

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 492 691**

51 Int. Cl.:

A61K 35/76 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2011 E 11726102 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2579884**

54 Título: **Composición antitumoral**

30 Prioridad:

14.06.2010 US 354361 P

10.06.2010 EP 10165577

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

10.09.2014

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)

Wim de Körverstraat 35

5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

SCHRIER, CARLA CHRISTINA y

JAGT, HENRICUS JOHANNES MARIA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 492 691 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición antitumoral

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el Paramixovirus Aviar (APMV) para su uso en el tratamiento de un tumor en un mamífero.

10 El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) es miembro de los paramixovirus aviares (APMV) que son los causantes de infección en diversas aves. El NDV pertenece a los APMV 1. La enfermedad se caracteriza por la inflamación de las vías respiratorias, el cerebro o el tracto gastrointestinal.

15 Se sabe desde hace muchas décadas que el virus de la enfermedad de Newcastle tiene otra característica bastante inesperada: por razones parcialmente desconocidas, tiene ciertos efectos antitumorales en mamíferos. Por lo tanto, junto al interés por la vacunación de las especies de aves, hay un creciente interés en el uso del virus de la enfermedad de Newcastle y otros paramixovirus en los tratamientos contra el cáncer, incluyendo tratamientos contra el cáncer humano.

20 Cuando el virus de la enfermedad de Newcastle se replica en seres humanos, hablando en términos generales, el virus no se comporta de forma virulenta. El síntoma mejor conocido en seres humanos infectados con NDV es una conjuntivitis leve. Este tipo de conjuntivitis la padecen normalmente los veterinarios que se implican por primera vez en la vacunación de grandes cantidades de pollos con NDV activo atenuado.

25 Sin embargo, por razones que no se entienden bien, la patogenicidad es mucho mayor para células tumorales mamíferas, en comparación con la patogenicidad en células no tumorales. Se estima que ND se replica en células cancerosas hasta aproximadamente 100.000 veces más que en células normales.

30 El NDV no es solamente un APMV que tiene efectos anti-tumorales, tales como efectos oncolíticos. Actualmente, se conocen cepas oncolíticas de APMV 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, del virus Mapuera y del virus Fer-de-Lance, véase por ejemplo, la solicitud de la patente de los Estados Unidos US2009/0208495.

35 Hay dos tipos de APMV: Las cepas líticas y las cepas no líticas. Las cepas tanto líticas como no líticas pueden destruir células cancerosas, pero las células líticas tienen un modo un tanto más rápido de acción. (Schirmmacher, V. *et al.*, *Int. J. Oncol.* May 2001; 18(5): 945-52). Se supone que las cepas líticas dañan la membrana plasmática de las células infectadas, mientras que las cepas no líticas parecen interferir con el metabolismo de la célula. Las cepas tanto líticas como no líticas son, por lo tanto, tóxicas para las células tumorales, aunque a través de distintos mecanismos. Por lo tanto, con el fin de evitar cualquier confusión, las cepas tanto líticas como no líticas, se denominarán también cepas citotóxicas. Dado que en la bibliografía, las cepas líticas, también se denominan cepas oncolíticas, el término cepa lítica se referirá en este documento a las cepas oncolíticas.

40 Se han investigado cepas NDV tanto líticas como no líticas para su uso en la lucha contra el cáncer. Esto ha llevado al desarrollo de tres tratamientos básicos antitumorales:

- 1) Administración a un paciente, de una cepa de APMV lítica o no lítica.
- 45 2) Administración a un paciente de los llamados oncolisados que comprenden fragmentos de la membrana plasmática a partir de células cancerosas infectadas con APMV *in vitro*.
- 3) Administración a un paciente de células cancerosas intactas, infectadas con una cepa no lítica de APMV.

50 El fundamento del primer enfoque es que la propagación de la cepa del virus lítico y la posterior replicación de esa cepa, conducirá finalmente a la infección de todas las células tumorales del cuerpo. Una consecuencia desventajosa de este enfoque es que se inducirá una respuesta inmunitaria después de un tiempo, lo que puede neutralizar el virus parental y/o descendente.

55 El fundamento del segundo y del tercer enfoque es que los antígenos específicos de tumor en la superficie de las células tumorales se reconocen mejor cuando están asociados con los antígenos virales. La elección entre el segundo y el tercer enfoque depende de cuál se supone que ofrece una mejor respuesta; las membranas plasmáticas o las células enteras.

