(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 010 311**

(51) Int. CI.:

***A61K 45/06*** (2006.01)
***A61K 35/768*** (2015.01)
***A61P 35/00*** (2006.01)
***C07K 14/47*** (2006.01)
***C12N 7/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2019 PCT/EP2019/086048**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2020 WO20127552**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2019 E 19827705 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2024 EP 3897727**

(54) Título: **Virus minuto de ratón para el tratamiento de tipos de cáncer con modificación de TP53/p53**

(30) Prioridad:

**20.12.2018 EP 18382956**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**02.04.2025**

(73) Titular/es:

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (100.00%)**
**Cdad. Universitaria de Cantoblanco C/ Einstein 3**
**28049 Madrid, ES**

(72) Inventor/es:

**ALMENDRAL DEL RÍO, JOSÉ MARÍA;**
**GALLEGO, CARLOS y**
**GIL-RANEDO, JON**

(74) Agente/Representante:

**MARTÍNEZ, Miguel Ángel**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

Virus minuto de ratón para el tratamiento de tipos de cáncer con modificación de TP53/p53

### Campo de la invención

La presente invención se engloba dentro del campo de la oncología. Particularmente, la presente invención se refiere al uso de virus que pertenecen a la familia *Parvoviridae*, preferiblemente al género *Protoparvovirus,* o a combinaciones de dichos virus con quimioterapia, en el tratamiento de cáncer. De forma particular el cáncer se caracteriza por presentar mutaciones en el gen *TP53* y/o modificaciones postraduccionales en la proteína p53.

### Estado de la técnica

Proteína p53 y cáncer

La proteína p53, que se expresa desde el gen *TP53*, realiza funciones esenciales a través de mecanismos muy diversos en el control del ciclo celular y la estabilidad genómica, por lo que se ha denominado a veces "el guardián del genoma". Por esto no es sorprendente que mutaciones en el gen *TP53* sean uno de los principales mecanismos responsables de la inducción de diversos tipos de cánceres en humanos. De hecho, *TP53* es el gen más frecuentemente mutado en cáncer humano y, en particular, diversos cambios genéticos en el gen *TP53* son frecuentes en glioblastoma (GBM) (Brennan, C.W. *et al.* (2013) *The somatic genomic landscape of glioblastoma.* Cell 155, 462-477), una enfermedad devastadora sin tratamiento eficaz. Las alteraciones genéticas en *TP53* y en otros genes hacen que el crecimiento de los tumores GBM esté gobernado por señalizaciones funcionalmente redundantes, lo que permite su adaptación en repuestas a terapias moleculares dirigidas. Se debe por tanto destacar que, a pesar de la enorme importancia que tienen las mutaciones en TP53 para el inicio y progresión de múltiples cánceres en millones de humanos, no se dispone de un tratamiento eficaz específico contra estas lesiones genéticas, por tanto a día de hoy TP53 se considera principalmente un gen "no farmacomanipulable" (Kastenhuber, E.R., and S. W. Lowe. (2017). *Putting p53 in context*. Cell 170,1062-1076).

Quimioterapia convencional del cáncer y p53

En la clínica oncológica actual, las quimioterapias usan con frecuencia (solos o en combinación) los siguientes fármacos:

- Hidroxiurea (HU u OH-U), que disminuye las concentraciones de dNTP (nucleósidos trifosfatos) al inhibir la ribonucleótido reductasa, y por tanto detiene la horquilla de replicación del ADN (como también hace la gemcitabina o el arabinósido de citosina), provocando respuestas celulares diversas que pueden incluir a p53.

- Cisplatino (Cispt), se usa con frecuencia en clínica en tratamientos sistémicos desde hace más de cuarenta años por su actividad frente a diversos tipos de cánceres sólidos [*Basu A, Krishnamurthy S. 2010. Cellular responses to cisplatin induced DNA damage. J Nucleic Acids doi: 10.4061/2010/201367*].

- 5-fluorouracilo (5FU), un antimetabolito análogo a uracilo de uso general contra cánceres diversos, aunque con más eficacia contra cáncer colorrectal. Su mecanismo de acción es complejo e incluye alteraciones de la heterocromatina y metabolismo del ARN.

Virus oncolíticos

Numerosos virus han demostrado capacidad anticancerígena (oncólisis) en diferentes sistemas, usados como cepas naturales o modificadas genéticamente. En este sentido, se deben destacar al menos los siguientes tipos de virus con algo de capacidad oncolítica: parvovirus, virus del sarampión, reovirus, adenovirus, herpesvirus o poxvirus. Sin embargo, no se ha identificado en los virus oncolíticos del estado de la técnica que actúen de forma selectiva en tipos de cáncer caracterizados por mutaciones en el gen *TP53* y/o modificaciones postraduccionales en la proteína p53. Es decir, la capacidad de los virus oncolíticos no se ha relacionado hasta hora de forma específica con mutaciones en el gen *TP53* y/o con modificaciones postraduccionales en la proteína p53.

La presente invención se centra por lo tanto en resolver el problema técnico arriba explicado, mediante la identificación de virus oncolíticos para su uso solos o en combinación con quimioterapia, para dirigirse especialmente a cánceres con mutaciones en el gen *TP53* y/o con modificaciones postraduccionales en la proteína p53. Así, la presente invención aporta una ventana terapéutica eficaz, permitiendo tratamientos personalizados y específicos contra tumores que albergan alteraciones genéticas en el gen *TP53* y/o modificaciones postraduccionales en la proteína p53, tales como las que se encuentran a menudo en cánceres primarios humanos.

**Descripción de la invención**

**Breve descripción**

La presente invención se refiere al uso de virus que pertenecen a la familia *Parvoviridae*, particularmente al género *Protoparvovirus*, o a combinaciones de tales virus con quimioterapia en el tratamiento de cáncer. De forma particular, muchos tipos de cánceres se caracterizan por presentar mutaciones en el gen *TP53* y/o modificaciones postraduccionales en la proteína p53. Además, en un aspecto preferido, la presente invención demuestra que tales virus cooperan de forma sinérgica en sus efectos tóxicos contra las células cancerígenas con la quimioterapia convencional, siempre que las células diana alberguen alteraciones genéticas en el gen *TP53* y/o modificaciones postraduccionales en la proteína p53, o bien constitutivas o bien inducidas por estos fármacos.

Por tanto, la presente invención rompe un prejuicio en el estado de la técnica debido a que en dicho estado de la técnica se acepta la existencia de una buena correlación entre la presencia de mutaciones en TP53 en pacientes con cáncer y el resultado adverso de tratamientos con quimio y radioterapia, aunque el espectro de mutaciones implicados en cada caso está aún por definir [Tchelebi, L., Ashamalla, H., and Graves P.R. (2014) *Mutant p53 and the response to chemotherapy and radiation.* In: Deb S., Deb S. (eds) Mutant p53 and MDM2 in Cancer. Subcellular Biochemistry, vol 85. Springer, Dordrecht]. En cambio, en la presente invención se demuestra un tratamiento eficaz de diversos tipos de cáncer caracterizados por presentar mutaciones en el gen *TP53* y/o una modificación postraduccional en la proteína p53, cuando se usan las partículas virales de la invención, consiguiéndose un efecto sinérgico cuando las cepas se combinan con agentes de quimioterapia genotóxicos.

Así, la presente invención, a través de las figuras y ejemplos dispuestos a continuación, demuestra que:

- Varias cepas de virus de la familia *Parvoviridae,* particularmente del género *Protoparvovirus,* ensayadas en la presente invención infectan de forma selectiva y tóxica (al expresar su proteína NS1) células cancerosas humano de muy distinto origen, incluyendo células madre primarias de pacientes con glioblastoma, con la condición de que alberguen mutaciones en el gen *TP53*.

- Las modificaciones postraduccionales no fisiológicas en la proteína p53, y en especial la fosforilación constitutiva o inducida en el residuo de serina 15, favorecen la infección tóxica y la replicación de las cepas de virus ensayadas en la presente invención, en células cancerosas humano de muy distinto origen, incluyendo células madre primarias de pacientes con glioblastoma.

- Alteraciones en la proteína p53 inducidas por proteínas de virus oncogénicas, presentes o bien en los tumores o bien expresadas de forma exógena en células madre y en líneas establecidas de glioblastoma humano, facilitan la infección tóxica y la replicación de las cepas de virus de la familia *Parvoviridae* ensayadas en la presente invención.

- Fármacos de quimioterapia de tratamientos del cáncer clínicos actuales (tales como por ejemplo OH-U, 5FU o cisplatino) que inducen modificaciones postraduccionales en la proteína p53 (por ejemplo, la fosforilación en el residuo Ser15), actúan de forma sinérgica con la infección tóxica de las cepas de virus de la familia *Parvoviridae* ensayadas en la presente invención, disminuyendo muy sensiblemente la viabilidad de estas células cancerosas. La invención es tal como se define en las reivindicaciones.

Por tanto, el primer aspecto de la presente invención se refiere a una partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en: SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, para su uso, solos o en combinación con fármacos de quimioterapia genotóxicos, en el tratamiento de cáncer, donde el cáncer se caracteriza por presentar mutaciones en el gen TP53 y/o modificación/modificaciones postraduccional(es) en la proteína p53.

Es importante destacar el alto porcentaje de homología existente entre las cuatro secuencias víricas que pertenecen al género *Protoparvovirus* de la familia *Parvoviridae* incluidas en la presente invención, tal como se muestra en la tabla 1. Cabe destacar que las diferencias en nucleótidos se sitúan sobre todo en regiones no codificantes de los genomas, por lo que si nos ceñimos a las regiones codificantes el porcentaje de homología sería aún mayor.

Tabla 1

| % de identidad | MVMp SEQ ID NO: 1 | MVMi SEQ ID NO: 2 |
|---|---|---|
| MVMp SEQ ID NO: 1 | 100 | 97 |

| | | |
|---|---|---|
| MVMi SEQ ID NO: 2 | 97 | 100 |

El segundo aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una partícula viral que a su vez comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en: SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en combinación con un fármaco de quimioterapia genotóxico.

En un aspecto preferido de la invención, las modificaciones postraduccionales en la proteína p53 son constitutivas, inducidas por fármacos de quimioterapia inductores de daño al ADN o estrés genotóxicos [*Kirkland, D. et al. Updated recommended lists of genotoxic and non-genotoxicchemicals for assessment of the performance of new or improvedgenotoxicity tests. Mutation Research* 795 (2016) 7–30] [*Zhu, Y. et al. Cisplatin causes cell death via TAB1 regulation of p53/MDM2/MDMX circuitry*. (2013). *Genes and Develop* 27:1739–1751], o inducidas por virus oncogénicos. Según la invención, la modificación postraduccional de la proteína p53 consiste en la fosforilación del residuo Ser15. Según la invención, la mutación del gen *TP53* se selecciona del grupo que comprende: R273H, P72R, E258K, G245S y/o V173L. En un aspecto preferido de la invención, la mutación del gen *TP53* se encuentra dominio de unión a ADN (DBD) de la proteína p53 codificada. En un aspecto preferido de la invención, el fármaco de quimioterapia genotóxico se selecciona del grupo que comprende: cisplatino, hidroxiurea, 5-fluorouracilo, gemcitabina o arabinósido de citosina.

En un aspecto preferido de la invención el cáncer es glioma, cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de útero o melanoma. En un aspecto preferido de la invención dicha partícula viral se usa en combinación con un fármaco de quimioterapia genotóxico, donde la partícula viral se administra al mismo tiempo, después o antes que el fármaco de quimioterapia genotóxico.

También se divulga un método *in vitro* para la determinación de mutaciones en el gen TP53 y/o modificaciones postraduccionales en la proteína p53 que comprende el uso de una partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en: SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

También se divulga un método para el diagnóstico *in vitro* de cáncer, o para la selección de pacientes con cáncer, que comprende la determinación de mutaciones en el gen *TP53* y/o modificaciones postraduccionales en la proteína p53 mediante el uso de la partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en: SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

También se divulgan mutaciones en el gen TP53 y/o modificaciones postraduccionales en la proteína p53 para su usos en el tratamiento de cáncer, donde la mutación de TP53 se selecciona del grupo que comprende: R273H, P72R, E258K, G245S o V173L y la modificación postraduccional de la proteína p53 es la fosforilación en el residuo Ser15.

También se divulga un método para el tratamiento de cáncer caracterizado por presentar mutaciones en el gen TP53 y/o modificaciones postraduccionales en la proteína p53 que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en: SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y/o quimioterapia.

Según la presente invención la mutación del gen *TP53* se selecciona del grupo que comprende: R273H, P72R, E258K, G245S y/o V173L. En un aspecto preferido de la presente invención la mutación del gen *TP53* se encuentra en la región DBD o en el dominio rico en prolinas (PRD) de la proteína p53 codificada. En este sentido, es importante tener en cuenta que la mayoría de las mutaciones, y muchas de las mutaciones más importantes que se producen en el gen *TP53* están presentes en el dominio DBD del gen y que, además, este hecho puede considerarse reproducible en diferentes tipos de cáncer tal como se observa en la figura 3J. Esto significa que la utilidad de la presente invención podría extrapolarse al tratamiento de cualquier tipo de cáncer con mutaciones en el gen *TP53*, particularmente en el dominio DBD, tales como: cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma, glioma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de útero, algunos tipos de leucemias, o melanoma entre otros. De hecho, a modo de ejemplo significativo, las mutaciones R273H y G245S se encuentran entre las más frecuentes no sólo en glioblastoma (figura 2F) sino también en diferentes tipos de cánceres y están presentes en el dominio DBD del gen *TP53* (figura 3J). En un aspecto preferido de la presente invención la mutación se selecciona del grupo que comprende: R273H, E258K, G245S y/o V173L. Según la presente invención la modificación postraduccional en la proteína p53 consiste en la fosforilación del residuo Ser15. En un aspecto preferido de la presente invención las mutaciones mencionadas anteriormente se encuentran aisladas de forma individual o en combinaciones de al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, o al menos seis de cualquiera de estas mutaciones.

Preferiblemente, en dicha composición farmacéutica o medicamento, la partícula viral se encuentra en una concentración de entre $10^6$ y $10^{12}$ unidades ufp/ml (ufp= unidad formadora de placa de lisis), más preferiblemente entre $10^7$ y $10^{11}$ ufp/ml, aún más preferiblemente entre $10^8$ y $10^{10}$ ufp/ml.

Esta concentración de partículas virales en la composición farmacéutica puede referirse, en el marco de la invención, a la concentración de un solo tipo de partícula viral, no conteniendo la composición farmacéutica ningún otro tipo de partícula viral. Alternativamente, la concentración indicada puede alcanzarse mediante mezclas de varios tipos de partículas virales como las definidas anteriormente, alcanzando conjuntamente la concentración indicada. En el marco de la presente invención se incluyen todas las combinaciones posibles que serán evidentes a un experto en la técnica.

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

Según una realización preferida, la composición farmacéutica comprende al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

Según una realización preferida, la composición farmacéutica comprende al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable

Según otra realización preferida, la composición farmacéutica comprende al menos un adyuvante farmacéuticamente aceptable.

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

La presente invención se refiere a:

Una partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en: SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, para su uso en el tratamiento de cáncer, en la que el cáncer se caracteriza por presentar al menos una mutación seleccionada del grupo que comprende o que consiste en: mutación R273H en el gen *TP53*, mutación P72R en el gen *TP53*, mutación E258K en el gen *TP53*, mutación G245S en el gen *TP53*, mutación V173L en el gen *TP53*, y/o fosforilación de la proteína p53.

En una realización preferida, la fosforilación de la proteína p53 es constitutiva, o se ha inducido previamente por fármacos de quimioterapia genotóxicos o por virus oncogénicos.

En una realización preferida, la fosforilación de la proteína p53 consiste en la fosforilación del residuo Ser15.

En una realización preferida, la mutación se sitúa en la región DBD del gen *TP53* o en la región PRD de la proteína p53.

En una realización preferida, el fármaco de quimioterapia genotóxico que induce la fosforilación en la proteína p53 se selecciona del grupo que consiste en: cisplatino, hidroxiurea, 5-fluorouracilo, gemcitabina o arabinósido de citosina.

En una realización preferida, el cáncer se selecciona del grupo que comprende: glioma, glioblastoma, leucemia mieloide aguda, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de vejiga o adenocarcinoma rectal, que presentan las mutaciones R273H, P72R, E258K, G245S y/o V173L en el gen *TP53*.

En una realización preferida, la partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en: SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO: 2 se usa en combinación con un fármaco de quimioterapia genotóxico, en la que la partícula viral se administra después del fármaco de quimioterapia.

En una realización preferida, el cáncer se caracteriza por presentar la mutación R273H en el gen *TP53*, seleccionado del grupo que consiste en: cáncer de pulmón, cáncer de esófago, cáncer hepático, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga, cáncer colorrectal, cáncer de próstata, glioblastoma, glioma, cáncer de cabeza y cuello,

cáncer de mama, cáncer de estómago, cáncer de ovario, cáncer de útero o melanoma.

En una realización preferida, el fármaco de quimioterapia genotóxico se selecciona del grupo que comprende: cisplatino, hidroxiurea, 5-fluorouracilo, gemcitabina o arabinósido de citosina.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una partícula viral que a su vez comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en: SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en combinación con un fármaco de quimioterapia genotóxico, para su uso en el tratamiento de cáncer, en la que la partícula viral se administra después del fármaco de quimioterapia.

