contiene dos promotores, P4 y P38, que controlan la expresión de las proteínas no estructurales (NS1 y NS2) y estructurales (VP1 y VP2), respectivamente [9]. Varios PVs, incluyendo el virus diminuto del ratón (MVM) y el H-1PV de rata, han mostrado ser oncolíticos y oncosupresores en diversos modelos de cáncer celular y animal [10]. Además, los PVs no son patógenos y muestran baja prevalencia en los seres humanos, lo que favorece su uso como agentes terapéuticos [11]. H-1PV se evaluará en breve en una fase I/IIa de ensayo clínico para el tratamiento de pacientes con glioblastoma multiforme recurrente [10]. La propiedad antineoplásica de estos PVs se debe, al menos en parte, a una replicación del ADN vírico preferencial y una expresión génica en las células malignas. Esto se podría remontar a la dependencia de los parvovirus de la fase S, y más particularmente de factores celulares, tales como E2F, CREB, ATF y ciclina A que se sabe que se sobreexpresan en las células cancerosas [10]. Además los PVs pueden aprovecharse también de la incapacidad común de las células malignas para organizar una respuesta inmune innata eficaz antivírica [12]. Se ha mostrado que los PVs tienen la capacidad de inducir una detención del ciclo celular [13] y diferentes vías de muerte en las células cancerosas, incluyendo la necrosis [14], la apoptosis [13, 15] y la muerte celular dependiente de lisosomas [16]. NS1 es el principal efector de la oncotoxicidad del parvovirus [13]. Aunque estudios preclínicos destacan el potencial anticancerígeno de los PVs, esta característica debe reforzarse aún más en vista de la aplicación clínica de estos agentes. Una limitación importante radica en el hecho de que los PVs se unen y entran en una variedad de células humanas normales, dando como resultado el secuestro de una gran porción de la dosis vírica administrada lejos de las células tumorales diana. Una reorientación de la entrada de los PVs en las células tumorales aumentaría por tanto la eficacia de los tratamientos basados en PVs y proporcionaría una seguridad adicional frente a eventuales efectos secundarios en los tejidos normales. Además, los PVs competentes para la replicación tienen una capacidad limitada para alojar transgenes y toleran solo la inserción de un transgén corto (300 pb como máximo), dificultando de este modo las estrategias para reforzar la eficacia anticancerígena de los PVs equipándolos con transgenes terapéuticos. Debe señalarse también que la producción a gran escala de PVs, como se requiere para las aplicaciones clínicas, sigue siendo una limitación importante.

El desarrollo de un vector híbrido de Ad que alberga solo una parte del genoma de parvovirus (un casete de expresión del gen de parvovirus que incluye la región P4-NS1-P38) y no el genoma completo de parvovirus, se ha descrito anteriormente [36]. Por ejemplo, el híbrido descrito en [36] carece de las regiones ITR incluyendo sitios de corte en una sola hebra de ADN (del inglés "nicking") específicos de NS1 que son esenciales para la escisión mediada por

NS1 y la liberación del genoma de PV desde la estructura principal del adenovirus en las células cancerosas diana. También se pierde el gen VP lo que excluye la posibilidad de generar partículas de parvovirus totalmente infecciosas.

5 Un adenovirus Ad5 que comprende un genoma de VAA que tiene los genes Rep controlados por un represor dependiente de Tet, se ha descrito previamente [37]. Los VAAs son dependovirus y aunque pertenecen a la familia Parvoviridae, muestran diferencias notables en comparación con los parvovirus y son virus que están bien diferenciados de los mismos. Lo más importante, los VAAs dependen de un virus auxiliar tal como un adenovirus para una replicación eficaz, mientras que los parvovirus tales como H-1PV, son competentes para la replicación.

10 El control de la replicación del ADN de parvovirus mediante un represor regulado con tetraciclina, se ha descrito recientemente [39].

La reorientación de parvovirus oncolíticos a células positivas para HPV usando un vector híbrido de adenovirus y H-1PV, se ha descrito anteriormente [40].

15 Por lo tanto, el problema sobre el que se basa la presente invención es proporcionar un medio (a) para aumentar la eficacia de la producción de parvovirus recombinantes, (b) para incrementar la especificidad frente a las células cancerosas y (c) superar las limitaciones actuales en relación con la inserción/expresión de transgenes terapéuticos que podrían complementar y reforzar las actividades antitumorales de PV.

Este problema técnico se resuelve proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

20 Desde la década de los años 70, la tecnología de ADN recombinante ha hecho posible para los biólogos la ingeniería genética de una variedad de vectores víricos, con el fin de que se ajusten a sus necesidades [17]. En particular, han generado quimeras víricas tanto para analizar los virus parentales [18] como para obtener nuevos viriones artificiales que combinaban las propiedades deseadas de los virus parentales y compensaban algunas de sus limitaciones dominantes [18-25]. En los experimentos resultantes de la presente invención se ha creado una quimera de adeno-parvovirus (Ad-PV) mediante la inserción del genoma completo de hH-1PV en el genoma de Ad5 con las regiones *E1* y *E3* delecionadas (Ad5ΔE1ΔE3), esperando que esta quimera pueda mejorar la replicación del PV en las células cancerosas mediante una expresión simultánea de funciones auxiliares del Ad [26-28]. Los beneficios a largo plazo para la terapia del cáncer basada en PV también pueden incluir: (i) la entrega específica de genomas de PV a células cancerosas por medio de Ads reorientados y (ii) equipar el genoma de Ad con transgenes terapéuticos que potencian la actividad destructora de PV. Si se emplea un vector adenovírico dotado de propiedades oncolíticas, el componente PV de la quimera debería reforzar esta actividad antineoplásica mediante (i) una expresión de la proteína NS1 citotóxica bajo su promotor natural de PV, y (ii) una amplificación del efecto antitumoral a través de la escisión de PV desde el vector, una replicación autónoma y una difusión por el tumor.

35 Los primeros intentos de desarrollar quimeras Ad-PV fallaron en la fase de producción debido a la fuerte interferencia negativa de las proteínas no estructurales (NS) de PV, con la replicación del vector híbrido. Por lo tanto, se ideó una estrategia para controlar estrechamente la expresión de las proteínas NS víricas durante el proceso de producción de la quimera. Para este fin, primero se diseñó el parvovirus H-1PV-TO, en el que el promotor P4 temprano, que controla la expresión de la unidad génica NS, se modificó mediante la inserción de elementos de operador de tetraciclina (TO) [29, 30]. En células HEK T-REx[®]-293, que expresan constitutivamente el represor Tet (TetR), la actividad de P4-TO se inhibió completamente, y en consecuencia no se detectó ni la expresión de la proteína NS1 ni la replicación de PV, a menos que se añadiera al medio el análogo de tetraciclina, doxiciclina (dox). Por el contrario, en células diana cancerosas, que no expresaban TetR, P4 era completamente funcional a niveles de tipo silvestre. Basándose en estos resultados, el genoma de PV-TO se insertó en la estructura principal de ADN de Ad, generando la quimera Ad-PV-TO. De acuerdo con los resultados anteriores, el bloqueo de la expresión de NS permitió que se produjera la quimera en títulos elevados en las células HEK T-REx[®]-293. La quimera Ad-PV-TO mostró ser capaz de suministrar eficazmente su componente PV a células cancerosas en las que el genoma de parvovirus se había escindido del vector y se replicó de forma autónoma, produciendo partículas de PV en la progenie. Lo más destacable, el Ad-PV-TO era más eficaz destruyendo diversas líneas celulares de cáncer que el PV o Ad parental (utilizados solos o en combinación).

50 Esta es la primera demostración de que un clon molecular vírico (PV) infeccioso se puede cargar y entregar a través de un vector vírico (Ad) diferente, a partir del cual se libera y se amplifica de forma autónoma en las células diana. La quimera Ad-PV representa una plataforma de lanzamiento potencial de una estrategia vírica innovadora contra el cáncer que podría combinar todo en uno: reorientación selectiva hacia el cáncer, oncolisis vírica y terapia génica contra el cáncer.

En resumen, las quimeras de la presente invención se caracterizan por las siguientes ventajas de cara al PV de la técnica anterior:

55 En primer lugar, conectan dos áreas de investigación y desarrollo: parvovirología y adenovirología. Los parvovirus se podrían beneficiar de las tecnologías avanzadas desarrolladas en el campo de los adenovirus. Por otro lado, el PV mejorará la actividad antineoplásica del Ad mediante (i) una expresión de la proteína NS1 citotóxica bajo el promotor P4 fuerte de PV, y (ii) una amplificación del efecto antitumoral por medio de la replicación del

PV y la difusión por el tumor.

En segundo lugar, tienen una eficacia contra el cáncer mejorada. Ad-PV es un agente anticancerígeno más fuerte que sus virus parentales frente a varias líneas celulares de cáncer.

5 En tercer lugar, mejoran la producción de PV. Ad-PV tiene potencial, al igual que cualquiera de los vectores basados en Ad, para ser producido en grandes cantidades bajo condiciones GMP, compatibles con las necesidades clínicas. Esto podría superar las dificultades de la producción de vectores basados en PV y en parvovirus.

10 En cuarto lugar, mejoran la especificidad de PV contra el cáncer. Ahora es posible mejorar la especificidad contra el cáncer de los parvovirus aprovechándose de las tecnologías de reorientación de Ad. De hecho, los Ads reorientados contra el cáncer (por ejemplo, obtenidos mediante la inserción en la cápside de Ad de péptidos, ligandos, adaptadores, moléculas Affibody (miméticos de anticuerpos), anticuerpos de cadena sencilla, etc., específicos del cáncer) (7), se podrían utilizar para el desarrollo de una segunda generación de quimeras Ad-PV que se podrían utilizar como un vehículo para la entrega específica de un genoma de parvovirus en células cancerosas.

15 En quinto lugar, mejoran la eficacia antineoplásica de PV y facilitan el camino para el desarrollo de estrategias innovadoras contra el cáncer. Ad-PV ofrece la capacidad de acomodar en su genoma otros transgenes terapéuticos (hasta 5 kilobases). Con deleciones adicionales en el genoma de Ad, el espacio libre abierto a la manipulación genética podría ampliarse a 30 kilobases. Ad-PV podría acomodar reforzadores genéticos complementarios de PV (por ejemplo, moléculas que podrían mejorar la oncolisis de PV y/o la replicación de PV en células malignas) y/o una terapia génica contra el cáncer simultánea.

20 En sexto lugar, aumentan las posibilidades de intervención. El genoma quimérico de Ad-PV se podría encapsidar dentro de una serie de diferentes cápsides de Ad, distintas inmunológicamente, lo que permitiría administraciones repetidas de Ad-PV al mismo paciente, eludiendo una respuesta humoral previa contra Ad-PV y el aumento de posibilidades de intervención. En la misma línea, Ad-PV se podría utilizar para entregar el genoma de PV a un paciente que ya ha recibido un tratamiento con PV y que ya ha desarrollado anticuerpos neutralizantes anti-PV.

25

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Interferencia de las proteínas no estructurales de parvovirus con la producción de la quimera adeno-parvovirus

30 Células 293 fueron transfectadas con pAd-hH-1 o pAd-hH-1-STOP en donde se habían insertado 3 codones de parada en el marco de lectura abierto de NS. Después de una semana, las células se lisaron y sus extractos sin purificar fueron inoculados en células 293 de nuevo aporte para una segunda ronda de amplificación del virus mediante infección. Los lisados celulares de estos cultivos se purificaron dos veces mediante ultracentrifugación con CsCl y las partículas de adenovirus producidas se midieron a través de su absorbancia a 260 nm.

Figura 2: Construcción de un promotor P4 de parvovirus inducible (P4-TO)

35 (A) Vista esquemática del promotor P4-TO generado mediante la inserción de dos elementos de operador 2 de tetraciclina (TetO₂) en el promotor P4 a partir del genoma de hH-1. TF: Factores de transcripción. (B) Secuencia de ADN del promotor P4-TO. Se resalta la caja TATA, los dos elementos TetO₂ y el codón ATG de inicio de la traducción de NS.

Figura 3: Inducibilidad del plásmido pHH-1-TO que contiene el promotor P4-TO

40 (A) Diseño experimental. Células T-REx[®]-293, que expresaban constitutivamente el represor Tet, fueron transfectadas con clones moleculares de pHH-1 o pHH-1-TO y se cultivaron en un medio con (+) o sin (-) dox (1 µg/ml). Después de 48 h, los extractos celulares totales de proteínas se prepararon a partir de estos cultivos y se analizaron mediante transferencia Western para estudiar la presencia de proteínas víricas (NS1 y VP) y actina (utilizada como control de carga)

45 (B) Transferencias Western que muestran que la expresión del gen vírico responde a la inducción con dox. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE.

Figura 4: Infectividad del virus hH-1-TO

50 (A) Diseño experimental. Células T-REx[®]-293 fueron transfectadas con plásmidos víricos pHH-1 o pHH-1-TO y se cultivaron durante una semana en presencia o ausencia de dox. Se recogieron las células desde el medio y se lisaron. Los virus producidos se amplificaron adicionalmente infectando células NB324K. Los lisados celulares de estos cultivos, se analizaron a continuación para estudiar la presencia de partículas de parvovirus mediante un ensayo en placa sobre células indicadoras NB324K.

(B) Imágenes representativas (áreas de 5 cm de diámetro) del ensayo en placa.

Figura 5: Dependencia de dox de la replicación del virus hH-1-TO en células T-REx[®]-293

5 (A) Diagrama de flujo experimental. Células T-REx[®]-293, cultivadas en placas de 6 pocillos, se infectaron con virus hH-1 o hH-1-TO, con una multiplicidad de infección de 2500 genomas víricos, Vg, por célula, y posteriormente se cultivaron en presencia o ausencia de dox. Después de 4 días, se recogieron las células desde su medio y se lisaron con 3 ciclos de congelación y descongelación. Después de la eliminación de los desechos celulares mediante centrifugación, las preparaciones de virus sin purificar se trataron con benzonasa para eliminar el ADN vírico libre y se procesaron para qPCR específica de parvovirus.

(B) Resultados de la qPCR de los parvovirus hH-1 o hH-1-TO parvovirus expresados en Vg/ml.

Figura 6: Inducibilidad del plásmido quimérico pAd-hH-1-TO

10 (A) Diagrama de flujo experimental. Células T-REx[®]-293 se transfectaron con el plásmido pAd-hH-1-TO y posteriormente se cultivaron en medio con o sin dox durante 5 días. Las células se lisaron después y los extractos de proteínas totales se analizaron por transferencia Western para estudiar la presencia de las proteínas NS1 y VP de parvovirus, y β -tubulina (control de carga).

15 (B) Imágenes representativas de las inmunotransferencias. Las proteínas se determinaron con SDS-PAGE al 8%.

Figura 7: Producción de la quimera adeno-parvovirus

20 (A) Diagrama de flujo experimental. En una primera ronda de producción, las células T-REx[®]-293 se transfectaron con el plásmido quimérico pAd-hH-1-TO o los plásmidos parentales pAd (pAd5 Δ E1 Δ E3) o pHH-1-TO, y se cultivaron en un medio complementado (o no) con dox. Los lisados celulares de estos cultivos se utilizaron para la infección de células T-REx[®]-293 de nuevo aporte en una segunda ronda de producción y el procedimiento se repitió una tercera vez aumentando el volumen de los matraces de cultivo como se describe en el Ejemplo 1. Las reservas víricas se purificaron dos veces a través de una ultracentrifugación en gradiente de CsCl y se caracterizaron.

25 (B) Las preparaciones de virus se titularon usando el kit Adeno-X[®] Rapid Titer (Clontech) y se expresaron como X unidades de Ad/ml. (C) Imágenes de microscopía electrónica de los virus purificados Ad-hH-1-TO y hH-1-TO. La barra negra representa una longitud de 100 nm.

Figura 8: Rescate y producción de la progenie de parvovirus en células infectadas con la quimera Ad-hH-1-TO

30 (A) Diagrama de flujo experimental. Las células SiHa y NB324K se infectaron con virus hH-1-TO o Ad-hH-1-TO y los medios de cultivo se renovaron después de 1 día para eliminar los virus no unidos. Después de una incubación adicional durante 4 a 5 días, se recogieron las células dentro de su medio y se lisaron. Las preparaciones de virus sin purificar se analizaron para estudiar la presencia de parvovirus mediante ensayo en placa.

(B) Parvovirus producidos en células SiHa y NB324K infectadas con virus Ad-hH-1-TO o hH-1-TO con la MOI indicada, fueron cuantificados. Los títulos de parvovirus se expresan en PFU/célula.

Figura 9: Crecimiento de líneas celulares de cáncer humano infectadas con Ad-hH-1-TO, control de Ad, hH-1-TO o la combinación de control de Ad y virus hH-1-TO

35 Células HeLa (A), CxCa (B), ME-180 (C), Lox-IMVI (D), HCT-15 (E), HCC-2998 (F) y A549 (G) de cáncer humano se sembraron en placas E de 96 pocillos (xCELLigence, Roche) y se infectaron en el momento indicado con quimera Ad-hH-1-TO, control de Ad, hH-1-TO o la combinación de vector de Ad y virus hH-1-TO. Se usaron células sin tratar como control. Los valores del índice celular son proporcionales al número de células y se registraron y se midieron cada 30 min durante un máximo de 1 semana, utilizando el sistema xCELLigence (Roche). Se muestran los valores promedio con desviaciones estándar relativas de un experimento típico realizado por triplicado.

Figura 10: La quimera Ad-hH-1-TO tiene actividades oncolíticas mejoradas respecto a sus virus parentales

45 Células obtenidas a partir de carcinoma de cuello uterino, HeLa (A), CxCa (B), ME-180 (C), de melanoma, LOX-IMVI (D), de cáncer de colon, HCT-15 (E) y HCC-2998 (F), se sembraron en placas de 96 pocillos, y se infectaron o no (-) con Ad-hH-1-TO quimérico (Ad-PV), control de Ad (Adc), parvovirus hH-1-TO (PV) o una mezcla de control de Ad y virus hH-1-TO (PV + Adc). Después de 4 días de incubación, la lisis celular y la proliferación celular se evaluaron con ensayos LDH y MTT, respectivamente.

Figura 11: La quimera Ad-hH-1-TO tiene una citotoxicidad limitada frente a células primarias humanas normales

50 Se sembraron fibroblastos de prepucio humano (A), fibroblastos orales humanos (B), melanocitos humanos (C) y astrocitos humanos (D) en placas de 96 pocillos, y se infectaron o no (-) con Ad-hH-1-TO quimérico (Ad-PV), control de Ad (Adc), parvovirus hH-1-TO (PV) o una mezcla de control de Ad y virus hH-1-TO (PV + Adc). Después de 5 días de incubación, la lisis celular y la proliferación celular se evaluaron con ensayos LDH y MTT, respectivamente.

Figura 12: Estructuras artificiales de ADN**(A)** pShuttle-hH-1-TO, **(B)** pAd-hH-1-TOFigura 13: Eficacia de la transducción de Ad-GFP y H-1GFP recombinante

5 Las células indicadas se infectaron con Ad o PV recombinante (10 TU/célula tal como se cuantificó mediante el uso de células HEK-293T) que era portador del gen informador GFP. Después de 48 y 72 h, se recogieron las células y se analizaron por citometría de flujo. Los valores representan el porcentaje de células positivas para GFP.

Figura 14: Actividad citotóxica mejorada de la quimera Ad-hH-1-TO frente a líneas celulares de cáncer

10 Células de cáncer humano HeLa **(A y B)**, A-549 **(C y D)**, ME-180 **(E y F)**, Lox-IMVI **(G y H)**, HCT-15 **(I y J)**, HCT 2998 **(K y L)** y pMeL **(M y N)** se sembraron en placas de 96 pocillos (ensayos LDH y MTT) o placas E de 96 pocillos (xCELLigence, Roche) y se infectaron con la MOI indicada de la quimera Ad-hH-1-TO (Ad-PV), control de Ad (Adc), hH-1-TO (PV) o la combinación de vector de Ad y virus hH-1-TO (PV + Adc). Células sin tratar (-) se utilizaron como control. Los valores mostrados en los paneles **A, C, E, G, I, K y M** representan el porcentaje de células lisadas (ensayo LDH) o viables (MTT) calculado como se describe en la sección de materiales y métodos. Los paneles **B, D, F y H, J, L y N** muestran las curvas de proliferación de las células infectadas o no con virus, medida en tiempo real utilizando el sistema xCELLigence. Los valores del índice celular son proporcionales al número de células y se registraron y se midieron cada 30 min durante un máximo de 1 semana. Los resultados se presentan como valores promedio con barras de desviación estándar relativa procedentes de mediciones por triplicado en un experimento típico. Las flechas indican el momento de la infección.

15

Figura 15: Citotoxicidad limitada de la quimera Ad-hH-1-TO frente a células primarias normales humanas

20 Fibroblastos de prepucio humano (A), fibroblastos orales (B), melanocitos (C) y astrocitos (D) se sembraron en placas de 96 pocillos, y se infectaron o no (-) con Ad-hH-1-TO quimérico (Ad-PV), control de Ad (Adc), parvovirus hH-1-TO (PV) o una mezcla de control de Ad y virus hH-1-TO (PV + Adc). Después de 5 días de incubación, el % de células lisadas o viables se evaluó con ensayos LDH y MTT, respectivamente, como se describe en materiales y métodos.

