

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 389**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2015.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2012 PCT/EP2012/053728**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.09.2012 WO12117116**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2012 E 12706618 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2680867**

54 Título: **Terapia antitumoral mejorada mediante virus oncolíticos dirigidos a células madre tumorales**

30 Prioridad:

03.03.2011 EP 11156842

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

03.12.2018

73 Titular/es:

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND,
LETZTVERTRETEN DURCH DEN PRÄSIDENTEN
DES PAUL-EHRLICH-INSTITUTS PROF. DR.
KLAUS CICHUTEK (100.0%)
Paul-Ehrlich-Strasse 51-59
63225 Langen, DE**

72 Inventor/es:

**BUCHHOLZ, CHRISTIAN;
BACH, PATRICIA y
ABEL, TOBIAS**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 692 389 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

Terapia antitumoral mejorada mediante virus oncolíticos dirigidos a células madre tumorales

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a virus oncolíticos recombinantes que se dirigen a células madre tumorales y a los diversos usos de estos virus recombinantes.

10 **Antecedentes de la invención**

Se piensa que los tumores comprenden una población celular tumoral heterogénea que difiere en el grado de diferenciación de las células. Se constituye una pequeña fracción de la población de células tumorales de un tumor determinado denominada células madre tumorales. Se mostró que dichas células madre tumorales tenían una capacidad más pronunciada para propagarse y/o generar nuevos tumores que la mayoría de las otras células tumorales diferenciadas de un tumor determinado. Dichas células madre tumorales pueden identificarse por sus marcadores de superficie, por ejemplo, CD133.

La glucoproteína CD133 se expresa principalmente en células indiferenciadas tales como células madre y células precursoras. La expresión de CD133 se ha mostrado en diversas células madre tales como células madre hematopoyéticas, células madre endoteliales y células madre neuronales y en diversos tumores.

La fracción de células tumorales positivas a CD133 dentro de un tumor determinado es muy baja, sin embargo estas células son la fuente principal de nuevos tumores, resistentes a quimioterapia y representan un alto potencial regenerativo.

Por lo tanto, muchos tipos de cáncer son aún no curables y existe una necesidad de nuevas terapias.

Publicaciones previas han propuesto al virus del sarampión como una terapia para el cáncer. El documento WO 03/093431 desvela un virus del sarampión que está modificado por ingeniería genética para anular la entrada dependiente de SLAM y para dirigirse a células positivas a CD38. Asimismo, Peng *et al.* desvelan un virus del sarampión que muestra unión reducida a sus receptores naturales y especificidad por CD38.

35 **Sumario de la invención**

El alcance de la invención se define en las reivindicaciones que se adjuntan. La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que los virus oncolíticos recombinantes que comprenden un dominio de unión específico para un marcador celular para una célula madre tumoral puede utilizarse para dirigirse/atacar específicamente células madre tumorales comprendidas en un tumor, inhibiendo por tanto el crecimiento y/o la metástasis posterior del tumor. Incluso más sorprendentemente, se ha descubierto que dichos virus oncolíticos modificados recombinantes exhiben un potencial oncolítico significativamente aumentado en comparación con sus homólogos originales no modificados.

Por tanto, la presente invención proporciona un tratamiento mejorado de diversos tipos de cáncer, e incluso es posible el tratamiento de dichos tipos que aún no se han considerado curables.

La invención se refiere a un virus oncolítico que comprende un dominio de unión recombinante específico de CD133+ que es un marcador de célula madre tumoral.

La expresión **virus oncolítico** significa que comprende cualquier virus que infecte/entre y produzca la lisis de las células cancerosas. El virus oncolítico ideal elimina de un modo eficaz una fracción clínicamente relevante de las células de cáncer de un paciente mediante citólisis directa con una destrucción mínima de tejido no neoplásico. La entrada dirigida de células tumorales y la especificidad de replicación son deseables. Asimismo, los virus deben ser inocuos y apatógenos cuando se aplican en pacientes. Los virus oncolíticos procedentes de muchos tipos de virus diferentes han sido descritos por Liu *et al.* (Liu *et al.*, Nature Clinical Practice Oncology 4: (2) 101-117, 2007). Entre estos virus con envoltura, tales como el virus del herpes simple (HSV), el virus de la variolovacuna (VV) y los paramixovirus, tales como el virus del sarampión (MeV, *measles virus*), el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) o el virus de la estomatitis vesicular (VSV) similar a rabdovirus, son los más destacados. Además de la aplicación de virus de tipo silvestre no modificados, la modificación por ingeniería genética puede mejorar adicionalmente la seguridad y eficacia de los virus oncolíticos. La modificación por ingeniería genética de las proteínas con envoltura puede restringir la infección por virus en las células tumorales y la inserción de genes suicida puede potenciar los efectos terapéuticos (Nakamura *et al.*, Expert Opin. Bio. Ther. 4: (10): 1685-1692, 2004); Liu *et al.*, Nature Clinical Practice Oncology 4: (2) 101-117, 2007).

El virus oncolítico de la invención es un virus con envoltura procedente de la familia *Paramyxoviridae*, del género *Morbillivirus*, más preferentemente, es un virus del sarampión (MeV) o una cepa vacunal del MeV, tal como la cepa Edmonston (MeV_{Edm}). El MeV utiliza dos glucoproteínas con envoltura (la proteína de fusión (F) y la proteína de hemaglutinina (H)) para aumentar la entrada en la célula diana. La proteína F es una proteína transmembrana de tipo I, mientras que la proteína H es un dominio transmembrana de tipo II, es decir, su extremo amino está expuesto directamente a la región citoplasmática. Por tanto, ambas proteínas comprenden una región transmembrana y una