Se divulga en el presente documento un método para tratar un tipo de cáncer caracterizado por presentar al menos una mutación seleccionada del grupo que comprende o que consiste en: mutación R273H en el gen *TP53*, mutación P72R en el gen *TP53*, mutación E258K en el gen *TP53*, mutación G245S en el gen *TP53*, mutación V173L en el gen *TP53*, y/o fosforilación de la proteína p53. Este método comprende la administración de una composición farmacéutica que comprende una partícula viral que a su vez comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en: SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, que, en una realización preferida, se combina con un fármaco de quimioterapia genotóxico.

Para los propósitos de la presente invención se proporcionan las siguientes definiciones:

- El término "que comprende" significa que incluye, pero no se limita a, lo que sigue a la palabra "que comprende". Por tanto, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes.

- Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sigue a la frase "que consiste en". Por tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos.

- "Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que se puede incluir opcionalmente en las composiciones de la invención y que no provoca efectos toxicológicos adversos significativos para el paciente.

- Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" de la composición de la invención se entiende que es una dosis que cuando se administra provoca una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que padece cáncer. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad, las condiciones generales del sujeto, la gravedad de la enfermedad que se está tratando, el modo de administración y otros factores relacionados. La cantidad "eficaz" apropiada puede determinarla un experto en la técnica usando experimentación de rutina, basándose en la información proporcionada en el estado de la técnica.

**Descripción de las figuras**

Figura 1. El parvovirus diminuto del ratón (MVM) induce p53 en células madre de glioblastoma humano (GS, o hGS). Se infectaron células madre obtenidas de pacientes con glioblastoma con las cepas MVMp (cepa prototípica) y MVMi (cepa inmunosupresora) y se analizaron para determinar la expresión de la proteína p53. *Izquierda:* análisis por inmunofluorescencia (IF) en microscopía confocal para la expresión de la proteína viral NS1 y la p53 celular en células GS de los pacientes # 5,7 y 8 que crecían como neuroesferas. Simulación, células no infectadas. *Derecha*: análisis de la inducción de estas mismas proteínas por inmunotransferencia de tipo Western en GS de cuatro pacientes. Nestina: control de carga por nestina. Las masas moleculares (kDa) se indican a la derecha.

Figura 2. Modificación postraduccional de p53 y alteraciones genéticas de TP53 en células GS permisivas a la infección citotóxica y a la replicación del parvovirus MVM. A. Análisis por IF en microscopía confocal de la correlación entre la expresión de NS1, la inducción de p53 fosforilada en Ser15, y la replicación del genoma de MVMp, en células madre de glioblastoma (GS) de cuatro pacientes (# 5, 7, 8, 9). B. Análisis citométrico de la correlación entre los niveles de replicación del genoma de MVMp y la fosforilación de p53 en Ser15 en GS de dos pacientes. C. Citometría de fibroblastos de ratón A9 infectados por MVMp y analizados para determinar la correlación entre los niveles de: expresión de NS1 y replicación de ADN del virus (arriba), modificación de p53 y replicación de ADN del virus en S15 (medio), y expresión de NS1 e inducción de p53 (abajo). D. Ilustración de algunas mutaciones en TP53 detectadas por secuenciación masiva (NGS) en GS de dos pacientes previamente infectadas y clasificadas por expresión de NS1(+)/ p53-S15(+).E. Frecuencia de aparición de mutaciones en TP53 detectadas por NGS en GS de tres pacientes infectadas y clasificadas por expresión de NS1(+)/ p53-S15(+). F. Representación de las cuatro mutaciones detectadas por NGS en los dominios de la proteína p53 en células GS de cuatro pacientes infectadas por MVMp y clasificadas por expresión de NS1(+)/ p53-S15(+). Se indican también las posiciones de las mutaciones V173L (presente en fibroblastos A9 de ratón como V170L) y R273H (presente en líneas celulares de glioblastoma humano U373MG y U251MG). Se ilustran también el tipo y el número de casos absolutos acumulados de todas las mutaciones descritas en los dominios de TP53 (TAD, dominio de transactivación; PRD, dominio rico en prolinas; DBD, dominio de unión a ADN; OD, dominio de oligomerización) tal como se informa

por los consorcios TCGA (The Cancer Genome Atlas, NIH USA; *https://portal.gdc.cancer.gov)* y Cosmic (Instituto Sanger del RU; *https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic*) en muestras de GBM humanas.

Figura 3. Modificación postraduccional en p53 y alteraciones genéticas de TP53 en líneas establecidas de cáncer humano y GS infectadas con el parvovirus MVM. A. Paneles de IF en confocal de líneas establecidas de humanos y simio infectadas con las dos cepas (i, p) del parvovirus MVM y teñidas para p53, p53 fosforilada en Ser15 (Pp53), y ADN del parvovirus (ADNv). B. Estimación por IF confocal de la frecuencia y nivel de expresión de p53-S15 en distintas células no infectadas (simulación) o infectadas por las cepas de MVM. C, D. Análisis por Inmunotransferencia de tipo Western de la inducción de NS1, p53 y p53-S15 en GS (C) y distintas líneas establecidas de ratón (A9) y glioblastoma humano (D). E. Purificación por clasificación de células A9 y GS en base a la expresión de NS1+ y p53-S15+. Las poblaciones indicadas se emplearon para el análisis genético de TP53. Se indica el % de células positivas para los marcadores en las ventanas seleccionadas. F. Análisis por Inmunotransferencia de tipo Western del reconocimiento de p53 por anticuerpos específicos contra dos regiones de la proteína en distintas líneas celulares. Nótese la falta de reconocimiento de p53 en la línea celular U87MG por el anticuerpo específico para el dominio aprox-20. G. wtTP53 impide la expresión de la proteína NS1 del virus. Análisis en IF confocal de la expresión de p53 y NS1 en células A9 y NB324K transfectadas con un plásmido que expresa wtp53 o con ADN portador. H, I. Cromatogramas que muestran secuenciación por Sanger de regiones de p53 en las células establecidas y poblaciones agrupadas indicadas (H) o en GS (I). J. Representación de las mutaciones detectadas en TP53 en este estudio en relación a todas las descritas en los dominios de TP53 (TAD, dominio de transactivación; PRD, dominio rico en prolinas; DBD, dominio de unión a ADN; OD, dominio de oligomerización) por los consorcios TCGA (The Cancer Genome Atlas, NIH USA; *https://portal.gdc.cancer.gov)* y Cosmic (Instituto Sanger del RU; *https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic*) en los tipos de cánceres indicados en humanos. El esquema muestra como la mayoría de las mutaciones en diferentes tipos de cáncer se producen en el dominio DBD del gen TP53, si bien la frecuencia de una mutación en particular puede ser muy elevada en un determinado tipo de cáncer.

Figura 4. Infección de los parvovirus MVMp y MVMi en líneas de glioblastoma humano y GS de pacientes transfectadas con oncogenes de adenovirus que alteran p53. A. Análisis por IF en confocal de células NIH3T3, o (B) células GS8, transfectadas con plásmidos que expresan oncogenes mostrando incremento en la replicación del genoma de MVMp. C. Estudio similar en células GS8 sobre los niveles del producto intermedio replicativo principal (mRF) del genoma de MVM analizado por transferencia de tipo Southern. D. Efecto de la transfección con plásmidos que expresan oncogenes sobre la replicación del genoma de MVMp en células GS8, o (E) del genoma de MVMi en U87MG medido por IF en confocal (izquierda) o citometría (derecha).

Figura 5. Efectos de fármacos de quimioterapia (CD) en la infección de células de glioblastoma U373MG con parvovirus MVMp. A. Análisis mediante citometría *(*izquierda) y (B) mediante IF en confocal (derecha) del efecto de tres CD sobre los niveles de expresión de NS1 y p53-S15. C. Análisis por IF en confocal del efecto de dosis de cisplatino en los niveles de NS1, p53-S15, y replicación del genoma del virus. D. Análisis en condiciones similares midiendo los niveles de NS1 y de proteínas de señalización de p53 mediante transferencia SDS, o (E) la viabilidad celular por formación de colonias.

Figura 6. Efectos de CD en la infección de células de glioblastoma U87MG con el parvovirus MVMi. A, B. Análisis por IF en confocal del efecto de dosis de 5FU e hidroxiurea (HU) en los niveles de p53-S15 en células U87 no infectadas. C. Efecto de dosis de estos CD sobre los niveles del producto intermedio replicativo principal (mRF) del genoma viral analizado por transferencia de tipo Southern. D. Análisis por IF en confocal del efecto de estos CD en los niveles de NS1, p53-S15 y replicación del genoma del virus. Efecto de dosis de 5FU sobre los niveles de NS1 y de proteínas de señalización de p53 medidas en transferencia (E), o en la viabilidad celular determinada por formación de colonias (F). Efecto de dosis de HU en los niveles de NS1 y de proteínas de señalización de p53 medidas en transferencia(G), o en la viabilidad celular determinada por formación de colonias (H).

Figura 7. Efectos de CD en la infección de células U87MG con el parvovirus MVMp. A. Análisis por IF en confocal del efecto de dosis de cisplatino en los niveles de NS1, p53-S15 y replicación del genoma del parvovirus. B. Análisis por inmunotransferencia de tipo Western de muestras equivalentes midiendo los niveles de NS1 y varias proteínas celulares de señalización de p53. C, D y E. Supervivencia celular (medida por formación de colonias) en infecciones a distintas multiplicidades (UFP/célula) con MVMp combinadas con las distintas dosis indicadas de los diversos CD.

**Descripción detallada de la invención**

EJEMPLO 1. MATERIALES Y MÉTODOS

Ejemplo 1.1. Células y cultivos celulares.

Las células madre de glioblastoma humano fueron proporcionadas por el servicio de Neurocirugía del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Los explantes se diagnosticaron como glioblastoma en estadio IV mediante histoquímica realizada por el servicio de Patológica del mismo hospital. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes y la aprobación del Comité Ético Institucional del Hospital Ramón y Cajal de Madrid. Se autorizó una investigación adicional en el cultivo de tejidos por los respectivos Comité Ético de la Universidad de Madrid y el

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM). Las biopsias, recogidas a pie de quirófano, fueron disgregadas mecánica y enzimáticamente, y finalmente la suspensión celular fue filtrada para ser cultivada en el medio DMEM:F12 (1:1) complementado con diversos factores.

Por su parte, las líneas celulares establecidas de ratón, cánceres humanos y de otros mamíferos se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) tamponado con $NaHCO_3$ al 0,3 % y en atmósfera del 5 % de $CO_2$. El medio fue complementado con antibióticos (75 U/ml de estreptomicina, 75 µg/ml de penicilina G), L-glutamina 2 mM y el 5 % de suero fetal bovino (FCS) descomplementado a 56 ºC durante 30 minutos. Se han utilizado las siguientes líneas celulares:

- Glioblastoma humano:
    - U87-MG: glioblastoma-astrocitoma humano (ATCC:HTB 14).
    - U373-MG: glioblastoma-astrocitoma humano (RRID:CVCL_2219).
    - U251-MG: glioblastoma-astrocitoma humano (RRID:CVCL_0021) (ECACC09063001).
- Otros cánceres humanos:
    - Hela, carcinoma cervical humano (ATCC-CCl-2)
    - NB324K: fibroblastos de riñón humano de recién nacido transformados con el antígeno T grande del *Polyomavirus* SV40 (RRID:CVCL_U409).
- Líneas celulares carcinogénicas de otros mamíferos:
    - COS-1, fibroblastos de hígado de primate transformados por el *Polyomavirus* SV40 (ATCC CRL-1650)
    - A9: línea derivada de fibroblastos L de ratón seleccionados por el fenotipo HGPRT. Muestra tener cierta capacidad carcinogénica cuando se inyecta en ratón (ATCC CCL-1.4).

Ejemplo 1.2. Citometría de flujo.

En todos los experimentos se adquirió un mínimo de 30.000 acontecimientos por muestra en un citómetro FACSCantoII (BD Biosciences), que fueron preseleccionados mediante una región en base a su tamaño y complejidad (parámetros FSC y SSC, respectivamente) con el fin de excluir restos celulares u otras partículas contaminantes. Se usó el software CellQuest (BD Biosciences) para la adquisición de los acontecimientos y el software FlowJo (Tree Star) para el análisis de los datos. El ciclo celular fue según [*Gil-Ranedo, J., Hernando, E., Riolobos, L., Domínguez, C., Kann, M., and José M. Almendral. 2015.The mammalian cell cycle regulates parvovirus nuclear capsid assembly. PlosPathogens, 11;11(6):e1004920*]. Para las tinciones, las células fueron permeabilizadas con PBS + 0,1% de tritón durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego se bloquearon con el mismo tampón complementado con FCS al 1 % durante 20 minutos. Las células se resuspendieron en PBS (pH 7,2) + BSA al 0,5 % y se añadieron los anticuerpos primarios indicados en las figuras seguido de 1 hora con agitación a 37 ºC. Los anticuerpos primario y secundario se incubaron, realizando un lavado con PBS entre ellos. Se realizaron dos lavados adicionales antes de analizar las muestras en el citómetro de flujo.

Para la purificación de células por citometría de flujo (FACS) destinadas al análisis genético de TP53 (tal como se muestran en la figura 3E), se prepararon todas las disoluciones con pirocarbonato de dietilo (DPC) usando agua destilada libre de nucleasas (Gifco, agua destilada sin ADNasa/ARNasa 10977-035). Las células fueron permeabilizadas e incubadas con anticuerpos como se indica más arriba, pero en tampones de PBS complementados con vanadato (inhibidor de ARNasa), gelatina en lugar de BSA (que permite autoclave), y filtrados. Antes de la clasificación, el equipo de citomería (Aria) fue extensivamente refrigerado con aPBS-DEPC sometido a autoclave a 4 ºC, las células sorteadas se recogieron sobre tubos estériles (F15, Falcon) en hielo, e inmediatamente se añadió trizol para inhibir degradaciones y proseguir con la purificación del ARN.

Ejemplo 1.3. Análisis clonogénico de viabilidad celular.

Se estimó la capacidad clonogénica y viabilidad celular mediante el ensayo de formación de colonias en placa basado en [*Rubio, M.P., Guerra, S., y Almendral, J.M. 2001. Genome replication and postencapsidation functions mapping to the nonstructural gene restrict the host range of a murine parvovirus in human cells. J Virol 75(23): 11573-11582*].

Ejemplo 1.4. Inmunofluorescencia indirecta (IF).

Se realizaron análisis mediante inmunofluorescencia de neuroesferas de hGSC (células madre de glioblastoma humano) y líneas celulares establecidas adherentes tal como sigue:

- Tinciones de neuroesferas. Las esferas se fijaron durante 30 minutos con paraformaldehído (PFA) al 4 %, luego se permeabilizaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con Triton X-100 al 0,1 % (Merck) en PBS y se bloquearon incubando 20 minutos con Triton X-100 al 0,1 % y suero fetal bovino al 10 % (Sigma) en PBS. Se incubaron en este mismo tampón las neuroesferas con los anticuerpos primarios indicados en las figuras durante 1 h a 37 ºC y se finalizó realizando cuatro lavados de cinco minutos con PBS. Seguidamente las neuroesferas se incubaron con los anticuerpos secundarios a concentraciones adecuadas en el mismo tampón y condiciones, y finalmente se tiñeron con DAPI durante media hora y se montaron incrustadas en agarosa-LGT 0,8 % preparada en PBS. Las neuroesferas incrustadas se aplicaron como gotas de 200 de microlitros en cubreobjetos grandes (2 χ 3 cm) previamente enfriados y se almacenan a 4 ºC en la oscuridad hasta su análisis confocal.

- Células adherentes. Las líneas celulares se sembraron sobre cubreobjetos, fueron tratadas como se indican en las figuras y se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído al 4 %. Las tinciones con los anticuerpos se llevaron a cabo esencialmente como lo descrito anteriormente para las neuroesferas. Las células se montaron con Fluoromount G (Southern Biotech). Las preparaciones se mantuvieron al menos 16 h a temperatura ambiente en la oscuridad antes de su observación al microscopio.

- Análisis de replicación de virus por FISH. Este método se usó para determinar el grado de replicación del genoma del parvovirus MVM. La sonda usada fue una mezcla de tres oligonucleótidos de ADN marcados en el extremo 3' terminal con el fluoróforo Cy5, y complementarios a distintas secuencias del genoma de MVM. Las células adheridas y fijadas en paraformaldehído al 4 % se permeabilizaron durante 10 minutos con Triton X-100 al 0,2 % (Merck) en PBS y se equilibraron durante 5 minutos a temperatura ambiente en 2xSSC (NaCl 0,3 M; $Na_2C_6H_5O_7$ 30 mM; pH 7) complementado con formamida al 15 %. Se hibridaron con 500 ng/ml de cada oligonucleótido en tampón FISH (5xSSC, SDS 0,5 %, sulfato de dextrano al 10 %, formamida al 50 %) durante 2,5 horas a 37 ºC. Las preparaciones se lavaron dos veces con 2xSSC, formamida al 15 % durante 30 minutos. Finalmente, se bloquearon las muestras en Triton X-100 al 0,1 % y FCS al 1 % en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y se prosiguió con el protocolo de inmunofluorescencia anteriormente descrito.

- Capturas de imagen. En las preparaciones de neuroesferas se usó un microscopio de barrido láser confocal LSM510 META acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss), o un microscopio de barrido láser confocal multifotón LSM710 acoplado a un microscopio invertido AxioObserver (Zeiss). Para el análisis de las preparaciones con células dispersas, se usó un microscopio invertido Axiovert200 (Zeiss) acoplado a una cámara ccd monocroma y color. Cuando se indique, se usó el microscopio de barrido láser confocal multifotón LSM710. Las imágenes se procesaron con los programas Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Incorporated) e ImageJ/FIJI (http://rsb.info.nih.gov/ij/) tomando como referencia de señal cero las mismas muestras sin anticuerpos (control de autofluorescencia), o únicamente con anticuerpos secundarios.