25 Figura 16: Producción, difusión y citotoxicidad de los parvovirus de la progenie en células infectadas con la quimera Ad-PV

30 **(A)** Producción de parvovirus: células NB324K o SiHa se infectaron con quimeras Ad-FV utilizadas con MOI 10 (NB324K) o 1 (SiHa) y los medios de cultivo se renovaron después de 1 día para eliminar los virus no unidos. Después de una incubación adicional durante 4 a 5 días, se recogieron las células dentro de su medio y se lisaron. Preparaciones de virus sin purificar se analizaron para estudiar la presencia de parvovirus con un ensayo en placa. Los títulos de parvovirus producidos se expresan en PFU/ml. **(B)** Producción de parvovirus y difusión: las células NB324K se infectaron con cantidades genómicas equivalentes de quimera Ad-PV o virus de tipo silvestre H-1PV (entrada, 10 Vg/célula sembrada). Después de 96 h, se recogieron las células en su medio y se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación. Después de un tratamiento con 50 U/ml de benzonasa para digerir el ADN celular y el ADN vírico no encapsidado, se analizaron los extractos celulares sin purificar para determinar su contenido en partículas víricas completas mediante qRT-PCR, como se describe en Materiales y Métodos. **(C)** Difusión de parvovirus: se infectaron células HeLa con quimeras Ad-PV (25 Vg/célula). Después de 10 h de la infección, un conjunto de placas se trató con 0,1 U/ml de neuraminidasa (+ NA) con el fin de evitar una segunda ronda de infección con parvovirus, mientras que otro conjunto se dejó sin tratar (- NA). Los lisados celulares totales tratados previamente con benzonasa se analizaron mediante qRT-PCR para estudiar los contenidos en partículas víricas. **(D)** Difusión y citotoxicidad del parvovirus: células HeLa, cultivadas en placas de 96 pocillos, se infectaron con quimeras Ad-PV, tratadas o no con NA como se describe en el panel C, y se procesaron para el ensayo LDH después de 72 h.

35

40

45 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un vector quimérico de adeno-parvovirus caracterizado porque comprende el genoma completo de un parvovirus de roedor insertado en un genoma de adenovirus, en donde:

(a) el genoma del adenovirus se caracteriza por la delección de E1 y E3; y

(b) la actividad del promotor temprano P4 de parvovirus que regula la expresión de la proteína de parvovirus NS, se modifica para inhibir o bloquear la expresión de la proteína NS en la línea celular de empaquetamiento durante la producción de las quimeras, pero es completamente funcional en las células cancerosas,

50 en donde el promotor temprano P4 de parvovirus se modifica de tal manera que se puede bloquear la expresión con un represor de tetraciclina; y en donde dicho vector quimérico de adeno-parvovirus se obtiene por un método caracterizado porque

(i) células de empaquetamiento se transfectan con dicho vector quimérico de adeno-parvovirus y se cultivan en condiciones que inhiben o bloquean la actividad del promotor P4 parvovírico y reducen o eliminan la expresión

de la unidad de transcripción de NS de parvovirus;

y (ii) la quimera adeno-parvovirus se aísla a partir de las células de empaquetamiento o del medio después de cultivar las células, en donde las células de empaquetamiento son células HEK T-REx[®]-293 y el vector se propaga en ausencia de doxiciclina (dox).

- 5 La persona experta en la técnica puede obtener las secuencias de nucleótidos de adenovirus que tienen una delección de E1 y E3 a partir de las secuencias de nucleótidos de adenovirus conocidas usando procedimientos conocidos en la técnica. La reducción o la eliminación de la actividad biológica de al menos una o varias proteínas parvovíricas NS (preferiblemente NS1 y/o NS2) se puede lograr mediante varias vías conocidas por el experto en la técnica, por ejemplo, modificando la secuencia de aminoácidos de la proteína dando como resultado versiones inactivas y/o truncadas de la proteína o, preferiblemente, mediante una reducción o eliminación de la expresión del gen que codifica dicha(s) proteína(s), por ejemplo, mediante la modificación del promotor temprano P4 parvovírico que dirige la expresión de NS. Preferiblemente, el promotor se modifica de tal manera que la expresión se puede inhibir de forma selectiva durante la propagación del virus quimérico para una producción en grandes cantidades, pero se restablece para la aplicación terapéutica del vector/virus quimérico en el paciente, es decir, en las células cancerosas del paciente, NS se expresa. Preferiblemente, el promotor temprano P4 se modifica de tal manera que la expresión se puede bloquear transitoriamente mediante un represor de tetraciclina como se describe en los ejemplos, a continuación. En las células cancerosas que no expresan el TetR, el promotor P4 es completamente funcional.

Preferiblemente, el genoma de adenovirus del vector quimérico de adeno-parvovirus de la invención es el genoma de Ad5.

- 20 En el vector quimérico de adenovirus-parvovirus de la invención, el parvovirus es un parvovirus de roedor. Los parvovirus de roedor preferidos son Lull, virus diminuto de ratón (MMV), parvovirus de ratón (MPV), virus diminuto de rata (RMV), parvovirus de rata (RPV), virus de rata (RV) o H1 (H1-PV). Preferiblemente, el parvovirus se obtiene a partir de parvovirus H1.

- 25 Además, el vector quimérico de adeno-parvovirus de la invención puede contener un gen que codifica un transgén expresable, por ejemplo, un marcador fenotípico detectable con el fin de probar una introducción exitosa en la célula diana. Preferiblemente, la proteína marcadora es una proteína fluorescente. Esto muestra fácilmente una transfección de la célula diana deseada. Ejemplos de genes adecuados que codifican proteínas fluorescentes son el gen rfp (rojo), gfp (verde), cfp (cian) y yfp (amarillo), siendo el preferido rfp (rojo) (DsRed-cDNA; Clontech). En una realización adicional del vector quimérico de adeno-parvovirus de la invención, el transgén es un gen que codifica un polipéptido terapéutico o inmunogénico que podría respaldar el beneficio terapéutico del vector de la invención. Ejemplos de tales transgenes son: un polipéptido citotóxico, citocina, quimiocina, shARNs, microARNs, un péptido específico del cáncer, ligando, adaptador, Affibody, anticuerpo de cadena sencilla y/o un polipéptido que mejora la oncolisis de PV y/o la replicación de PV.

- 35 Ejemplos de promotores adecuados (heterólogos) para dirigir la expresión del transgén son el promotor RSV (virus del sarcoma de Rous), promotor CMV (citomegalovirus), promotor HSV (virus del herpes simple), promotores tk o el promotor P38 del virus diminuto de ratón de parvovirus autónomo que se transactiva fuertemente con la proteína no estructural NS1, una proteína que se une a ADN específica de secuencia. Se prefiere el promotor P38. El casete de expresión (promotor/p. ej. gen marcador/sitio de poliadenilación) se inserta en el vector en un sitio adecuado que puede determinar fácilmente una persona experta en la técnica.

- 40 En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método de preparación de un vector quimérico de adeno-parvovirus caracterizado porque

(i) las células de mamífero se transfectan con un vector quimérico de adeno-parvovirus de la invención y se cultivan en condiciones que inhiben o bloquean la actividad del promotor P4 parvovírico y reducen o eliminan la expresión de la unidad de transcripción de NS de parvovirus, y

- 45 (ii) el adeno-parvovirus quimérico se aísla a partir de las células de empaquetamiento o del medio después de cultivar las células, en donde las células de empaquetamiento son células HEK T-REx[®]-293 y el vector se propaga en ausencia de doxiciclina (dox).

Por tanto, las partículas recombinantes se producen mediante la introducción de los vectores anteriores en una célula permisiva, tal como se entiende este término en la técnica (por ejemplo, una célula "permisiva" se puede infectar o transducir con el virus). Se puede emplear cualquier método para introducir los vectores en la célula permisiva, incluyendo, pero no limitados a, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, microinyección, liposomas catiónicos o aniónicos y liposomas en combinación con una señal de localización nuclear.

- 55 Cualquier célula de mamífero permisiva adecuada, conocida en la técnica se puede emplear para producir los adeno-parvovirus quiméricos de la invención, por ejemplo, células HEK 293, HEK 293Q, HEK293T, HEK293TT y cualquier línea celular de empaquetamiento que exprese las proteínas E1 de adenovirus y la actividad del promotor P4 de parvovirus que bloquea el represor de tetraciclina. En el método de la presente invención, las células de mamífero son células HEK T-REx[®]-293.

La presente invención también proporciona un vector de adeno-parvovirus quimérico recombinante obtenido por un método de la invención, así como una célula que contiene dicho vector.

Finalmente, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que contiene el vector quimérico de adeno-parvovirus de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, así como al uso de un vector de adeno-parvovirus quimérico de la invención para uso en terapia génica o un método para tratar un tumor. Los vehículos adecuados y la formulación de tales medicamentos son conocidos por la persona experta en la técnica. Los vehículos adecuados comprenden, por ejemplo, soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, por ejemplo, emulsiones de aceite/agua, agentes humectantes, soluciones estériles, etc. El tipo de vehículo depende de la forma de administrar el vector/virus de acuerdo con la invención. Una dosificación adecuada es determinada por el médico asistente y depende de varios factores, por ejemplo, la edad del paciente, el sexo y el peso, la gravedad de la enfermedad, el tipo de administración, etc.

Una terapia génica se puede llevar a cabo con un vector de adeno-parvovirus quimérico de acuerdo con la invención, en donde las células se transducen/infectan mediante incubación con el vector o las partículas víricas. Las células pueden estar presentes en un organismo, en donde las células que se van a infectar son alcanzables mediante inyección con aguja, inyección a chorro o pistola de partículas. Por otro lado, las células que se van a transducir también se pueden aislar a partir de un organismo, infectar fuera del organismo y luego devolverlas de nuevo al organismo. Tales células se denominan células autólogas. Además, igual que para el organismo, también es posible usar células alogénicas para la transducción. A este respecto, es favorable que estas células pertenezcan a un tipo de HLA correspondiente al organismo. La persona experta en la técnica conoce métodos para proporcionar células con un cierto tipo de HLA. Los vectores recombinantes (partículas) de acuerdo con la invención también son útiles para una aplicación auxiliar a la quimioterapia, es decir, para la terapia tumoral.

En resumen, los inventores han conseguido generar un vector de adenovirus-parvovirus quimérico (Ad-PV) que combina un título elevado y una transferencia génica eficaz de adenovirus con el potencial anticancerígeno del parvovirus de roedor. Para este fin, en una realización más preferida, el genoma de PV oncolítico completo se insertó en un genoma del vector Ad5 de replicación defectuosa, con E1 y E3 delecionados. Ya que los inventores encontraron que la expresión de NS parvovírico inhibía la producción de la quimera Ad-PV, diseñaron en una realización más preferida, el promotor temprano P4 de parvovirus, que gobierna la expresión de NS, insertando elementos de operador de tetraciclina en su secuencia. Como resultado de estas modificaciones, la expresión dirigida con P4 estaba bloqueada en las células T-REx[®]-293 de empaquetamiento, que expresan constitutivamente el represor de tetraciclina, permitiendo un rendimiento elevado en la producción de quimeras. La quimera entregaba eficazmente el genoma de PV en las células cancerosas, a partir del cual se generaban partículas de parvovirus competentes para la replicación, totalmente infecciosas. Sorprendentemente, la quimera Ad-PV ejercía actividades citotóxicas más fuertes contra varias líneas celulares de cáncer, en comparación con los virus parentales PV y Ad, aunque seguía siendo inocua para un panel de células humanas primarias normales sometidas a ensayo. Esta quimera Ad-PV representa un nuevo agente anticancerígeno versátil, que se puede someter a manipulaciones genéticas adicionales, con el fin de reforzar su capacidad oncolítica mejorada, equipándola con transgenes o reorientándola hacia células tumorales. Por lo tanto, el vector de adenovirus-parvovirus quimérico de la invención se emplea preferiblemente como un agente terapéutico contra el cáncer. Ejemplos de cánceres a los que se puede dirigir son carcinomas de cuello uterino, gliomas, carcinomas pancreáticos, melanoma, cánceres de pulmón y colon, incluyendo otros tipos de cáncer que son resistentes a la citotoxicidad de PV.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

(A) Células

Las líneas celulares HEK 293 (riñón embrionario humano transformado), NB324K (riñón humano de recién nacido transformado) y A549 (carcinoma de pulmón) se obtuvieron de la ATCC (LGS Standards GmbH, Wesel, Alemania) y HEK T-REx[®]-293 de Invitrogen (Darmstadt, Alemania). Las líneas celulares de carcinoma de cuello uterino HeLa y SiHa, positivas para el virus del papiloma humano (VPH) tipo 16 y 18, respectivamente, fueron un regalo del Dr. Angel Alonso (DKFZ, Heidelberg, Alemania). La línea celular ME-180, positiva para HPV 68, se obtuvo gracias a la Dra. Elisabeth Schwarz (DKFZ, Heidelberg, Alemania). Los cultivos celulares obtenidos a partir de carcinoma de cuello uterino (CxCa) de pase temprano, positivos para HPV 16, fueron proporcionados por el Dr. Andreas Kaufmann (Charité Medical University of Berlin, Alemania). Las líneas celulares de cáncer de colon HCT-15 y HCC-2998 y de melanoma Lox-IMVI eran del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) (Bethesda, MD, EE.UU.). Los fibroblastos orales primarios humanos y los fibroblastos de prepucio eran un regalo del Dr. Massimo Tommasino (IARC, Lyon, Francia). Los melanocitos adultos primarios humanos, ligeramente pigmentados (HEMa-LP), eran de Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.). Los astrocitos humanos se obtuvieron de ScienCell Research Laboratories (San Diego, CA, EE.UU.).

Las células HEK 293, HeLa, SiHa, CxCa, A549 y los fibroblastos orales primarios humanos se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 10% de suero bovino fetal (FBS) (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Las células T-REx[®]-293 se cultivaron en DMEM que contenía 10% de FBS certificado exento

de tetraciclina (PAA, Cölbe, Alemania). Las células ME-180 se cultivaron en medio de McCoy 5a modificado, complementado con FBS al 10%, respectivamente. HCT-15, HCC-2998 y Lox-IMVI se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 complementado con 10% de FBS. Los fibroblastos de prepucio primarios humanos y NB324K se cultivaron en medio esencial mínimo (MEM) complementado con 10% y 5% de FBS, respectivamente. Los melanocitos adultos humanos primarios se cultivaron en medio 254 complementado con HMGS (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Los astrocitos humanos se cultivaron en medio de astrocitos (ScienCell Research Laboratories, San Diego, CA, EE.UU.). Todos los medios, excepto los de los melanocitos y los astrocitos, contenían 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y L-glutamina 2 mM. Las células se cultivaron a 37°C en 5% de CO₂ y 92% de humedad.

10 (B) Virus

Los virus hH-1 y hH-1-TO se produjeron en células T-REx[®]-293. Las células se cultivaron en placas de 10 cm en medio exento de tetraciclina y se transfectaron transitoriamente con una confluencia del 12,5% con 10 µg/placa de las estructuras artificiales víricas pH-1 o pH-1-TO. A las 4 h, 3 días y 6 días después de la transfección, se añadió dox (1 µg/ml) al medio. El día 7, se recogieron las células dentro de su medio y se lisaron mediante 3 ciclos de congelación y descongelación y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. Los virus producidos se amplificaron adicionalmente mediante infección de células NB324K y se purificaron a través de centrifugación en gradiente de iodixanol.

Ad-hH-1-TO y el control de Ad (Ad5ΔE1ΔE3) se produjeron a través de 3 rondas de producción en células T-REx[®]-293 cultivadas en medio que contenía 5% de FBS sin tetraciclina. En la primera ronda, las células en placas de 12 pocillos se transfectaron con una confluencia del 75% con 1 µg/pocillo de los plásmidos pAd-hH-1-TO o pAd5ΔE1ΔE3 digeridos previamente con Pacl. Después de la transfección, las células fueron inducidas o no con 1 µg/ml de dox. Cinco días después de la transfección, la mitad del medio de cultivo se reemplazó para asegurar unas condiciones óptimas de crecimiento. Siete días después de la transfección, las células se recogieron en su medio, se lisaron con 3 ciclos de congelación y descongelación y los restos celulares se eliminaron por centrifugación. En la segunda ronda, 25% del extracto vírico sin purificar producido en la primera ronda se utilizó para infectar células T-REx[®]-293 cultivadas en frascos de 75 cm². Cinco días después de la infección, se añadió la mitad de medio de nuevo aporte para mantener unas condiciones óptimas de crecimiento. Siete días después de la infección, se recogieron las células y se lisaron como se ha descrito anteriormente. La tercera ronda era comparable a la segunda ronda, pero se llevó a cabo en frascos de 175 cm². Los lotes víricos finales se purificaron dos veces mediante ultracentrifugación en gradiente de CsCl.

30 (C) Clonación del ADN

El plásmido de parvovirus pH-1-TO se construyó insertando dos elementos represores TetO₂ en el promotor P4 de pH-1 [31], a través de una clonación con PCR. En una primera etapa, dos PCRs se llevaron a cabo en paralelo, usando pH-1 como molde, con los siguientes cebadores: PCR1-Directo: 5'-AAACTCGAGGCGGTTCCAGGGAGTTTAAACC-3' y PCR1-Inverso: 5'-AACTGACTTCTCTCTATCACTGATAGGGAGATCTCTACTGATAGGGAAGTAGTTGCTTATA TACTTTAAACC-3'; PCR2-Directo: 5'-AGCAACTACTTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGAGAAGTCAGTTACTTATCTTTTCTTTCC-3' y PCR2-Inverso: 5'-AAAAAGCTTCCATCCGATATCTTTTCCATTTCAG-3'. En una segunda etapa, una tercera PCR se llevó a cabo usando una mezcla estequiométrica de los 2 productos previos purificados de la PCR como molde con PCR1-Directo y PCR2-Inverso como cebadores. El producto de ADN obtenido se digirió con *PmeI/EcoRV* y se usó para reemplazar el fragmento correspondiente en pH-1. pShuttle-CMV-free se construyó del modo siguiente: pShuttle-CMV (Qbiogen, MP Biomedicals, Heidelberg, Alemania) se digirió con *BglII*, se desfosforiló con fosfatasa de intestino de ternera y se sometió a una recombinación homóloga, en *E. coli* BJ5183, con oligonucleótidos apareados 5'-GTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCAGATCTGGTACCG-3' y 5'-CGGTACCAGATCTGAACTCCATATATGGGCTATGAAC-3'.

pShuttle-hH-1 se generó en 3 etapas. (1) En pShuttle-CMV-free, el único sitio de *EcoRI* se cambió a un sitio *SwaI*, a través de la inserción de los oligonucleótidos apareados 5'-p-AATTATTTA-3' y 5'-p-AATTTAAAT-3' en la posición de *EcoRI*. (2) La región 5' de hH-1 se amplificó a partir de pH-1 mediante PCR usando los cebadores 5'-AAGGAAAAAGTCGACTTTTGTGATGCTCGTCA-3' y 5'-AGGAAAAAAGATATCTTTTCCATTTCAGTTGA-3'. El producto de la PCR fue digerido con *Sall/EcoRV* (633 bases) y se ligó en el vector pShuttle-CMV-free previamente modificado, digerido previamente con las mismas enzimas, dando como resultado pShuttle-5'hH-1. (3) El extremo 3' restante del genoma de hH-1 (4730 bases) se escindió del plásmido pH-1 utilizando las enzimas *EcoRV/NotI*, se crearon extremos romos con Klenow y se ligaron en pShuttle-5'hH-1 digerido con *EcoRV*, generando pShuttle-hH-1.

55 pShuttle-hH-1-STOP se clonó mediante la inserción de 3 x codones STOP en el único sitio *EcoRV* de pShuttle-hH-1, localizado al comienzo de la secuencia codificadora de NS de parvovirus. El dúplex de ADN 3XSTOP fue generado mediante un autoapareamiento del oligonucleótido 5'-TAATAGTGAGAATTCTCACTATTA-3'.

pShuttle hH-1-TO (Figura 12A) se obtuvo mediante la sustitución del fragmento *AleI/EcoRV* de pShuttle hH-1 con el fragmento de ADN correspondiente de 393 bases de longitud de pH-1-TO.

pAd-hH-1, pAd-hH-1-STOP y pAd-hH-1-TO (Figura 12B) se generaron mediante una recombinación de pShuttle-hH-1, pShuttle-hH-1-STOP o pShuttle-hH-1-TO, respectivamente, con pAd5ΔE1ΔE3 en *E. coli* BJ5183, de acuerdo con el manual de instrucciones del sistema de vector adenovirico AdEasy® (Agilent technologies, Stratagene products, Waldbronn, Alemania).

5 pAd5ΔE1ΔE3, en el que las regiones que abarcaban los genes E1 (nt 459 a 3228) y E3 (nt 27897 a 30463) (Ad5 Refseq: AC_000008) se habían delecionado, se construyó del modo siguiente. Un plásmido lanzadera que contenía secuencias que flanqueaban E3 [32], se digirió con *MluI/XbaI*, se crearon extremos romos con Klenow y se ligaron generando pLeft-Right. Este plásmido se digirió con *Sall/NotI*, se desfosforiló y se utilizó para una recombinación homóloga en *E. coli* BJ5183, con pTG3622 linealizado con *SpeI* [33] del que se había delecionado la región E1.

10 Todas las estructuras artificiales descritas en este documento, se aislaron clonalmente y se verificaron sus secuencias de longitud completa.

(D) Transfecciones

15 Las transfecciones de ADN se llevaron a cabo utilizando Fugene HD (Roche Diagnostics & Applied Sciences, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante con ligeras modificaciones. Los plásmidos se diluyeron en medio exento de suero hasta una concentración final de 20 ng/μl. A continuación, se añadió Fugene HD en una proporción de 1:2,5 (μg de ADN:μl de Fugene) y la mezcla se incubó a TA durante 30 - 60 min. Posteriormente, la mezcla se añadió a las células gota a gota.