- región citoplasmática. Una función conocida de la proteína F es actuar como mediadora en la fusión de membranas víricas con las membranas celulares de la célula hospedadora. Las funciones atribuidas a la proteína H incluyen el reconocimiento del receptor en la membrana diana y el soporte de la proteína F en su función de fusión de membrana. La fusión de la membrana directa y muy eficaz en la membrana de la superficie celular es una propiedad particular del virus del sarampión y de los virus del género *Morbillivirus*, diferenciándose así ellos mismos de muchos otros virus con envoltura que comienzan a endocitizarse y solo se fusionarán después de un descenso del pH tras la endocitosis. Ambas proteínas se organizan en la superficie vírica en una matriz regular de puntas estrechamente compactadas, tetrámeros H y trímeros F (Russell *et al.*, *Virology* 199: 160-168, 1994).
- 5
- 10 La cepa Edmonston del MeV (MeV_{Edm}) utiliza una sola proteína como su receptor principal, concretamente, la proteína conocida por ser el regulador del factor de activación del complemento, CD46 (Gerlier *et al.*, *Trends Microbiol.* 3: 338-345, 1995). CD46 se expresa en todas las células humanas nucleadas. Sin embargo, la mayoría de los aislados clínicos del virus del sarampión no pueden utilizar de un modo eficaz CD46 como receptor. La SLAM (del inglés *signaling lymphocytes activation molecule*, molécula de activación de linfocitos de señalización; también conocida como CDw150) humana, es una glucoproteína de membrana recientemente descubierta que se expresa en algunos linfocitos T y B, y también se descubrió que actuaba como un receptor celular de MeV, incluyendo la cepa Edmonston (Tatsuo *et al.*, *Nature* 406 (6798): 893-7, 2000). Las funciones biológicas exactas y las interacciones de las proteínas H y F de MeV permanecen aún sin aclarar.
- 15
- 20 La expresión **dominio de unión recombinante** significa que comprende cualquier dominio del virus que permite que el virus aumente la entrada en la célula diana y que no está presente en el virus de origen natural. El dominio de unión de la invención comprende un fragmento variable monocatenario (scFv, *single-chain Fv*). El dominio de unión comprende un scFv y es específico para el marcador CD133 de células madre tumorales.
- 25
- 30 La expresión **específico para un marcador de célula madre tumoral** debe entenderse como la capacidad del dominio de unión recombinante para interactuar con el marcador de células madre tumorales. Preferentemente, esta interacción es una unión del dominio de unión con dicho marcador. Más preferentemente, esta unión se realiza por interacciones entre proteínas. Incluso más preferentemente, el dominio de unión actúa como un ligando, aunque el marcador de células madre tumorales actúa como un receptor. El concepto de interacciones ligando y receptor es muy conocido por el experto en la técnica. La expresión **marcador celular** como se utiliza en la presente invención, se refiere a una molécula presente en la superficie de una célula. Dichas moléculas pueden ser, entre otras, péptidos o proteínas que pueden comprender cadenas de azúcar o lípidos, antígenos, grupos de diferenciación (CD, *cluster of differentiation*), anticuerpos o receptores. Por tanto, dado que no todas las poblaciones de células expresan los mismos marcadores celulares, un marcador celular puede utilizarse para identificar, seleccionar o aislar una población determinada de células que expresan un marcador celular específico. Como ejemplo, CD4 es un marcador celular expresado por linfocitos T auxiliares, linfocitos T reguladores y células dendríticas. Por tanto, los linfocitos T auxiliares, los linfocitos T reguladores y las células dendríticas pueden identificarse, seleccionarse o de otra manera aislarse, entre otros, mediante una clasificación celular FACS, por medio del marcador celular CD4. Del mismo modo, CD133 se expresa en la superficie de las células madre tumorales. El marcador celular de la presente invención es un marcador de células madre tumorales, es decir específico para células madre tumorales. El marcador de células madre tumorales es CD133.
- 35
- 40
- 45 El virus oncolítico de la invención tiene una especificidad disminuida por su receptor o receptores originales utilizados para la entrada en la célula. En esta realización, el virus oncolítico de la presente invención se modifica además preferentemente ya que el ligando o ligandos que se utilizan naturalmente por el virus para aumentar la entrada a su célula hospedadora tienen una especificidad disminuida por su receptor o receptores. Preferentemente, el ligando o los ligandos que se utilizan de manera natural por el virus para aumentar la entrada en su célula hospedadora están modificados para no tener especificidad o sustancialmente ninguna especificidad por su receptor o receptores. Dicha modificación se realiza preferentemente mediante una mutación de los ligandos originales, más preferentemente mediante al menos una mutación puntual dentro del ligando o ligandos. El experto en la técnica será capaz de introducir fácilmente mutaciones tales como, por ejemplo, adiciones y deleciones, en una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos determinada. Dichas tecnologías conocidas se desvelan, por ejemplo, en Sambrook *et al.* (1989). En una realización especialmente preferida en la que el virus oncolítico es MeV, se introduce al menos al menos una mutación puntual en la proteína H utilizada para la entrada en la célula.
- 50
- 55
- 60 La mutación de la proteína H del MeV, generalmente elimina interacciones productivas de la proteína Hmut resultante con CD46 y SLAM, respectivamente. En una realización, esta mutación se introduce por las mutaciones puntuales Y481A y R533A de la proteína H del MeV. En otra realización, la proteína Hmut también incluye las mutaciones S548L y/o F549S, que conducen a una eliminación más completa de la infectividad residual mediante CD46. Además, la mutación de los restos V451 e Y529 elimina la interacción productiva con CD46 y SLAM. Anteriormente se han descrito mutaciones alternativas para eliminar/impedir la interacción de la proteína H con CD46. Todas estas mutaciones, que se introducen en las proteínas H para eliminar el uso de receptores naturales, se localizan en el ectodominio de la proteína H del MeV. Para impedir la interacción de la proteína H con SLAM, uno o más de los siguientes restos puede reemplazarse con otro aminoácido, en particular, alanina: 1194, D530, Y553, T531, P554, F552, D505, D507 (véase: Wongpunsawad *et al.* (2004) *J Virol* 78 (1) págs. 302-313); Masse *et al.* (2004) *J Virol* 78 (17) págs. 9051-9063).
- 65

El dominio de unión recombinante del virus oncolítico es específico para CD133 (glioma, adenocarcinoma pancreático etc.). El marcador celular CD133 es una glucoproteína de cinco dominios transmembrana (5-TM) que inicialmente se mostró que se expresaba en poblaciones celulares primitivas, incluyendo células progenitoras y madre hematopoyéticas CD34⁺ y otras células primitivas tales como las de la retina y retinoblastoma y desarrollo del epitelio. El antígeno CD133 pertenece a una familia molecular recientemente caracterizada de proteínas 5-TM. Ningún ligando natural se ha demostrado aún para la molécula CD133 y su función exacta en el tejido hematopoyético se desconoce.

El dominio de unión recombinante comprende un scFv. Preferentemente, dicho scFv es específico para CD133. En la realización más preferida el dominio de unión comprende un scFv procedente de la línea celular de hibridoma depositada en la ATCC como HB-12346. La generación de un scFv a partir de una línea celular de hibridoma es una técnica conocida por el experto en la materia y se ilustra en los ejemplos que se adjuntan (véase el Ejemplo 1).

En una realización adicional de la presente invención, el virus oncolítico comprende adicionalmente al menos un gen suicida. Un gen suicida es un concepto conocido por el experto en la materia. Generalmente, después de su expresión, causará la muerte de una célula, preferentemente por apoptosis. En una realización adicional se utiliza un gen suicida para hacer que una célula tumoral sea más sensible a quimioterapia. Dicha estrategia implica preferentemente un gen suicida que está codificando un metabolito tóxico y/o una enzima no encontrada en el hospedador de la célula tumoral que puede convertir una sustancia inocua (profármaco) en un metabolito tóxico. Un transgen suicida preferible codifica la SuperCD, una proteína de fusión compuesta por citosina desaminasa y uracil-ribosil-transferasa de levadura. Cuando se expresa a partir de un virus oncolítico en células tumorales, convertirá el profármaco no tóxico 5-fluorocitosina, en el compuesto altamente tóxico 5-fluorouracilo (Graepler *et al.*, World J. Gastroenterol. 11: 6910-6919, 2005).

En otro aspecto, la presente invención se refiere al virus oncolítico de la invención como un medicamento. Preferentemente, el virus oncolítico según la invención está comprendido en una composición farmacéutica.

Las composiciones farmacéuticas basadas en los virus oncolíticos de la presente invención, pueden formularse de cualquier manera convencional utilizando uno o más transportadores o excipientes fisiológicamente aceptables. Por tanto, los virus oncolíticos de la presente invención pueden formularse para su administración, por ejemplo, por inyección, inhalación o insulación (bien a través de la boca o de la nariz) o por administración oral, bucal, parenteral o rectal.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para diversos modos de administración, incluyendo la administración sistémica, tópica o localizada. Pueden encontrarse técnicas y formulaciones, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa. Para la administración sistémica, se prefiere la inyección, incluyendo la intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para los fines de inyección, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse en soluciones líquidas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank o solución de Ringer. Además, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes de su uso. Las formas liofilizadas de las composiciones farmacéuticas son también adecuadas.

Para la administración por vía oral, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden tener forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas, preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como, agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrógeno fosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato sódico). Los comprimidos también pueden cubrirse por métodos bien conocidos en la técnica. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tener forma, por ejemplo, de soluciones, jarabes o suspensiones o pueden presentarse como un producto deshidratado para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleaginosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según sea apropiado.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para administración parenteral por inyección, por ejemplo, por inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante opcionalmente añadido. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse adicionalmente como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos y pueden contener otros agentes incluyendo agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Adicionalmente, las composiciones farmacéuticas también pueden formularse como una preparación de tipo depósito. Estas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por tanto, por ejemplo, los compuestos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble. Otros sistemas de suministro adecuados incluyen microesferas, que ofrecen la posibilidad de un suministro de fármacos local, no invasivo, durante un período de tiempo prolongado. Esta tecnología puede incluir microesferas que tienen un tamaño precapilar, que pueden inyectarse mediante un catéter coronario en cualquier parte seleccionada de un órgano, sin causar inflamación o isquemia. El agente terapéutico administrado se libera después lentamente de las microesferas y es absorbido por las células circundantes presentes en el tejido seleccionado.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se utilizan penetrantes apropiados para filtrarse en la barrera. Dichos penetrantes se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Además, para facilitar la filtración pueden utilizarse detergentes. La administración transmucosa puede producirse utilizando pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración tópica, las partículas vectoriales de la invención pueden formularse en pomadas, bálsamos, geles o cremas, como se sabe generalmente en la técnica. También puede utilizarse por vía local una solución de lavado para tratar una lesión o inflamación para acelerar la cicatrización.