Ejemplo 1.5. Parvovirus MVM.

MVM pertenece a la familia *Parvoviridae,* género *Protoparvovirus*. La cepa prototípica de este virus (MVMp) fue aislada originalmente de fibroblastos [*Crawford, L. (1966) A minute virus of mice, Virology, 29, págs. 605–612*] y la cepa llamada inmunosupresora (MVMi) de linfocitos de ratón [*Bonnard, G. D., Manders, E. K., Campbell, D. A., Herberman, R. B. and Collins, M. J. (1976) Immunosuppressive activity of a subline of the mouse EL-4 Lymphoma, J Exp Med, 143 (1), págs. 187–205. DOI:10.1084/jem.143.1.187*]. Sólo la cepa MVMi es patogénica en ratón.

Ejemplo 1.6. Producción de parvovirus MVM en cultivo.

Los preparados de los parvovirus MVM (p, i) se obtuvieron en células NB324K siguiendo protocolos establecidos [*Segovia, J. C., Gallego, J. M., Bueren, J. A. y Almendral, J. M. (1999) Severe leukopenia and dysregulated erythropoiesis in SCID mice persistently infected with the parvovirus minute virus of mice., Journal of Virology, 73 (3), pág. 1774–84*], [*Sánchez-Martínez, C., Grueso, E., Carroll, M., Rommelaere, J. y Almendral, J. M. (2012) Essential role of the unordered VP2 n-terminal domain of the parvovirus MVM capsid in nuclear assembly and endosomal enlargement of the virion fivefold channel for cell entry. Virology, 432 (1), págs. 45–56*], [*Gil-Ranedo, J., Hernando, E., Valle, N., Riolobos, L., Maroto, B. y Almendral, J. M. (2018) Differential phosphorylation and n-terminal configuration of capsid subunits in parvovirus assembly and viral trafficking, Virology, 518, págs. 184–194*]. Para esto, se usaron plásmidos que contenían el genoma completo de las cepas MVMp y MVMi, incluidas las secuencias palindrómicas de [*Gardiner, E.M. y Tattersall, P. 1988. Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. J Virol 62(8): 2605-2613*] [*Hirt, B., Colomar, M. C. y Beard, P. (1998) Two segments in the genome of the immunosuppressive minute virus of mice determine the host-cell specificity, control viral DNA replication and affect viral RNA metabolism., Journal of General Virology, 79, 581–586*] lo que permite obtener partículas virales por transfección de células [*Sánchez-Martínez, C., Grueso, E., Carroll, M.,*

*Rommelaere, J. y Almendral, J. M. (2012) Essential role of the unordered VP2 n-terminal domain of the parvovirus MVM capsid in nuclear assembly and endosomal enlargement of the virion fivefold channel for cell entry. Virology, 432 (1), págs. 45–56*]. Usando virus directamente producido por transfección (48 horas tras la transfección), se infectaron células NB324K cultivadas hasta confluencia en diez placas P100 (un total de $5x10^7$ células) a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,005 unidades formadoras de placa/célula (UFP/célula) en 1 ml de PBS completo (PBSc; PBS) con $CaCl_2$ 0,9 mM y $MgCl_2$ 0,5 mM) con FCS al 0,1 %. Después de 1 hora a 37 ºC, se retiró el inóculo y se incubó en DMEM con FCS al 5 % durante 5 horas para permitir la internalización del virus. Posteriormente las células adheridas se levantaron con tripsina-EDTA, se diluyeron en 400 ml de DMEM con FCS al 5 % y se sembraron en cincuenta placas P100. Las células se incubaron hasta la aparición de efecto citopático (5 días aproximadamente).

Ejemplo 1.7. Purificación del parvovirus MVM.

Se siguieron protocolos descritos por [*Santarén, J. F., Ramírez, J. C. y Almendral, J. M. (1993) Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMp: involvement of phosphorylated VP-2 subtypes in viral morphogenesis., Journal of Virology, 67 (9), págs. 5126–38*], [*Hernando, E., Llamas-Saiz, A. L., Foces-Foces, C., McKenna, R., Portman, I., Agbandje-McKenna, M. y Almendral, J. M. (2000) Biochemical and Physical Characterization of Parvovirus Minute Virus of Mice Virus-like Particles, Virology, 267 (2), págs. 299–309*], [*Sánchez-Martínez, C., Grueso, E., Carroll, M., Rommelaere, J. y Almendral, J. M. (2012) Essential role of the unordered VP2 n-terminal domain of the parvovirus MVM capsid in nuclear assembly and endosomal enlargement of the virion fivefold channel for cell entry. Virology, 432 (1), págs. 45–56*] y [*Gil-Ranedo, J., Hernando, E., Riolobos, L., Domínguez, C., Kann, M., y José M. Almendral. 2015.The mammalian cell cycle regulates parvovirus nuclear capsid assembly. PlosPathogens, 11;11(6):e1004920*]. En breve, el virus presente en el medio se recuperó por precipitación con polietilenglicol 6000 al 3,4 % y NaCl 0,5 M durante la noche a 4 ºC y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 30 minutos en un rotor angular Sorvall GSA. Para recuperar el virus intracelular, el sedimento de células se resuspendió en Tris-HCl 50 mM pH 7,5, EDTA 1 mM (TE) y se sometió a tres ciclos consecutivos de congelación/descongelación, tras los cuales, se añadió SDS al 0,2 % final y se clarificó a 8000 rpm, 10 minutos a 4 ºC en el rotor flotante Sorvall HB4. El virus recuperado del medio y el virus intracelular se agruparon y centrifugaron a través de un colchón de sacarosa (Merck) al 20 % en Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, NaCl 0,1 M y SDS al 0,2 % durante 18 h a 16000 rpm en un rotor TST 28.38. El sedimento se resuspendió en TE con Sarkosyl al 0,2 % (Sigma) y se bandeó en un gradiente de CsCl (ni=1,371) centrifugando hasta equilibrio durante 24 horas a 50000 rpm y 15 ºC en un rotor TFT 80.13. Desde la parte superior del gradiente se recogieron con jeringa fracciones de 0,5 ml y se determinó en ellas la presencia de cápsides vacías y virus llenos de ADN mediante hemaglutinación con eritrocitos de ratón. Por último, se agruparon las fracciones que contenían los virus y se dializaron frente a PBS. Se almacenó virus purificado en alícuotas a -70 ºC.

Ejemplo 1.8. Hemaglutinación.

Este método se usó para estimar la cantidad de partículas de virus y purificaciones de seguimiento. Se basó en [*Sánchez-Martínez, C., Grueso, E., Carroll, M., Rommelaere, J. y Almendral, J. M. (2012) Essential role of the unordered VP2 n-terminal domain of the parvovirus MVM capsid in nuclear assembly and endosomal enlargement of the virion fivefold channel for cell entry. Virology, 432 (1), págs. 45–56*] y [*Hernando, E., Llamas-Saiz, A. L., Foces-Foces, C., McKenna, R., Portman, I., Agbandje-McKenna, M. y Almendral, J. M. (2000) Biochemical and Physical Characterization of Parvovirus Minute Virus of Mice Virus-like Particles, Virology, 267 (2), págs. 299–309*]. Para el ensayo de hemaglutinación (HA), se lavó sangre de ratón adulto tres veces con solución salina de fosfato (PBS), recogiendo los eritrocitos por centrifugación en centrífuga de mesa a 1500 rpm durante 5 min. Después de varios lavados se resuspendió el sedimento de eritrocitos al 50 % (v/v) en PBS y se conservó a 4 ºC hasta el momento de su uso. La HA se llevó a cabo en placas de microprueba de perfil en U (Nunc). Las muestras que iban a valorarse se aplicaron en un volumen final de 100 µl en PBS y se realizaron diluciones seriadas 1:2 en PBS. Finalmente se añadieron 50 µl de eritrocitos al 2 % en PBS en cada pocillo, se agitó suavemente la placa y se mantuvo a 4 ºC en la oscuridad durante al menos dos horas. El título se obtuvo del inverso de la dilución más elevada que mantiene la capacidad hemaglutinante.

Ejemplo 1.9. Valoración de parvovirus MVM por formación de placas.

Basado en [*Gil-Ranedo, J., Hernando, E., Valle, N., Riolobos, L., Maroto, B. y Almendral, J. M. (2018) Differential phosphorylation and n-terminal configuration of capsid subunits in parvovirus assembly and viral trafficking, Virology, 518, págs. 184–194*]. Se usaron células NB324K sembradas 24 horas antes en placas P60 a una densidad de 2,2x10e5 células/placa. Se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células en PBS con Ca++ y Mg++ (completo o PBSc) y se añadió el inóculo viral en 400 µl por P60, diluido en PBSc complementado con FCS al 0,1 %. Después de una hora de adsorción a 37 ºC con agitación suave, se retiró el inóculo y se añadieron 7 ml de medio de plaqueo (DMEM, FCS al 10 %, agarosa LM-GQT al 0,6 % de Pronadisa) equilibrado a 37 ºC. Después de una incubación de 6 días, las placas se fijaron en formaldehido al 10 % (Panreac) en PBS y se tiñeron con cristal violeta al 0,2 % (Panreac) en formaldehido al 10 % en PBS. El recuento del número de placas de lisis multiplicado por la dilución permite obtener el título de virus en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml).

Ejemplo 1.10. Obtención de ADN viral.

El ADN de bajo peso molecular proveniente de células electroporadas con plásmidos o infectadas con MVM, se obtuvo mediante el método de Hirt modificado [*Segovia, J. C., Gallego, J. M., Bueren, J. A. y Almendral, J. M. (1999) Severe leukopenia and dysregulated erythropoiesis in SCID mice persistently infected with the parvovirus minute virus of mice., Journal of Virology, 73 (3), págs. 1774–84*]. Brevemente, las células transfectadas se lisaron en la disolución de Hirt (Tris 50 mM pH 7,5, SDS al 0,5 %, EDTA 10 mM) complementada con portador de ARNt 20 μg/ml para garantizar la recuperación, y fueron digeridas con proteinasa K (100 μg/ml) (Merck) durante 2 horas a 37 ºC. Se ajustó la reacción a NaCl 1 M y se precipitó el ADN genómico durante la noche a 4 ºC. La fracción enriquecida de ADN viral de bajo peso molecular se obtuvo del sobrenadante después de centrifugar la muestra a 4 ºC y 14 K rpm durante 30 minutos en una microfuga (Eppendorff). Este ADN se precipitó con NaCl 0,3 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto a -20 ºC, se lavó con etanol al 70 % para eliminar las sales y se resuspendió en agua o en Tris 50 mM pH 7,5 y EDTA 10 mM.

Ejemplo 1.11. Electroforesis de ADN y transferencia a membranas.

Las muestras se sometieron a electroforesis 2-3 horas a 60V en un gel de agarosa al 0,8 % (Gibco) en tampón Tris-borato-EDTA (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM) con 5 μg/ml de bromuro de etidio (Boehringer) junto con marcadores de peso molecular (digesto de HindIII de ADN Ø29 de fago) y controles de formas replicativas y ADNmc de MVM. La transferencia se realizó a una membrana de nailon (Hybond-N+, Amersham Pharmacia) en una disolución de NaOH 0,4 M durante la noche. Finalmente, se lavó la membrana en una disolución 2XSSC durante 10 minutos a temperatura ambiente (20X SSC es: NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M) y se secó 2 horas a 78 ºC.

Ejemplo 1.12. Hibridación con sonda específica de MVM.

La membrana se incubó en disolución de prehibridación (5X SSC, 5X disolución de Denhardts [Ficoll (Ty400), polivinilpirrolidona, BSA], Tris 10 mM 7,5, SDS 0,5 %, formamida al 50 %), para eliminar las posibles uniones inespecíficas, durante cuatro horas a 42 ºC. A continuación, se reemplazó la disolución por la disolución de hibridación, que está formada por los mismos componentes de la disolución de prehibridación junto con la sonda desnaturalizada. La sonda era el genoma de MVM de longitud completa marcado *in vitro* a alta actividad específica con $^{32}P$ por "cebado aleatorio" usando generalmente dCTP-alfa $^{32}P$. Se permitió la hibridación a 42º C durante uno o dos días, y finalmente las membranas se lavaron con una disolución de 0,1X SSC y SDS 0,5 % a 50 ºC durante tres horas, antes de la exposición a películas de rayos X.

Ejemplo 1.13. Anticuerpos.

Los anticuerpos primarios y secundarios usados en técnicas inmunológicas fueron:

Tabla 2

| | Anticuerpo | m/pAc | Dilución | Incubación | IF/WB | Origen | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Anticuerpos primarios | B7 | mAc | 1:50 | 1 h a TA | IF | No comercial | CR Parrish |
| | BAX | pAb | 1:10000 | 1 h a TA | WB | Proteintech | 50599-2-Ig |
| | Beta-Actina | pAc | 1:5000 | 1 h a TA | WB | Invitrogen | PA1-183 |
| | MDM2 | mAB | 1:10000 | 1 h a TA | WB | Proteintech | 66511-1-Ig |
| | Nestina | mAc | 1:500 | 1 h a TA | IF | Chemicon | MAB5326 |
| | | | 1:100000 | 4 ºC durante la noche | WB | | |
| | NS1-Ratón | pAc | 1:2000 | 1 h a TA | IF | No comercial | J.M. Almendral |
| | NS1-S7 | pAc | 1:2000 | 1 h a TA | IF | No comercial | J. Rommelaere |
| | | | 1:100000 | 4 ºC durante la noche | WB | | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | p21 | mAc | 1:10000 | 4 ºC durante la noche | WB | Santa Cruz Biotechnology | sc-53870 |
| | PCNA | mAc | 1:2000 | 4 ºC durante la noche | WB | Cell Signalling | #2586 |
| | p53 (~20) | mAb | 1:200 | 1 h a TA | IF | Cell signalling | #2524 |
| | | | 1:2000 | 4 ºC durante la noche | WB | | |
| | p53 (212-217) | mAb | 1:20 | 1 h a TA | IF | Invitrogen | AHO0112 |
| | | | 1:2000 | 4 ºC durante la noche | WB | | |
| | Pp53 (S15) | mAb | 1:2000 | 1 h a TA | IF | Cell Signalling | #9286 |
| | | | 1:2000 | 4 ºC durante la noche | WB | | |
| | VP (VPB | pAc | 1:100 | 1 h a TA | IF | No comercial | J.M. Almendral |
| | | | 1:10000 | 4 ºC durante la noche | WB | | |
| Anticuerpos secundarios | Anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con Alexa 555 | pAc | 1:500 | 1 h a TA | IF | Invitrogen | A-31572 |
| | Anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con Alexa 647 | pAc | 1:500 | 1 h a TA | IF | Invitrogen | |
| | Anticuerpo anti-IgG de conejo marcado con Alexa 488 | pAc | 1:500 | 1 h a TA | IF | Invitrogen | A-31570 |
| | Anticuerpo anti-Ig de ratón marcado con HRP | pAc | 1:10000 | 1 h a TA | WB | DAKO | P0161 |
| | Anticuerpo anti-Ig de conejo marcado con HRP | pAc | 1:10000 | 1 h a TA | WB | Cell signalling | #7074 |

Ejemplo 1.14. Reactivos químicos.

Se obtuvo hidroxiurea de Calbiochem (hidroxiurea cat. 400046-5gm). Se obtuvo 5-fluorouracilo (5FU) de Sigma (ref. F-6627-1G). Cisplatino de EMC Millipore (232120-50 mg).

Ejemplo 1.15. Análisis de proteínas: SDS-PAGE y transferencia a membranas. Las muestras de proteína, una vez desnaturalizadas por ebullición durante cinco minutos en tampón de carga (glicerol al 10 % (Merck), β-mercaptoetanol al 5 % (Merck), azul de bromofenol al 0,002 % (Merck), Tris-HCl 0,5 M pH 6,3, SDS al 0,4 %), se revolvieron por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida al 8 %. La electroforesis se llevó a cabo en Tris-glicina (Tris-HCl 25 mM (Serva), glicina 192 mM (Gibco), SDS al 0,1 %) durante dos-cuatro horas a 100 V en minigeles (10x10x0,1 cm), con marcadores de masa molecular en paralelo ("Prestained SDS-PAGE Standards, Broad Range" (Biorad), o "Protein Molecular Weight Standards, Broad Range", Amersham). Las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell) en tampón de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0,1 % y metanol al 20 %) durante una hora a 100 V (célula de transferencia electroforética Trans-Blot, Biorad).

Ejemplo 1.16. Detección de proteínas transferidas a membrana ("inmunotransferencia de tipo Western").

La membrana se hidrató en tampón TBS-T (Tris 20 mM pH 7,5, NaCl 140 m, Tween 20 al 0,1 %) y se incubó con agitación durante una hora a 4 ºC en TBS-T con suero fetal bovino al 10 % (FBS). Después de lavar con TBS-T, se incubó con el anticuerpo primario diluido en TBS-T con FBS al 1 % y NP40 al 1 %, 24 h a 4 ºC. Después de lavar

exhaustivamente se añadió e incubó el anticuerpo secundario durante 1 h a TA. Finalmente se lavó la membrana con TBS-T y TBS (sin Tween 20), se reveló con el sistema ECL ("Enhanced Chemiluminiscence", Amersham) y se expuso a autorradiografía (Kodak).