(E) Extracción de proteínas

20 Los sedimentos celulares se lisaron sobre hielo durante 30 min en 5 volúmenes de tampón de extracción de proteínas (Tris 50 mM pH 8, NaCl 200 mM, 0,5% de NP-40, DTT 1 mM) que contenía inhibidores de proteasas (complete EDTA-free, Roche, Mannheim, Alemania) y 10% de glicerol. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 10.000 RPM durante 10 minutos a 4°C.

(F) Anticuerpos

25 Los anticuerpos siguientes fueron utilizados para el análisis de transferencia Western: anti-β-tubulina monoclonal de ratón (clon TUB 2.1, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.), anti-actina monoclonal de ratón (clon C4, MP Biomedicals, Illkirch, Francia), antisuero policlonal anti-NS1 SP8 (proporcionado por la Dra. Nathalie Salomé, ATV DKFZ, Heidelberg, Alemania) [34] y antisuero policlonal anti-VP2 (un regalo de la Dra. Christiane Dinsart, ATV DKFZ, Heidelberg, Alemania) [31].

(G) Titulación de los parvovirus

(1) Ensayo en placa

30 Las células NBK cultivadas hasta una densidad de 20.000 células/cm² se infectaron con diluciones en serie de extractos de virus sin purificar durante 1 h, seguido de una sustitución del inóculo con un recubrimiento de 0,68% de agar Bacto® (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Alemania) en medio esencial mínimo (Gibco, Invitrogen) complementado con 5% de FBS, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100 μg/ml de estreptomycin. Siete días después de la infección, las células vivas se tiñeron durante 18 h con un recubrimiento (0,85%) de agar Bacto® que contenía rojo neutro (0,2 mg/ml) diluido en PBS. Se hizo un recuento de las placas y los títulos se expresaron como unidades formadoras de placas (PFU) por ml.

(2) Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR)

40 Extractos de virus sin purificar se digirieron con 50 U/ml de nucleasa benzonasa® [grado ultrapuro (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania)] durante 30 min a 37°C para eliminar el ADN genómico vírico libre. Para liberar el ADN vírico desde los virus, se lisaron 10 μl de cada muestra en un total de 40 μl de tampón de lisis alcalina (NaOH 1 M en tampón TE) a 56°C durante 30 min. La lisis se detuvo mediante la adición de 960 μl de HCl 40 mM. La cuantificación del ADN vírico se llevó a cabo mediante qPCR en tiempo real con una sonda TaqMan® específica de NS1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania), como se ha descrito previamente [28]. Con este método, se calculó que 1 PFU de hH-1-TO y 1 Ad X U (véase más abajo) de Ad-hH-1-TO se correspondía con aproximadamente 500 y 100 partículas que contenían genomas víricos, respectivamente.

(H) Titulación del adenovirus

50 Los títulos de adenovirus recombinante se determinaron empleando el kit Adeno-X® Rapid Titer -X (Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Francia), 3 días después de la infección de las células T-REx®-293 (Invitrogen) y se expresaron como unidad Ad X /ml.

La concentración de partículas físicas de adenovirus se estimó a partir del contenido en ADN de los virus purificados, medida a través de la absorbancia a 260 nm. Una absorbancia de 1 corresponde a 1,1 x 10¹² partículas de adenovirus por ml [35].

(I) Microscopía electrónica

Rejillas de cobre de malla 300 revestidas con carbono se colocaron hacia abajo sobre partes alícuotas de 5 µl de suspensión de virus durante 2 min, teñidas con 2% de acetato de uranilo durante 30 segundos, y se secaron durante aprox. 1 min. Las micrografías se tomaron con 38.000 aumentos con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 10A (Zeiss, Oberkochen, Alemania) utilizando un voltaje de aceleración de 80 kV. El indicador de aumentos se controló rutinariamente mediante comparación con una réplica de rejilla.

(J) Ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH) y ensayos MTT

Las células humanas se sembraron primero en placas de 96 pocillos, con densidades de 4000 células/pocillo para las células cancerosas y 8000 a 10000 células/pocillo para las células primarias. Excepcionalmente, los melanocitos y los astrocitos se cultivaron en medios artificiales (indicados en (A)), y luego se sembraron en medio DMEM complementado con 10% de FBS termoinactivado. Después de la infección, todas las células se mantuvieron en su medio basal correspondiente complementado con 5% de suero bovino termoinactivado, con un volumen de 200 µl por pocillo. Las células cancerosas y las células primarias se incubaron durante 4 y 5 días, respectivamente, a continuación, se realizaron los ensayos LDH y MTT como se ha descrito anteriormente [13].

LDH se midió usando un ensayo de citotoxicidad no radiactiva CytoTox 96 (Promega Biotech, Madison, WI, EE.UU.) y se leyó con un lector de ELISA a 492 nm. Después de sustraer el valor de fondo dado por un medio no condicionado, la fracción de células lisadas en cultivos infectados o no infectados se calculó a partir de la relación de la actividad LDH en el medio condicionado frente a la actividad LDH total del cultivo correspondiente. Se determinó la actividad LDH total después de una lisis celular mediante la adición de 10x tampón que contenía 9% (vol/vol) de Triton X-100. Se utilizaron los mismos cultivos celulares para determinar la liberación de LDH y la actividad MTT. La actividad MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolio) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) se leyó con un lector de ELISA a 570 nm. La viabilidad de las células infectadas se expresó como la relación entre la absorbancia correspondiente y la de las células no infectadas, tomada arbitrariamente como el 100%.

(K) Detección en tiempo real del efecto citopático vírico (CPE)

Las células se sembraron en placas E de 96 pocillos (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Alemania) con una densidad de 4000 células/pocillo (menos para HCC-2998: 8000 células/pocillo). Después de 24 h a 72 h, las células se infectaron con Ad-hH-1-TO, Ad5ΔE1ΔE3 (control de Ad), hH-1-TO o la combinación del control de Ad y los virus hH-1-TO. La proliferación celular, que reflejaba el efecto citopático mediado por virus (CPE), se supervisó en tiempo real, cada 30 minutos, utilizando el Sistema xCELLigence (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Alemania). Las curvas de crecimiento mostradas representan el promedio de al menos tres replicados con desviaciones estándar relativas.

Ejemplo 2**Generación de parvovirus hH-1-TO portadores de un promotor P4 inducible con tetraciclina**

Los primeros intentos con el objetivo de producir un adenovirus portador de un genoma Ad-PV quimérico fracasaron por el hecho de que las proteínas NS de parvovirus (lo más probable NS1) interfirieron con la producción de la quimera Ad-PV (Fig. 1). De hecho, la introducción de codones de parada dentro del marco de lectura abierto de NS pudo devolver la producción de Ad a los niveles normales (Fig. 1). De cara a estos resultados, el promotor P4 temprano de parvovirus, que controla la expresión del gen NS, se modificó con el fin de controlar estrechamente su actividad durante la producción de la quimera. Se aprovechó la tecnología T-REx[®] [29, 30] y se sometió a ensayo si era posible diseñar el promotor P4 y hacer que fuera inducible mediante la inserción de dos 2 elementos de operador de tetraciclina (TetO2) [30] entre la caja TATA y el codón de inicio de NS (Fig. 2A y B). Con esta modificación, se esperaba que la actividad del promotor P4 estuviera inhibida en las células T-REx[®]-293, que expresaban constitutivamente el represor de tetraciclina (TetR), en ausencia de doxiciclina (dox) y que se indujera en su presencia [30]. Por el contrario, en las células cancerosas que no expresaban el TetR, el promotor P4 debía ser completamente funcional. Este parvovirus modificado se generó a partir de un clon molecular infeccioso y se denominó pHH-1-TO (Fig. 2).

Con el fin de verificar si la expresión de las proteínas parvovíricas desde pHH-1-TO es inducible como se había anticipado, las células T-REx[®]-293 se transfectaron con pHH-1-TO o pHH-1 parental, se incubaron durante 2 días, se recogieron y se procesaron para una detección con transferencia Western de las proteínas NS1 y VP parvovíricas (Fig. 3A). En las células transfectadas con el vector pHH-1 vírico parental, la adición de dox no afectaba a los niveles totales de proteína NS1 (Fig. 3B). Por el contrario, en las células transfectadas con pHH-1-TO, la detección de NS1 se observó solo en presencia de dox, lo que demuestra que la actividad del promotor P4-TO está bajo el control de un mecanismo de activación y desactivación. En condiciones de inducción, los niveles de proteína NS1 eran similares a los obtenidos utilizando el vector vírico parental, lo que indica que la inserción de TetO₂ no afectaba a la producción de NS cuando se suministraba dox al medio de cultivo. Se sabe que la proteína NS1 transactiva el promotor p38 de parvovirus, el cual controla la transcripción de los genes VP que codifican las proteínas de la cápside. De conformidad con la inhibición de la producción de NS1, solo se observó una ligera expresión de VP1 y VP2 en las

células T-REX[®]-293 transfectadas con pH-1-TO cultivadas en condiciones sin doxiciclina. Por el contrario, las proteínas VP se acumulaban en estas células cuando se añadía dox al medio (Fig. 3B).

5 A continuación se investigó si la transfección con pH-1-TO daba como resultado la producción de una progenie de viriones infecciosos. Para este fin, las células T-REX[®]-293 se transfectaron con las estructuras artificiales pH-1-TO o pH-1 y se cultivaron en presencia o ausencia de dox durante un total de 7 días. Los lisados celulares de estos cultivos se usaron después para la infección de células NB324K. Después de 7 días adicionales, las células se lisaron de nuevo y los extractos celulares sin purificar se sometieron a ensayo para estudiar la presencia de viriones completos capaces de infectar, destruir y propagarse en células indicadoras NB324K, tal y como se midió con un ensayo en placa (Fig. 4A). Como se esperaba, el virus parental hH-1 se producía a niveles similares, independientemente de la presencia de dox. Por el contrario, dox era necesaria durante la fase de transfección de T-REX[®]-293 para que se produjeran viriones hH-1-TO a un nivel significativo (Fig. 4B), obteniéndose títulos de virus comparables a los obtenidos con el virus parental. Estos resultados muestran que inserciones de TetO₂ en el región del promotor P4 (i) hacen que la producción de PV en las células T-REX[®]-293 dependa de la inducción con dox, (ii) son totalmente compatibles con el curso completo del ciclo de vida de parvovirus, ya que en células tales como NBK324 que no expresan el TetR, las partículas víricas hH-1-TO producidas nuevas son totalmente infecciosas y capaces de replicarse autónomamente.

20 La propagación de los virus hH-1-TO se investigó adicionalmente en células T-REX[®]-293. Se inocularon las células bien con virus hH-1-TO o hH-1 y se cultivaron en presencia o ausencia de dox durante 4 días con un cambio de medio a las 24 h, con el fin de eliminar las partículas víricas no unidas. Las células se lisaron después en sus medios y la producción de parvovirus se evaluó con una qPCR específica de parvovirus (Fig. 5A). De conformidad con los resultados presentados anteriormente, la producción de virus hH-1-TO en las células T-REX[®]-293 solo era eficaz cuando los cultivos se cultivaban en presencia de dox, con una reducción de 60 veces en los títulos de virus en ausencia del inductor (Fig. 5B). Cabe señalar, sin embargo, que la producción de hH-1-TO en presencia de dox era aproximadamente seis veces menor que la de hH-1, lo que sugiere que las modificaciones introducidas en la región del promotor P4 reducen ligeramente la capacidad del virus en esas células.

Ejemplo 3

Generación de la quimera adeno-parvo

30 Debido a los resultados presentados en el Ejemplo 2, el genoma completo del parvovirus hH-1-TO se insertó en la estructura principal de ADN de un vector de adenovirus con replicación deficiente (Ad5ΔE1ΔE3), generando de este modo el vector quimérico pAd-hH-1-TO. En primer lugar, se sometió a ensayo si la región del promotor P4-TO conservaba su sensibilidad frente a TetR una vez insertado en el genoma de Ad. Para este fin, las células T-REX[®]-293 se transfectaron con el vector quimérico pAd-hH-1-TO y se cultivaron durante 5 días con o sin dox. A continuación, se analizaron los extractos totales de proteínas de estas células mediante transferencia Western en busca de la presencia de las proteínas parvovíricas NS1 y VP (Fig. 6A). Como se ilustra en la Fig. 6B, NS1 se detectó solo cuando se proporcionaba dox a las células. De acuerdo con los resultados anteriores (Fig. 3B), la expresión de NS1 se correlacionaba con una inducción de la expresión de las proteínas de la cápside VP1 y VP2. Estos resultados confirmaron la sensibilidad frente a TetR de la expresión génica de P4-TO en un contexto de Ad.

40 A continuación, se investigó si era posible producir viriones quiméricos Ad-PV a partir de la estructura artificial pAd-hH-1-TO. Como control negativo, se utilizó el vector pAd-hH-1 que contenía el promotor P4 de tipo silvestre (a partir del cual antes no se pudieron generar los viriones quiméricos) (Fig. 1), y como control positivo, el plásmido de Ad parental cuya delección génica *E1/E3* se complementa con las células 293 utilizadas como productoras. En una primera ronda de producción, las células T-REX[®]-293 se transfectaron con los plásmidos pAd-hH-1-TO, pAd-hH-1 o pAd y se cultivaron en un medio que contenía (o no) dox, durante 7 días antes de ser lisadas. Los extractos celulares sin purificar se utilizaron a continuación para volver a infectar células T-REX[®]-293 de nuevo aporte en dos rondas sucesivas de amplificación vírica (Fig. 7A). Los lisados celulares finales se purificaron luego mediante centrifugación en gradiente con cloruro de cesio (CsCl) y las reservas víricas se titularon utilizando un ensayo de replicación de adenovirus. Las preparaciones víricas se sometieron también a un análisis con microscopía electrónica para controlar su pureza. De conformidad con los resultados anteriores (Fig. 1), el vector quimérico pAd-hH-1 no podía generar ninguna partícula vírica detectable. Por el contrario, los virus quiméricos Ad-hH-1-TO se producían en células T-REX[®]-293, a menos que se hubiera añadido dox al medio de cultivo. Estos resultados eran acordes con la evidencia anterior de que las proteínas NS parentales (lo más probable NS1), eran responsables de la inhibición de la replicación del virus quimérico de adenovirus. Sorprendentemente, la producción de los virus quiméricos Ad-hH-1-TO no solo era posible en presencia de TetR funcional, sino que también era muy eficaz, ya que estaba dentro del intervalo de rendimiento del control de Ad (Fig. 7B). Un análisis con microscopía electrónica no mostraba ninguna diferencia entre los virus Ad-hH-1-TO y el control de Ad, ni ninguna contaminación con parvovirus en las reservas víricas de Ad-hH-1-TO (Fig. 7C) producidas. En conjunto, estos resultados demuestran que mediante un bloqueo transitorio de la unidad de transcripción NS de parvovirus, es posible producir virus quiméricos Ad-PV con títulos elevados en la línea celular de empaquetamiento T-REX[®]-293.

Ejemplo 4

Rescate de parvovirus infecciosos a partir de la quimera adeno/parvo

A continuación se investigó si es posible generar parvovirus totalmente infecciosos mediante la infección de células diana transformadas con partículas víricas quiméricas Ad-hH-1-TO. Dos líneas celulares permisivas para la producción de parvovirus, a saber, SiHa obtenida a partir de carcinoma de cuello uterino y transformada con SV40, se infectaron con virus purificados Ad-hH-1-TO o hH-1-TO y se incubaron durante 4 días (SiHa) o 5 días (NB324K), con una renovación del medio de cultivo después de 24 h para eliminar los virus no unidos. Las células infectadas se lisaron después en su medio, y los extractos sin purificar se analizaron para estudiar la presencia de partículas de parvovirus infecciosas mediante un ensayo en placa (Fig. 8A). Con la verificación de la hipótesis de trabajo inicial, los parvovirus infecciosos con replicación autónoma fueron rescatados después de la infección de las células tanto NB324K como SiHa con viriones quiméricos Ad-hH-1-TO (Fig. 8B). Estos resultados proporcionan una prueba de concepto de que la quimera Ad-PV se puede utilizar como una nueva herramienta para la entrega de parvovirus autónomos a células diana.

Ejemplo 5**Potencial oncolítico incrementado de la quimera Ad-hH-1-TO**

Se sabe que H-1PV induce efectos citopáticos (CPE) sobre un gran número de células de cáncer [10]. Experimentos preliminares mostraban que los parvovirus hH-1 y hH-1-TO tenían actividades citotóxicas similares contra células HeLa, indicando que la modificación introducida en la región del promotor P4 no modificaba la actividad oncolítica del virus.

En este documento, la quimera Ad-hH-1-TO y ambos virus parentales (control de Ad y hH-1-TO) se compararon en función de sus actividades citotóxicas frente a un panel de cultivos de células de cáncer y normales humanas mediante ensayos MTT (análisis de la proliferación celular) y LDH (análisis de la lisis celular). Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos se presentan en la Tabla 1 y las Figuras 10 y 11.

Tabla 1. Citotoxicidad de la quimera Ad-hH-1-TO frente a líneas celulares de cáncer humano y células primarias in vitro.

Proliferación celular (%) (ensayo MTT)						
Células cancerosas	MOI	sin tratar	PV	Adc	PV + Adc	Ad-PV
HeLa*	10	100 ± 10	25 ± 4	65 ± 7	11 ± 3	7 ± 2
CxCa*	33	100 ± 9	91 ± 15	58 ± 12	48 ± 9	10 ± 2
ME-180*	33	100 ± 10	80 ± 15	66 ± 11	53 ± 14	19 ± 8
Lox-IMVI**	100	100 ± 1	85 ± 3	79 ± 6	78 ± 4	11 ± 3
HCT-15***	33	100 ± 3	89 ± 4	35 ± 2	20 ± 3	2 ± 1
HCC-2998***	100	100 ± 4	81 ± 14	48 ± 20	26 ± 3	7 ± 5
Células primarias						
Fibroblastos de prepucio	33	100 ± 2	83 ± 8	114 ± 6	102 ± 9	112 ± 6
Fibroblastos orales	100	100 ± 4	108 ± 10	139 ± 11	123 ± 10	77 ± 6
Melanocitos	33	100 ± 1	71 ± 9	134 ± 7	115 ± 6	118 ± 8
Astrocitos	33	100 ± 1	87 ± 8	144 ± 13	131 ± 15	106 ± 20
Toxicidad celular (%) (ensayo LDH)						
Células cancerosas	MOI	sin tratar	PV	Adc	PV + Adc	Ad-PV
HeLa*	10	13 ± 1	82 ± 3	20 ± 5	86 ± 6	98 ± 6
CxCa*	33	9 ± 3	20 ± 3	41 ± 8	47 ± 11	107 ± 16
ME-180*	33	21 ± 7	33 ± 8	22 ± 5	32 ± 6	69 ± 14
Lox-IMVI**	100	24 ± 2	35 ± 2	24 ± 3	35 ± 2	76 ± 8
HCT-15***	33	7 ± 2	9 ± 1	24 ± 7	31 ± 5	94 ± 13
HCC-2998***	100	10 ± 3	18 ± 3	34 ± 5	39 ± 7	82 ± 12
Células primarias						

Toxicidad celular (%) (ensayo LDH)						
Células cancerosas	MOI	sin tratar	PV	Adc	PV + Adc	Ad-PV
Fibroblastos de prepucio	33	11 ± 4	17 ± 5	8 ± 2	12 ± 4	14 ± 5
Fibroblastos orales	100	12 ± 2	12 ± 2	10 ± 4	23 ± 3	43 ± 16
Melanocitos	33	-3 ± 1	1 ± 6	-2 ± 1	3 ± 1	45 ± 7
Astrocitos	33	17 ± 3	22 ± 8	14 ± 3	24 ± 6	42 ± 12

* Cáncer de cuello uterino
 ** Melanoma
 *** Cáncer de colon

5 *Los resultados del LDH y MTT se llevaron a cabo después de 4 días (células cancerosas) o 5 días (células normales) de incubación con hH-1-TO (PV), control de Ad (Adc), una combinación de hH-1-TO y control de Ad (PV + Adc) y la quimera Ad-hH-1-TO (Ad-PV). Se utilizaron células sin tratar como control. Se muestran los valores promedio con desviaciones estándar relativas de un experimento típico realizado por triplicado.*

10 En una primera etapa, se evaluó la actividad citotóxica de la quimera Ad-hH-1-TO en células HeLa conocidas por ser sensibles a una infección con parvovirus hH-1-TO. De acuerdo con los resultados anteriores, hH-1-TO empleado individualmente o en combinación con el control de Ad, destruía muy eficazmente las células HeLa. Un efecto citotóxico más fuerte se observó con Ad-hH-1-TO, lo que indica que, con estas condiciones experimentales, el potencial citostático y citotóxico de PV se conserva o incluso se incrementa una vez cargado en el vector de Ad. Como control de Ad solo, mostraba mucha menos actividad citotóxica y citostática que la de hH-1-TO, se concluyó que la citotoxicidad de Ad-hH-1-TO quimérico se debe principalmente al componente PV, en esas células (Fig. 10A).

15 En una segunda etapa, se sometió a ensayo si la quimera puede permitir que su componente PV destruya células tumorales que de otro modo son resistentes a una infección directa con PV. Para este fin, se realizaron experimentos usando cinco líneas celulares diferentes que eran resistentes a la citotoxicidad de parvovirus y que se habían obtenido a partir de tumores malignos de cuello uterino (ME-180 y CxCa en un pase inferior), melanoma (Lox-IMVI) y de colon (HCT-15 y HCC-2998).