60 Las desventaja de los enfoques antitumorales 1, 2 y 3 basados en virus, es que se inducirá una respuesta inmunitaria contra el APMV después de un tiempo, lo que puede interferir con el virus parental y/o descendente, y bloquear así la infección de más células.

Este problema se ha tratado de varias maneras. Algunos enfoques se basan, entre otros, en la introducción, dentro del genoma viral, de un gen heterólogo que codifica un compuesto que interfiere con el sistema inmunitario del hospedador.

65

Otro enfoque es suministrar virus a (muy) altas dosis, varias veces por semana, con el fin de, o bien superar el efecto de los anticuerpos inducidos o inducir algún tipo de tolerancia inmunitaria contra el virus.

5 Otros enfoques intentan evitar la necesidad de segundas y posteriores rondas de infección viral, a través de un primer ataque muy fuerte. Esto puede hacerse, por ejemplo, a través de la administración combinada de NDV y algún fármaco antitumoral, tal como un compuesto citotóxico o citostático. Otros de estos enfoques se basan en la introducción en NDV de genes que codifican, por ejemplo, un anticuerpo completo de IgG dirigido contra un antígeno tumoral específico.

10 Una desventaja común de estos enfoques es que cada uno de ellos es más agravante para el paciente, en comparación con el tratamiento básico con concentraciones relativamente bajas de NDV. De este modo, hay una necesidad de enfoques alternativos que disminuyan los problemas asociados con la inducción de anticuerpos.

15 Un objetivo de la presente invención es proporcionar medios para disminuir los problemas asociados con la inducción de anticuerpos sin enfrentarse a las desventajas mencionadas anteriormente.

20 A este respecto, una realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un paramixovirus aviar (APMV) para su uso en el tratamiento de un tumor en un mamífero, en el que dicho tratamiento comprende la etapa de administración de una cantidad citotóxica de un primer APMV a dicho mamífero, seguido por la fase de administración de una cantidad citotóxica de un segundo APMV a dicho mamífero dentro de las 2-56 semanas desde la administración del primer APMV y en el que el segundo APMV tiene una proteína HN que es inmunológicamente diferente de la del primer APMV.

25 Todos los APMV llevan un gen que codifica la actividad de la hemaglutinina/neuraminidasa (HN) y un gen que codifica la proteína de fusión (F). La hemaglutinina/neuraminidasa, es un inductor potente de una respuesta inmunitaria protectora, mientras que la proteína de fusión, está también (aunque en menor medida), implicada en la inducción de una respuesta inmunitaria protectora.

30 Se ha descubierto sorprendentemente, que hay una reactividad inmunológica cruzada sorprendentemente baja entre la hemaglutinina/neuraminidasa y la proteína de fusión de los diversos miembros de los paramixovirus aviares (APMV). En algunos casos, la reactividad inmunológica cruzada es incluso prácticamente inexistente. Este descubrimiento inesperado abre nuevos enfoques que reducen, o preferentemente evitan los problemas asociados con la inducción inmunitaria después de la primera administración de la cepa de APMV.

35 Una forma de alcanzar este objetivo es administrar una cantidad citotóxica de un primer APMV a un mamífero, seguido por la administración de una cantidad citotóxica de un segundo APMV a un mamífero dentro de las 2-56 semanas después de dicha administración del primer APMV, cuidando que el segundo APMV tenga una proteína HN y una proteína de fusión que sea inmunológicamente diferente de la del primer APMV.

40 En este sentido, inmunológicamente diferente significa que la segunda proteína HN y la proteína de fusión son de un APMV que no pertenece al primer APMV. Simplemente como un ejemplo, si la proteína HN del primer APMV pertenece al APMV 1, la proteína HN del segundo APMV debe pertenecer a otro APMV, tal como APMV 3 o APMV 5, para considerarlo inmunológicamente diferente.

45 Siguiendo este enfoque, el segundo APMV se vería obstaculizado menos o incluso mucho menos por una posible respuesta inmunitaria contra el primer APMV, debido a la (muy) baja reactividad inmunológica cruzada entre los diferentes APMV. Esto permitirá la administración de varias rondas de virus a lo largo tiempo. La ventaja de este tipo de enfoque es clara, aún más cuando el tumor que se va a tratar es un tumor sólido. Especialmente en estos casos, no es probable que todas las células de la masa tumoral estén infectadas en el mismo momento. Al principio, el núcleo del tumor permanecerá sin ser atacado. Después de una primera administración de virus, esas células afectadas tendrán que morir y desaparecer antes de que las capas de células más profundas en la masa tumoral puedan infectarse. En ese momento, la inmunidad inducida contra el virus, bien podría haber eliminado el virus restante y como consecuencia no se destruirían estas capas celulares más profundas. Una segunda ronda de administración de APMV resolvería este problema, ahora, sin embargo, junto con una segunda (y cuando sea necesaria una tercera o más) cepa de APMV contra la cual no se haya inducido ninguna respuesta inmunitaria.