Ejemplo 1.17. Plásmidos.

Para expresar la proteína p53 en cultivo de células se usó el plásmido pCMV-neo-p53 [*Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, y Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. Science.* 1990, 249(4971):912-5], proporcionado amablemente por J. Paramio (Ciemat, Madrid). El plásmido denominado "auxiliar" y el plásmido para expresar el oncogén E4orf6 de *Adenovirus* [*Winter, K., von Kietzell, K., Heilbronn, R., Pozzuto, T., Fechner, H., y S. Weger. (2012). Roles of E4orf6 and VA I RNA inadenovirus-mediesated stimulation of human parvovirus B19 DNA replication and structural gene expression. J. Virol. 86, 5099-5109*] fueron donados amablemente por S. Weger (Charité, Berlin). Los plásmidos fueron transfectados en las células por métodos químicos (Jetpaid) o físicos (electroporación) dependiendo del tipo de célula.

Ejemplo 1.18. Secuenciación del gen TP53.

Las muestras de células se procesaron para obtener ARN total usando Trizol y protocolos convencionales. El ARN fue copiado luego a ADNc a usando transcriptasa inversa y cebadores aleatorios. El ADNc así obtenido se usó para secuenciar el gen TP53 humano o de ratón usando la secuencia de TP53 y los cebadores indicados en el anexo. Los métodos seguidos fueron secuenciación de Sanger convencional o secuenciación masiva (NGS) para las muestras de ARN obtenidas de GS clasificadas por FACS (véanse las figuras 2 y 3). Ambos métodos de secuenciación fueron realizados en el Parque Científico de Madrid (PCM) usando los equipos y protocolos disponibles en esta instalación.

EJEMPLO 2. RESULTADOS.

Ejemplo 2.1. La expresión de la proteína citotóxica NS1 del parvovirus MVM principal en células madre de glioblastoma humano (GS) se correlaciona con la inducción de p53.

En la figura 1 (izquierda) se muestra la respuesta de p53 en GS de tres pacientes (#5, 7 y 8) infectadas por las cepas MVMp o MVMi. En las neuroesferas no infectadas, la tinción de p53 es débil y homogénea. Después de la infección se detecta la expresión de NS1, la proteína no estructural citotóxica principal del virus, en un % variable de GS variable dependiendo del paciente, pero en los tres casos p53 se induce fuerte y específicamente en las células NS1+. Cuando se analizaron infecciones de GS de cuatro pacientes en inmunotransferencia de tipo Western (figura 1, derecha), la inducción de p53 no es evidente por la señal de fondo que procede de la mayoría de las células que no expresan NS1. Solo en GS7, más permisivo al MVM, esta inducción es patente. Por tanto, las células GS inducen una respuesta al daño al ADN (DDR) genuina, con implicación de p53, en respuesta a la infección por MVM.

Ejemplo 2.2. Aquellas GS permisivas a la replicación del genoma del parvovirus MVM inducen p53 modificada por fosforilación en el residuo de serina 15.

A continuación se estudió si en la DDR montada por la GS en respuesta al parvovirus MVM está involucrada, en forma tipo celular o cepa de virus dependiente, la modificación por fosforilación en el residuo de serina 15 de p53 por fosforilación (Pp55-S15). En neuroesferas de GS no infectadas se observa una expresión basal de Pp53-S15, con algunas células prominentes en GS5 y GS7, pero al infectar con MVMp se induce claramente Pp53-S15 en una fracción de las células que expresan NS1 (figura 2A). Una estimación de los porcentajes de expresión basal, e inducción de Pp53-S15 en respuesta a la infección por las cepas de MVM en GS (así como en diversas líneas establecidas), se muestran en la figura 3B. Sin embargo, la replicación del genoma del virus se produce preferiblemente en aquellas células GS que son Pp53-S15+ (figura 2A, abajo). Esta correlación NS1+/Pp53-S15+ se confirmó de forma cuantitativa por citometría de flujo (figura 2B), ya que en las poblaciones NS1+ de GS de dos pacientes infectada por MVMp la síntesis de ADN del virus (ADNv+) se lleva a cabo preferiblemente en células que expresan niveles elevados de Pp53-S15.

Ejemplo 2.3. Líneas celulares transformadas de distinto origen, incluyendo diversos cánceres humanos, que son permisivas a la expresión de NS1 y en ocasiones a la replicación del genoma de MVM, albergan p53 mutada y/o alterada fenotípicamente, generalmente por fosforilación en Ser15.

Para ampliar el estudio anterior a otros tipos de cánceres, así como a las células que se usan para crecer estos virus, se infectaron con las dos cepas (MVMp, MVMi) varias líneas celulares humanas y de otros mamíferos y se analizaron para la expresión de NS1 y replicación del genoma del virus, en relación con la presencia de mutaciones en el gen *TP53* y a modificaciones postraduccionales de la proteína p53. Los resultados obtenidos con estas líneas celulares fueron:

- La línea celular A9 de fibroblastos inmortales de ratón, de uso común para crecer virus MVMp [*Gardiner, E.M. y Tattersall, P. 1988. Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the*

*parvovirus minute virus of mice. J Virol 62(8): 2605-2613*] [*Gil-Ranedo J., Hernando, E., Riolobos, L., Domínguez, C., Kann, M., y José M. Almendral. 2015.The mammalian cell cycle regulates parvovirus nuclear capsid assembly. PlosPathogens, 11;11(6):e1004920*] infectadas con MVMp y sincronizadas con timidina fueron analizadas a 9 horas tras la liberación de este paro, cuando la síntesis de macromoléculas del virus alcanza sus máximos valores [*Gil-Ranedo J., Hernando, E., Riolobos, L., Domínguez, C., Kann, M., y José M. Almendral. 2015.The mammalian cell cycle regulates parvovirus nuclear capsid assembly. PlosPathogens, 11;11(6):e1004920*]. Se observó que mientras que el ciclo en células A9 no infectadas se acumula en G2 en estas condiciones (figura 2C, arriba), una fracción importante de las células infectadas están retenidas antes de G2. Aunque alrededor del 40 % de la población celular no expresan NS1, todas las células que expresaban NS1 habían progresado a G2. Más importante, sólo la mitad de aquellas células que expresaban NS1 son permisivas a la síntesis del ADN del virus (ADNv). P53 se indujo en respuesta a la infección, y su nivel de síntesis se corresponden con los de NS1 (figura 2C, abajo). En estas células los niveles constitutivos de Pp53-S15 son indetectables (véase también la figura 3C), pero se indujeron fuertemente en respuesta a la infección, y aquellas células que son ADNv+ tienen niveles de inducción de p53-S15 más elevados (figura 2C, panel medio).

Para analizar la marcada diferencia entre las células NS1+ que permitían o no la síntesis de ADNv, se procedió a clasificar estas dos poblaciones celulares y a caracterizar su genética de *TP53*. Las células A9 NS1+ clasificadas se comportaban de nuevo distribuidas en dos poblaciones similares ADNv+/- (figura 3E, izquierda). De manera notable, la mutación TP53-G665C (que determina el cambio de aminoácido V170L) se detectó en el ARNm expresado en las dos poblaciones de A9, así como en la población inicial de A9 no clasificada, pero no en fibroblastos control de ratón no transformados y no permisivos a la infección por MVM (figura 3H). Por tanto, las células A9 tienen la mutación sin sentido V170L (que se corresponde en el gen humano con V173L) que podría ser necesaria para la expresión de NS1 (véase más abajo esta demostración). La replicación del genoma de MVMp esta confinada principalmente a una subpoblación de células A9 en la que la infección induce p53 fosforilada en la Ser15.

- Líneas celulares humanas o de primates transformadas por virus oncogénicos (figura 3A, arriba), que expresan oncogenes que inactivan o alteran funcionalmente p53. Fueron tres: NB324K, células humanas de riñón de recién nacido transformadas por el antígeno T del poliomavirus oncogénico SV40 [*Shein, H. M., Enders, J. F. y Levinthal, J. D. (1962). Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. II. Cell-virus relationships., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 48, págs. 1350–7*]. La secuencia del gen TP53 de estas células fue secuenciado a partir de ADNc y no poseían mutaciones (datos no mostrados), pero si manifiestan alteración constitutiva de Pp53-S15, inducción de p53 por la expresión de NS1, y replicación del genoma a niveles elevados en la mayoría de las células (figura 3A y figura 3D), aunque los niveles de expresión de Pp53-S15 en virus replicantes en células varió. Los resultados fueron similares en las células COS-1 (fibroblastos de primate transformados también por SV40), y Hela (obtenidas de cáncer cervical humano inducido por infección con virus del papiloma), aunque los niveles de replicación del genoma del virus y de Pp53-S15 constitutivo fueron generalmente menores (figura 3A).

- Líneas celulares establecidas a partir de pacientes con glioblastoma:

    - U373-MG y U251-MG. Estas células albergan la mutación TP53-g849a que codifica el cambio de aminoácido R273H en p53, una mutación bien documentada en la bibliografía que se confirmó por secuenciación de Sanger de su ARNm (datos no mostrados). Estas células son poco permisivas a las dos cepas de MVM (p, i), ya que solo una pequeña fracción de la población induce NS1 a niveles bajos, coincidiendo con una subida en p53 (figura 3A, figura 3D). Estas líneas celulares de glioblastoma muestran alteración de Pp53-S15 constitutiva pero a niveles basales, y sostienen la replicación del genoma de las cepas de MVM (p, i) exclusivamente en un muy bajo número de células que inducen Pp53-S15+ (figura 3A).

    - U87-MG. En esta línea celular no pudieron encontrarse alteraciones genéticas en el ARNm de *TP53* (datos no mostrados) como ha sido descrito anteriormente en la bibliografía, ni mostró de forma constitutiva la modificación Pp53-S15 (véanse las figuras 4, 6 y 7). Sin embargo, la proteína p53 expresada por U87-MG debe tener otro(s) tipo(s) de modificación/modificaciones postraduccional(es) ya que un anticuerpo comercial (Invitrogen) generado contra el dominio de 212-217 aminoácidos sí la reconoció (así como otras especies de p53 en otros tipos celulares), mientras que otro anticuerpo comercial de diferente especificidad (Cell Signaling) obtenido contra un péptido del entorno del residuo 20, no reconoció p53 (figura 3F). Cabe destacar que las células U87-MG fueron en su mayoría permisivas a la expresión de la proteína NS1 de MVMi, pero no de la proteína de MVMp, aunque MVMi no replicó su genoma ni indujo Pp53-S15+ (figuras 4 y 6).

Ejemplo 2.4. La expresión de la proteína citotóxica NS1 del parvovirus MVM requiere mutaciones TP53 o modificaciones de la proteína p53.

Si bien la correlación entre alteraciones genéticas en TP53 y/o modificaciones en la proteína p53 con la expresión de

la proteína NS1 del MVM era cohrente en diversas líneas celulares transformadas (figuras 1-3), esto no demostraba una relación causal entre ambos fenómenos. Para abordar esta importante cuestión, se procedió a sobreexpresar la proteína p53 a partir del plásmido pCMV-neo-p53 *[Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorrectal carcinoma cell growth by wild-type p53. Science. 1990, 249(4971):912-5]* tanto en células A9 de ratón que poseen la mutación TP53-V173L (en realidad la mutación de ratón V170L equivalente) como en células NB324K que carecen de mutaciones en TP52 pero muestran p53-S15 altamente fosforilada (figuras 3A y C). Tal como se muestra en la figura 3G, la expresión de NS1 tras la transfección con ADN portador (preparado a partir de esperma de salmón) fue muy alta en ambos tipos de células, mientras que los niveles de p53 fueron basales o indetectables. Sin embargo, cuando p53 se sobreexpresó por la transfección de pCMV-neo-p53, se provocó una inhibición absoluta de la expresión de NS1. Aquellas células A9 de ratón y NB324K humanas que sobreexpresan wtp53 transfectada por encima de los niveles constitutivos característicos excluyen completamente la acumulación de la proteína NS1 viral (véanse los paneles de pTP53 en la figura 3G). Por tanto, la expresión de NS1 requiere alteraciones funcionales de p53 inducidas por mutaciones genéticas en TP53 o modificaciones postraduccionales en la proteína p53.

Ejemplo 2.5. El parvovirus MVM expresa proteínas citotóxicas y replica su genoma preferiblemente en células madre de glioblastoma humano (GS) que albergan alteraciones genéticas en TP53.

Los análisis con líneas establecidas respaldaron la asociación encontrada entre la modificación Pp53-S15 y la permisividad a la infección por MVM en células GS (figura 2A), y sugirieron además que esta relación podría tener una base genética. Por tanto, para abordar esta cuestión en profundidad, se analizó el estado genético de TP53 en GS de los cuatro pacientes. Para ello, se obtuvieron muestras de controles no infectados, infectados con MVMp o MVMi, así como de GS infectadas por MVMp y se clasificaron adicionalmente (FACS, véase Material y métodos) para determinar la expresión de NS1 y Pp53-S15. La figura 3E ilustra las ventanas restrictivas (ventanas de análisis) elegidas (para garantizar la pureza) de las poblaciones de células NS1+/Pp53-S15+ y NS1+/Pp53-S15 sometidas a análisis genético. De todas estas muestras se purificó el ARNm poliA+, se copió en ADNc y se amplificó mediante PCR a través del gen TP53. Estos amplicones se secuenciaron mediante secuenciación de nueva generación (NGS, figuras 2D y E) y se confirmaron mediante el método de secuenciación convencional de Sanger (figura 3I). Las diversas mutaciones en TP53 que se detectaron se describen a continuación (comentadas en la dirección N a C de la proteína p53):

• La mutación P72R. La mutación c215g que implica el cambio del residuo de aminoácido P72R (mutación sin sentido) en el dominio rico en prolina (PRD) de p53 (véanse las figuras 2F y 3J), es claramente evidente en las poblaciones GS7 infectadas y clasificadas por FACS (+/+ y +/ -), así como en una proporción significativa de ambas poblaciones clasificadas GS8 equivalentes, y en una proporción muy baja de células GS5 que permiten la expresión de NS1 (+/-). Por tanto, el cambio de p53-P72R beneficia la transcripción y replicación de MVMp, aunque en diferente grado dependiendo del contexto de GS del paciente con GBM. Es interesante que esta mutación haya sido descrita en una sola muestra de GBM por la base de datos Cosmic (figura 2F), pero es una mutación común en tumores hematopoyéticos y linfoides, en particular P72R es, con diferencia, la mutación TP53 más frecuente en leucemia mieloide aguda (LMA) (figura 3J).

• La mutación V173L corresponde al cambio de V170L que se ha identificado en la línea celular de fibroblastos de ratón A9. Esta mutación se ha descrito en dos muestras de GBM (figura 2F) y está localizada en la región de "punto caliente" del dominio DBD de p53 donde se han encontrado más mutaciones (figura 3J). El cambio de V173L está implicado en diversos cánceres, pero particularmente con alta frecuencia en el adenocarcinoma de recto y el adenocarcinoma de pulmón (figura 3J).

• La mutación G245S. Se encontró mediante NGS que las GS de los pacientes 8 y 9 tienen el gen TP53 mutado en la posición g733a, lo que implica el cambio de aminoácido G245S (mutación sin sentido) en todas las células y en todas las muestras (poblaciones clasificadas y totales independientemente de la infección por MVM) de estos pacientes (figura 2 D, E). La mutación fue confirmada en las mismas muestras mediante secuenciación de Sanger (figura 31). La presencia general de la mutación sugiere que no beneficia la expresión genética del virus por sí sola. Sin embargo, esta mutación TP53-g733a también aparece en una baja proporción de las células GS5 (figura 2E), exclusivamente en las infectadas y clasificadas (+/+ y +/-), lo que señala que el cambio de p53-G245S puede contribuir a la transcripción y replicación de MVM en estas células GS5. Es importante señalar que esta mutación ya se ha descrito con alta frecuencia en las bases de datos genéticas de GBM actualizadas (figura 2F), en coherencia con su ubicación dentro de la región del "punto caliente" de p53, el dominio DBD. Además, el cambio de p53-G245S es una de las mutaciones más frecuentes en los múltiples tipos de cáncer humano analizados para la genética de TP53 (figura 3J), como, por ejemplo, cáncer de vejiga, adenocarcinomas de recto y pulmón (figura 3J).

• La mutación E258K. NGS observó la mutación g772a, que implica el cambio de aminoácido E258K (mutación sin sentido), en el bajo porcentaje de la población GS7 infectada y clasificada que expresa NS1, lo que sugiere fuertemente que contribuye a la transcripción viral en estas células madre de GBM. Esta mutación no se describió previamente en las bases de datos genéticas actuales de GBM (figura 2F), aunque también está localizada en el dominio DBD de p53 de "punto caliente", donde se han encontrado más mutaciones. De hecho, la mutación E258K es común en muchos tipos de cánceres (figura 2F, abajo) y se destaca como una mutación muy común en el

carcinoma de vejiga (figura 3J).