20 Las infecciones con virus Ad y hH-1-TO (utilizados por separado o en combinación) tuvieron poco efecto sobre el crecimiento de estas células. Esto estaba en marcado contraste con la quimera Ad-hH-1-TO, que era mucho más tóxica y destruía de manera eficaz todas las líneas celulares de tumor analizadas, indicando que la quimera tenía actividades oncolíticas mejoradas en relación con los virus parentales a partir de los cuales se había originado (Fig. 10B-F).

25 En una tercera etapa, era importante verificar que la especificidad tumoral de la citotoxicidad de PV se conservaba cuando el PV se entregaba a través del vector de Ad. Para este fin, la citotoxicidad de la quimera se comparó con la de los virus parentales en células primarias humanas con diferentes orígenes, a saber, fibroblastos de prepucio normales, fibroblastos orales, melanocitos y astrocitos. Aunque el tiempo de incubación del virus, antes de procesar las células para los ensayos MTT y LDH, era un día más en los cultivos primarios con respecto a las células cancerosas (5 días frente a 4 días), la quimera no mostraba la misma potencia para destruir las células normales que como se había descrito anteriormente contra las células cancerosas. En particular, no se encontró citotoxicidad en fibroblastos de prepucio humanos (Fig. 11A), aunque solo se observaban efectos citotóxicos menores para los otros cultivos primarios analizados (Fig. 11B-D)

35 A continuación, la dinámica de la destrucción de células tumorales a través de la quimera Ad-hH-1-TO y los virus de control se investigó adicionalmente usando el sistema xCELLigence. Con este dispositivo, es posible controlar en tiempo real la proliferación y la viabilidad de las células. Las líneas celulares de cáncer previamente analizadas mediante ensayos LDH y MTT con la adición de A549 de carcinoma de pulmón, se infectaron con la quimera Ad-hH-1-TO y virus de control, y se cultivaron durante otros 5-7 días midiendo la densidad celular cada 30 min. La Fig. 9 muestra las curvas de crecimiento de células infectadas frente a células no tratadas. El virus de control de Ad tenía un efecto limitado sobre el crecimiento celular de las células HeLa, mientras que el parvovirus hH-1-TO era capaz de inhibir de manera eficaz la proliferación e inducir la muerte de casi todas las células. Esta capacidad de destrucción sorprendente se logró en un grado similar cuando el parvovirus se entregaba a través de la quimera (Fig. 9A). Vale la pena señalar que el efecto citotóxico de la quimera Ad-hH-1-TO se retrasaba en comparación con el inducido por hH-1-TO (aproximadamente 24 horas), lo que presumiblemente se podría asignar al tiempo requerido para el rescate de PV desde el vector quimérico. De acuerdo con los resultados anteriores (Tabla 1), CxCa, ME-180, Lox-IMVI, HCT-15 y HCC-2998 eran bastante resistentes a la citotoxicidad de hH-1-TO, en donde sus curvas de crecimiento solo estaban afectadas muy ligeramente por este virus (Fig. 9C-F). Por otra parte, la infección con el control de Ad inducía unos efectos citotóxicos fuertes solamente en HCC-2998 obtenida a partir de cáncer de colon (Fig. 9G), unos efectos citostáticos en CxCa (Fig. 9B) y ME-180 (Fig. 9C) obtenidas a partir de carcinoma de cuello uterino (para la primera solo cuando se usaba el virus con una concentración elevada de MOI 100), y ninguna citotoxicidad en Lox-

IMVI de melanoma (Fig. 9D) y HCT-15 de cáncer de colon (Fig. 9E). Estos resultados no cambiaron cuando el control de Ad se subadministraba junto con hH-1-TO. Por el contrario, como ya se había observado previamente en los ensayos LDH y MTT, la quimera Ad-hH-1-TO era mucho más tóxica en comparación con todos los controles de la infección. Este virus destruía de manera eficaz todas las líneas celulares sometidas a ensayo, induciendo fuertes efectos citotóxicos, ya 20-40 horas después de la infección (Fig. 9B-F). La supervisión del crecimiento con xCELLigence de A549 obtenida a partir de cáncer de pulmón, mostraba similitud a las células HeLa. Esta línea celular resultó ser sensible tanto a la citotoxicidad de hH-1-TO como de Ad-hH-1-TO quimérico (Fig. 9G), confirmando que el potencial oncolítico de la quimera se conservaba en líneas celulares de cáncer que eran originalmente permisivas al parvovirus. En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la mejora de la actividad oncolítica de la quimera Ad-hH-1-TO.

Ejemplo 6

Potencial oncotóxico mejorado de la quimera Ad-PV

Se sabe que H-1PV induce efectos citopáticos sobre un gran número de células cancerosas [10]. Sin embargo, también hay líneas celulares cancerosas que son débilmente susceptibles o completamente resistentes a la citotoxicidad de H-1PV. Los experimentos de los inventores mostraron que los parvovirus hH-1 y hH-1-TO ejercían actividades citotóxicas similares contra las células HeLa, tal como se midió por el ensayo LDH, lo que indica que la modificación introducida en la región del promotor P4 no modificaba la actividad oncolítica del parvovirus.

Las actividades citotóxicas de la quimera Ad-hH-1-TO (Ad-PV) y los dos virus parentales [control de Ad (Adc) y hH-1-TO (PV)] se compararon frente a un panel de líneas celulares cancerosas humanas que diferían en su sensibilidad frente a una infección con H-1PV, incluyendo células altamente sensibles (HeLa obtenida a partir de carcinoma de cuello uterino, pMeIL de melanoma), las células menos sensibles (A549 obtenida a partir de cáncer de pulmón) y las células resistentes (ME-180 obtenida a partir de carcinoma de cuello uterino, Lox-IMVI de melanoma, HCT-15 y HCC-2998 de cáncer de colon).

En una primera etapa, la susceptibilidad de estas células a una infección con Ad5 y H-1PV se determinó mediante el uso de virus recombinantes que albergaban el gen informador GFP (Ad-GFP o H-1-GFP). Como se ilustra en la Fig. 13, un análisis con FACS realizado 48 y 72 h después de la infección, reveló que Ad-GFP y H-1GFP transducían HeLa y A549 de una manera similar, mientras que Ad-GFP era mucho más eficaz que H-1GFP en la transducción de las líneas celulares previamente identificadas como resistentes a la citotoxicidad de H-1PV. Como se esperaba, las células pMeIL (que carecen de los receptores de Ad en su superficie), se transducían eficazmente con H-1GFP pero no con Ad-GFP (Fig. 13).

En una segunda etapa, la citotoxicidad vírica se evaluó mediante el ensayo MTT (análisis de la viabilidad celular), ensayo LDH (análisis de la lisis celular) y xCELLigence (análisis en tiempo real del crecimiento celular).

(i) La actividad citotóxica de la quimera Ad-PV se evaluó primero en células HeLa, en comparación con la de los virus parentales (Fig. 14A). Se infectaron las células con cantidades iguales de los diferentes virus. De acuerdo con los resultados anteriores, los ensayos LDH y MTT revelaron que PV empleado individualmente o en combinación con el control de Ad, destruía las células HeLa de manera muy eficaz. Un efecto citotóxico similar se observó con la quimera Ad-PV, indicando que en estas condiciones experimentales, el potencial citotóxico de PV se conserva después de la entrega de PV a través del vector de Ad. Ya que el Adc solo era mucho menos tóxico que el PV, los inventores concluyeron que la citotoxicidad de Ad-PV quimérico en estas células se debía principalmente al componente PV (Fig. 14A). De acuerdo con estos resultados, un análisis de las curvas de crecimiento celular utilizando el sistema xCELLigence, mostró que el virus Adc tenía un efecto limitado sobre la proliferación de las células HeLa, mientras que el PV era capaz de inhibir de manera eficaz la proliferación e inducir la muerte de estas células (Fig. 14B). Esta sorprendente inhibición del crecimiento y destrucción de las células HeLa se lograron en un grado similar cuando el PV era entregado por la quimera. Vale la pena señalar que el efecto citotóxico de la quimera Ad-PV se retrasó aproximadamente 24 h en comparación con el inducido por PV, lo que sería coherente con el tiempo necesario para el rescate de PV desde el vector quimérico en estas células. También se encontró que las células A549 eran sensibles a la citotoxicidad de PV y Ad-PV quimérico, confirmando que el potencial oncolítico de H-1PV se conserva en el virus quimérico (Fig. 14C y D). En consonancia con el hecho de que las células A549 son menos susceptibles a la infección con H-1PV que las células HeLa, se requirió una concentración diez veces mayor de PV o quimera Ad-PV, con el fin de destruir de manera eficaz estas células.

(ii) Los inventores sometieron a ensayo a continuación si la quimera es capaz de destruir células tumorales identificadas previamente como resistentes a una infección directa con H-1PV, a saber, ME-180, Lox-IMVI, HCT-15 y HCC-2998 (Fig. 14). Los ensayos MTT y LDH mostraron que las infecciones con los virus Ad y PV (utilizados solos o en combinación) tenían pocos efectos citotóxicos sobre estas células. En marcado contraste, la quimera Ad-PV era mucho más tóxica y destruía eficazmente todas las líneas celulares tumorales analizadas, lo que indicaba que la quimera tiene una actividad oncolítica mejorada en comparación con los virus parentales a partir de los cuales se habían originado (Fig. 14E, G, I y K). Los análisis cinéticos mostraban que el crecimiento de las líneas celulares anteriores solo se alteraba marginalmente con PV, confirmando su resisten-

cia significativa a los parvovirus (Fig. 14F, H, J y L). Por otra parte, el virus Adc tenía diversos efectos tóxicos sobre estas células, que iban desde una inhibición completa del crecimiento (HCC-2998: véase la Fig. 14L) o un retraso del crecimiento (ME-180: véase la Fig. 14F), hasta una resistencia completa (Lox-IMVI y HCT-15: véanse las Fig. 14H y J, respectivamente). Se obtuvieron resultados similares con el Adc empleado en combinación con PV. Curiosamente, se encontró que la quimera Ad-PV era mucho más tóxica que cualquiera de los virus parentales, inhibiendo completamente el crecimiento de todas las células e induciendo fuertes efectos citotóxicos ya 20-40 horas después de la infección (Fig. 14F, H, J y L).

(iii) Como control, la línea celular pMelL sin ningún receptor para Ad-5 [(30)] también se incluyó en este análisis. Como se muestra en la Fig. 14M y N, estas células fueron sensibles a la citotoxicidad de PV, pero eran completamente resistentes tanto frente a Adc como a la quimera Ad-PV, lo que indica que la quimera ejerce su citotoxicidad solo en células competentes para la penetración de Ad (Fig. 14M y N).

En una tercera etapa, era importante verificar si la especificidad tumoral de la citotoxicidad de PV se conservaba cuando el PV era entregado por el vector de Ad. Para este fin, la citotoxicidad de la quimera se comparó con la de sus virus parentales en células primarias humanas con diferentes orígenes, a saber, fibroblastos de prepucio normales, fibroblastos orales, melanocitos y astrocitos, usando ensayos LDH y MTT. Incluso después de una incubación más larga del virus en comparación con las células cancerosas (5 días frente a 4 días), se encontró que las células normales eran totalmente resistentes (fibroblastos de prepucio) o únicamente poco sensibles (fibroblastos orales, melanocitos y astrocitos) a la actividad citotóxica de la quimera Ad-PV, en contraste sorprendente con la sensibilidad elevada mencionada anteriormente de las células cancerosas (Fig. 15 A-D).

En conjunto, estos resultados muestran la mejora de la actividad oncolítica de la quimera Ad-PV en comparación con los virus parentales Ad y PV.

Ejemplo 7

Generación de partículas de parvovirus infecciosas a partir de la quimera adeno/parvo

Los inventores investigaron si se producían parvovirus totalmente infecciosos después de una infección de células diana transformadas con las partículas víricas quiméricas Ad-PV. Se utilizaron dos líneas celulares permisivas para la producción de parvovirus, a saber, células NB324K transformadas con SV40 y SiHa obtenidas a partir de carcinoma de cuello uterino. Después de la infección con Ad-PV purificada, extractos celulares sin purificar se analizaron para estudiar la presencia de partículas de parvovirus infecciosas mediante un ensayo en placa. De acuerdo con los resultados iniciales, se produjeron parvovirus infecciosos con replicación autónoma después de la infección de las células tanto NB324K como SiHa con viriones quiméricos Ad-PV (Fig. 16A). La producción de H-1PV se realiza rutinariamente en dos etapas, primero mediante la transfección de las células HEK293 con un plásmido que alberga el genoma vírico, para producir un lote inicial de virus, y luego mediante la amplificación de este lote a través de una infección de las células NB324K durante tres o cuatro días. Los inventores compararon los rendimientos de las partículas PV producidas en las células NB324K después de su infección, con cantidades genómicas equivalentes de H-1PV y quimera Ad-PV. Como se muestra en la Fig. 16B, se obtuvieron títulos de PV similares, independientemente de si las células productoras se habían infectado con H-1PV o quimeras Ad-PV. Con el fin de verificar si las partículas de PV generadas mediante células infectadas con la quimera Ad-PV, en una población de células cancerosas son de hecho capaces de infectar células vecinas y multiplicarse en las mismas, los inventores han llevado a cabo ensayos de "propagación de virus" en células HeLa. Con el fin de distinguir entre la producción de PV durante la primera ronda de infección (Ad-PV → conversión a PV) y la producción total de PV, las células se trataron o no con neuraminidasa (NA). Diez horas después de la infección, se sabe que NA evita que H-1PV se una a la membrana plasmática de la célula, catalizando la hidrólisis del ácido siálico, un componente importante del receptor de H-1PV [38] y, por lo tanto, no interfiere en la replicación del virus en células infectadas previamente, aunque inhibe la difusión de la progenie del virus y una amplificación adicional. Como se muestra en la Fig. 16C, el rendimiento de PV 72 h después de la infección era significativamente mayor en las células HeLa cultivadas en ausencia de NA, proporcionando una evidencia de la difusión de PV en estos cultivos. También es importante señalar que los rendimientos de PV en presencia de NA eran similares para las células infectadas con PV y Ad-PV (datos no mostrados). En conjunto, estos resultados indican que el componente PV de la quimera Ad-PV se había rescatado eficazmente de la quimera, dando como resultado una producción primaria de PV que continuaba con rondas de amplificación secundaria de PV. Esto se confirmó mediante la medición de la capacidad de las partículas de PV generadas y liberadas por células infectadas con Ad-PV, para destruir células cancerosas vecinas. Células HeLa se infectaron con Ad-PV a MOI bajas (0,2 y 0,4 UI/célula) y luego se cultivaron en presencia o ausencia de NA durante 72 h antes de ser procesadas para el ensayo LDH. Como se muestra en la Fig. 16D, la quimera solamente destruía una pequeña fracción de las células cuando se añadía NA al medio de cultivo después de la infección con Ad-PV. Esto es consistente con el hecho de que el tratamiento con NA impide las segundas rondas de infección, restringiendo de ese modo la destrucción de la fracción de células afectadas inicialmente por la quimera. Por el contrario, la mayor parte de la población de células cultivadas en ausencia de NA, moría 72 h después de la infección, indicando que las partículas de PV producidas por células infectadas con la quimera eran capaces de una difusión en las células cancerosas vecinas y de destruirlas eficazmente (Fig. 16D).

Estos resultados proporcionan una prueba de concepto de que la quimera Ad-PV se puede utilizar como una herra-

mienta novedosa para la entrega de parvovirus autónomos a células diana y que una vez introducido en las células a través de la quimera, el genoma de PV se libera e inicia la síntesis nueva de partículas de la progenie de parvovirus totalmente infecciosas.

Lista de referencias

- 5 1. Russell, W.C., Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol*, 2009. 90(Pt 1): p. 1-20.
2. Edelstein, M.L., et al., Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview. *J Gene Med*, 2004. 6(6): p. 597-602.
3. Kurreck, J., Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem*, 2003. 270(8): p. 1628-44.
- 10 4. Mathis, J.M., M.A. Stoff-Khalili, and D.T. Curiel, Oncolytic adenoviruses - selective retargeting to tumor cells. *Oncogene*, 2005. 24(52): p. 7775-91.
5. Everts, M. y D.T. Curiel, Transductional targeting of adenovirico cancer gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2004. 4(3): p. 337-46.
- 15 6. Rein, D.T., M. Breidenbach y D.T. Curiel, Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. *Future Oncol*, 2006. 2(1): p. 137-43.
7. Peng, Z., Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum Gene Ther*, 2005. 16(9): p. 1016-27.
8. Liu, T.C., E. Galanis, y D. Kirn, Clinical trial results with oncolytic virotherapy: a century of promise, a decade of progress. *Nat Clin Pract Oncol*, 2007. 4(2): p. 101-17.
- 20 9. Rommelaere, J. y J.J. Cornelis, Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods*, 1991. 33(3): p. 233-51.
10. Rommelaere, J., et al., Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev*. 21(2-3): p. 185-95.
- 25 11. Cornelis, J.J., et al., Parvovirus oncosuppression, in *Parvoviruses*, J.R. Kerr, Cotmore, S.F., Bloom, M.E., Linden, R.M., Parrish, C.R. (compiladores), Editor. 2006, Hodder Arnold: London. p. 365-378.
12. Grekova, S., et al., Activation of an antivirico response in normal but not transformed mouse cells: a new determinant of minute virus of mice oncotropism. *J Virol*. 84(1): p. 516-31.
13. Hristov, G., et al., Through Its Nonstructural Protein NS1, Parvovirus H-1 Induces Apoptosis via Accumulation of Reactive Oxygen Species. *J Virol*, 2010. 84(12): p. 5909-22.
- 30 14. Ran, Z., et al., Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis. *Virus Res*, 1999. 65(2): p. 161-74.
15. Ohshima, T., et al., Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection. *J Gen Virol*, 1998. 79 (Pt 12): p. 3067-71.
- 35 16. Di Piazza, M., et al., Cytosolic activation of cathepsins mediates parvovirus H-1-induced killing of cisplatin and TRAIL-resistant glioma cells. *J Virol*, 2007. 81(8): p. 4186-98.
17. Jackson, D.A., R.H. Symons y P. Berg, Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1972. 69(10): p. 2904-9.
- 40 18. Mathenge, E.G., et al., Fusion PCR generated Japanese encephalitis virus/dengue 4 virus chimera exhibits lack of neuroinvasiveness, attenuated neurovirulence, and a dual-flavi immune response in mice. *J Gen Virol*, 2004. 85(Pt 9): p. 2503-13.
19. Gluzman, Y. y K. Van Doren, Palindromic adenovirus type 5-simian virus 40 hybrid. *J Virol*, 1983. 45(1): p. 91-103.
- 45 20. Fisher, K.J., et al., A novel adenovirus-Adeno-associated virus hybrid vector that displays efficient rescue and delivery of the VAA genome. *Hum Gene Ther*, 1996. 7(17): p. 2079-87.
21. Caplen, N.J., et al., Adeno-retrovirico chimeric viruses as in vivo transducing agents. *Gene Ther*, 1999. 6(3): p. 454-9.

22. Lieber, A., et al., Integrating adenovirus-adenovirus hybrid vectors devoid of all viral genes. *J Virol*, 1999. 73(11): p. 9314-24.
23. Tan, B.T., L. Wu y A.J. Berk, An adenovirus-Epstein-Barr virus hybrid vector that stably transforms cultured cells with high efficiency. *J Virol*, 1999. 73(9): p. 7582-9.
- 5 24. Goncalves, M.A., et al., Efficient generation and amplification of high-capacity adenovirus-adenovirus hybrid vectors. *J Virol*, 2002. 76(21): p. 10734-44.
25. Epstein, A.L. y R. Manservigi, Herpesvirus/retrovirus chimeric vectors. *Curr Gene Ther*, 2004. 4(4): p. 409-16.
- 10 26. Ledinko, N. y H.W. Toolan, Human adenovirus type 12 as a "helper" for growth of H-1 virus. *J Virol*, 1968. 2(2): p. 155-6.
27. Fox, E., P.T. Moen, Jr. y J.W. Bodnar, Replication of minute virus of mice DNA in adenovirus-infected or adenovirus-transformed cells. *Virology*, 1990. 176(2): p. 403-12.
28. El-Andaloussi, N., et al., Novel adenovirus based helper system to support production of recombinant parvovirus Cancer Gene Therapy, 2010. En prensa.
- 15 29. Hillen, W. y C. Berens, Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol*, 1994. 48: p. 345-69.
30. Yao, F., et al., Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther*, 1998. 9(13): p. 1939-50.
- 20 31. Kestler, J., et al., cis requirements for the efficient production of recombinant DNA vectors based on autonomous parvoviruses. *Hum Gene Ther*, 1999. 10(10): p. 1619-32.
32. Lagrange, M., et al., Intracellular scFvs against the viral E6 oncoprotein provoke apoptosis in human papillomavirus-positive cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. 361(2): p. 487-92.
33. Chartier, C., et al., Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*. *J Virol*, 1996. 70(7): p. 4805-10.
- 25 34. Bodendorf, U., et al., Nuclear export factor CRM1 interacts with nonstructural proteins NS2 from parvovirus minute virus of mice. *J Virol*, 1999. 73(9): p. 7769-79.
35. Mittereder, N., K.L. March y B.C. Trapnell, Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol*, 1996. 70(11): p. 7498-509.
36. Raykov et al., *Gene Therapy*, Vol. 9, No. 5, 2002, pp. 358-362.
- 30 37. Documento WO 03/061582 A2
38. Allaume, X., N. El-Andaloussi, B. Leuchs, S. Bonifati, A. Kulkarni, T. Marttila, J.K. Kaufmann, D.M. Nettelbeck, J. Kleinschmidt, J. Rommelaere y A. Marchini. 2012. Retargeting of rat parvovirus H-1PV to cancer cells through genetic engineering of the viral capsid, *J. Virol*. 86:3452-65
- 35 39. Maxwell, I. H., et al., Control of Parvovirus DNA replication by a tetracycline-regulated repressor. *Gene Therapy*, 1999, Vol. 6, p. 309-313.
40. Marchini, A., et al., Research project proposal: Targeting of the oncolytic parvovirus to HPV positive cells using an adenovirus-H-1PV hybrid vector: restoring death pathways in tumor cells. www.cancerpolege.org/cge/uplo_ads/heidelberg_marchini_antonio.pdf, 2011.