50 Hay varias formas de elegir o seleccionar el primer y el segundo APMV. Una forma fácil es utilizar uno de los APMV seleccionados del grupo que consiste en APMV 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, el virus Mapuera y el virus Fer-de-Lance como un primer APMV y otro APMV de este grupo como un segundo APMV. Simplemente como un ejemplo: se podría administrar una cantidad citotóxica de APMV 1 como un primer APMV, seguido por la administración de una cantidad citotóxica de APMV 3 dentro de las 2-56 semanas tras la primera administración.

65 Otra forma más elaborada pero elegante de seleccionar el primer y el segundo APMV, se basa en el hecho de que, como se ha mencionado anteriormente, la principal respuesta inmunitaria contra el APMV se dirige contra el HN del virus y, aunque en menor grado, a la proteína F. Simplemente reemplazando el gen que codifica el HN, y si se desea el gen que codifica la proteína F, de un APMV específico por el de otro APMV, se podría utilizar la misma cadena

principal de APMV dos veces: una vez como el tipo silvestre y una segunda vez como un tipo recombinante que lleva ahora el (gen que codifica el) HN y posiblemente también la proteína F de otro AMPV en lugar de la de entonces de tipo silvestre. Simplemente a modo de ejemplo, se podría utilizar el NDV como un primer APMV y un NDV recombinante basado en la misma cadena principal de NDV pero que ahora lleva el (gen que codifica el) HN y posiblemente también la proteína F de otro APMV, por ejemplo, APMV 3, como el segundo APMV, en vez del original NDV HN o la proteína fusión. El segundo (el NDV recombinante) APMV estaría (mucho) menos obstaculizado por la respuesta inmunitaria inducida contra el primer APMV porque (a pesar del hecho de que la base del segundo APMV sea NDV) los principales determinantes inmunogénicos del segundo (NDV recombinante) no serían el del NDV, sino de otro APMV, por ejemplo, de APMV 3.

El periodo de 2-56 semanas entre la administración del primer y el segundo APMV tiene el siguiente fundamento: algunos tumores crecen rápidamente, mientras que otros tumores, o incluso células tumorales que han desarrollado metástasis, pueden crecer lentamente o incluso ser "latentes" durante bastante tiempo. De este modo, dependiendo de las características del tumor, podría ser beneficioso dar un segundo APMV más temprano o más tarde en el tiempo. En muchos casos, el periodo sería más corto, entre la administración del primer y del segundo APMV, porque el tiempo de "latencia" es de menos de 56 semanas. Y además, se querría evitar un riesgo de sobrecrecimiento temprano de células. Por lo tanto, un periodo preferido sería entre 2 y 28 semanas, y más preferido entre 2-20, 2-16, 2-12 o incluso 2-8 semanas, en este orden de preferencia.

Este enfoque novedoso tiene la ventaja, sobre los enfoques actuales, de que depende únicamente de los efectos citotóxicos del APMV, por lo tanto, en principio, no es obligatorio el uso de fármacos citotóxicos o de compuestos o regímenes que interfieran en el sistema inmunitario y en la respuesta inmunitaria, como se ha indicado anteriormente, sobre los cuales se basan los enfoques conocidos.

Una ventaja adicional de la presente invención es la siguiente: si después de un tiempo, una célula tumoral "latente" (o que ha desarrollado metástasis comienza a dividirse, después de que el paciente haya sido tratado con la composición, de acuerdo con la invención en dos etapas, el procedimiento se puede repetir simplemente administrando un tercer APMV y si se desea APMV adicionales.

Teniendo en cuenta que se desencadena una determinada respuesta inmunitaria contra la proteína F, preferentemente el segundo APMV no solamente tiene una proteína HN que es inmunológicamente diferente a la del primer APMV, sino que también tiene una proteína F que es inmunológicamente diferente de la del primer APMV.

Debería entenderse que si, por ejemplo, se utiliza una cadena principal de NDV tanto en la primera fase como en la segunda fase, la proteína HN y la de fusión en el segundo NDV, el recombinante, debería originarse preferentemente a partir de una y a partir del mismo APMV no NDV. A modo de ejemplo, si el primer NDV es un NDV de tipo silvestre, el segundo NDV, el NDV recombinante, debería preferentemente llevar tanto la proteína HN, como la de fusión de, por ejemplo, APMV 4 o de APMVS y no la HN del APMV 4 y la proteína de fusión de APMVS.