En una realización adicional, la invención se refiere al virus oncolítico de la invención para el tratamiento o la prevención de cáncer, incluyendo, pero sin limitación, neoplasias, tumores, metástasis o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por un crecimiento celular incontrolado, y particularmente, formas de los mismos resistentes a fármacos múltiples. El cáncer puede ser un tumor multifocal. Como ejemplos de tipos de cánceres y trastornos proliferativos a tratar con los agentes terapéuticos de la invención se incluyen, pero sin limitación, leucemia (por ejemplo, mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia, leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica), linfoma (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, angiosarcoma, endoteliosarcoma, tumor de Ewing, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de células renales, hepatoma, tumor de Wilms, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, tumor testicular, carcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, oligodendroglioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, displasia e hiperplasia. En una realización particular, el compuesto terapéutico de la invención se administra a pacientes que tienen cáncer de próstata (por ejemplo, prostatitis, hipertrofia prostática benigna, hiperplasia prostática benigna (BPH), paraganglioma prostático, adenocarcinoma de próstata, neoplasia intraepitelial prostática, fístulas prostatorrectales y lesiones estromales prostáticas atípicas). En una realización especialmente preferida, los medicamentos de la presente invención se utilizan para el tratamiento de cáncer, glioma, carcinoma de hígado y/o carcinoma de colon. El tratamiento y/o la prevención del cáncer incluye, pero sin limitación, el alivio de los síntomas asociados a cáncer, la inhibición del avance del cáncer, la promoción de la regresión del cáncer y la promoción de la respuesta inmunitaria.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse solas o en combinación con otros tipos de estrategias para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia, inmunoterapia y agentes antitumorales). Como ejemplos de agentes antitumorales se incluyen, pero sin limitación, cisplatino, ifosfamida, paclitaxel, taxanos, inhibidores de topoisomerasa I (por ejemplo, CPT-11, topotecán, 9-AC y GG-211), gemcitabina, vinorelbina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, vinorelbina, temodal y taxo.

En las reivindicaciones y en la descripción detallada de la invención se describen realizaciones adicionales de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Breve descripción de las figuras

- Fig. 1:** ofrece una visión global sobre la clonación de MV-CD133, una célula madre tumoral específica y un virus oncolítico del sarampión recombinante según la invención.
- Fig. 2:** muestra los resultados de experimentos FACS e inmunotinción para verificar la selectividad de las células madre tumorales de MV-CD133.
- Fig. 3:** muestra la selectividad de MV-CD133 por células CD133⁺ en cultivos de células CD133⁺ y CD133⁻ mezcladas.
- Fig. 4:** muestra los resultados de un análisis FACS de la expresión de CD133 y GFP y de un análisis de la viabilidad de células infectadas con MV-CD133.
- Fig. 5:** muestra el potencial oncolítico de MV-CD133 en ratones inmunodeficientes (NOD/SCID).
- Fig. 6:** muestra la eliminación eficaz de tumores multifocales mediante MV-CD133
- Figs. 7/8:** muestra la infección de esferas tumorales de Glioma mediante MV-CD133.
- Fig. 9:** muestra la eficacia *in vivo* de MV-CD133 en un modelo de glioma con esferas tumorales infectadas con

MV-CD133.

Ejemplos

5 La proteína H de envoltura del virus del sarampión se modificó para utilizar CD133 humano como un receptor para la entrada en la célula y para no unirse más a SLAM ni a CD46. El virus recombinante resultante es un virus oncolítico que se dirige a células madre tumorales.

10 **Ejemplo 1: Aislamiento y clonación de scFv específico de CD133 y producción del virus del sarampión recombinante**

15 Para la generación de MV-CD133, ARN preparado a partir del hibridoma HB-12346 productor del anticuerpo AC141.7 generado como se describe en Yin *et al.*, Blood, 90: 5002-5012.1997 se retrotranscribió para amplificar las regiones codificantes de las cadenas pesada y ligera variables de IgG. Para la PCR con transcripción inversa se utilizó una mezcla de cebadores degenerados (Heavy Primer Mix, n.º 27-1586-01; Light Primer Mix, n.º 27-1583-01; GE Healthcare). Los fragmentos resultantes de la PCR se subclonaron en el vector de clonación pJET1.2/Blunt (Fermentas) y después se amplificaron para insertar secuencias codificantes para los sitios de restricción SfiI y NotI y el enlazador (G₄S)₃ utilizando las secuencias cebadoras de CD133-VH y CD133-VL indicadas en la Tabla 1. Los fragmentos resultantes de la PCR que codifican las cadenas pesada o ligera se digirieron con Taul y SfiI, o con Taul y NotI, respectivamente y se insertaron mediante ligamiento triple en una estructura pCG-Hmut digerida con SfiI y NotI dando como resultado pCG-Hmut-CD133scFv que ahora codifica la proteína Hmut citoplasmática con truncamiento en la cola ligada al scFv específico de CD133 (Funke *et al.*, Mol. Ther. 16: 1427-1436, 2008; Anliker *et al.*, Nat. Methods 7: 929-935, 2010)

25 A continuación, el fragmento de pCG-Hmut-CD133scFv, digerido con PacI/Spel, se insertó en los sitios correspondientes de pMeGFPNV (MVeGFP), que codifica un clon infeccioso de longitud completa marcado con GFP del virus del sarampión de la estirpe Edmonston (Duprex *et al.*, J. Virol. 73: 9568-9575, 1999) (Fig. 1A). Para el rescate de MV-CD133, se utilizó la etiqueta de hexahistidina (His6) y el sistema de redireccionamiento como se ha descrito anteriormente (Nakamura *et al.*, Nat. Biotechnol. 23: 209-214, 2005) (Fig. 1A). Se generaron reservas de virus después de infección de células Vero-anti-His (anti-His) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,03, y los virus asociados a células se recogieron mediante ciclos de congelación y descongelación múltiples.

Tabla 1: secuencias cebadoras de CD133-VH y CD133-VL

Cebador	Secuencia
CD133-VH directo1	5'-GGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCCAGCTGCAGGAGTCTGG-3'
CD133-VH inverso1	5'-GCCGCCACCTCCAGAGCCACCACCTCCCGAGGAGACGGTGACCGTGGTC-3'
CD133-VL directo1	5'-GCGGCAGTGGTGGTGGAGGATCCGACATTGTCTGACCCAGTCTCCA-3'
CD133-VL inverso1	5'-TGGCGCCGCCCGTTTATTTCAGCTTGGTCCC-3'

35 Para analizar la capacidad de propagación de MV-CD133 redirigido en las células tumorales a lo largo del tiempo, se realizó un ensayo de propagación de virus en células HuH7. Las células HuH7 se infectaron con MV-Nse no dirigido o con los MV redirigidos a CD133 a una MOI de 0,005 y se cultivaron a 37 °C para la propagación del virus. El número de células positivas a GFP se determinó a las 24, 48, 72, 96 y 120 h después de la infección. MV-CD133
40 mostró la misma cinética de propagación que la de la cepa MV-Nse precursora (Fig. 1B), demostrando que el virus redirigido no tiene ninguna ventaja en su propagación a través de células HuH7 en comparación con la cepa vacunal precursora.

45 **Ejemplo 2: Verificación de la selectividad de células madre tumorales**

Las células HuH7, Vero o HT1080 se analizaron para determinar la expresión de CD133 mediante citometría de flujo aplicando el anticuerpo anti CD133/1-PE humano (clon AC133, Miltenyi). Se utilizaron controles de isotipo apropiados según las instrucciones del fabricante.

50 El 90 % de las células HuH7 fueron positivas a CD133 mientras que las células HT1080 y las células Vero fueron negativas a CD133 (Fig. 2A).

La expresión de CD133 de las células HuH7 se confirmó por tinción con inmunofluorescencia utilizando, como anticuerpo primario, un anticuerpo de ratón anti CD133 humano, y utilizando, como anticuerpo secundario, un anticuerpo de burro anti IgG de ratón Cy3 (Dianova) (Fig. 2B).