• La mutación R273H. Esta mutación sin sentido no se encontró en la GS primaria de los cuatro pacientes que se han analizado (figuras 2 y 3), aunque es muy común en las bases de datos genéticas de GBM (figura 2F). Cabe destacar que la mutación p53-R273H se destaca actualmente como la más frecuente entre los miles de cánceres humanos estudiados (véanse ejemplos en la figura 3J). Aunque el hecho de no identificar la mutación R273H en las cuatro GS podría deberse al número limitado de muestras, nuestro estudio sugiere más bien que esta mutación *per se* beneficia poco a la infección por MVM. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que las líneas celulares de glioblastoma U373MG y U251MG que albergan esta mutación son poco permisivas para las infecciones por MVMp y MVMi (figuras 3A y 5). Sin embargo, MVMp produce una muy buena sinergia con fármacos de quimioterapia en la infección citotóxica de la línea de glioblastoma U373MG (figura 5, véase más abajo), lo que sugiere fuertemente que los tratamientos de quimioterapia genotóxica de GBM y otros cánceres portadores de la mutación p53-R273H en combinación con MVM pueden traer beneficios clínicos muy importantes.

• La mutación S366A. NGS observó la mutación tl096g, que implica el cambio de aminoácido S366A (una mutación sin sentido), en las poblaciones GS5 y GS7 globales y clasificadas independientemente de la infección por MVM. Esto sugiere que esta mutación por sí sola no beneficia ni inhibe la infección por parvovirus MVM. Es poco probable que esta mutación contribuya en cierta medida con otras en la permisividad de GS7 y GS5 a la infección por MVM, aunque esta posibilidad no se puede descartar con los datos disponibles. La mutación S366A reside en el extremo carboxilo de p53 y no se ha descrito en muestras de GBM (figura 2F). De hecho, su papel general en el cáncer humano parece poco relevante (figura 3J, a continuación).

En resumen, de este análisis pueden extraerse las siguientes conclusiones relevantes:

• Todas las poblaciones de GS que expresan la proteína citotóxica NS 1, que puede replicar el genoma MVMp a diferentes niveles, albergan en un determinado porcentaje alguna mutación TP53, o bien individualmente o bien acompañada de otra(s).

• Las mutaciones G245S y R273H que favorecen la infección por MVM en líneas celulares de GS y glioblastoma, respectivamente, son las mutaciones de p53 más frecuentes encontradas en GBM y otros cánceres humanos caracterizados genéticamente, lo que subraya la importancia del análisis.

• Las mutaciones P72R, V173L y E258K no se habían descrito previamente o se encontraron con una frecuencia muy baja en GBM. Sin embargo, aparecen con alta frecuencia en otros tipos de cáncer, lo que puede permitir extender la terapia basada en MVM a otros cánceres.

• Las mutaciones P72R (excepto un caso) y E258K no se han descrito previamente en GBM, sin embargo, se detectan en GS mediante NGS tras la infección por MVMp, lo que podría permitir el uso de MVM para el diagnóstico de mutaciones de p53 menores, aunque clínicamente relevantes, en tumores.

• GS que alberga mutaciones de TP53 que se correlacionan con la expresión de NS1 también induce la fosforilación de Pp53-S15, lo que debería promover la transcripción y replicación del virus.

• Por tanto, entre la gran heterogeneidad genética de las poblaciones de GS, incluso siendo la mayoría de las células wtTP53, el MVM se dirige específicamente a la infección citotóxica y, a veces, también a la replicación del genoma del virus, siendo la baja proporción de GS la que alberga *TP53* genéticamente alterado.

• La mutación TP53 más frecuente en el cáncer humano, R273H, no hace que las células sean permisivas para MVM por sí sola, pero sí promueve una importante citotoxicidad sinérgica del virus con la quimioterapia (véase más abajo).

Ejemplo 2.6. La expresión exógena de oncogenes que alteran p53 aumenta la permisividad de las líneas celulares de GS y glioblastoma a la infección por MVM.

La alta permisividad a la expresión de NS1 y la replicación del genoma de MVM en líneas cancerosas con tinción constitutiva de Pp53-S15 y que expresan oncogenes virales (figura 3A, arriba), llevó a investigar una posible conexión causal entre ambas características, si las células wtTP53 pudieran volverse susceptibles a MVM alterando funcionalmente p53 de forma exógena. La figura 4A muestra que los fibroblastos de ratón NIH3T3 que no son permisivos a la infección por MVMp aumentan sustancialmente la expresión de NS1 y la replicación del genoma del virus tras la transfección mediante un plásmido denominado “auxiliar”, que inactiva p53 mediante una degradación mediada por la expresión de oncogenes de adenovirus E1A, E1B y E4 orf6 e inactivan PKR mediante VA-ARN I [*Winter, K., von Kietzell, K., Heilbronn, R., Pozzuto, T., Fechner, H., y S. Weger. (2012). Roles of E4orf6 and VA I RNA inadenovirus-mediesated stimulation of human parvovirus B19 DNA replication and structural gene expression. J. Virol. 86, 5099-5109*]. En paralelo (figura 4D), las células GS5 infectadas con MVMp, que acumulan un alto DDR en respuesta a la expresión de NS1, aumentan sustancialmente la replicación del genoma viral si se transfectan con el plásmido “auxiliar” u otro plásmido que sólo expresa el oncogén E4orf6 [*Winter, K., von Kietzell, K., Heilbronn, R.,*

*Pozzuto, T., Fechner, H., y S. Weger. (2012). Roles of E4orf6 and VA I RNA inadenovirus-mediesated stimulation of human parvovirus B19 DNA replication and structural gene expression. J. Virol. 86, 5099-5109*]. Los resultados se confirmaron en células GS8, que son muy restrictivas para la replicación de MVMp aunque inducen p53 en células que expresan NS1 (figura 4B), pero se observa un aumento significativo en la replicación de MVM cuando los oncogenes se expresan mediante transfección (figura 4C). Esta estrategia experimental se tradujo a la infección por MVMi de células de glioblastoma U87-MG, que poseen una secuencia wtTP53 pero expresan una proteína p53 modificada postraduccional (figura 3). Consistentemente, la expresión de oncogenes también dio como resultado un aumento significativo en la replicación del genoma del virus medida por IF en confocal (figura 4E, izquierda) y citometría (figura 4E, derecha). Por tanto, los oncogenes de adenovirus que inactivan funcionalmente p53 aumentan la replicación de MVM en líneas celulares de GS y glioblastoma con wtTP53.

Ejemplo 2.7. Los fármacos de quimioterapia que alteran la fosforilación de p53 aumentan la expresión, la replicación y la capacidad del gen MVMp para destruir células de glioblastoma U373-MG que albergan la mutación TP53-R273H, muy frecuente en múltiples tipos de cánceres humanos.

Como la infección por MVM se correlacionaba con la expresión de Pp53-S15 (figuras 2 y 3), se estudió si la infección por el virus puede beneficiarse de una terapia combinada con fármacos quimioterápicos (CD) de uso común en regímenes clínicos (5FU, HU y Cis - Pt). Por ejemplo, CisPt es un fármaco de uso común en regímenes clínicos contra múltiples cánceres humanos (Dasari, S., y Tchounwou, P-B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.* 5 de octubre de 2014; 0: 364–378). Para este estudio, se usaron líneas celulares de glioblastoma humano con dos orígenes genéticos. En el primer estudio, U373MG que porta la mutación R273H se presenta con frecuencia en muchos tipos de cánceres humanos [*Muller, P.A., y Vousden, K.H. 2013. P53 mutations in cancer. Nat. Cell Biol. 13, 2-8*][*Brennan, C.W. et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. Cell 155, 462-477*], además en una búsqueda profunda en bases de datos actuales realizada por los inventores aparece como el más frecuente en GBM (figura 2F) y cáncer en general (figura 3J). La figura 5A muestra mediante análisis de citometría de flujo de U373MG infectado por MVMp (que permite determinar cuantitativamente los niveles de expresión de proteínas en las células), un aumento en el porcentaje de células que expresan la proteína NS1, así como en el nivel de expresión, en tratamientos de combinación con una sola dosis de los CD respecto a la infección simple. El tratamiento con CisPt determina el mayor incremento en ambos parámetros de expresión de NS1. Este beneficio probablemente esté relacionado con la inducción generalizada de Pp53-S15 en todas las células provocada por CisPt, que también se observa en las células tratadas y no infectadas. Este efecto se confirmó mediante IF en confocal (figura 5B).

Por consiguiente, se analizó el efecto de la dosis de CisPt sobre diferentes parámetros del ciclo de vida de MVMp y sobre la fosforilación de p53 y la señalización funcional en células U373-MG. Para esto, las células U373-MG tratadas con dosis de cisplatino (10-120 microM) durante 1 hora a 37 ºC se inocularon con MVMp para permitir la adsorción, y luego se dejó que la infección progresara durante 24 horas. Se tomaron muestras de las células y se procesaron para determinar marcadores macromoleculares de virus y determinaciones de Pp53-S15. Mediante IF en confocal se observó un aumento significativo en los niveles de Pp53-S15 en todo el intervalo analizado de 5-20 microM de dosis de Cis-Pt (figura 5C), de manera coordinada con el aumento (%) de la expresión de NS1 y la replicación del genoma del virus (ADNv) con respecto a la infección basal. Es de destacar que los niveles de replicación del genoma del virus se beneficiaron con CisPt 10 microM pero no con dosis más altas, lo que parece dañar la maquinaria de síntesis de ADNv. El aumento de los niveles de NS1 en las dosis de CisPt de 5 a 20 microM se confirmó mediante inmunotransferencia de tipo Western (figura 5D), que también reflejó alteraciones en los niveles de los factores p21 y MDM2 relacionados con la señalización funcional de p53.

Finalmente se analizó si estos efectos cooperativos de MVM/CisPt impactan en la viabilidad de las células cancerosas y, por tanto, si implican una importancia terapéutica. Tal como se observa en la figura 5E, el tratamiento simple de 1 hora con CisPt disminuyó progresivamente la viabilidad (ensayo clonógeno) de las células U373-MG, en correspondencia con su uso común como fármaco de quimioterapia en la clínica de oncología. Además, MVMp inoculado individualmente a dos MOI también disminuyó la viabilidad celular hasta cierto punto. Sin embargo, cuando se aplicaron CisPt y MVMp en combinación, la viabilidad celular disminuyó de manera muy significativa de manera aditiva (figura 5E, CisPt 5 y 10 microM). Esta cooperación conjunta entre el fármaco y el virus para destruir las células de glioblastoma humano U373-MG, que albergan la mutación TP53-R273H, puede generar importantes beneficios terapéuticos en los tratamientos contra los múltiples cánceres humanos que portan esta mutación (véase la figura 3J).

Ejemplo 2.8. Las dos cepas de parvovirus MVMp y MVMi, en terapia combinada con CD, aumentan su expresión y replicación génica, y su capacidad para destruir células de glioblastoma humano U87-MG que albergan modificaciones postraduccionales de p53.

En un segundo estudio, este análisis de la terapia combinada CD/MVM se extendió a la línea celular de glioblastoma humano U87-MG, que carece de mutaciones en TP53 pero expresa formas de proteína p53 modificadas postraduccionalmente (figura 3F). En el primer análisis se estudió una posible cooperación CD/MVMi. En el estado basal, las células U87-MG no mostraron una señal Pp53-S15 significativa, MVMi expresó niveles altos de NS1 pero no pudo replicar su genoma (figura 6D). Sin embargo, los tratamientos con HU y 5FU de células U87-MG no

infectadas aumentaron sustancialmente la fosforilación de p53 *per se* en el residuo Seri 5 (figura 6A, B). De manera coherente este efecto, cuando estos CD se administraron en dosis seleccionadas, aumentaron proporcionalmente los niveles de replicación del genoma del virus en estas células (figura 6C, D). Tal como se muestra en las figuras 6F y H, este aumento en la síntesis de ADNv correspondió a una mayor capacidad del MVMi para destruir células U87-MG en combinación con 5FU (cuyos efectos alcanzaron niveles de sinergia) y con OH-U (efectos aditivos). Las figuras 6E y G muestran como el aumento de la fosforilación de Pp53-S15 que acompaña a la infección (con respecto a las células no infectadas) es mayor en las dosis de CD, trayendo el mejor beneficio para el virus, lo que también determina una disminución más patente en los niveles de p21 (un marcador funcional de p53).

En un segundo análisis se analizó la cooperación CD/MVMp. La infección por MVMp de U87-MG (figura 7A) produce una proporción muy baja de células NS1+ incluso a una alta multiplicidad (MOI 10). Sin embargo, cuando las células se trataron con diferentes dosis de Cis-Pt antes de la infección, se observó un aumento muy significativo en el porcentaje de células NS1+ (figura 7A). Este aumento fue coherente con el de los niveles de Pp53-S15 que se correlacionan con la dosis de CisPt usada. El aumento coordinado de NSI/Pp53-S15 también se demostró mediante inmunotransferencia de tipo Western (figura 7B), que también reflejó alteraciones de p21. Tal como se describió anteriormente para U373MG, la replicación del genoma de MVMp (ADNv) también se benefició del tratamiento con Cis-Pt 10 o 20 microM, pero no de dosis más altas, lo que sugiere una mayor sensibilidad de las maquinarias replicativas del virus transcripcional a CisPt (figura 7A). El aumento en el % de células $NS1^+$ correspondió a la mayor capacidad de MVMp para destruir células U87-MG en combinación con CisPt, que alcanzó niveles de sinergia en las dosis de 10 y 20 microM (figura 7C). Curiosamente, la disminución de los niveles de p21 (un marcador funcional de p53) en las células infectadas fue más patente a estas dosis (figura 7B). Finalmente, la combinación de MVMp con 5FU (figura 7D) y HU (figura 7E) también produjo efectos aditivos coherentes en la muerte de células U87-MG en las dosis en las que estos CD inducen niveles más altos de Pp53-S15 en células no infectadas (véase la figura 6A y B respectivamente).

**REIVINDICACIONES**

1. Partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en: SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 para su uso en el tratamiento de cáncer, en la que el cáncer se caracteriza por presentar al menos una mutación en el gen *TP53* y/o en la proteína p53 seleccionada del grupo que consiste en: R273H, P72R, E258K, G245S, V173L y/o fosforilación de la proteína p53.

2. Partícula viral que comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en: SEQ ID NO: 1, según la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de cáncer, en la que el cáncer se caracteriza por presentar al menos una mutación en el gen *TP53* o en la proteína p53 seleccionada del grupo que consiste en: R273H, P72R, E258K, G245S, V173L y/o fosforilación de la proteína p53.

3. Partícula viral para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la fosforilación de la proteína p53 es constitutiva, o se ha inducido previamente por fármacos de quimioterapia genotóxicos o por virus oncogénicos.

4. Partícula viral para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la fosforilación de la proteína p53 consiste en la fosforilación del residuo Ser15.

5. Partícula viral para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, en la que el fármaco de quimioterapia genotóxico se selecciona del grupo que comprende: cisplatino, hidroxiurea, 5-fluorouracilo, gemcitabina o arabinósido de citosina.

6. Composición farmacéutica que comprende una partícula viral que a su vez comprende una secuencia de nucleótidos que consiste esencialmente en: SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en combinación con un fármaco de quimioterapia genotóxico.

7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que el fármaco de quimioterapia genotóxico se selecciona del grupo que comprende: cisplatino, hidroxiurea, 5-fluorouracilo, gemcitabina o arabinósido de citosina.