REIVINDICACIONES

1. Un vector de adeno-parvovirus quimérico **caracterizado porque** comprende el genoma completo de un parvovirus de roedor insertado en un genoma de adenovirus, en donde:
- (a) el genoma de adenovirus se **caracteriza por** la delección de E1 y E3; y
- 5 (b) la actividad del promotor temprano P4 parvovírico que regula la expresión de la proteína de parvovirus NS se modifica para inhibir o bloquear la expresión de la proteína NS en la línea celular de empaquetamiento durante la producción de la quimera pero es completamente funcional en células cancerosas;
- en donde el promotor temprano P4 parvovírico se modifica de tal manera que la expresión se puede bloquear mediante un represor de tetraciclina; y en donde dicho vector quimérico de adeno-parvovirus se obtiene por un método
- 10 **caracterizado porque**
- (i) las células de empaquetamiento se transfectan con dicho vector quimérico de adeno-parvovirus y se cultivan en condiciones de inhibición o bloqueo de la actividad del promotor P4 parvovírico y reducen o eliminan la expresión de la unidad de transcripción de NS parvovírico; y
- (ii) el adeno-parvovirus quimérico se aísla a partir de las células de empaquetamiento o del medio después de cultivar las células, en donde las células de empaquetamiento son células HEK T-REx[®]-293 y el vector se propaga en ausencia de doxiciclina (dox).
- 15
2. El vector de adeno-parvovirus quimérico según la reivindicación 1, en el que la expresión de NS se reduce o se elimina, preferiblemente en el que la proteína NS es NS1 y/o NS2.
3. El vector de adeno-parvovirus quimérico según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el parvovirus de roedor es Lulll, virus diminuto de ratón (MMV), parvovirus de ratón (MPV), virus diminuto de rata (RMV), parvovirus de rata (RPV), virus de rata (RV) o H1 (H1-PV).
- 20
4. El vector de adeno-parvovirus quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que contiene adicionalmente un transgén expresable.
5. El vector de adeno-parvovirus quimérico según la reivindicación 4, en el que el transgén se inserta en una posición compatible del genoma de Ad.
- 25
6. El vector de adeno-parvovirus quimérico según la reivindicación 4 o 5, en el que la expresión del transgén está bajo el control (a) del promotor P38, o (b) un promotor heterólogo, preferiblemente CMV, SV 40 o TK.
7. El vector de adeno-parvovirus quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el transgén es un gen que codifica una proteína marcadora.
- 30
8. El vector de adeno-parvovirus quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que el transgén es un gen que codifica un polipéptido terapéutico o inmunogénico
9. El vector de adeno-parvovirus quimérico según la reivindicación 8, en el que el transgén es un gen que codifica un polipéptido citotóxico, una citocina, una quimiocina, un péptido específico de cáncer, un ligando, un adaptador, un Affibody, un anticuerpo de cadena sencilla y/o un polipéptido que potencia la oncolisis de PV y/o la replicación de PV.
- 35
10. Un método para preparar un vector de adeno-parvovirus quimérico, en donde dicho método se **caracteriza porque**
- (i) las células de empaquetamiento se transfectan con un vector de adeno-parvovirus quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y se cultivan en condiciones que inhiben o bloquean la actividad del promotor P4 parvovírico y reducen o eliminan la expresión de la unidad de transcripción de NS parvovírico; y
- 40 (ii) el adeno-parvovirus quimérico se aísla a partir de las células de empaquetamiento o del medio después de cultivar las células, en donde las células de empaquetamiento son células HEK T-REx[®]-293 y el vector se propaga en ausencia de doxiciclina (dox).
11. Célula que contiene el vector de adeno-parvovirus quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 45
12. Composición farmacéutica que contiene el vector de adeno-parvovirus quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Vector de adeno-parvovirus quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 8, para uso en el tratamiento de un tumor.
14. Vector de adeno-parvovirus quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 8 para el uso según

la reivindicación 13, **caracterizado porque** el uso es para el tratamiento de cánceres que son resistentes a la citotoxicidad de parvovirus.

- 5 15. Vector de adeno-parvovirus quimérico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 8 para el uso según la reivindicación 13 o 14, **caracterizado porque** el uso es para el tratamiento de carcinomas de cuello uterino, melanomas, cánceres de pulmón y colon.

Figura 1

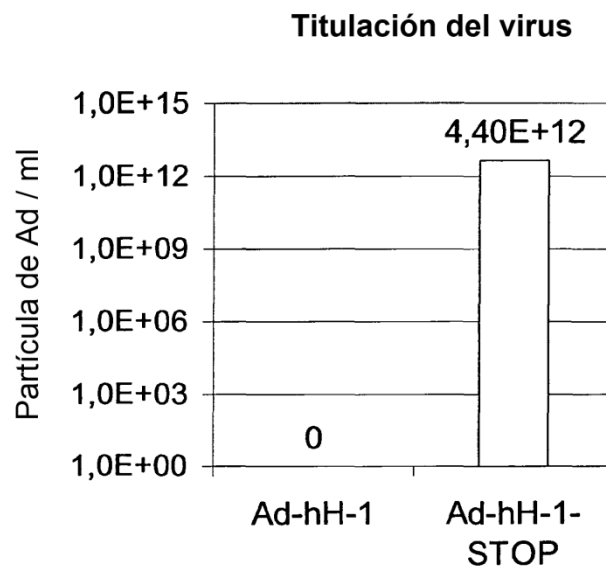
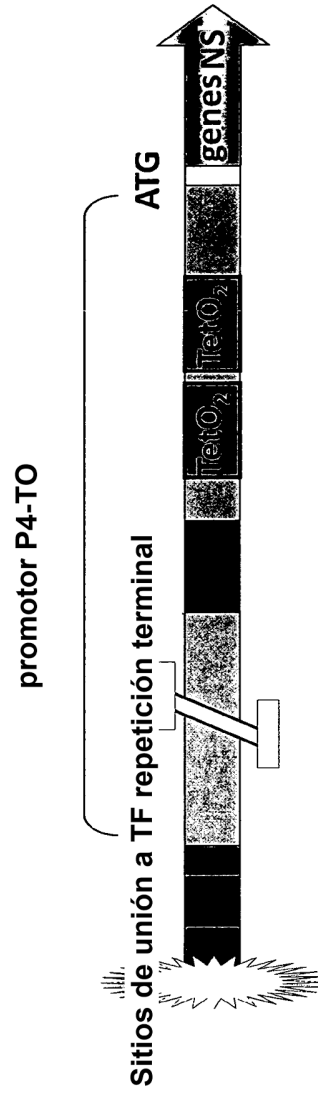


Figura 2

A



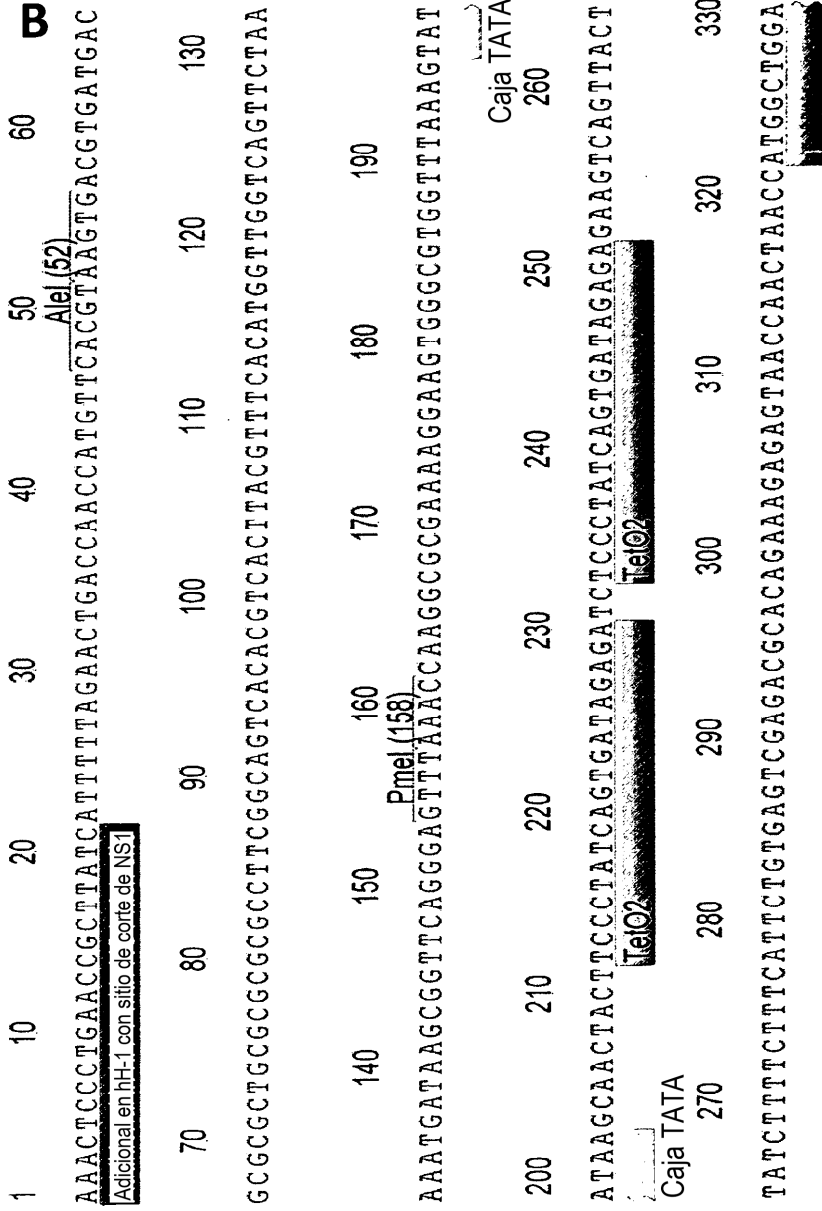
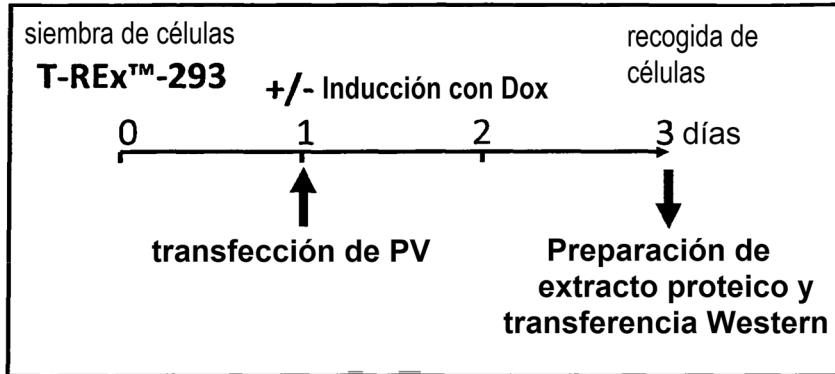


Figura 2

Figura 3

A



B

Transferencia Western

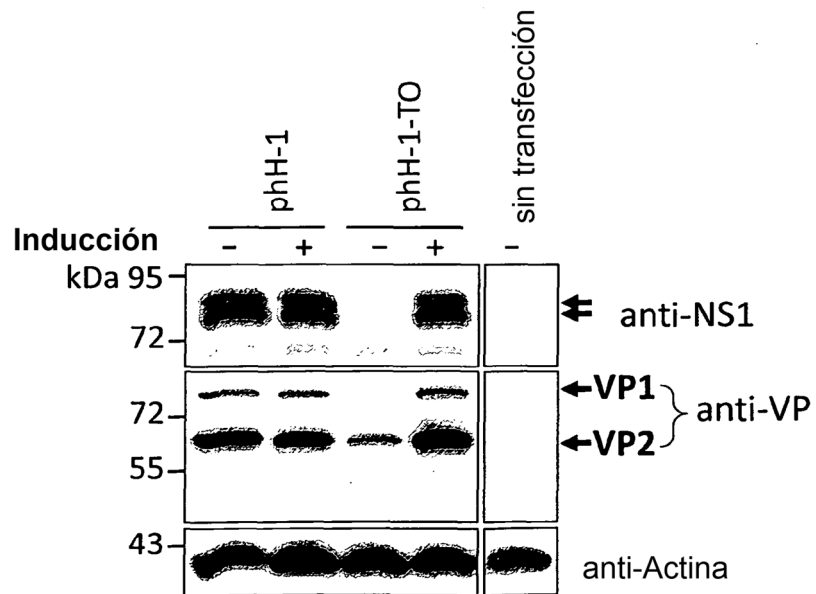


Figura 4

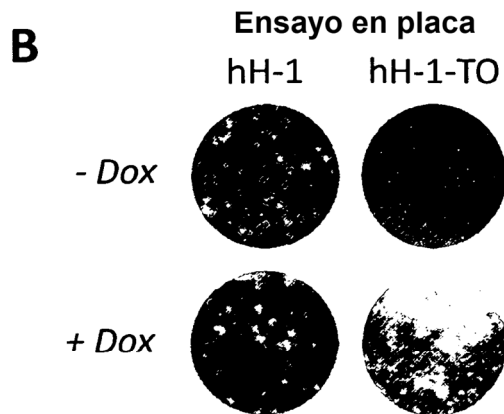
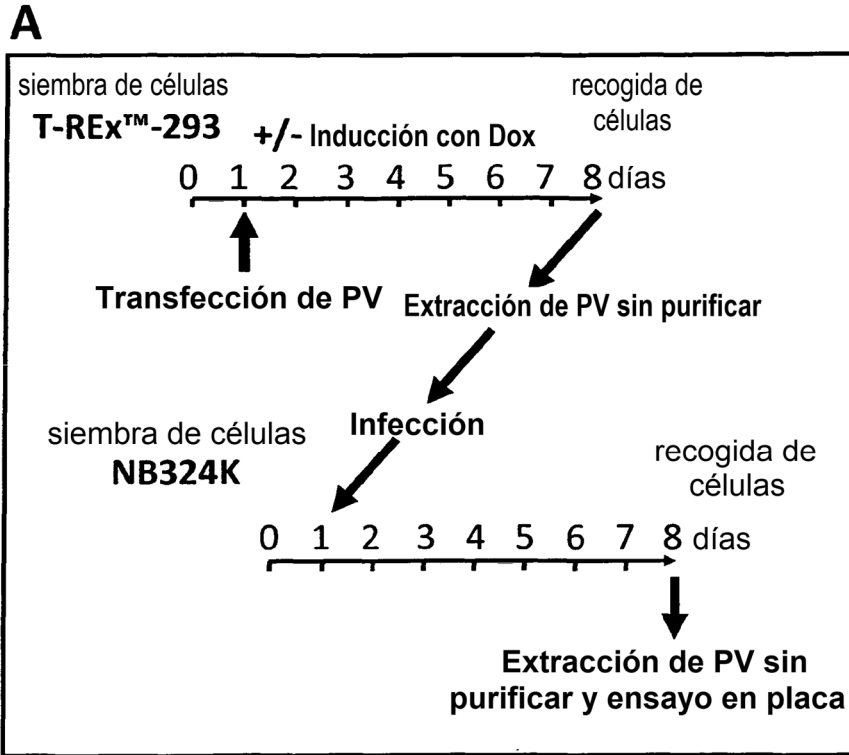
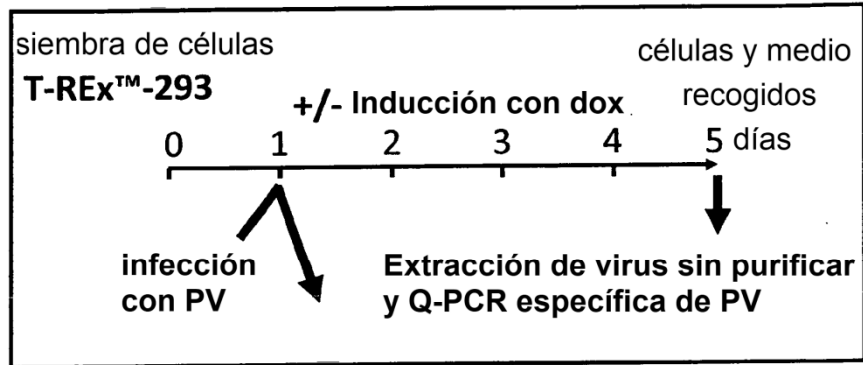


Figura 5

A



B

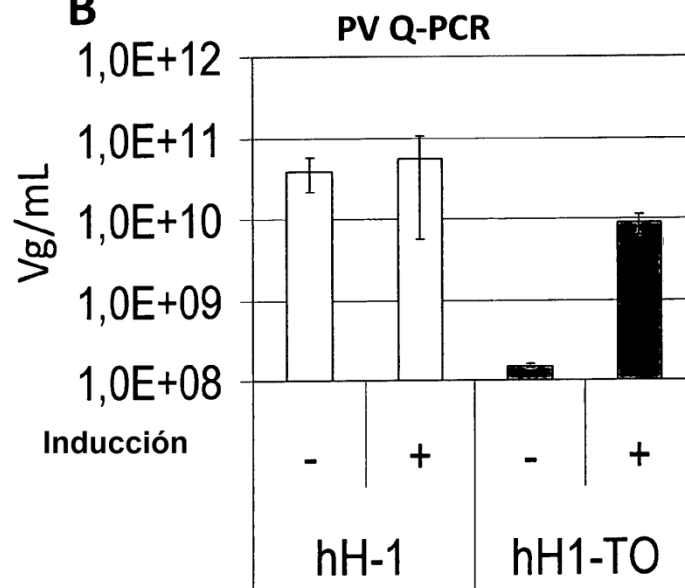
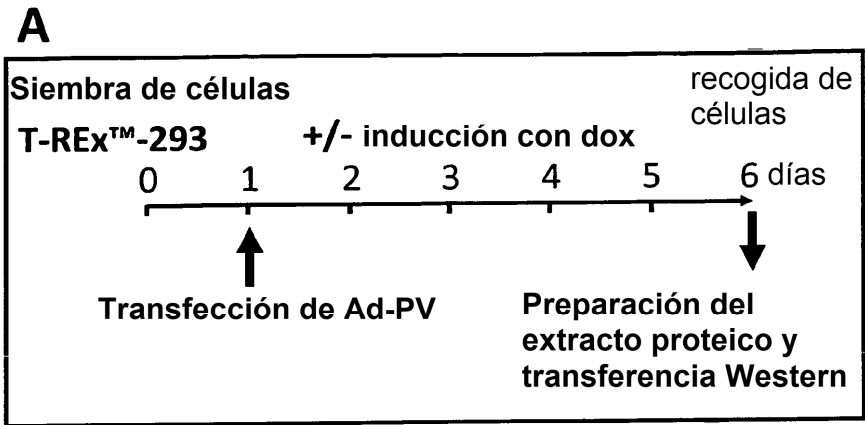
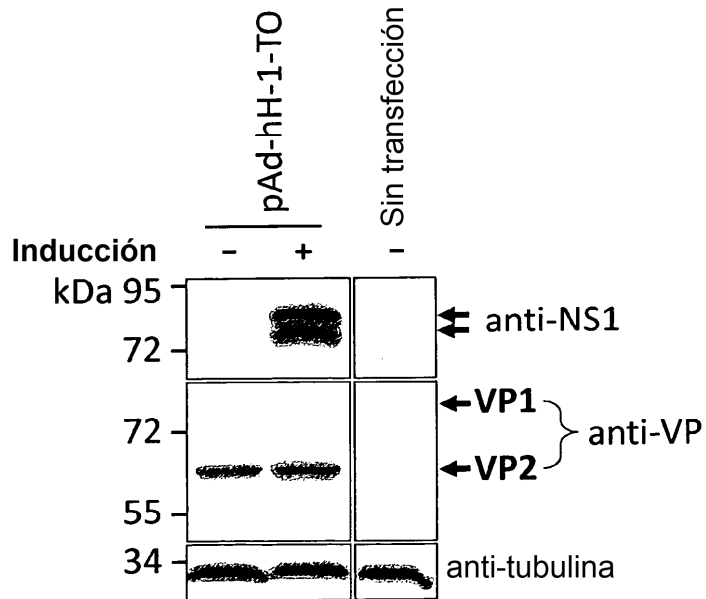