60 Las células HuH7, Vero y HT1080 (1x10⁴ células/placa de 24 pocillos), se incubaron en medio Opti-MEM con MV-CD133 o MV-Nse a una MOI de 1 a 37 °C. Después de 72 horas de infección, las células se observaron con microscopía fluorescente. Aunque MV-Nse infectó a todos los tipos de células, MV-CD133 infectó solo a las células HuH7 positivas a CD133. Las células Vero y HT1080, que era negativas a CD133, no se infectaron con MV-CD133

(Fig. 2C). Por tanto, MV-CD133 es muy selectivo para las células madre tumorales positivas a CD133.

Ejemplo 3: Infección específica de células CD133⁺ por MV-CD133 en cultivos de células CD133⁺ y CD133⁻ mezcladas

La especificidad dirigida de MV-CD133 se determinó adicionalmente en un experimento de cocultivo de células CD133⁺ (células HT1080 modificadas genéticamente que expresan CD133) y células CD133⁻ (células HT1080 de tipo silvestre). Para distinguir entre ambos tipos de células, las células CD133⁻ se modificaron genéticamente para expresar la proteína fluorescente roja (RFP, *red fluorescent protein*). Por tanto, si estas células (HT1080) comienzan a infectarse con un virus del sarampión que codifica la GFP se volverán amarillas mientras que las células CD133⁺ (HT1080-CD133) se volverán verdes. Ambos tipos de células se mezclaron en una proporción de 1:1 y se infectaron con MV-CD133 o MV-Nse a una MOI de 0,5, respectivamente. Mientras que las células HT1080-CD133 solo se infectaron con MV-CD133 (Fig. 3A, panel de la derecha), los dos tipos de células se infectaron con MV-Nse, dando como resultado señales de color amarillo (Fig. 3A panel central). En la Figura 3A de las imágenes microscópicas, ambos canales de color se muestran superpuestos, en la Fig. 3B-C, los canales de GFP (C) y RFP (B) se muestran por separado, permitiendo la inspección de la Figura sin color. Las flechas señalan células CD133⁻. Las líneas discontinuas indican áreas de sincitios causadas por infección con MV-CD133, que solo aparecen en el canal de GFP proporcionando de este modo la especificidad de MV-CD133 (Fig. 3C). En la Fig. 3D se muestran imágenes de campo brillante. Esto muestra que MV-CD133 es capaz de distinguir entre células CD133⁺ y CD133⁻ incluso cuando están en contacto cercano como en el tejido tumoral.

Ejemplo 4: Viabilidad de células infectadas con MV-CD133

Células HuH7 infectadas con MV-CD133 y MV-Nse se analizaron con respecto a la expresión de CD133 y GFP mediante análisis FACS. Para ello, las células HuH7 se infectaron con una MOI de 1 y dos días después las células se digirieron con tripsina y se tiñeron con respecto a la expresión de CD133 con un anticuerpo humano anti CD133/1-PE y se analizaron las células positivas a GFP. Con MV-CD133 aproximadamente el 80 % de las células se habían vuelto positivas a GFP, con MV-Nse aproximadamente el 60 % de las células. La infección con MV-CD133 dio como resultado una ligera regulación negativa de la expresión de CD133 en la superficie celular (Fig. 4A).

Para determinar la viabilidad de las células infectadas, se utilizó el ensayo que emplea bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (Kit de Proliferación Celular I (MTT); Roche, Indianapolis, IN). Las células crecieron en placas de microtitulación de 96 pocillos (1x10⁴ células/pocillo) en el medio de cultivo recomendado.

Las infecciones fueron a una MOI de 0 (simulada), 0,01, 0,1 o 1. Noventa y seis (96) horas después de la infección la viabilidad celular se midió a través de la absorbancia de colorante, determinada por una medición de densidad óptica a 595 nm en un lector automático de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. La viabilidad de las células se calculó como la media de los valores de densidad óptica cuadruplicados, dividido entre la media de los valores de densidad óptica cuadruplicados de células cultivadas del mismo modo sin virus (que sirvió como células de control) y se expresó como un porcentaje de células de control.

Comparadas con las células HuH7 tratadas de manera simulada, las células HuH7 infectadas con MV-CD133 mostraron una viabilidad celular solo del 10 % después de infección a una MOI de 1. En el caso de las células HuH7 infectadas con MV-Nse, un 20 % de las células fueron viables. También a MOI inferiores de 0,1 y 0,01, las células HuH7 se destruyeron con MV-CD133 de un modo más eficaz que con MV-Nse (Fig. 4B).

Ejemplo 5: Potencial oncolítico de MV-CD133 en un modelo de ratones NOD/SCID.

Para determinar el potencial oncolítico de MV-CD133, por vía subcutánea, se implantaron células HuH7 (5 x10⁶ células en 100 µl) en el costado derecho de ratonas diabéticas no obesas/con inmunodeficiencia grave combinada (NOD/SCID) de 6 semanas de vida (Jackson Labs).

Después de 10 a 14 días aproximadamente, cuando los tumores midieron 0,5-0,6 cm de diámetro, las ratonas recibieron cuatro inyecciones intratumorales (una al día) de TCID50 (dosis infectiva media de cultivo tisular) 1x10⁶ en medio Opti-MEM 100 µl de MV-Nse o MV-CD133. Los animales de control (grupos con terapia simulada) recibieron inyecciones con los mismos volúmenes de Opti-MEM sin virus. Después, se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral a lo largo del tiempo.

Las ratonas tratadas con MV-CD133 mostraron una reducción sustancial en el crecimiento tumoral y un período de supervivencia significativamente prolongado en comparación con los animales tratados con MV-Nse o con ratonas de control (Fig. 5).

Ejemplo 6: Eliminación eficaz de tumores multifocales mediante MV-CD133

Para evaluar el potencial antitumoral de MV-CD133 en un modelo tumoral multifocal con nódulos que crecen en sitios dispersos, se inyectaron células HuH7 modificadas genéticamente para expresar luciferasa (células HuH7-luc) por vía intraperitoneal en ratones lampiños atímicos (n= 4-5) y el crecimiento tumoral se controló los días 5, 19 y 47 mediante obtención de imágenes *in vivo* de la actividad de luciferasa utilizando el sistema de obtención de imágenes Spectrum IVIS. Siete días después de la administración de las células, los focos tumorales múltiples eran visibles y los ratones se infectaron con MV-CD133 o MV-Nse por vía intraperitoneal. Los grupos de control recibieron solo medio de cultivo celular. Cada animal recibió en total tres inyecciones de virus, en días alternos, y la formación de tumor se monitorizó tres veces por semana durante un período de varias semanas. La intensidad de señal se cuantificó como la media de todos los recuentos detectados dentro de la región de interés después de restar el fondo. Los ratones de control mostraron proliferación celular tumoral potenciada a lo largo del tiempo, mientras que se observó un crecimiento tumoral reducido en los animales tratados con MV-Nse precursor el día 19 (Fig. 6A). El efecto antitumoral fue incluso más pronunciado en los ratones tratados con MV-CD133. Se descubrió que durante un largo periodo de tiempo estos animales no tenían tumores (Fig. 6A).

En la Fig. 6B se muestran los datos cuantitativos de las intensidades de bioluminiscencia de luciferasa de los tumores infectados con MV-CD133 (círculos), MV-Nse (cuadrados) o controles (triángulos). Las barras de error representan una media de intervalos de confianza del 95 %. Las flechas representan los puntos temporales de la inyección del virus. Los animales tratados con MV-CD133 mostraron regresión de tumores después de 3 semanas del primer tratamiento. Los tumores inyectados con MV-Nse demostraron una ligera reducción tumoral en las primeras semanas después del tratamiento, pero se produjo gradualmente recrecimiento tumoral a partir del día 40 en adelante durante todo el período de tratamiento. A diferencia de esto, los animales tratados con control mostraron un crecimiento progresivo del tumor a lo largo del tiempo hasta que los ratones tuvieron que sacrificarse debido a una pérdida de peso significativa. Por otra parte, los ratones tratados con MV-CD133 mostraron una supervivencia significativamente más prolongada en comparación con los animales de control o tratados con MV-Nse (Fig. 6C). Un ratón del grupo tratado con MV-CD133 murió accidentalmente (se indica con #).

Resumiendo, MV-CD133 fue capaz de reducir sustancialmente la carga tumoral no solo en un modelo subcutáneo sino también en un modelo tumoral multifocal. Lo que es más importante, su actividad oncolítica mejoró significativamente en comparación con la del virus MV-Nse no dirigido que normalmente se aplica en ensayos clínicos.