Figura 1

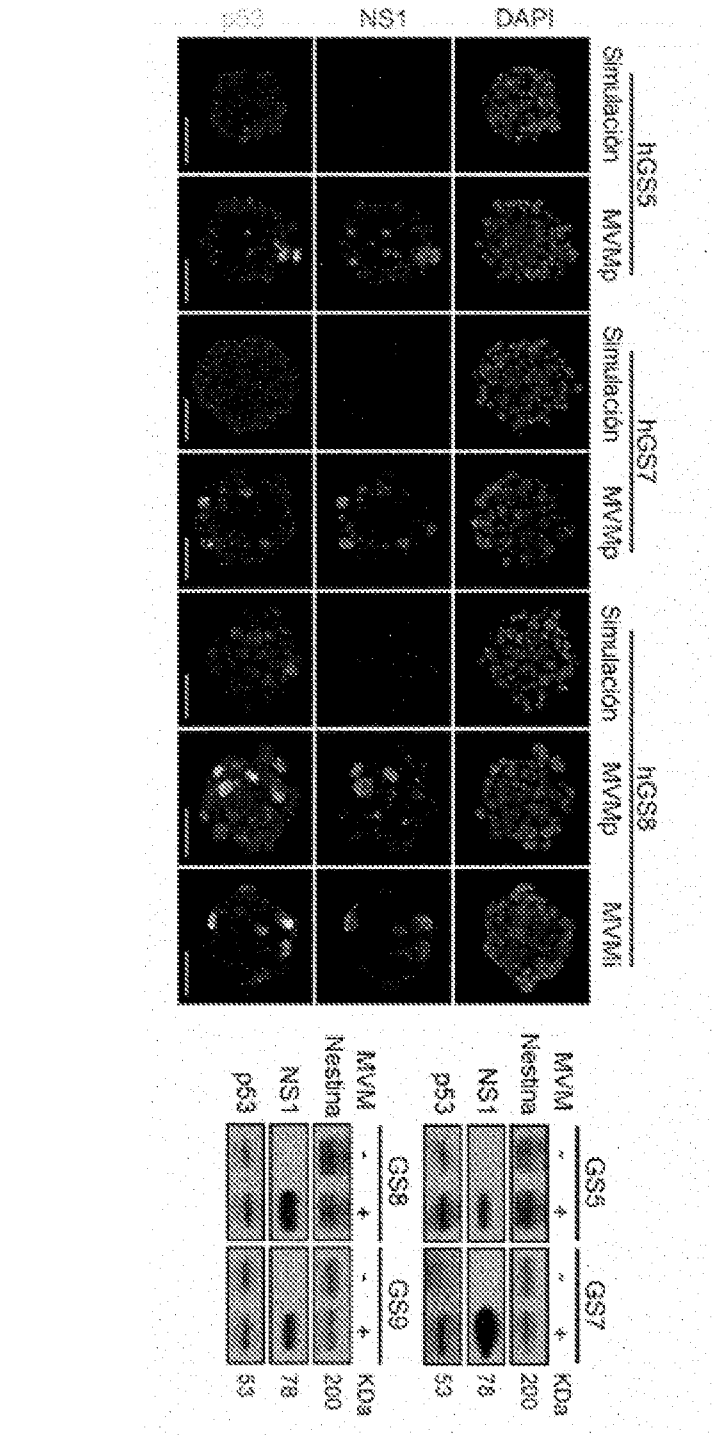
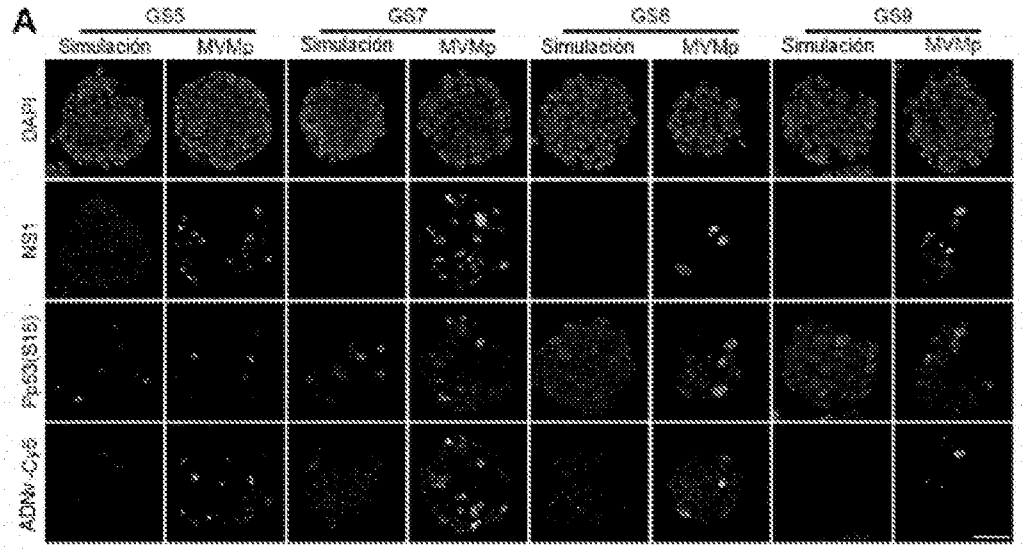

p53
NS1
DAPI
Simulación
MVMp
hGS5
hGS7
hGS8
MVMi
MVM
Nestina
NS1
p53
GS8
GS9
GS5
GS7
KDa
200
78
53

Figura 2


A
CS5
CS7
CS8
CS9
Simulación
MVMp
DAPI
NS1
PpS3(S1S)
ADNv-Cy5

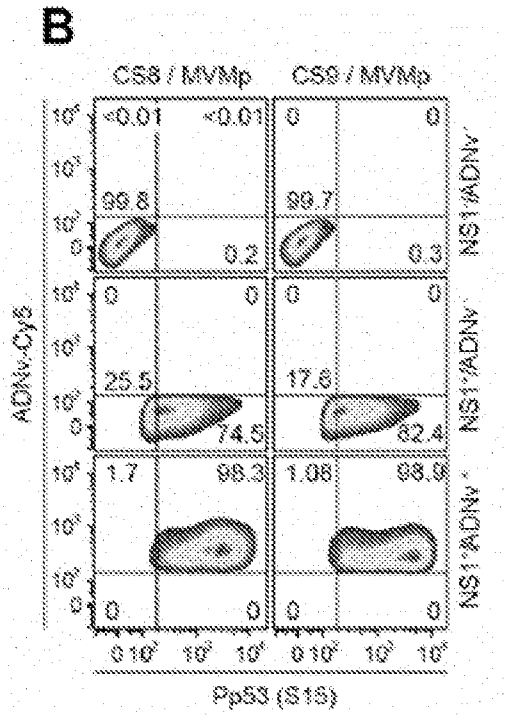

B
CS8 / MVMp
CS9 / MVMp
ADNv-Cy5
NS1+/ADNv+
NS1-/ADNv+
NS1+/ADNv-
PpS3 (S1S)
<0.01
99.8
0.2
99.7
0.3
25.5
74.5
17.6
82.4
1.7
98.3
1.06
98.9

Figura 2 cont.

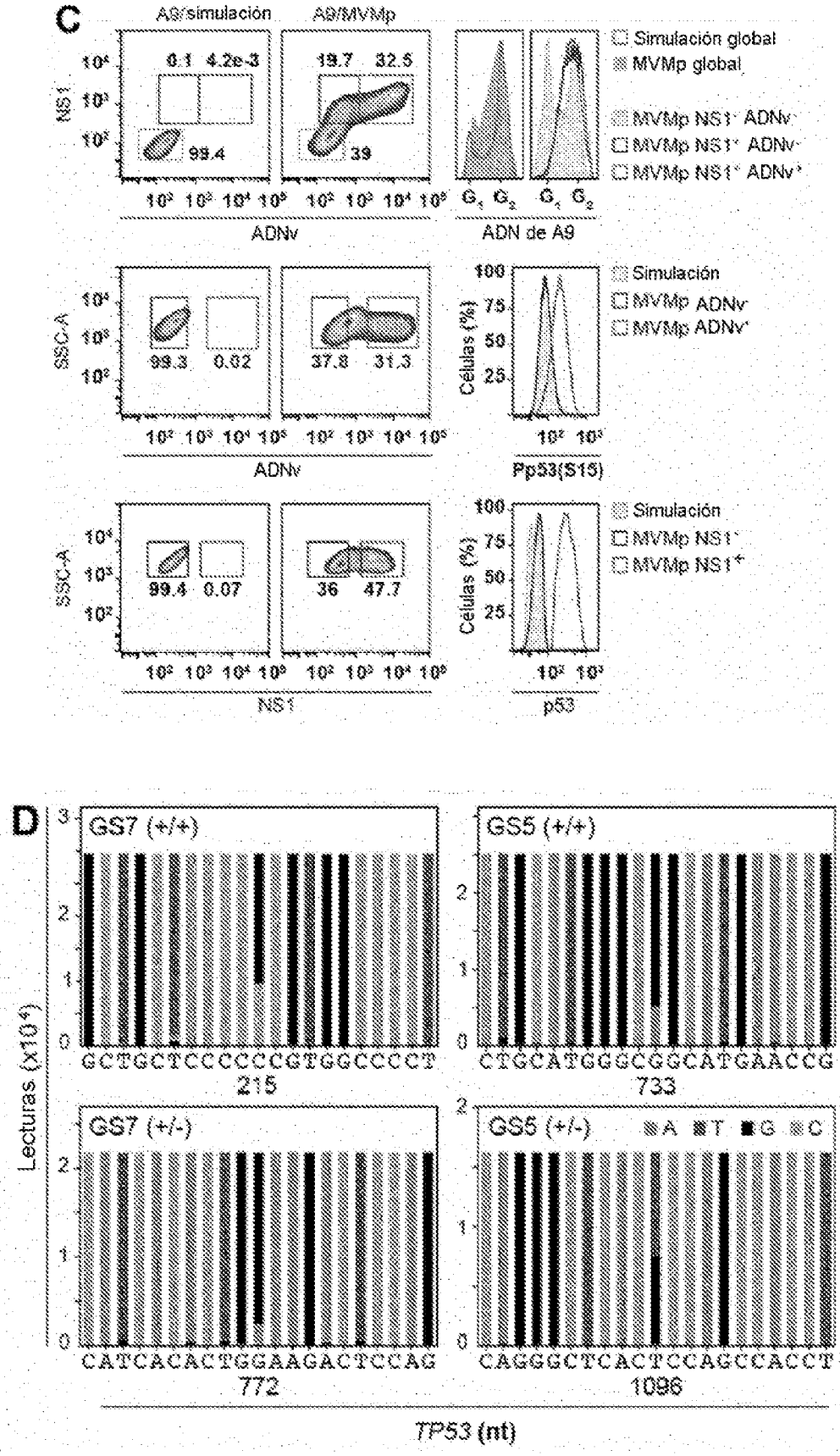
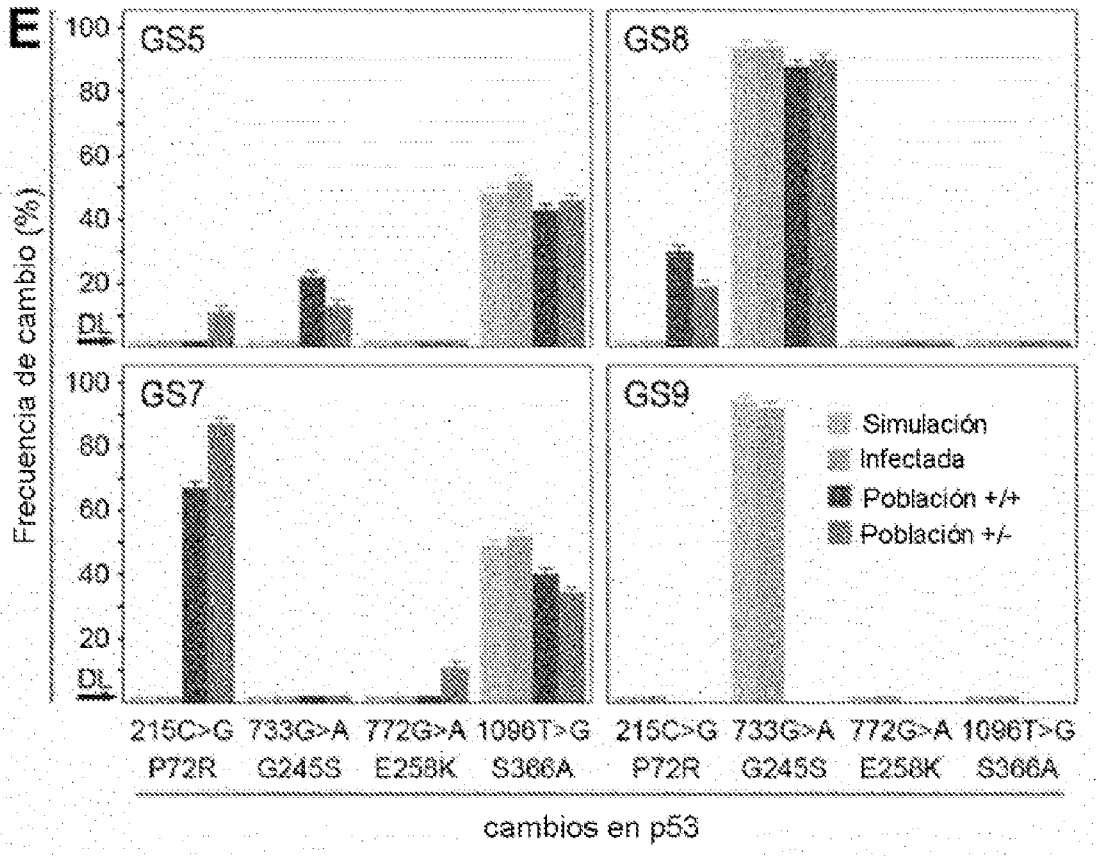


Figura 2 cont.



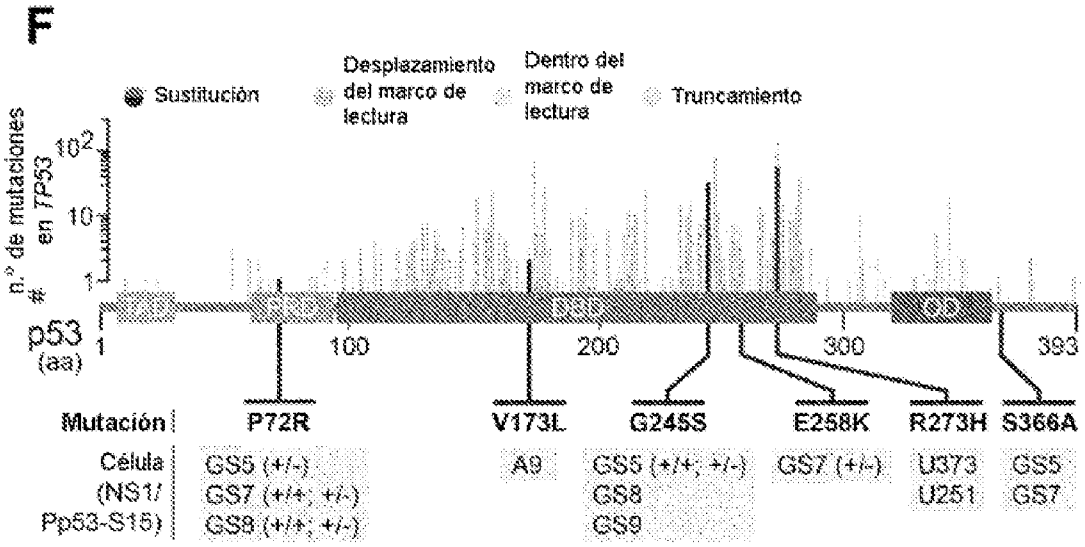
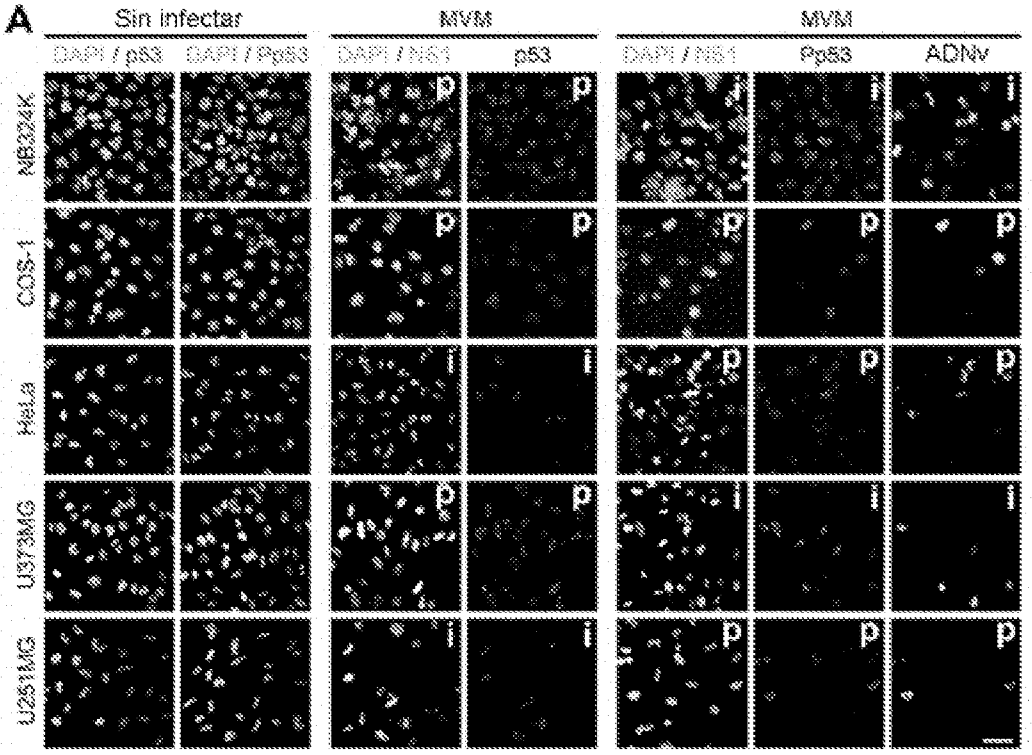



Figura 3


A
Sin infectar
MVM
MVM
DAPI / p53
DAPI / Pp53
DAPI / NS1
p53
DAPI / NS1
Pp53
ADNv
NB324K
COS-1
HeLa
U373MG
U251MG
p
i

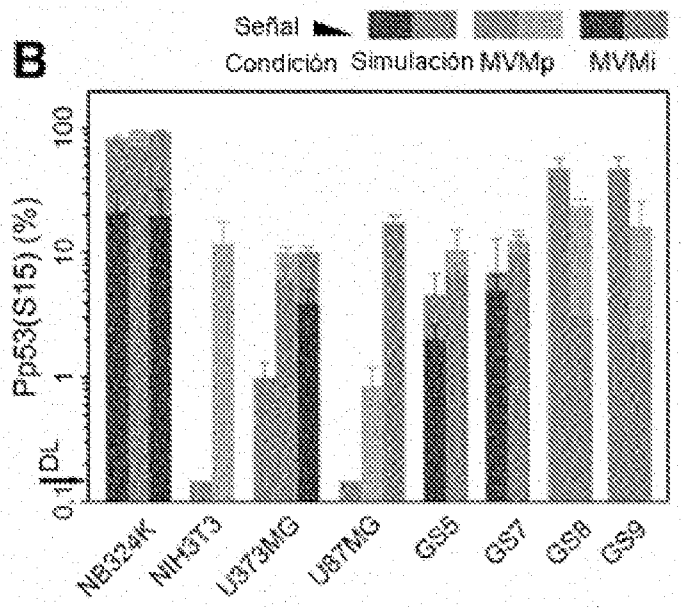
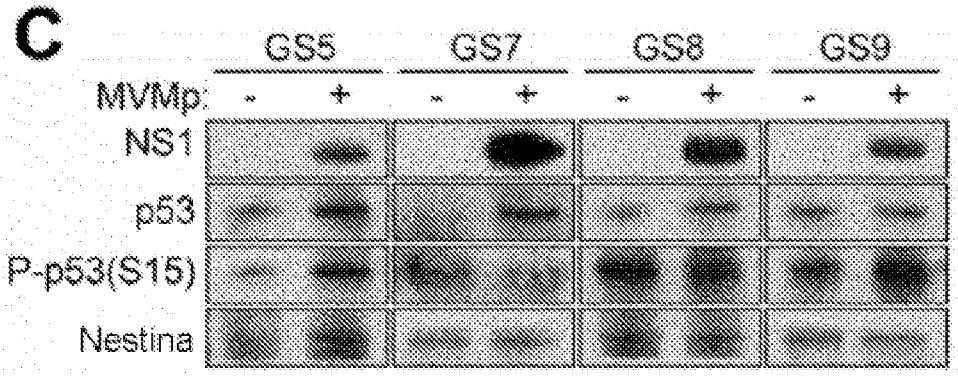
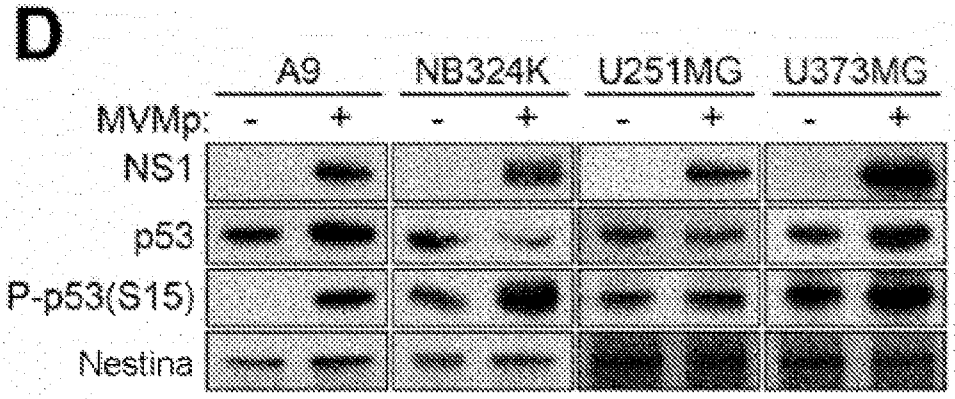

B
Señal
Condición
Simulación MVMp
MVMi
Pp53(S15) (%)
100
10
1
0.1
DL
NB324K
NIH3T3
U373MG
U87MG
GS5
GS7
GS8
GS9

Figura 3 cont.