Figura 6



B Transferencia Western



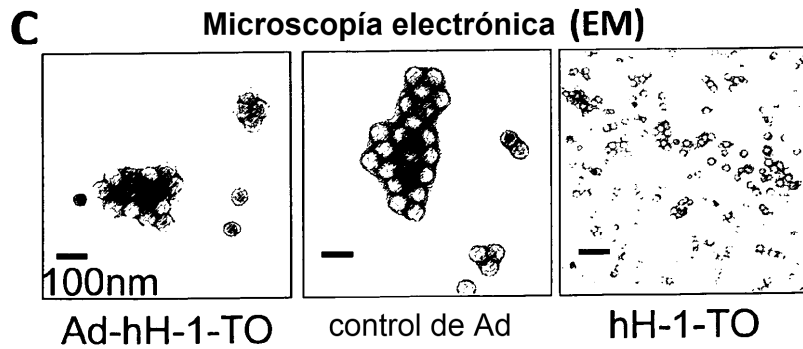
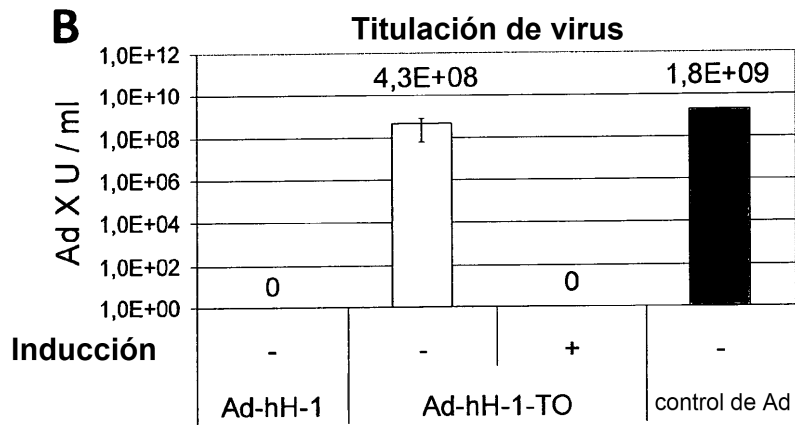
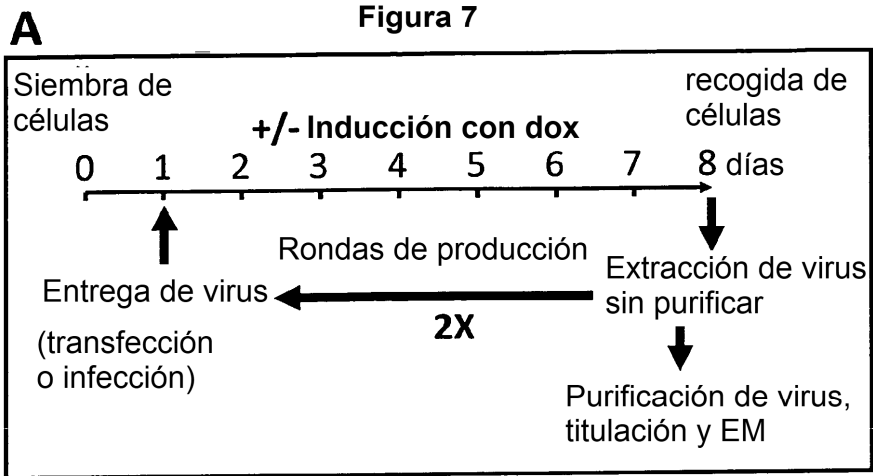


Figura 8

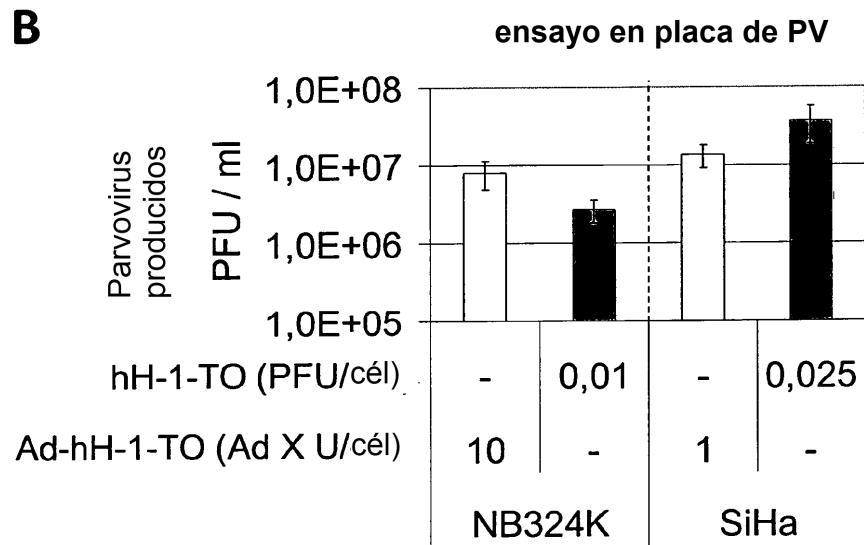
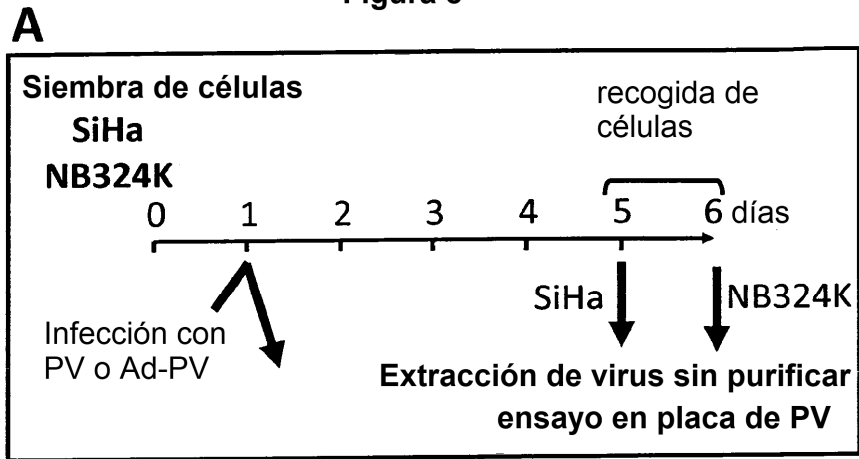


Figura 9

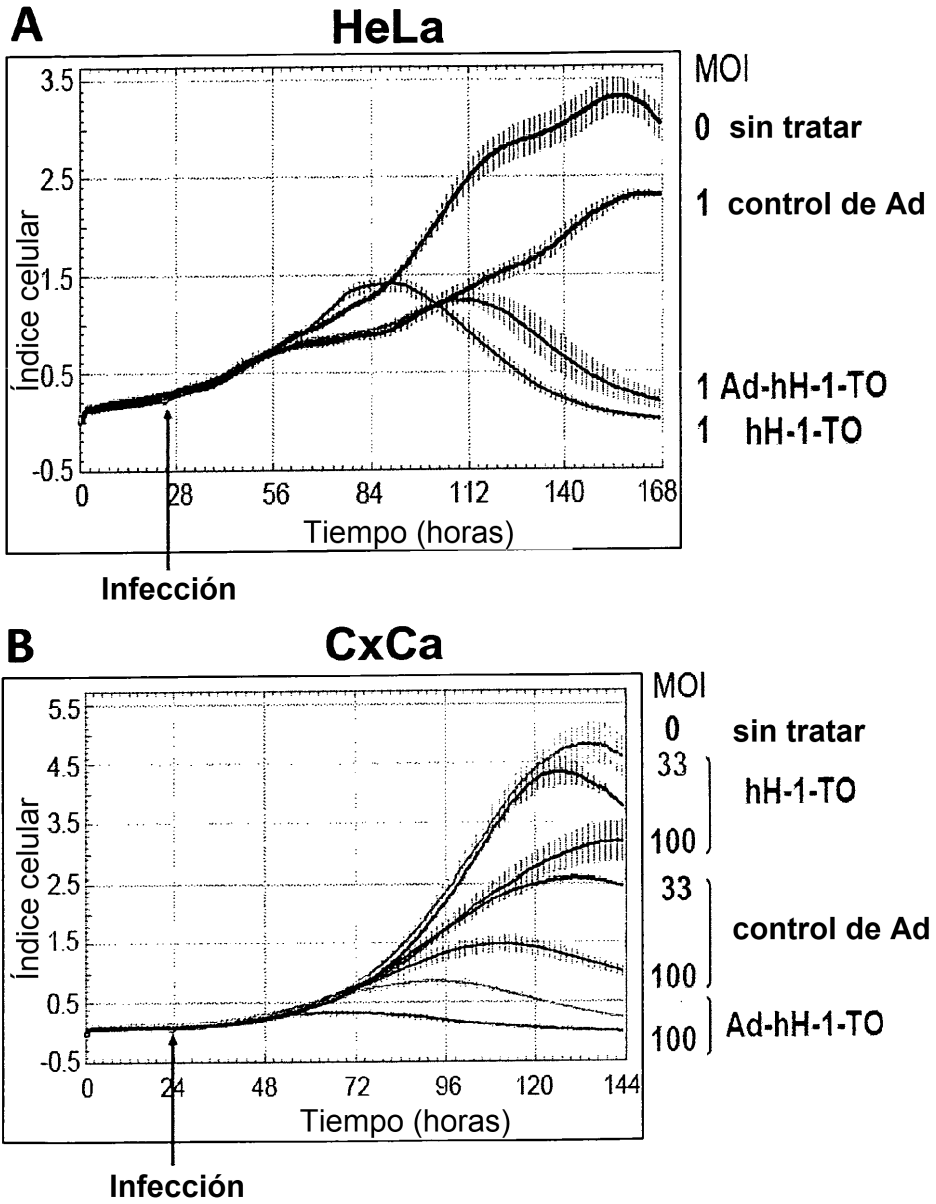


Figura 9

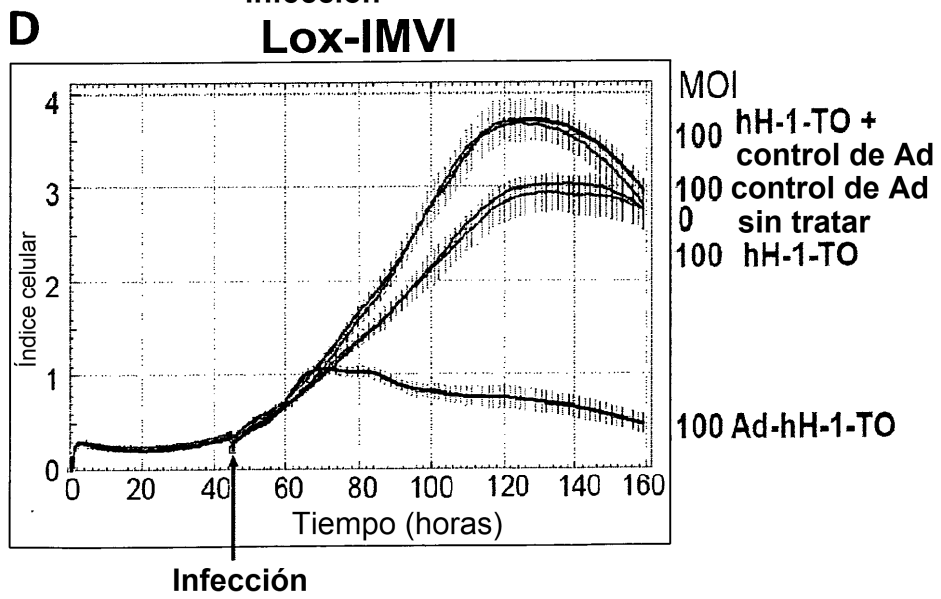
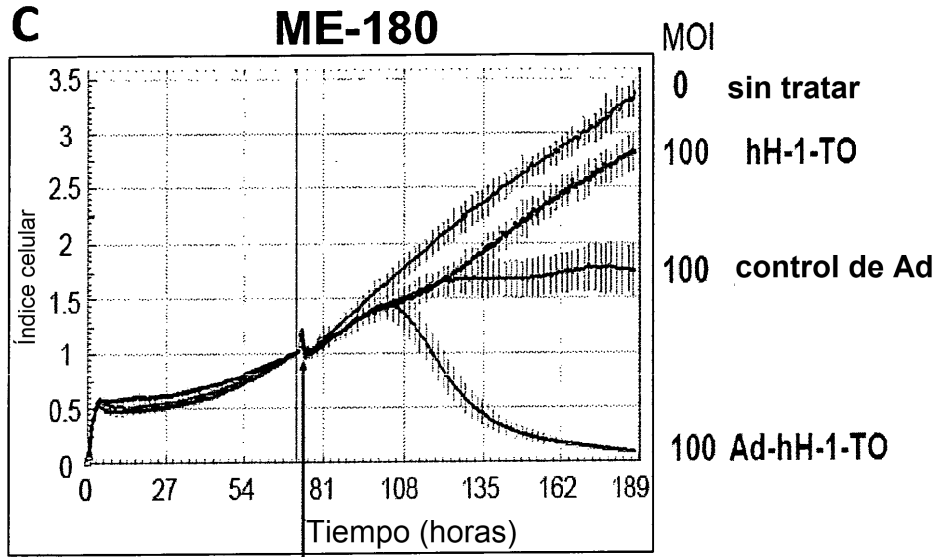


Figura 9

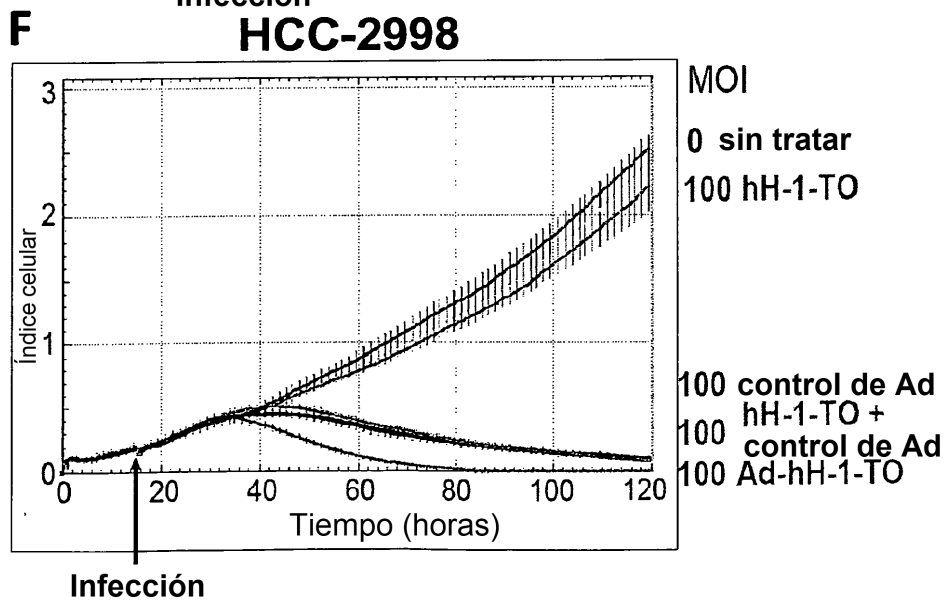
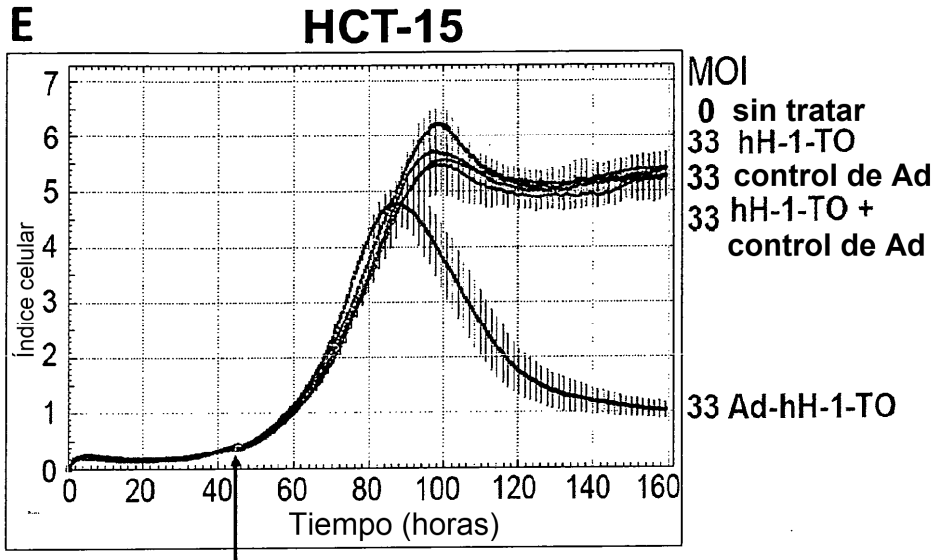