Ejemplo 7: Infección con MV-CD133 de esferas tumorales de glioma

El MV-CD133 se sometió a ensayo con respecto a la infección de esferas tumorales de glioma de dos pacientes diferentes (644 o 421K) (Fig. 7 y 8). Para ello, se incubaron esferas tumorales (1×10^4 células/placa de 24 pocillos) con virus (MV-CD133 o MV-Nse) a una MOI de 1 en medio Opti-MEM a 37 °C. En el intervalo de 48 a 72 horas después de la infección, se tomaron fotos de las células con un microscopio de fluorescencia.

Ambas líneas de esferas tumorales fueron positivas a CD133 (Fig. 7A y 8A) y rápidamente se infectaron con MV-CD133 y MV-Nse.

En el caso de infección con MV-CD133, se produjo una fuerte formación de sincicios. MV-Nse también pudo infectar esferas tumorales pero a un nivel mucho más reducido (Fig. 7B y 8B). El análisis de células sobre la expresión de GFP mediante microscopía se correlacionó bien con los datos obtenidos mediante el análisis FACS.

Ambas líneas de esferas tumorales mostraron niveles de expresión de GFP altos después de la infección con MV-CD133 y niveles de expresión de GFP bajos después de la infección con MV-Nse (Fig. 7C y 8C).

Ejemplo 8: Actividad oncolítica de MV-CD133 en un modelo ortotópico en esferas tumorales de glioma primario

Para evaluar la actividad oncolítica de MV-CD133 en un entorno cercano a la situación clínica de pacientes con glioma, células tumorales primarias se desarrollaron como esferas tumorales. Después de infección con MV-CD133 o MV-Nse (MOI de 0,5), las células tumorales se implantaron en el hemisferio derecho de ratones NOD/SCID (n = 5) 16 h después de la infección. La supervivencia de los animales tratados se siguió a lo largo del tiempo. Los ratones que recibieron células tumorales tratadas con control murieron al cabo de 30 días después de la implantación, mientras que los animales que habían obtenido células de glioma tratadas con MV-CD133 o MV-Nse, sobrevivieron durante un periodo de tiempo de 70 a 90 días (Fig. 9). Curiosamente, algunos de los ratones inyectados con células tumorales tratadas con MV-Nse, murieron considerablemente antes que los ratones inyectados con células tumorales tratadas con MV-CD133, pero en general esta diferencia en la supervivencia entre ambos grupos no fue significativa. Sin embargo, también en este modelo tumoral, MV-CD133 fue al menos tan eficaz como el virus del sarampión no dirigido.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten durch den Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts, Prof. Dr. Klaus Cichutek BUCHHOLZ, Christian BACH, Patricia ABEL, Tobias

<120> Terapia tumoral mejorada mediante virus oncolíticos dirigidos a células madre tumorales

<130> 141-007P

10 <150> EP11156842.4
<151> 03-03-2011

<160> 4

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 42
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador directo

25 <400> 1
ggcccagccg gccatggccc aggtccagct gcaggagtct gg 42

<210> 2
30 <211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia de ADN artificial

<220>
35 <223> Cebador inverso

<400> 2
gccgccacct ccagagccac cacctcccga ggagacgggtg accgtggtc 49

40 <210> 3
<211> 47
<212> ADN
<213> Secuencia de ADN artificial

45 <220>
<223> Cebador directo

<400> 3
gcccagctgg tggaggagga tcgacattg tctgaccca gtctcca 47

50 <210> 4
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia de ADN artificial

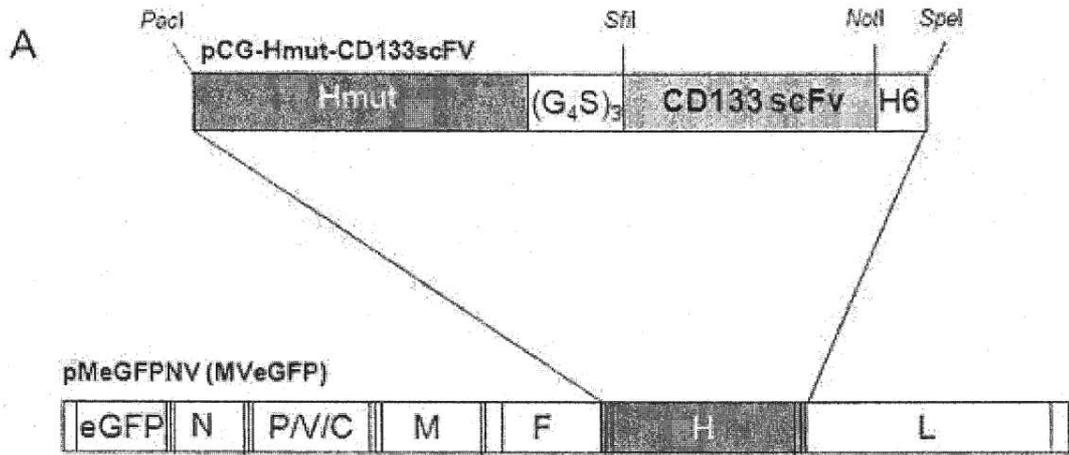
55 <220>
<223> Cebador inverso

<400> 4
60 tgggccgcc cgtttattt ccagcttgg ccc 33

REIVINDICACIONES

1. Un virus oncolítico que comprende un dominio de unión recombinante específico de un marcador de célula madre tumoral,
5 en donde el marcador de célula madre tumoral es CD 133,
en donde el virus tiene una especificidad disminuida por su(s) receptor(es) original(es) utilizado(s) para la entrada en la célula,
en donde el dominio de unión recombinante comprende un fragmento variable monocatenario (scFv), y
10 en donde el virus proviene de la familia *Paramyxoviridae*, del género *Morbillivirus*.
2. El virus oncolítico según la reivindicación 1, en el que el scFv procede de la línea celular de hibridoma ATCC HB-12346.
3. El virus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que adicionalmente comprende un gen suicida.
15
4. El virus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el virus es un virus del sarampión (MeV).
- 20 5. El virus oncolítico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso como un medicamento.
6. El virus oncolítico según el uso de la reivindicación 5, para el tratamiento o la prevención del cáncer, en donde, opcionalmente, el cáncer es un tumor multifocal.
- 25 7. El virus oncolítico según el uso de reivindicación 6, en donde el cáncer es glioma, carcinoma de hígado y/o carcinoma de colon.
8. El virus oncolítico según el uso de las reivindicaciones 6 o 7, para su uso en combinación con otros tipos de estrategias de tratamiento del cáncer.
30