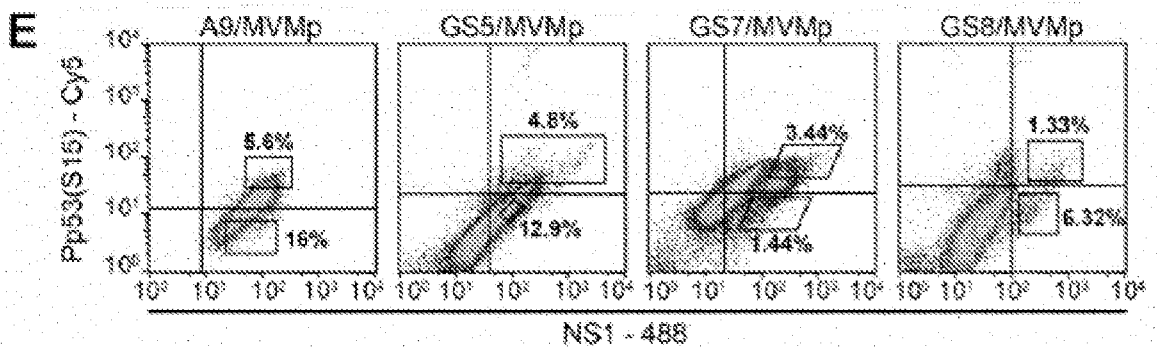
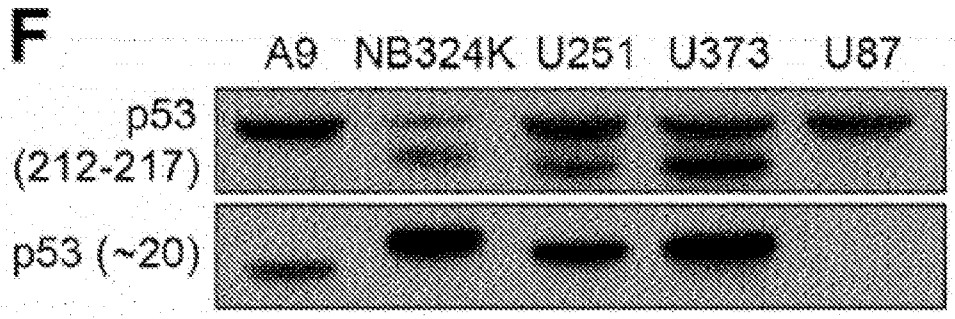



Figura 3 cont.



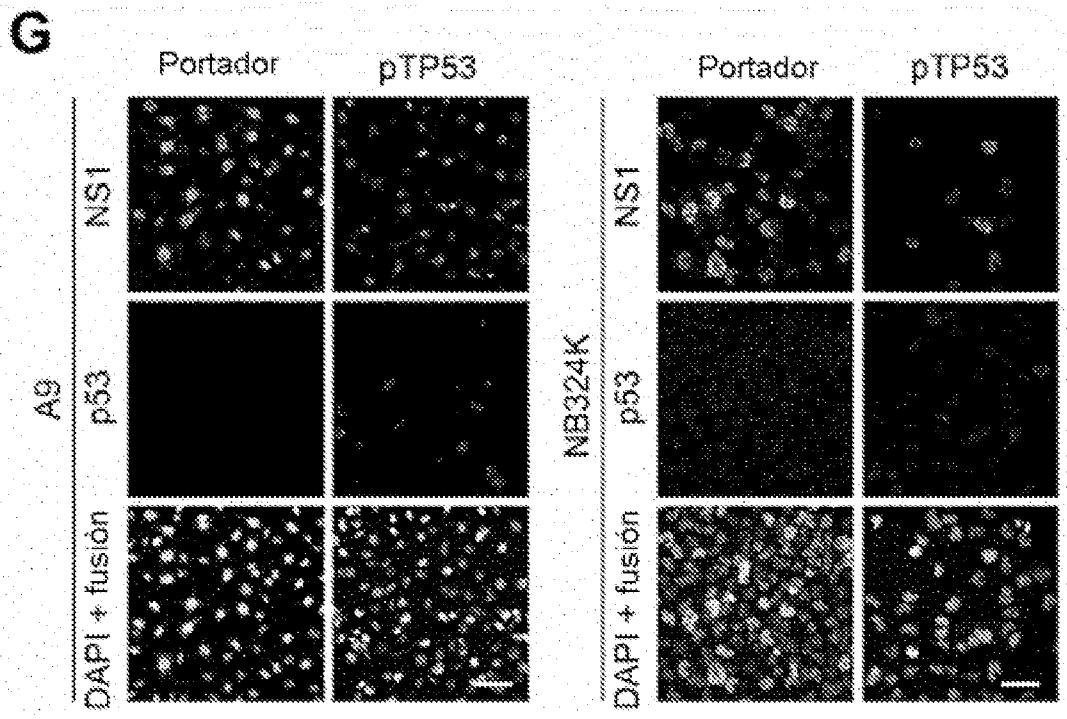



Figura 3 cont.

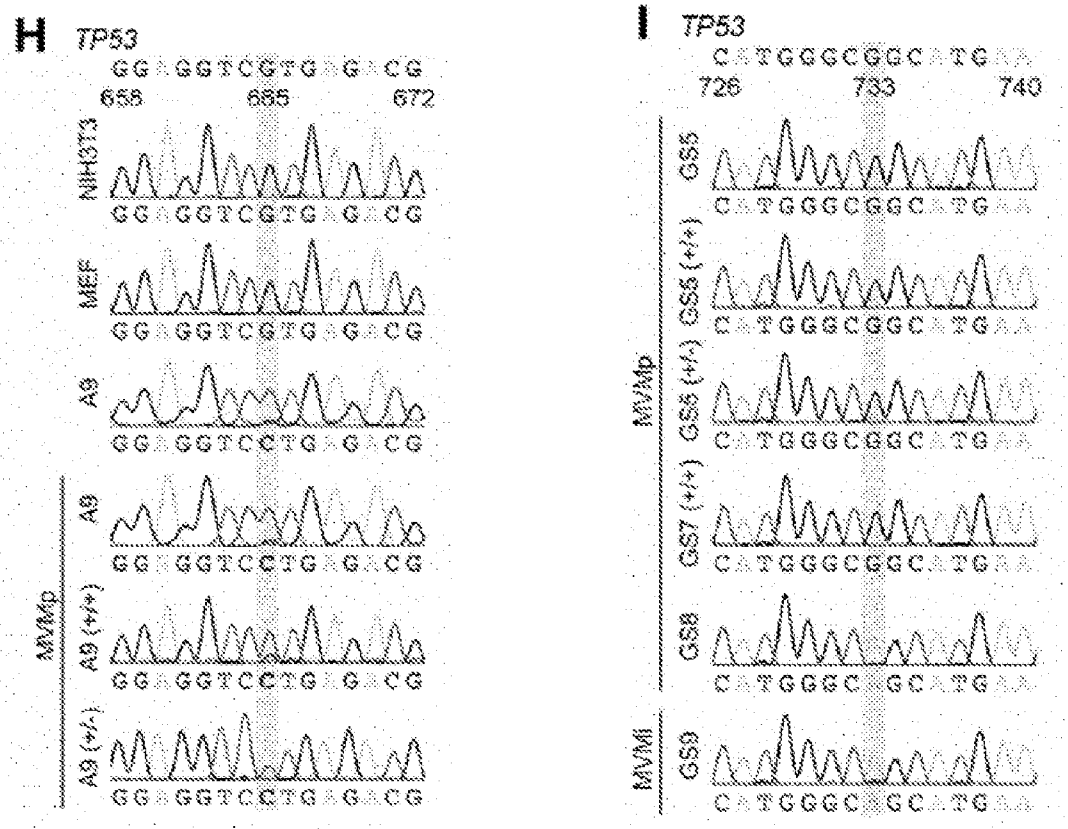


Figura 3 cont.

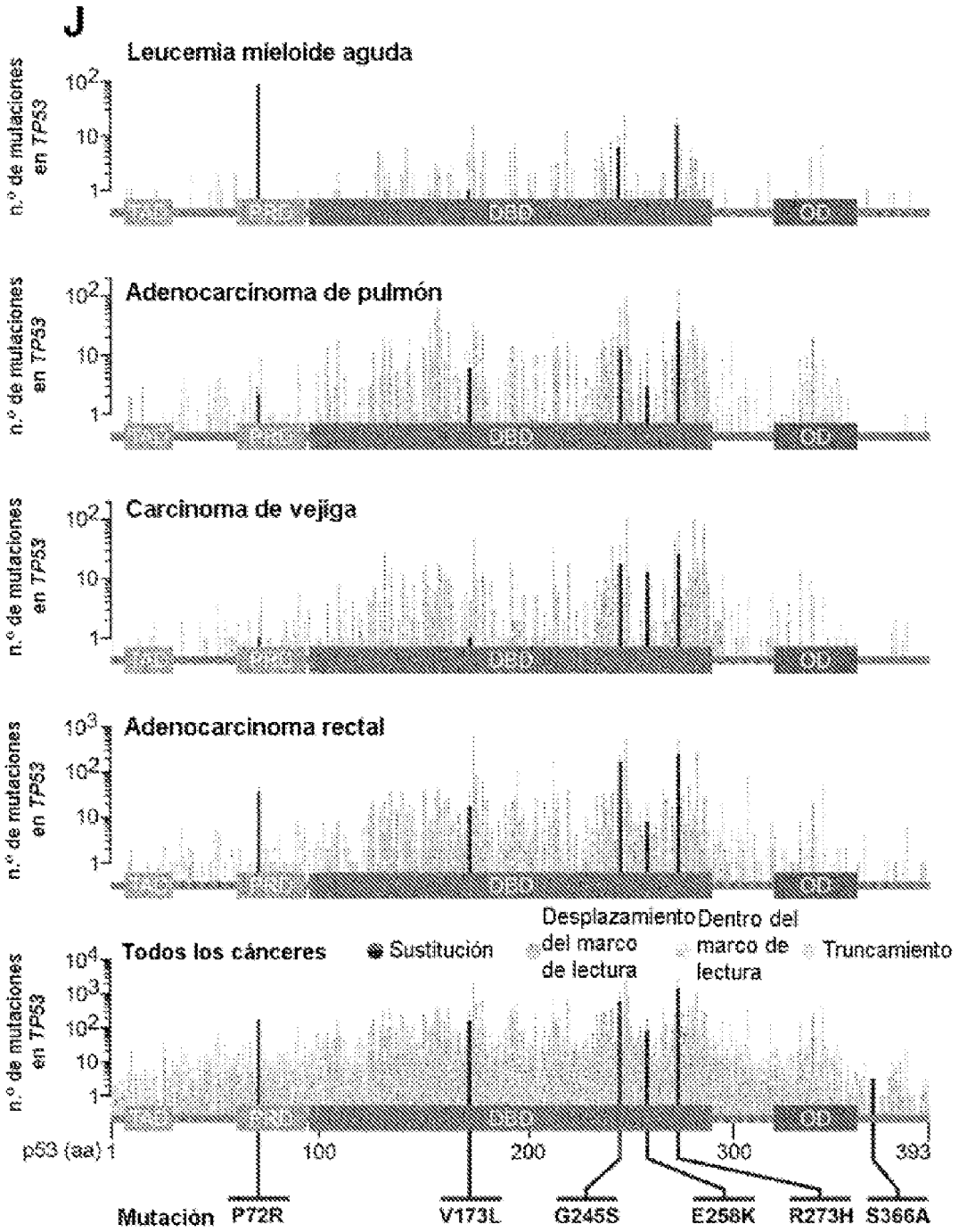


Figura 4

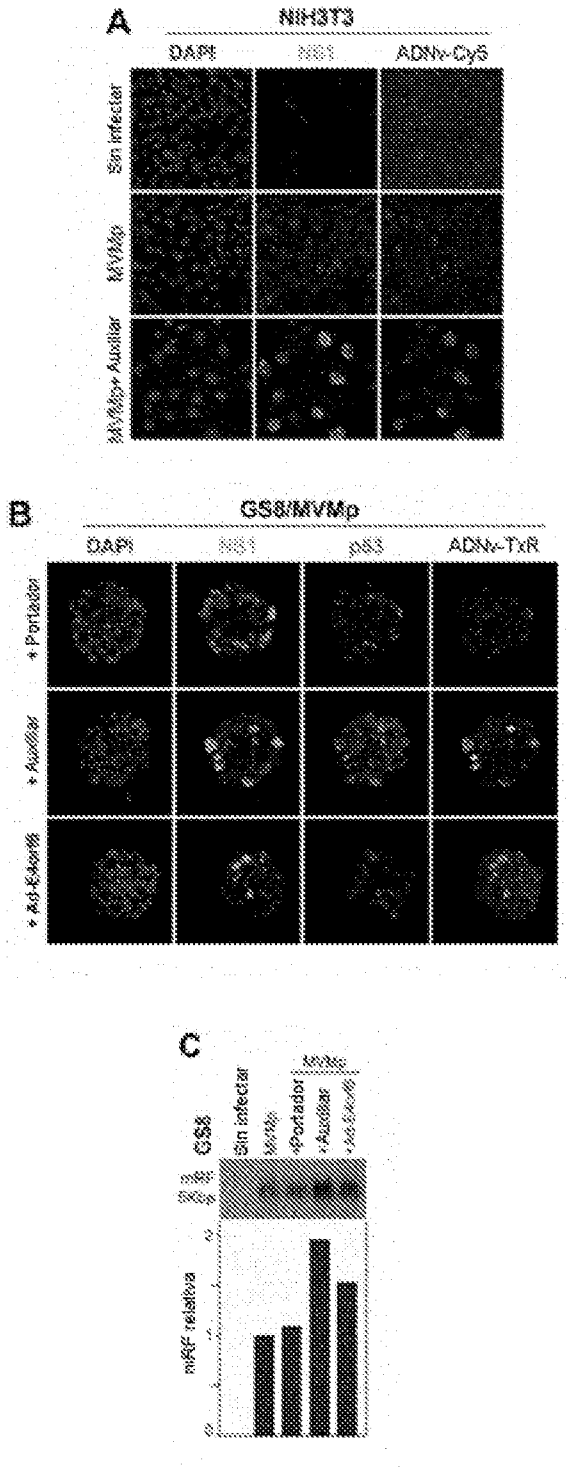
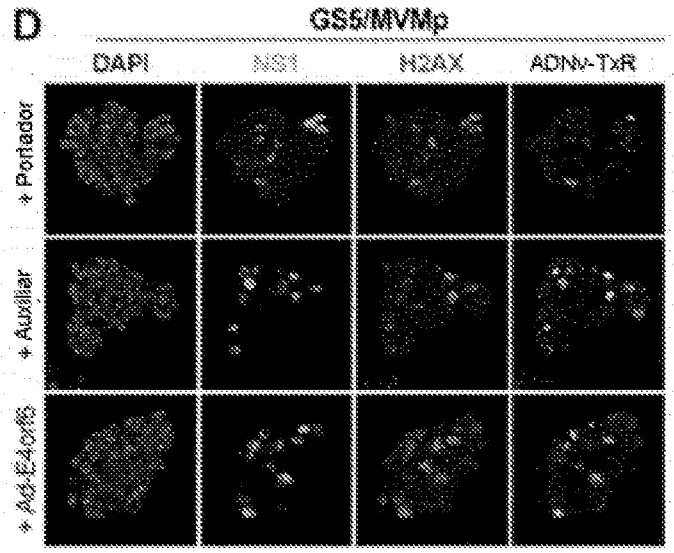

A
NIH3T3
DAPI
ADNc-Cy5
Sin infectar
MVMp
MVMp+ Auxiliar
B
GS8/MVMp
DAPI
pS3
ADNc-TxR
+ Portador
+ Auxiliar
C
GS8
Sin infectar
+Portador
+Auxiliar
ARNr relativo

Figura 4 cont.