Figura 9

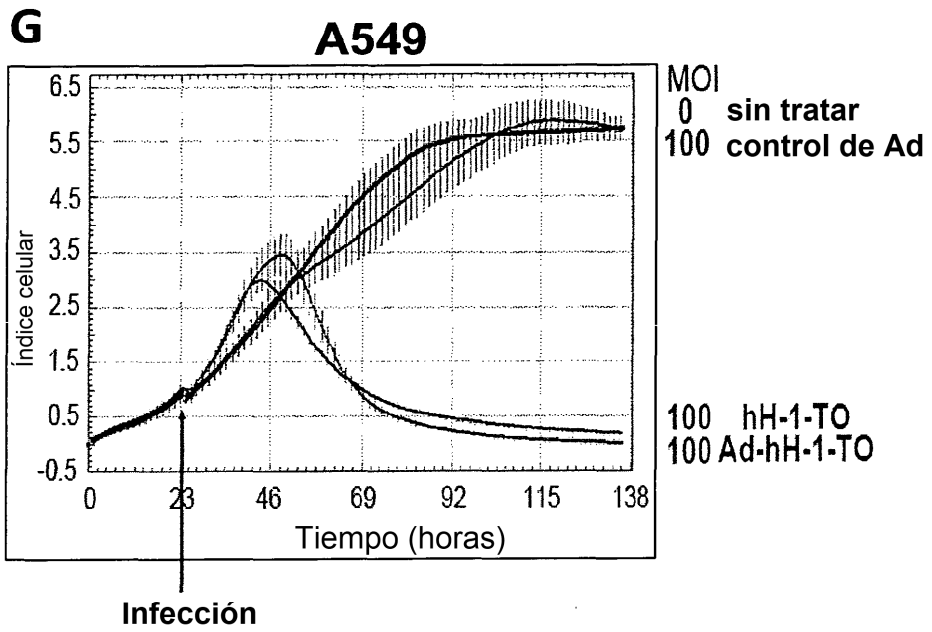


Figura 10

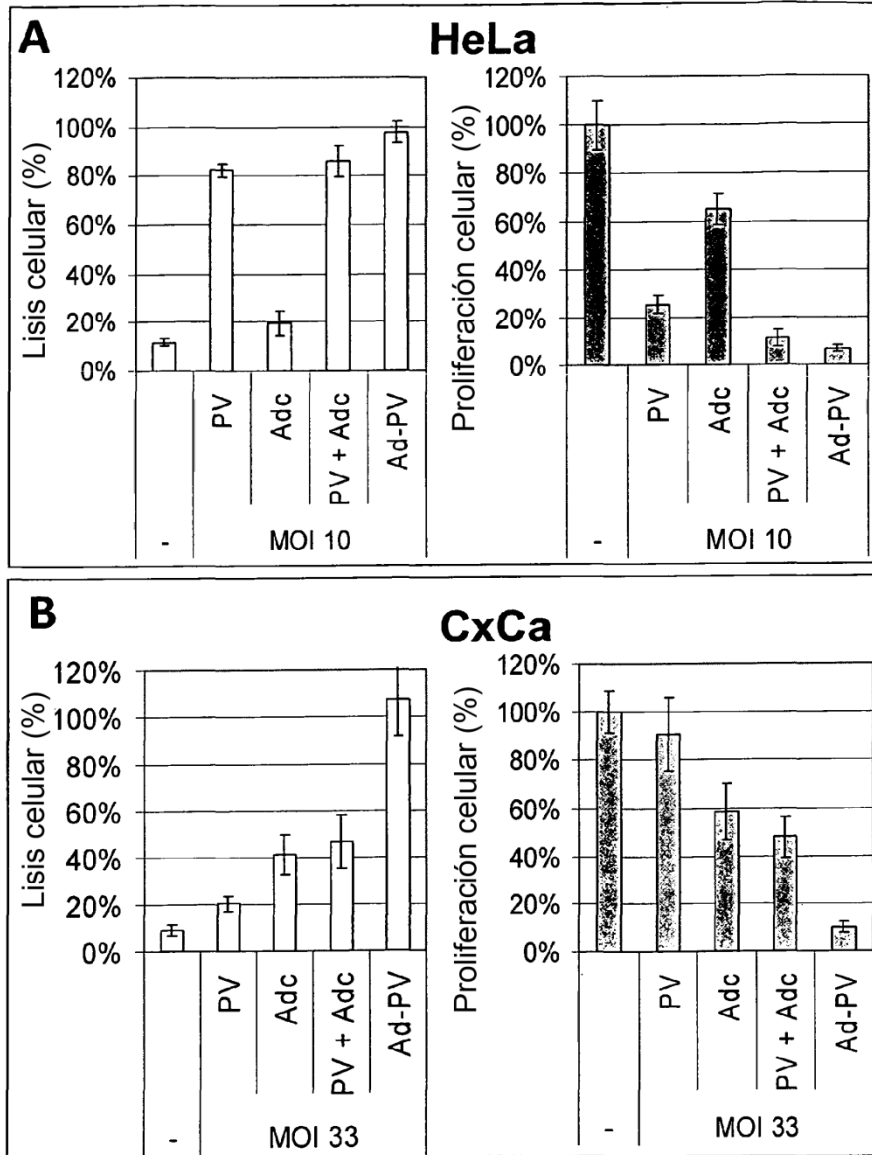


Figura 10

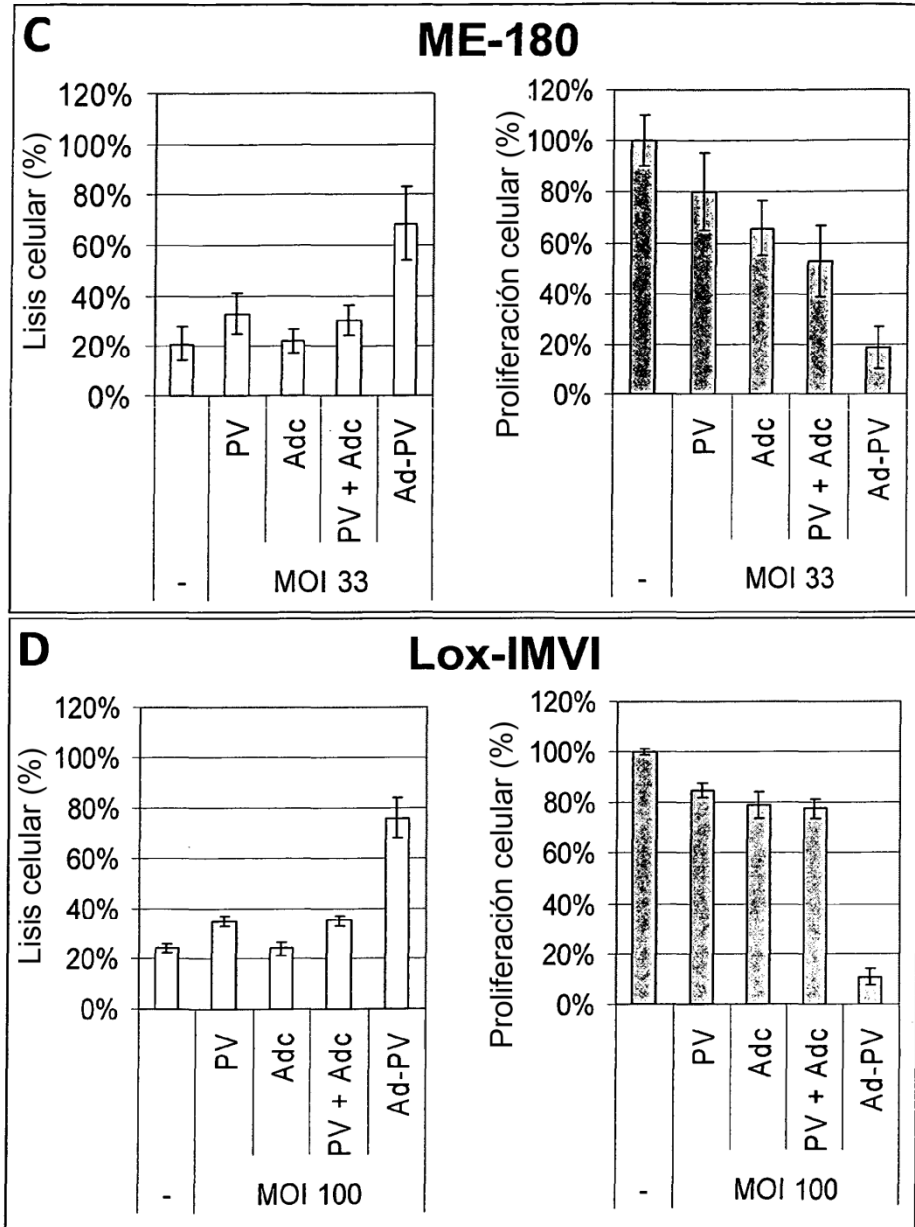


Figura 10

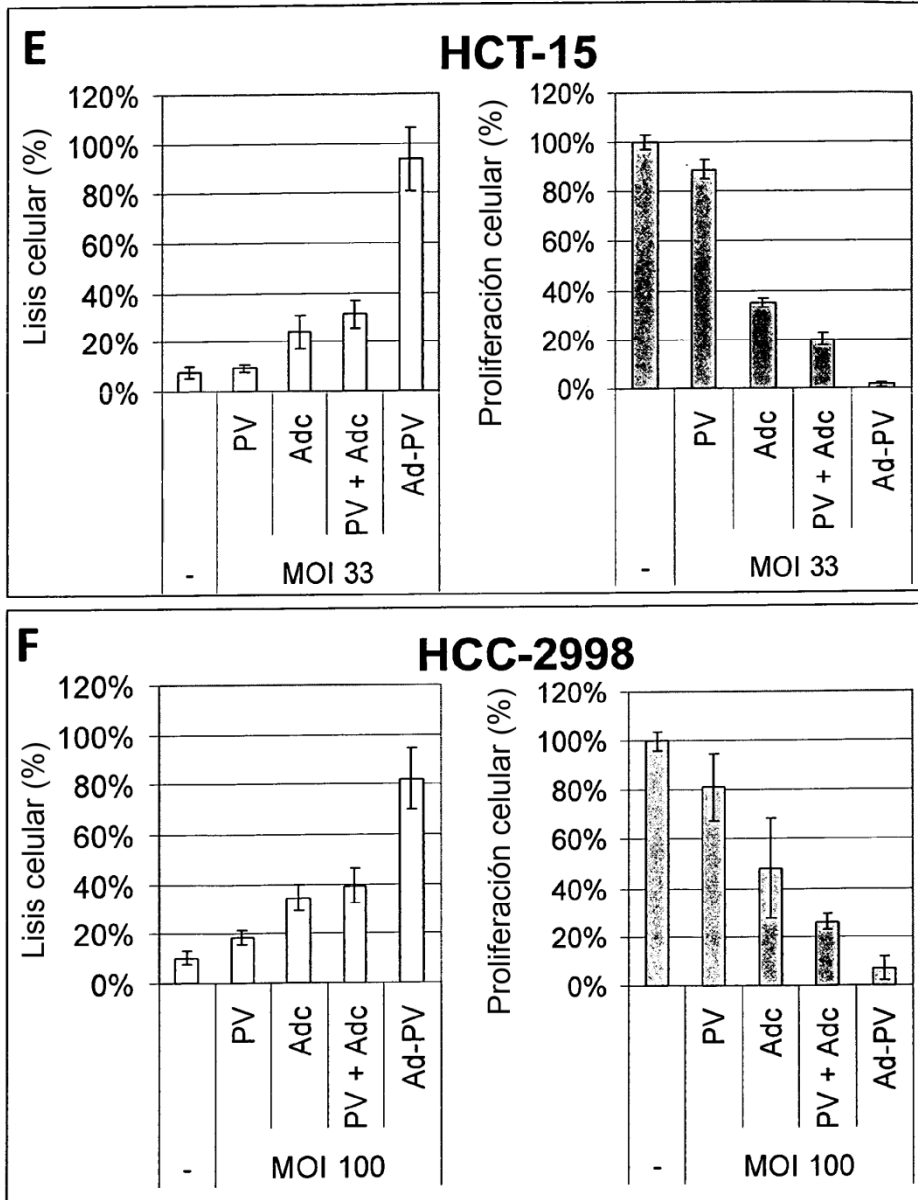


Figura 11

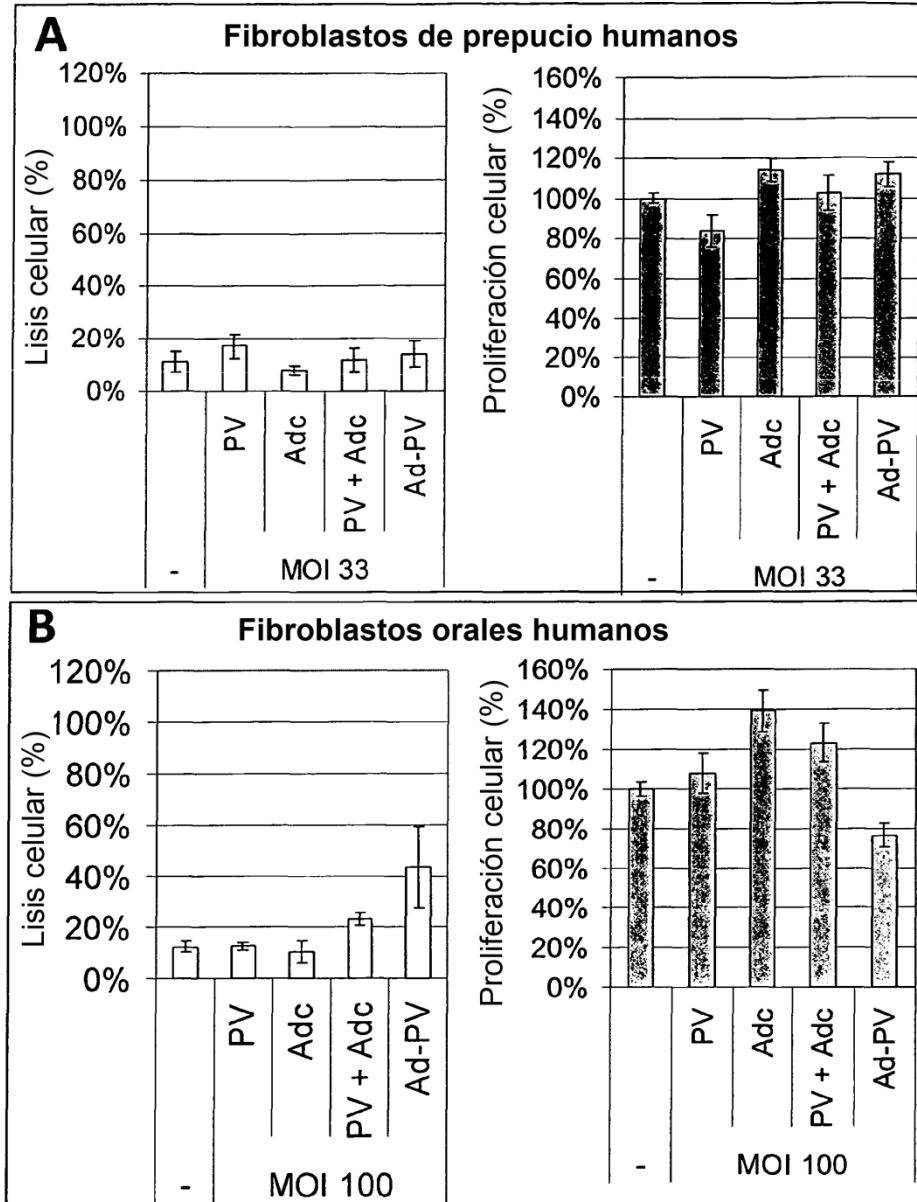


Figura 11

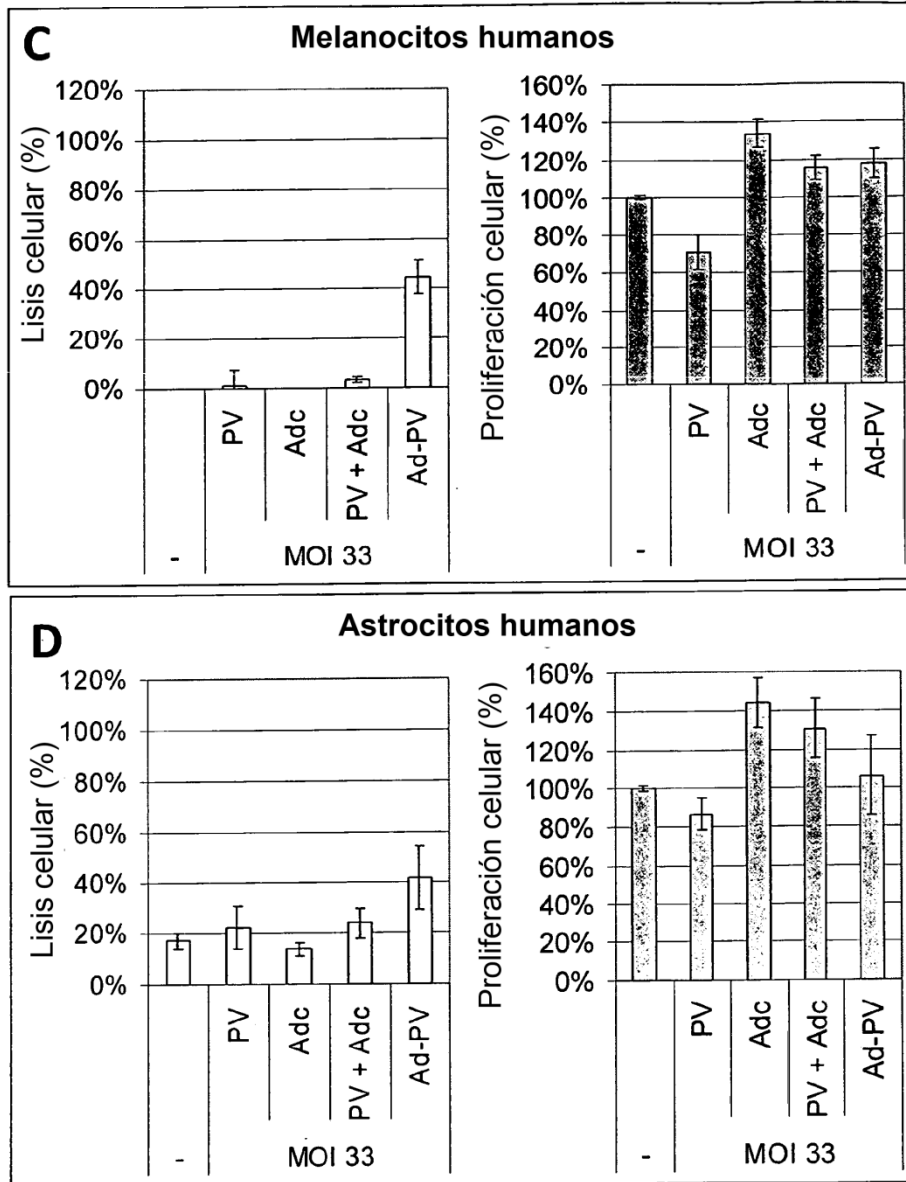


Figura 12A

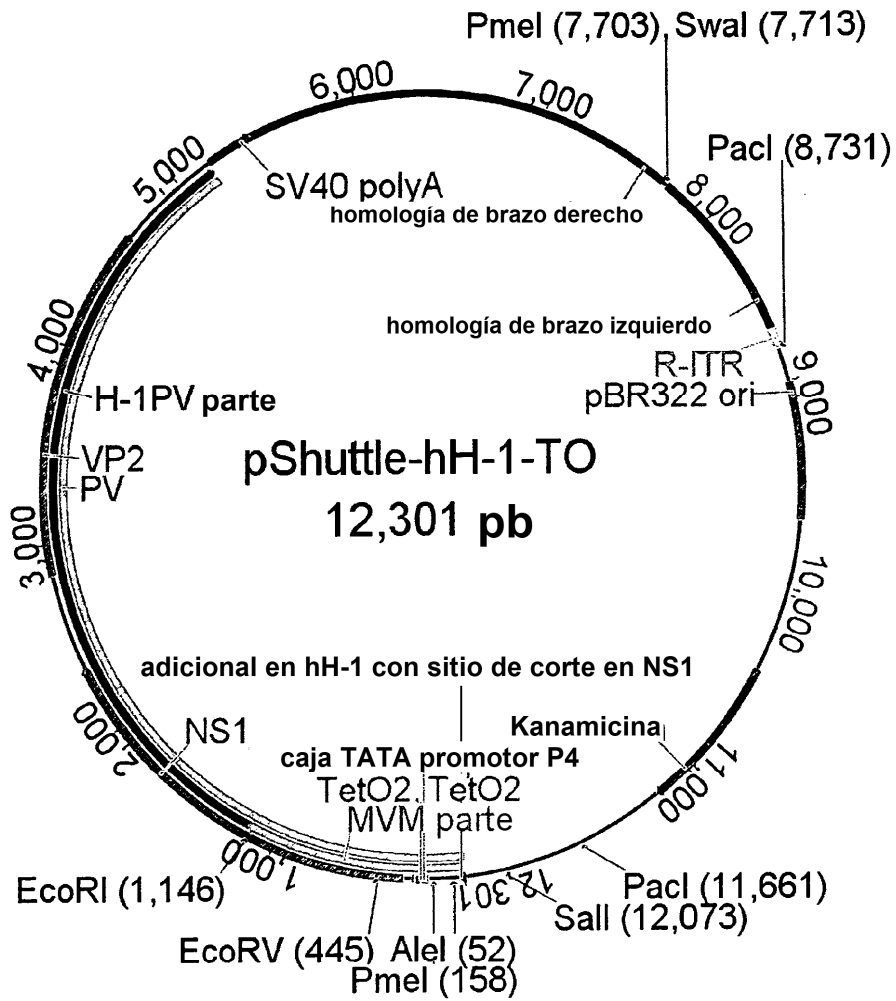


Figura 12B

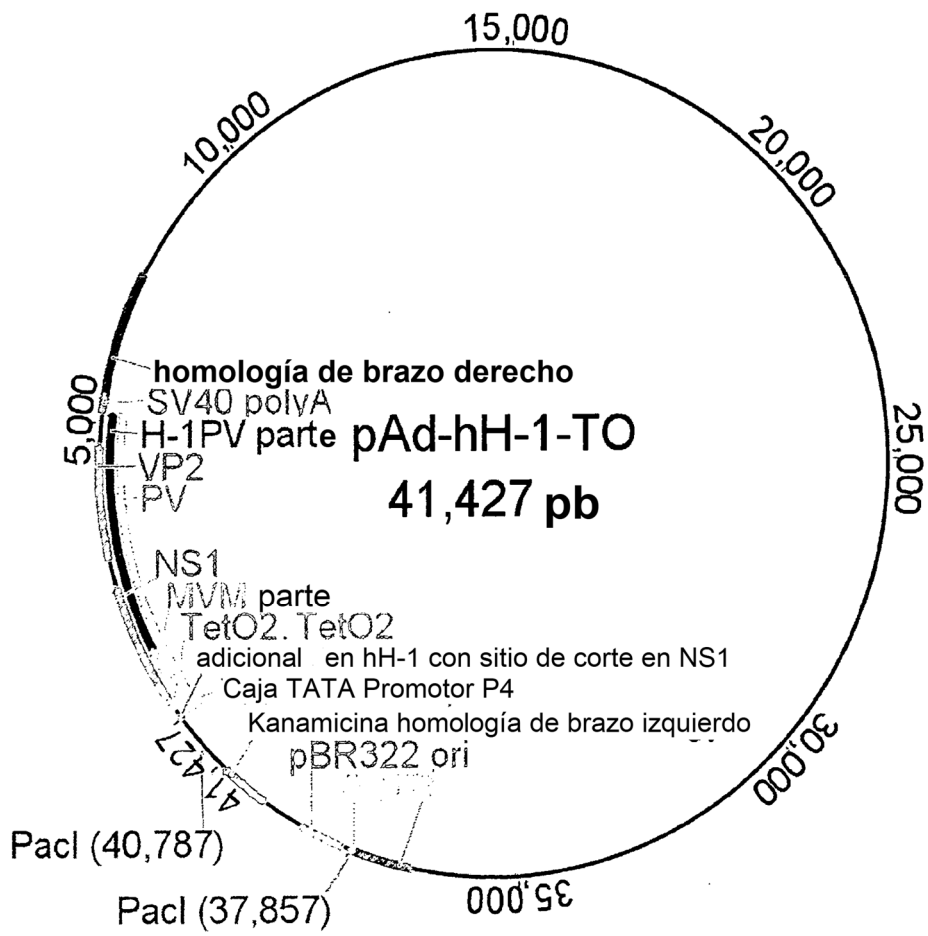


Figura 13

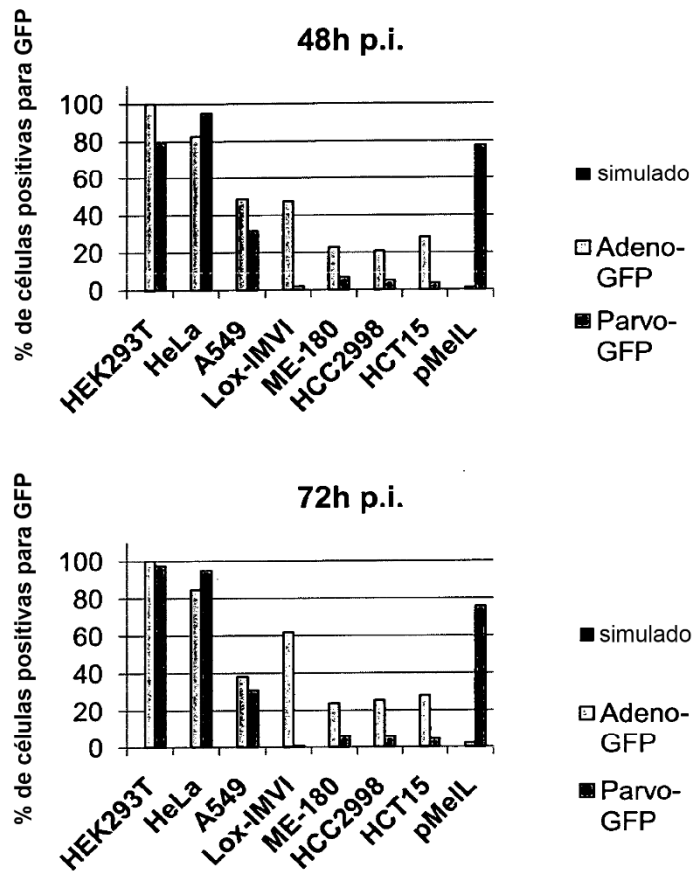


Figura 14

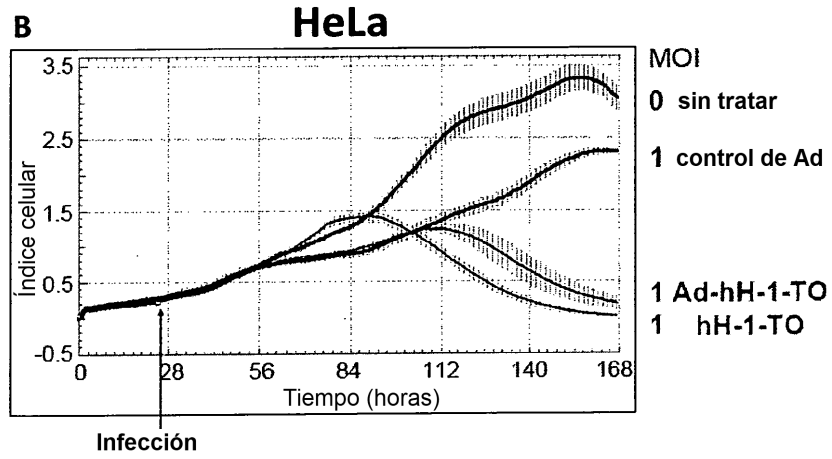
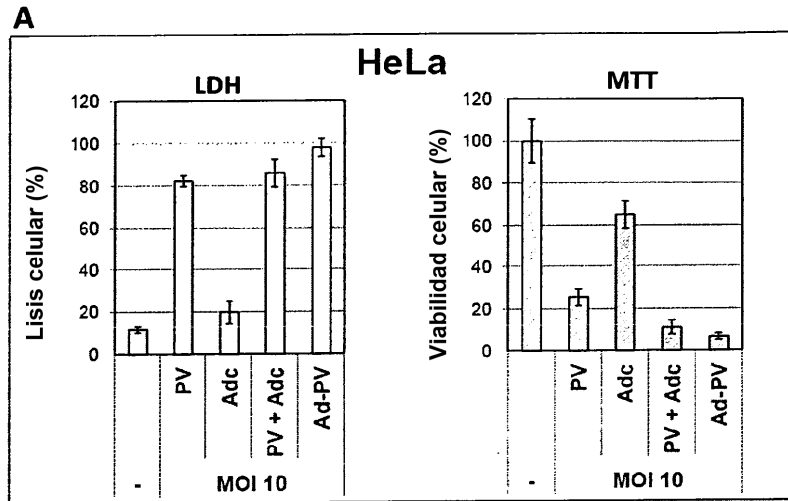