Fig.1



Hmut: proteína H mutada

(G₄S)₃: Enlazador de glicina-serina

(H6): etiqueta de histidina

B

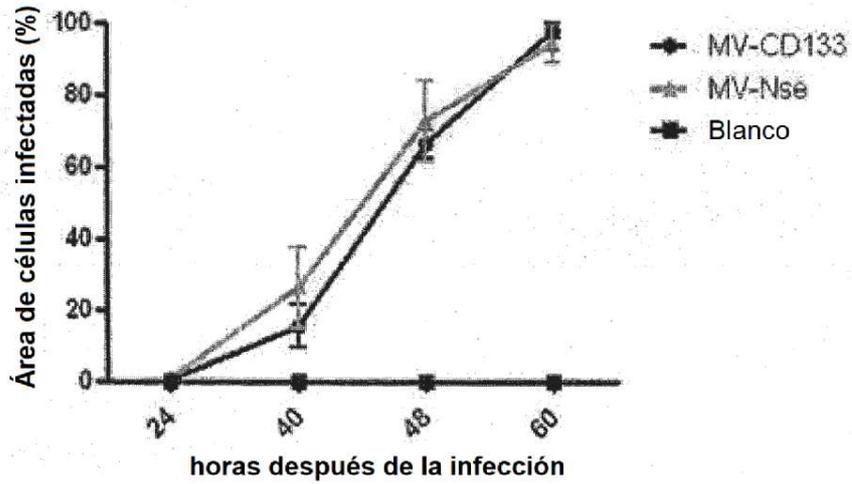


Fig.2

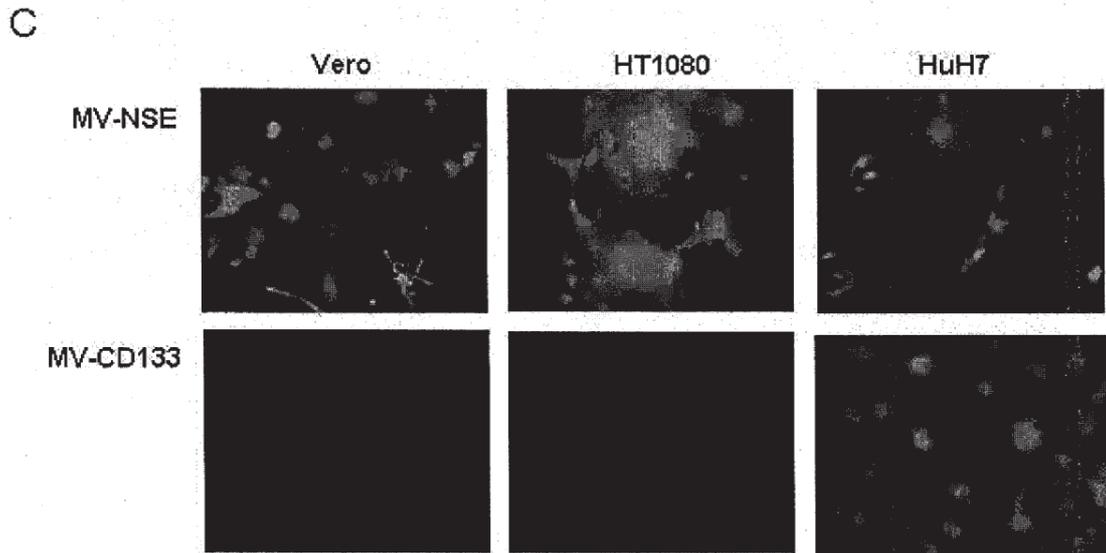
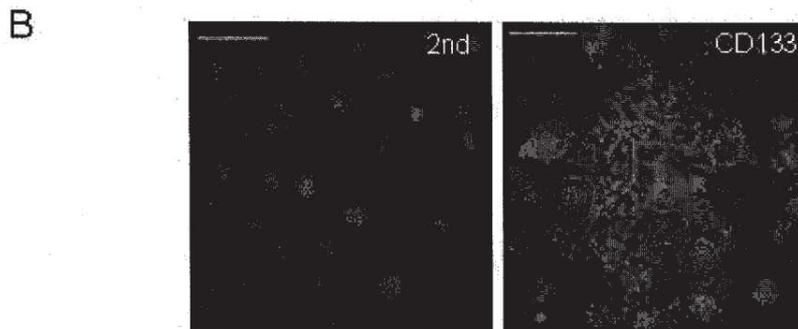
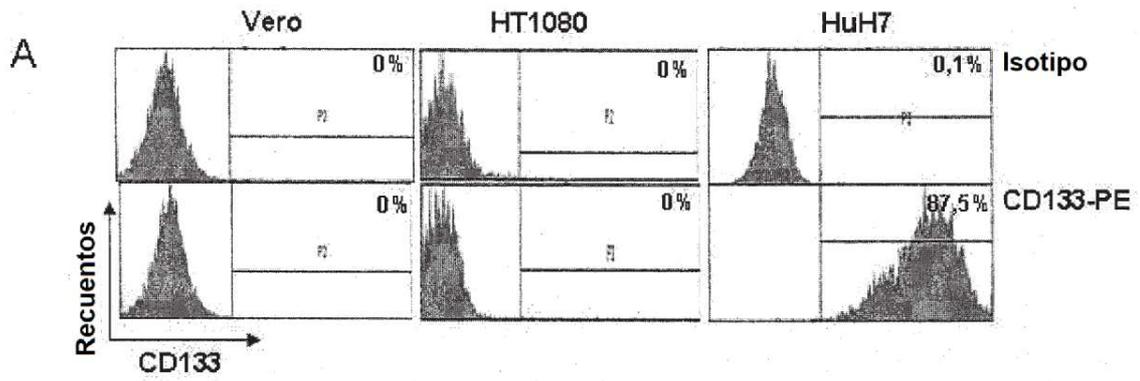