De este modo, una realización preferente de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención en la que el segundo APMV tiene además una proteína F que es inmunológicamente diferente a la del primer APMV.

La elección de los virus es bastante extensa. Los APMV apropiados para tratamientos antitumorales se conocen y se han conocido en la técnica durante mucho tiempo. Por ejemplo, un resumen de las cepas que se utilizan en estudios contra el cáncer humano comprende, entre otros, la cepa 73-T (Cassel WA, Garrett RE. *Cancer* 18: 863-8, 1965), Ulster (Bohle W, Schlag P, Liebrich W, *et al.* *Cancer* 66 (7): 1517-23, 1990.), MTH-68 (Csatary LK, Moss RW, Beuth J, *et al.* *Anticancer Res* 19 (1B): 635-8, 1999) (Csatary LK, Eckhardt S, Bukosza I, *et al.* *Cancer Detect Prev* 17 (6): 619-27, 1993.), Italien (Mallmann P. *Hybridoma* 12 (5): 559-66, 1993), Hickman (Wheelock EF, Dingle JH. *N Engl J Med* 271(13): 645-51, 1964), PV701 (Pecora AL, Rizvi N, Cohen GI, *et al.* *J Clin Oncol* 20 (9): 2251-66, 2002.), HUJ (Freeman AI, Zakay-Rones Z, Gomori JM, *et al.* *Mol Ther* 13 (1): 221-8, 2006) y LaSota (Liang W, Wang H, Sun TM, *et al.* *World J Gastroenterol* 9 (3): 495-8, 2003).

Con respecto a la vía de administración, de nuevo, los conocimientos existentes en la técnica también dan a la persona experta, una amplia orientación. Se proporciona la siguiente visión de conjunto, simplemente como ejemplos de la técnica:

En estudios con animales, la infección por NDV se ha logrado mediante, entre otros, vía intratumoral, intraperitoneal e vía intravenosa, como se resume en Schirrmacher V, Griesbach A, Ahlert T., *Int J Oncol* 18 (5): 945-52, 2001. La infección por NDV por vía intramuscular o subcutánea se ha resumido en, entre otros, Heicappell R, Schirrmacher V, von Hoegen P, *et al.*, *Int J Cancer* 37 (4): 569-77, 1986.

En estudios con seres humanos, en casos en lo que los pacientes han sido infectados con una cepa de NDV lítica, se usa una inyección intratumoral, intravenosa o intramuscular (Cassel WA, Garrett RE, *Cancer* 18: 863-8, 1965, Csatary LK, Moss RW, Beuth J, *et al.* *Anticancer Res* 19 (1B): 635-8, 1999, Pecora AL, Rizvi N, Cohen GI, *et al.*, *J Clin Oncol* 20 (9): 2251-66, 2002, Csatary LK, Bakács T, *JAMA* 281 (17): 1588-9, 1999, Wheelock EF, Dingle JH, N

Engl J Med 271(13): 645-51, 1964, Csatory LK., Lancet 2 (7728): 825, 1971.

También se usan las siguientes vías: inhalación e inyección directa en el colon (es decir, a través de una apertura de colostomía). (Csatory LK, Moss RW, Beuth J, *et al.* Anticancer Res 19 (1B): 635-8, 1999 Jan-Feb, Csatory LK, Eckhardt S, Bukosza I, *et al.*, Cancer Detect Prev 17 (6): 619-27, 1993).

Además, se puede encontrar una amplia visión de conjunto del uso de APMV tales como el NDV en tratamientos anticáncer, en el Cuestionario de Descripción de Posición "Newcastle Disease Virus (PDQ®) Health Professional Version" del Instituto Nacional del Cáncer.

Una cantidad citotóxica de APMV es la cantidad de virus necesario para la inducción de la muerte celular. Teóricamente hablando, un APMV puede infectar y destruir una célula. Sin embargo, en un entorno práctico, se podría administrar una cantidad que es una gran cantidad del número de células tumorales para infectar. Las cantidades adecuadas se dan por ejemplo en Csatory LK, Eckhardt S, Bukosza I, *et al.*: Attenuated veterinary virus vaccine for the treatment of cancer. Cancer Detect Prev 17 (6): 619-27, 1993. Hablando en general, el comportamiento muy leve de la infección en células no tumorales en mamíferos, permite que se administren dosis relativamente altas. Serían dosis aceptables las dosis entre el amplio intervalo de 10^4 a 10^{12} ufp. Las dosis en el intervalo entre 10^5 y 10^9 ufp serían dosis preferibles para la mayoría de las aplicaciones. La bibliografía citada anteriormente da una amplia orientación al respecto.