Figura 14

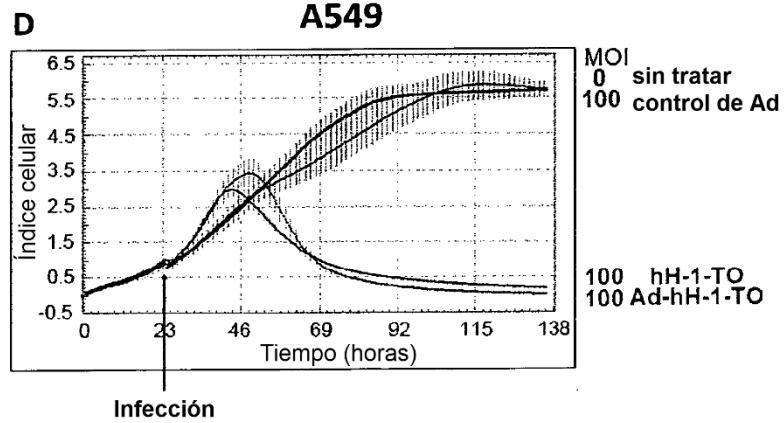
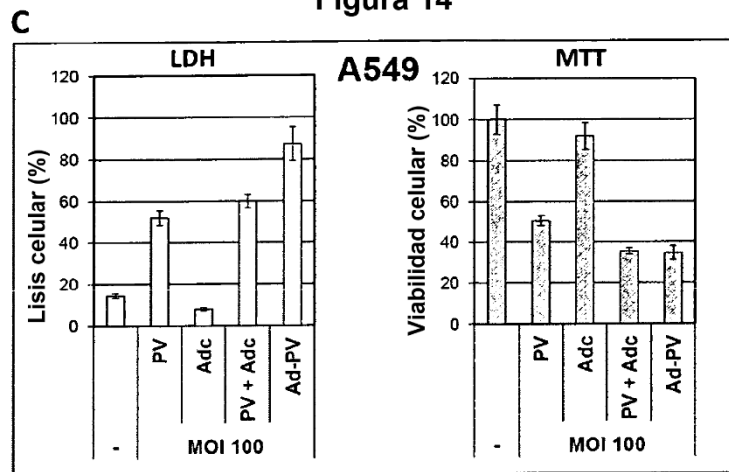


Figura 14

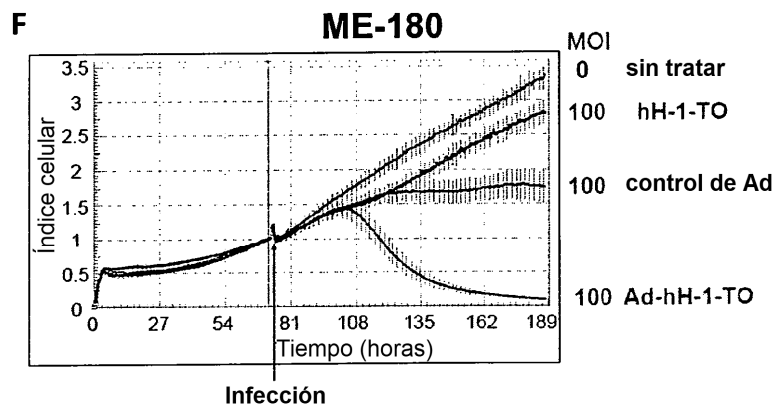
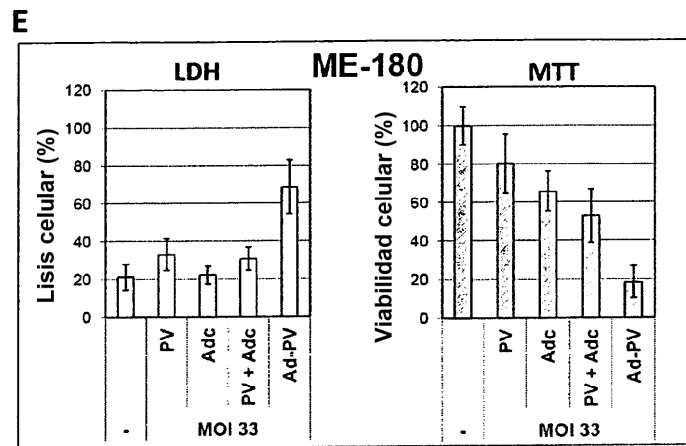


Figura 14

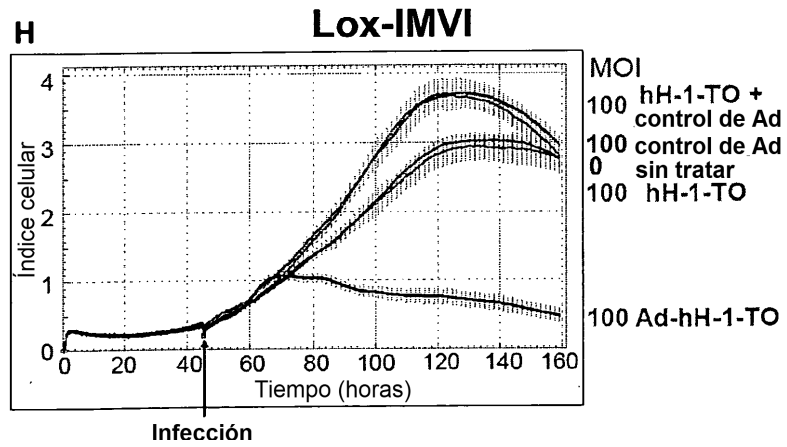
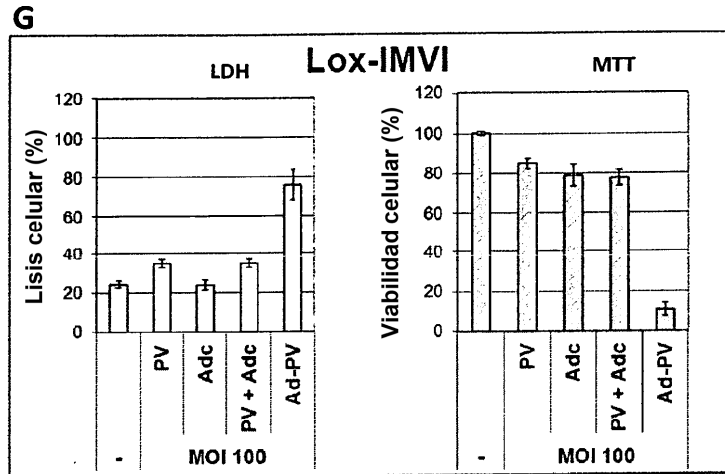


Figura 14

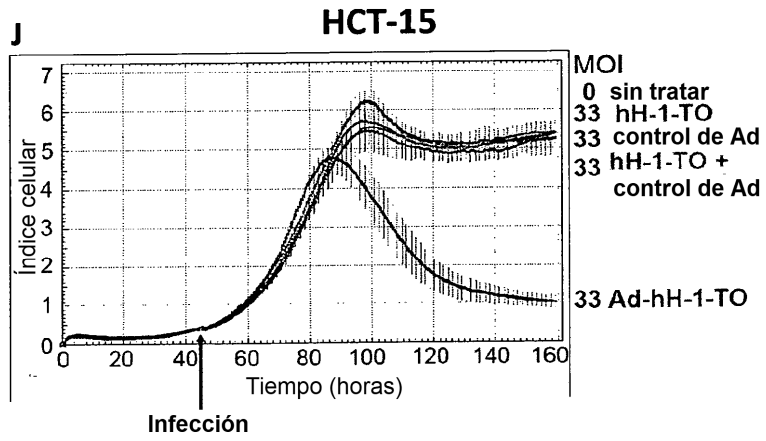
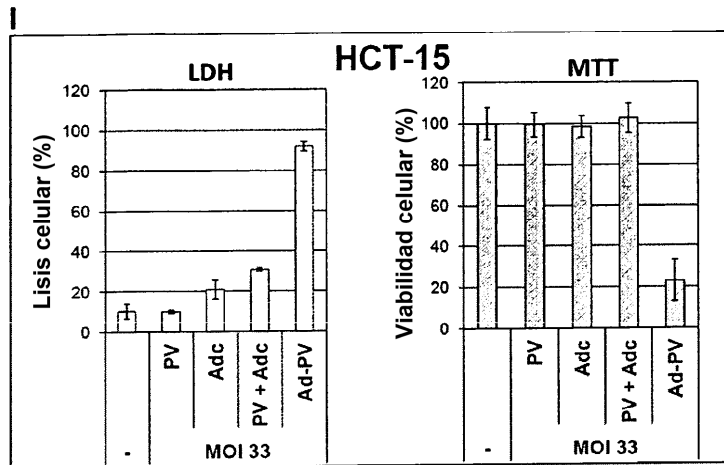


Figura 14

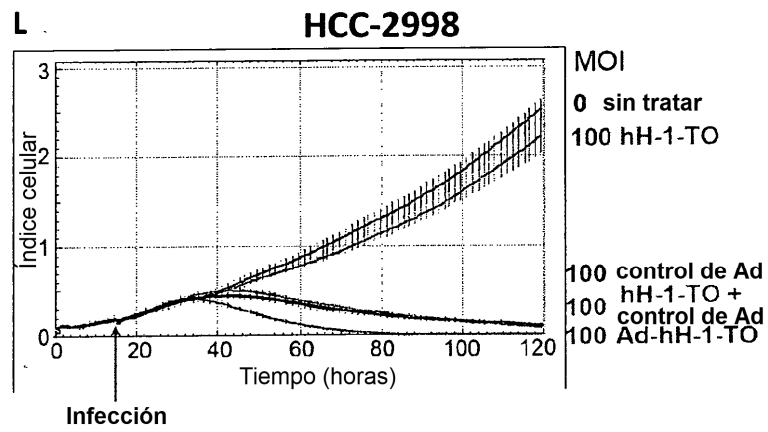
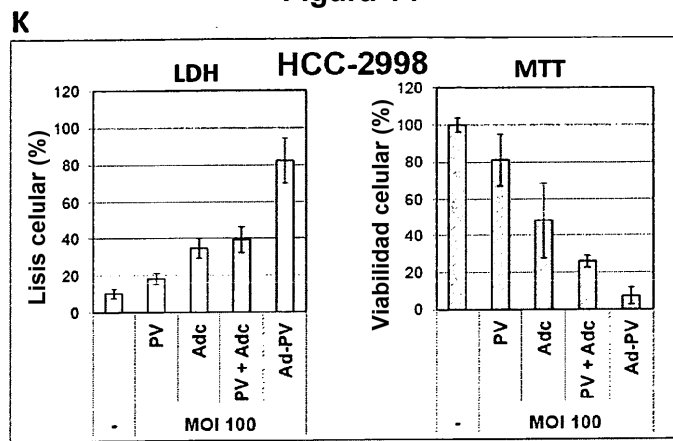
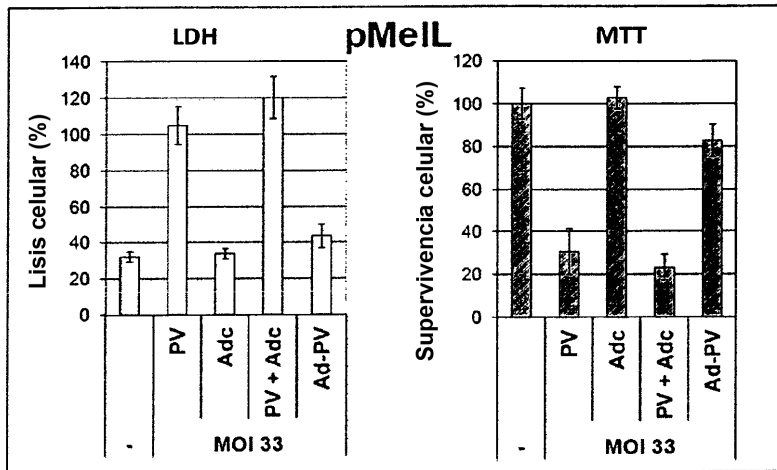


Figura 14

M



N

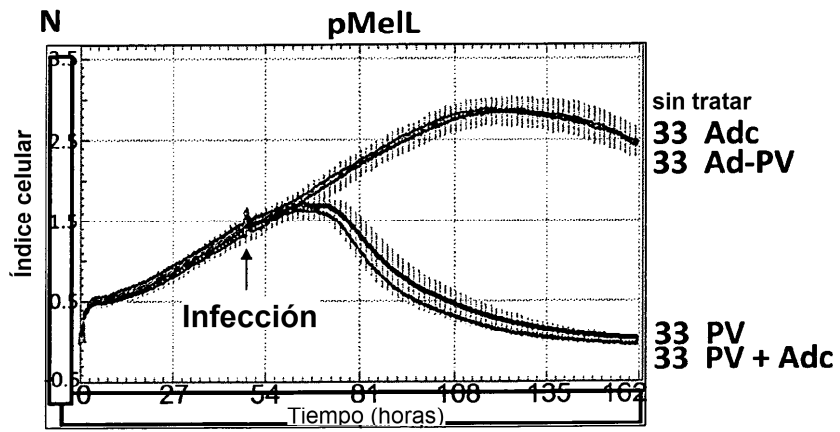
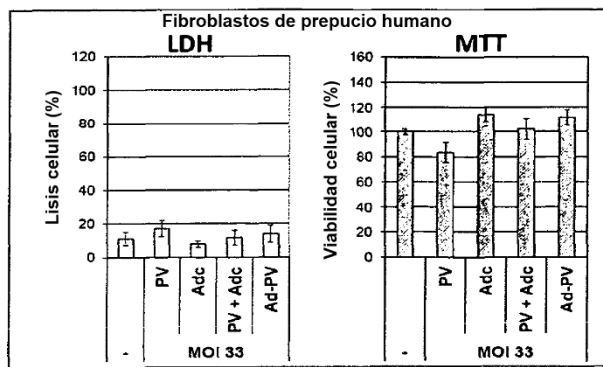


Figura 15

A



B

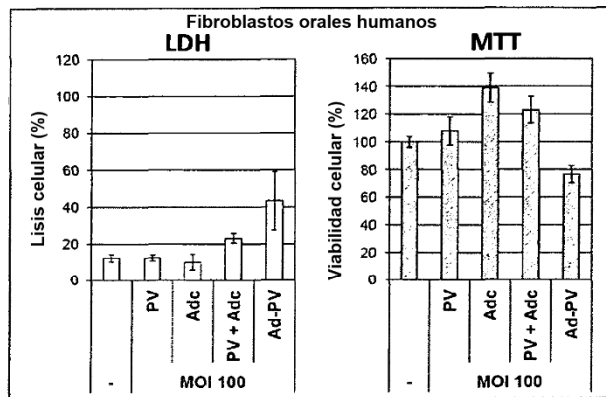


Figura 15

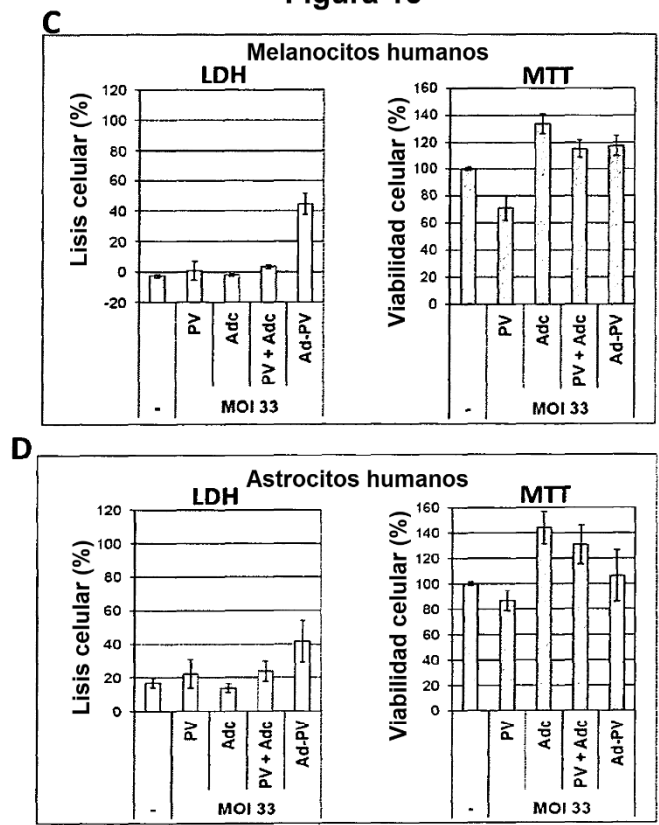
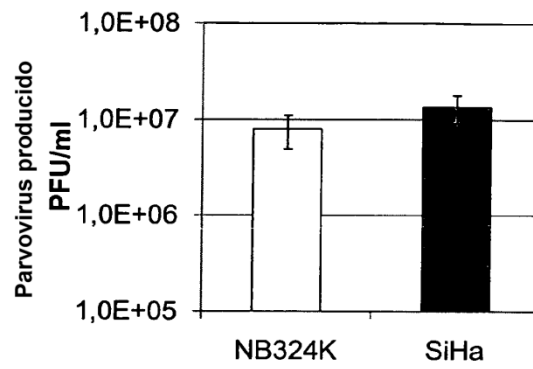


Figura 16

A



B

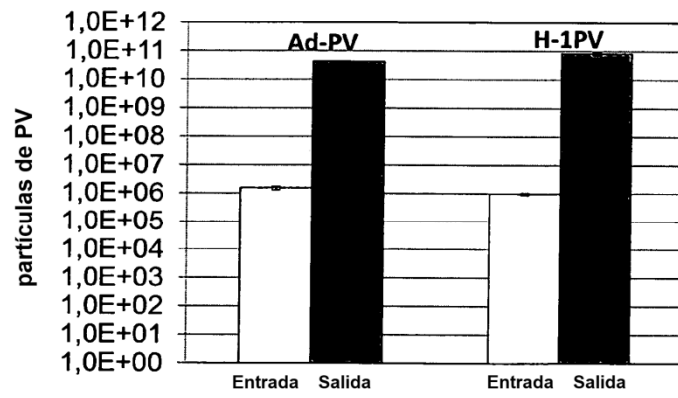
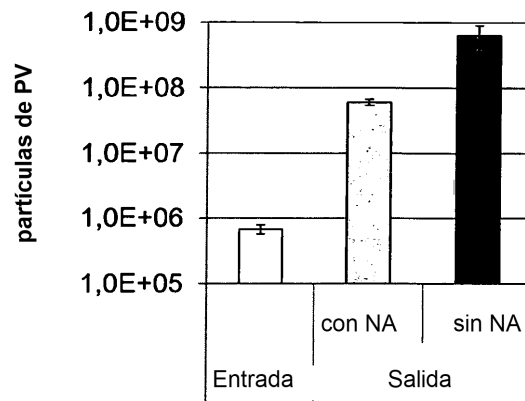


Figura 16

C



D