Fig. 3

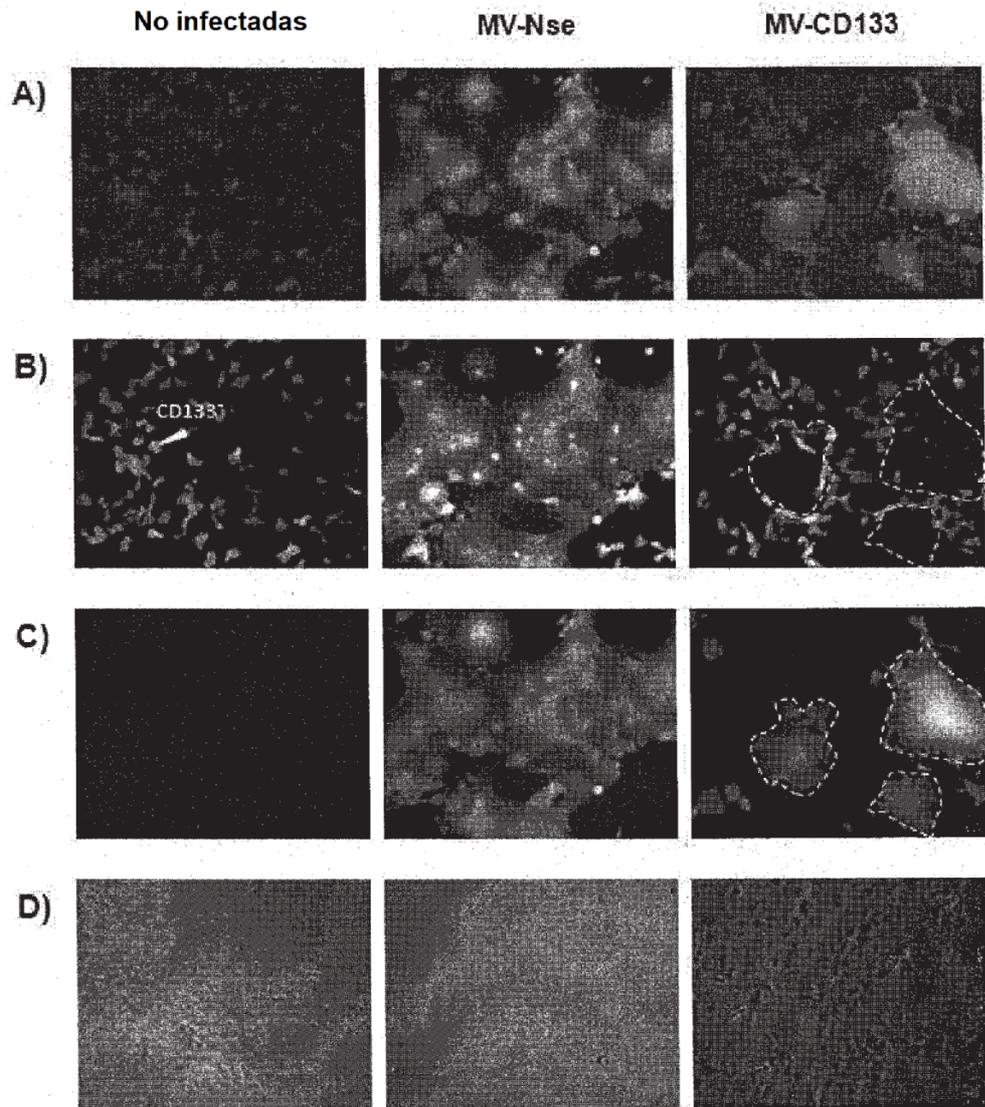


Fig.4

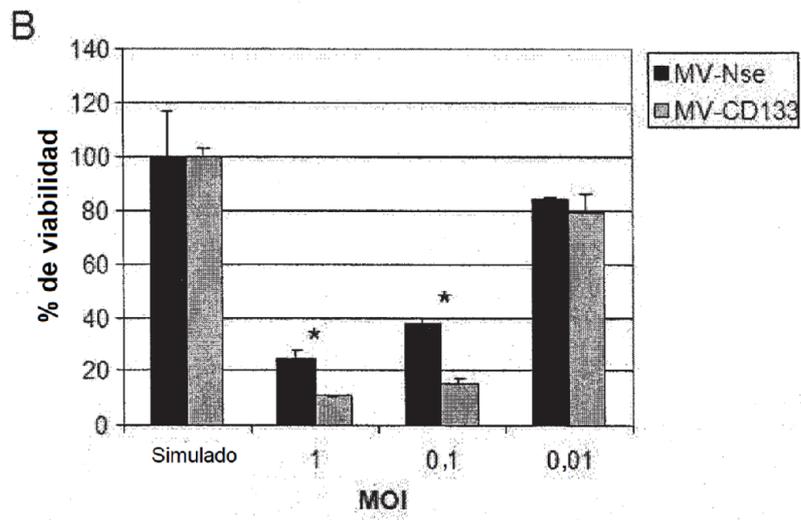
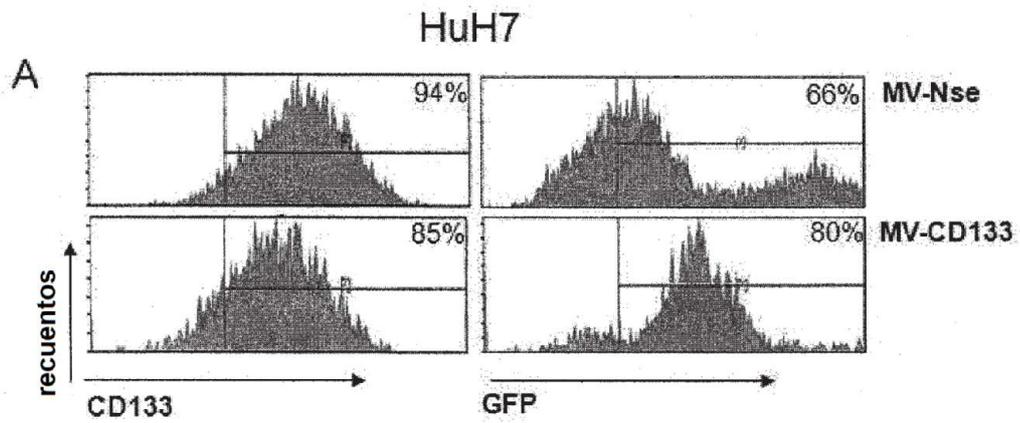


Fig.5

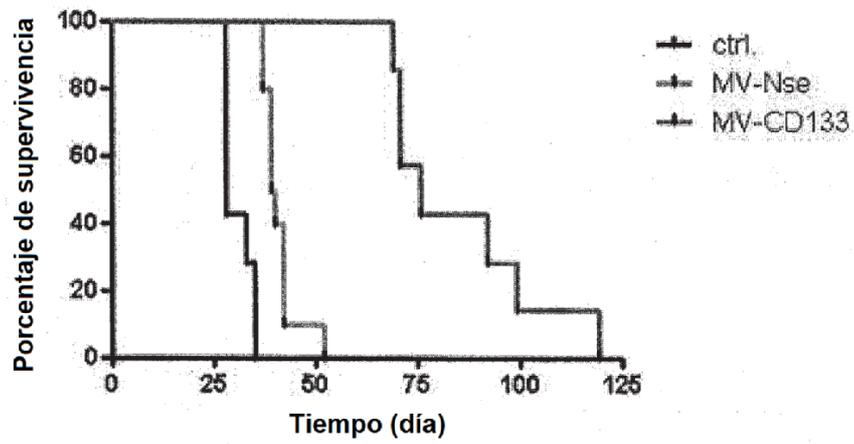
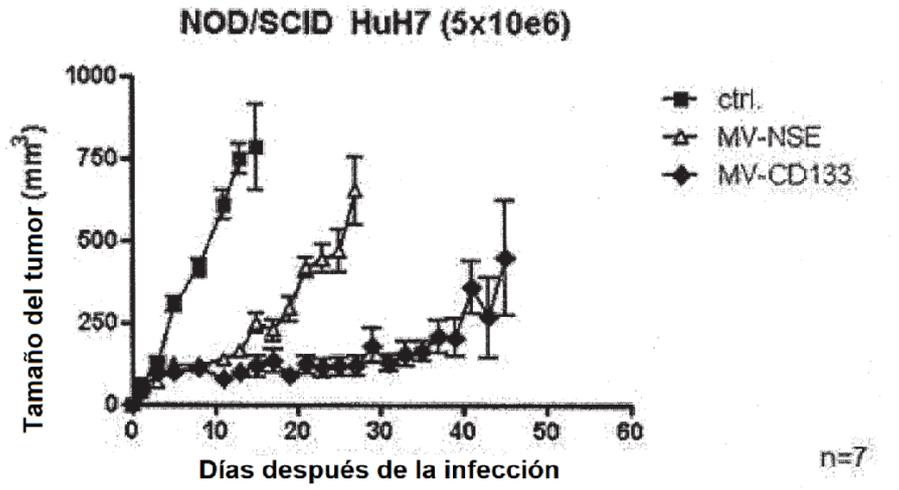