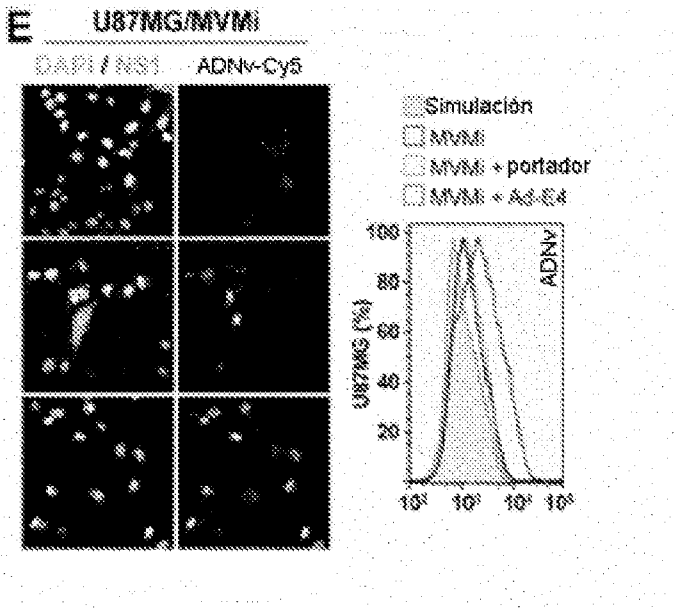



Figura 5

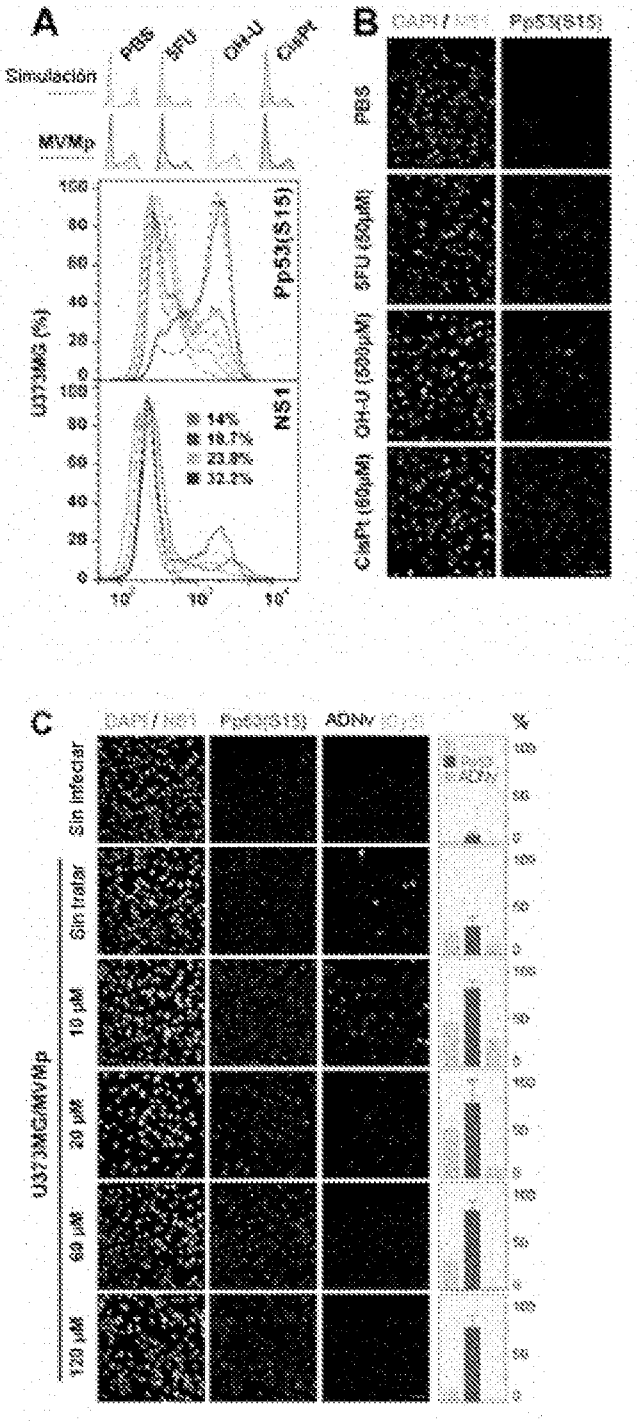
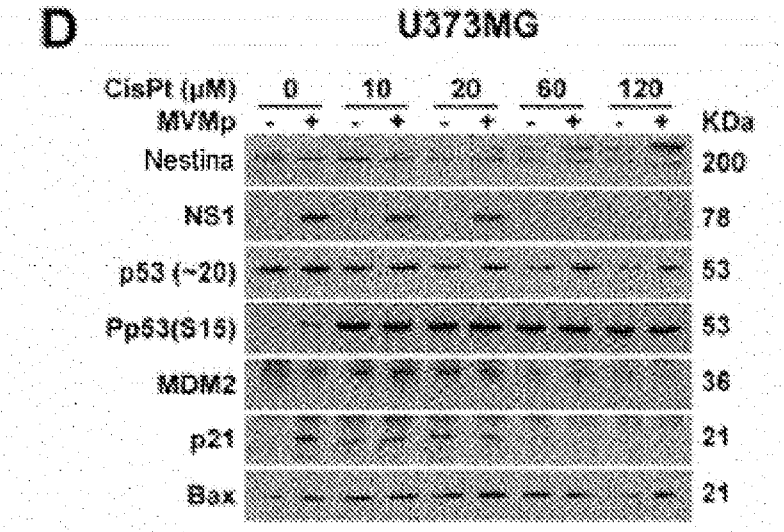

A
Simulación
MVMp
PBS
5FU
CH-U
CisPt
U373MG (%)
PpS3(S15)
NS1
B
DAPI / NS1
PpS3(S15)
PBS
5FU (50µM)
CH-U (600µM)
CisPt (60µM)
C
DAPI / NS1
PpS3(S15)
ADNv
Sin infectar
Sin tratar
10 µM
20 µM
60 µM
120 µM
U373MG/MVMp
%

Figura 5 cont.



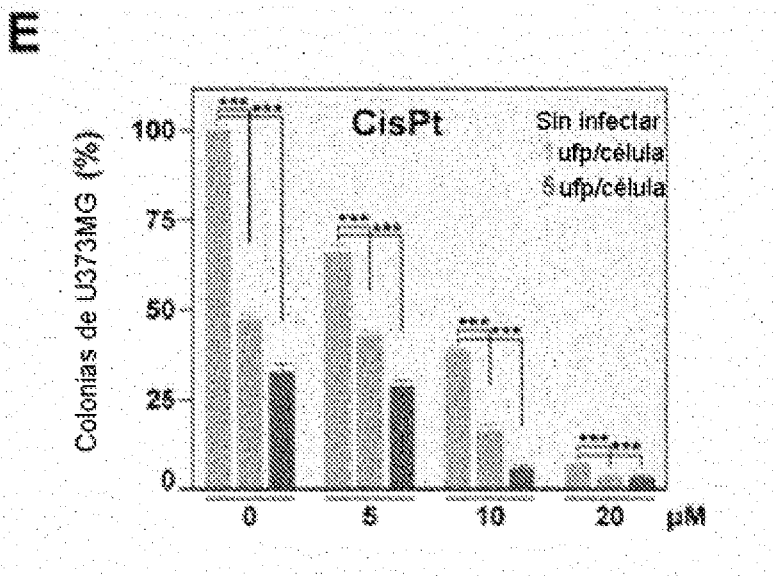



Figura 6

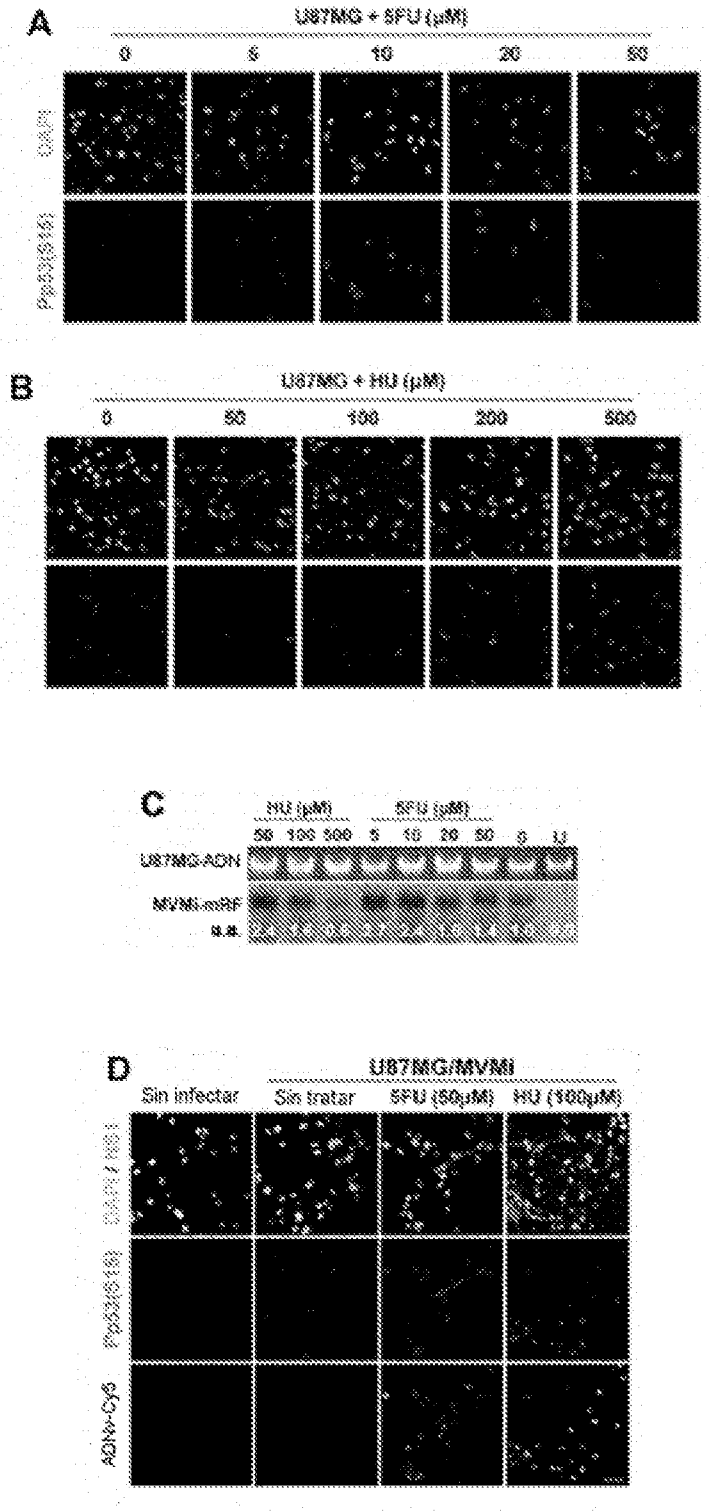

A
U87MG + 5FU (μM)
0
5
10
20
50
B
U87MG + HU (μM)
0
50
100
200
500
C
HU (μM)
5FU (μM)
50 100 500 5 10 20 50 0 U
U87MG-ACN
MVMi-mRF
D
U87MG/MVMi
Sin infectar
Sin tratar
5FU (50μM)
HU (100μM)

Figura 6 cont.

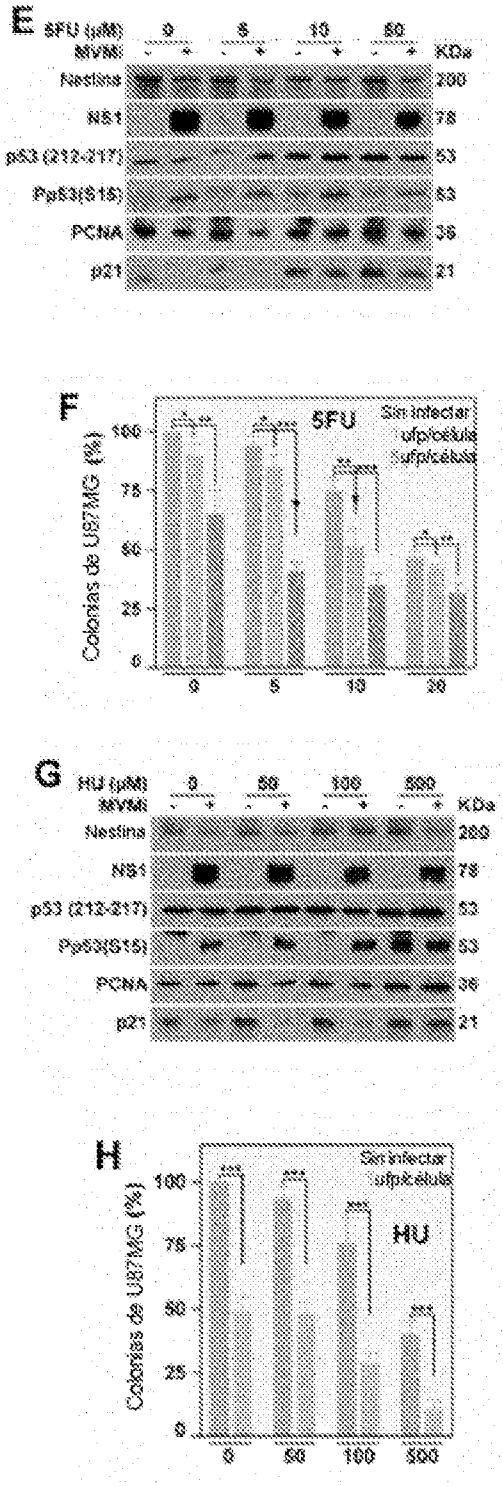


Figura 7

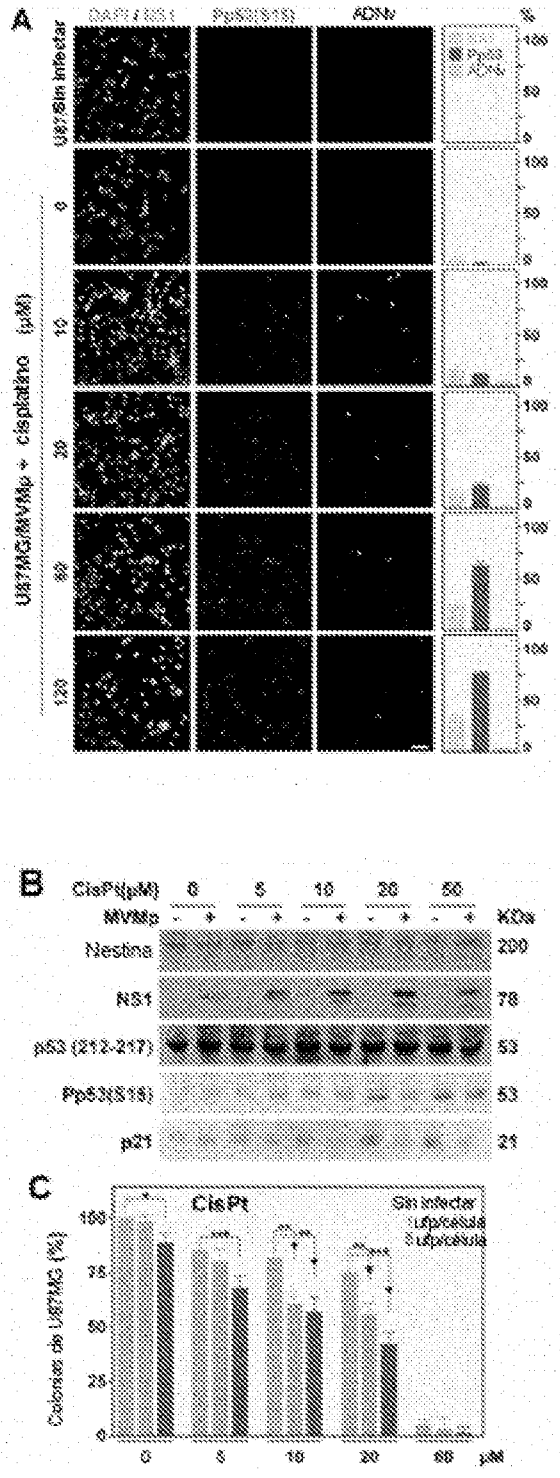

A
DAPI / GS1
Pp53(S15)
ADNv
%
U87MG/MVMp + cisplatino (µM)
B
CisPt(µM)
MVMp
KDa
Nestina
NS1
p53 (212-217)
Pp53(S15)
p21
C
CisPt
Sin infectar
Células de U87MG (%)
µM

Figura 7 cont.