Fig.6

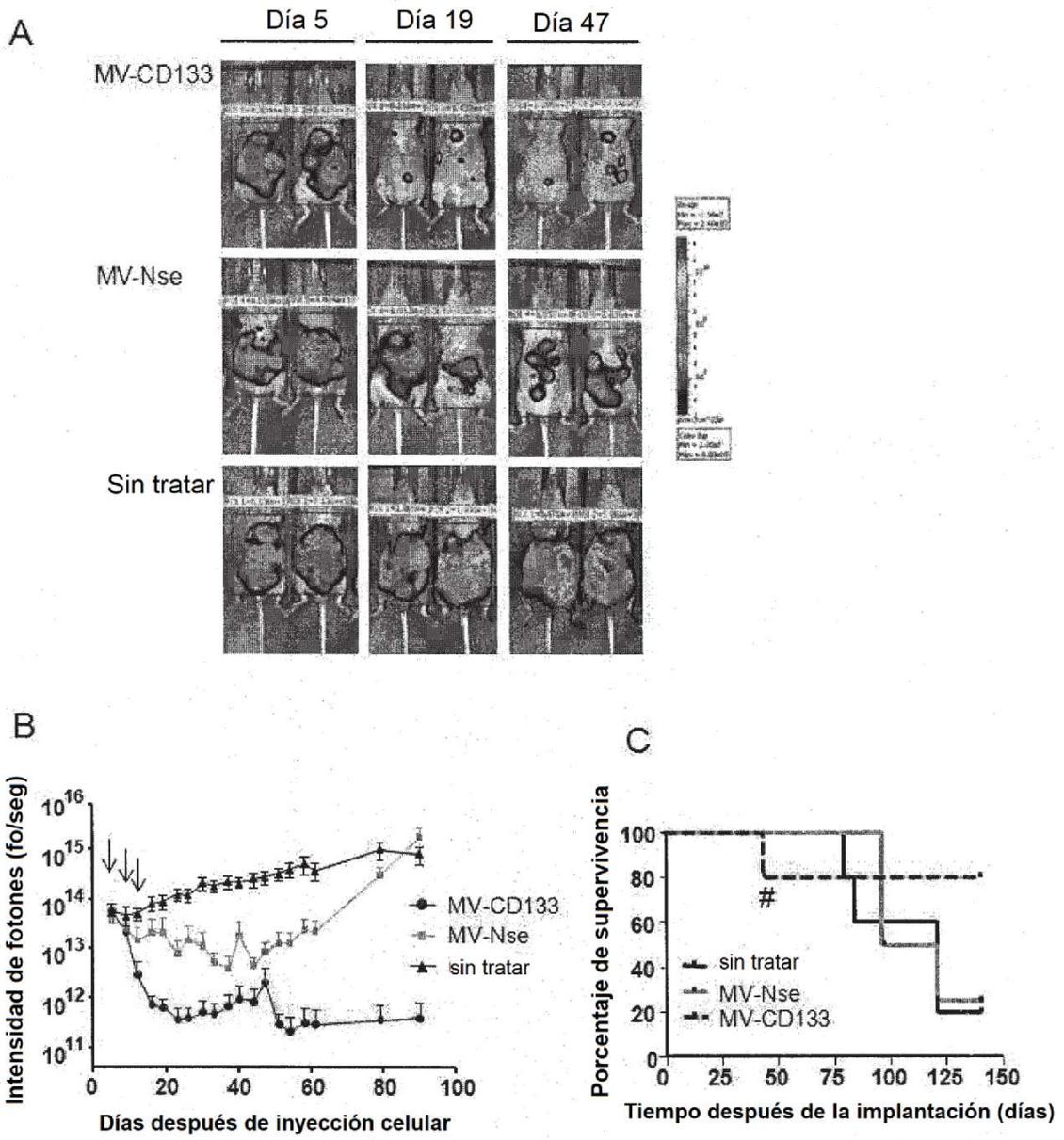
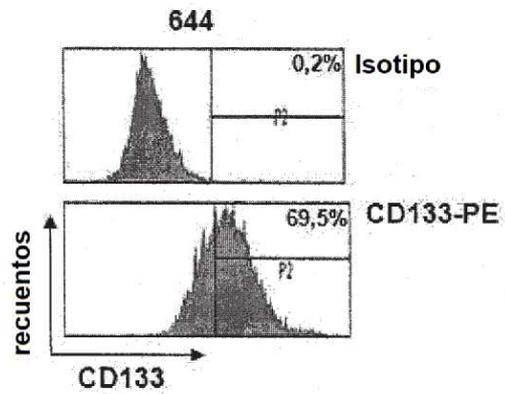
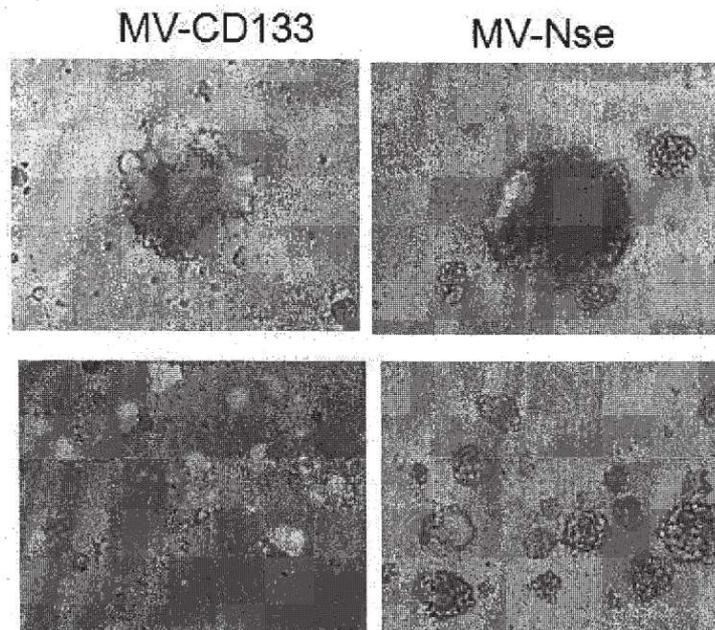


Fig.7

A



B



C

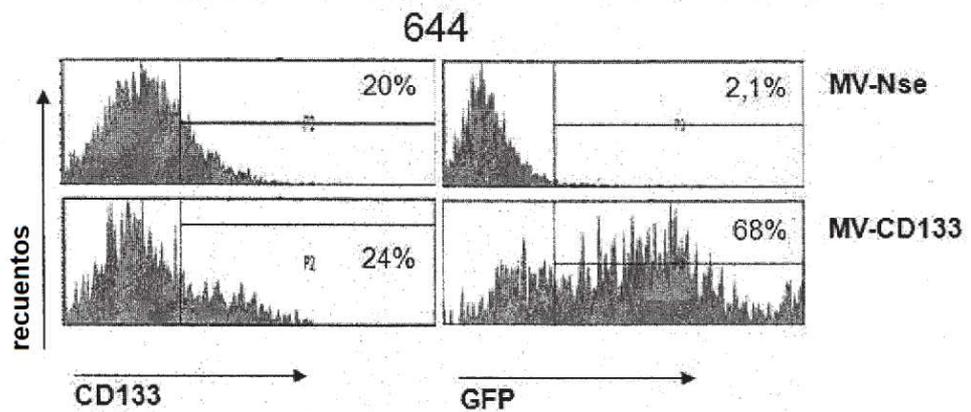


Fig.8

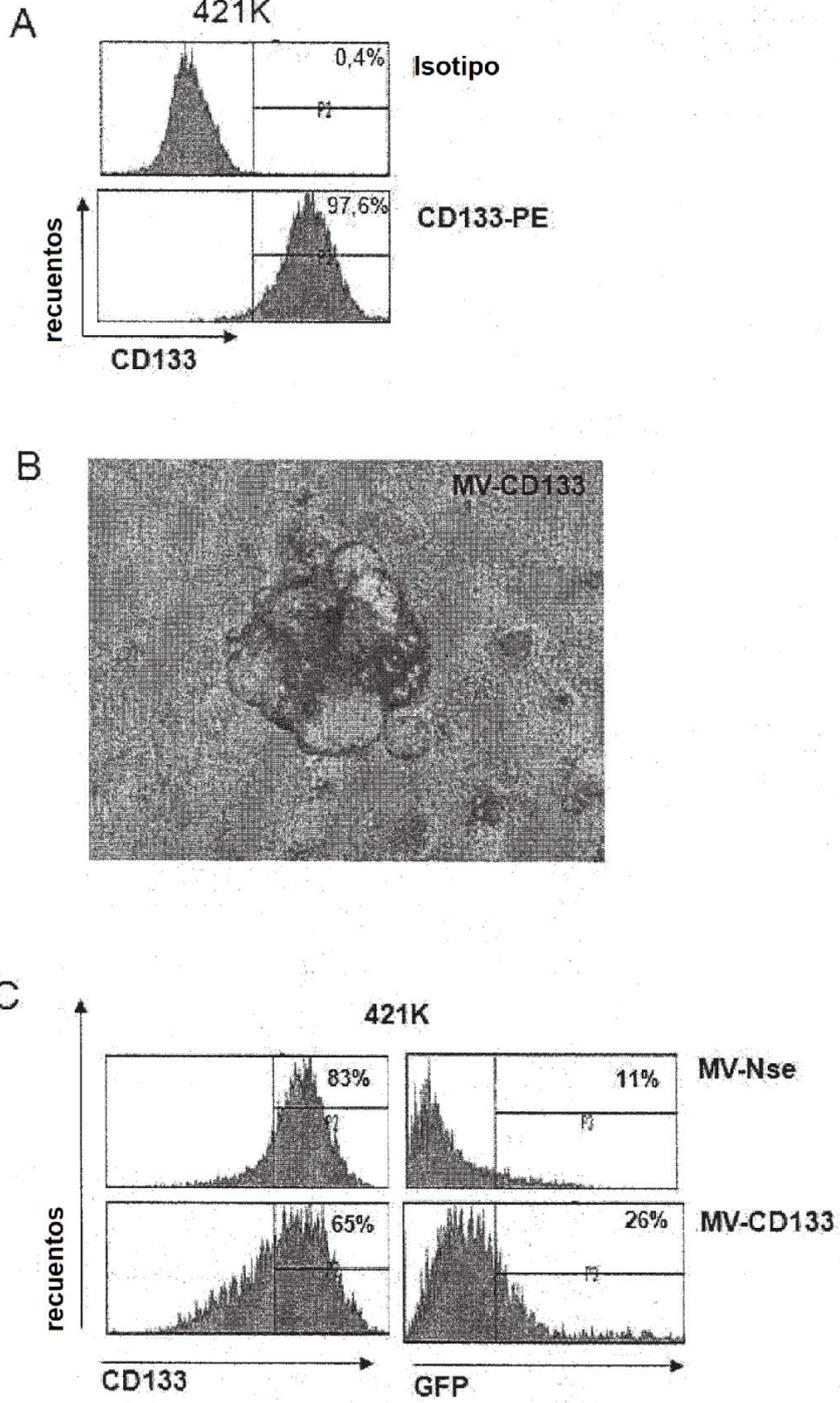


Fig.9