Si se contrae una infección por enfermedad de Newcastle mediante una cepa de NDV cetogénica o mesogénica, la enfermedad se tiene que declarar obligatoriamente en casi todos los países occidentales. Por lo tanto, si se usan cepas de NDV en composiciones antitumorales, se elegirían cepas lentogénicas, con el fin de evitar la declaración obligatoria.

De todos los APMV, el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) es el virus más usado. Por lo tanto, puede haber algunas preferencias con respecto al uso de este virus, ya sea como el primer o el segundo APMV. Por lo tanto, una realización más preferente de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención en las que el primer APMV es el virus de la enfermedad de Newcastle.

En el caso de que el segundo APMV fuese un APMV recombinante, que lleva por lo tanto el (gen que codifica la proteína) HN y si se desea, también la proteína F de otro APMV en vez de los genes de tipo silvestre de los APMV, la cadena principal de APMV preferida tanto para el primer APMV como para el segundo es NDV.

Otro APMV atractivo es el APMV 3 ya sea como el primer APMV o como el segundo. Por lo tanto, otra realización más preferida de la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención en las que el primer APMV es el APMV 3.

Aún más preferentes son las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención en las que el primer APMV es el virus de la enfermedad de Newcastle y el segundo APMV es un APMV 3, o viceversa. Por lo tanto, una realización aún más preferente de la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención en las que el primer APMV es el virus de la enfermedad de Newcastle y el segundo APMV es el APMV 3.

Otra realización aún más preferente de la invención se refiere a las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención en las que el primer APMV es APMV 3 y el segundo APMV es el virus de la enfermedad de Newcastle.

Como se ha mencionado anteriormente, el APMV lítico actúa más rápidamente en el sentido de que destruye células más rápidamente, si se compara con APMV no líticos. Por lo tanto, preferentemente uno o más de los APMV tendrían que ser APMV líticos.

De este modo, una realización aún más preferente de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención, en las que al menos el primer o el segundo APMV es lítico.

Una forma más preferente de esta realización se refiere a las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención, en las que tanto el primer APMV como el segundo son líticos.

Especialmente en países desarrollados, hay un creciente interés en el cuidado de felinos y caninos que padecen cáncer. Como sucede en seres humanos, una mayor esperanza de vida aumenta la posibilidad de padecer cáncer en estos animales. Y se ha demostrado que las composiciones farmacéuticas, de acuerdo con la invención, funcionan muy bien en los felinos y caninos.

De este modo, otra forma de esta realización se refiere a composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención para su uso en animales de compañía, tales como especies de equinos, hurones, felinos y caninos. Preferentemente este tipo de composiciones serían para uso en especies de equinos y caninos, más preferentemente para su uso en especies caninas.

Como se ha indicado anteriormente, las composiciones farmacéuticas, cuando se usan como tales, tienen ventajas importantes sobre los enfoques conocidos contra el cáncer. No obstante, aún puede haber razones para combinar las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención con cualquier agente antitumoral. Se proporciona una lista extensa de este tipo de agentes antitumorales, por ejemplo, en la solicitud de patente de los Estados Unidos US2009/0208495.

Por lo tanto, otra forma de la realización, se refiere a las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención, en la que durante la administración de al menos el primer AMPV o el segundo, se administra conjuntamente una cantidad de agente antitumoral, tal como un fármaco citotóxico.

El primer AMPV y/o el segundo puede ser un AMPV recombinante que adicionalmente lleva un gen heterólogo, por ejemplo, que codifica una enzima para la conversión de un profármaco, o una proteína de unión. Dicha proteína de unión podría ser, por ejemplo, un anticuerpo. Otro ejemplo de este tipo de gen podría ser un gen que codifica una proteína de fusión que lleva un dominio de inmunoglobulina, como se describe en el documento WO 2006/050984.

De este modo, otra forma de esta realización se refiere a las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención en la que al menos el primer o el segundo APMV es un APMV recombinante que lleva un gen adicional.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención, debería en principio comprender el APMV en un vehículo farmacéuticamente aceptable, con el fin de permitir la administración del APMV. La naturaleza del vehículo depende, entre otros, de la vía de administración. Si la vía de administración es a través de la inhalación, el vehículo podría ser tan simple como agua esterilizada, una solución salina fisiológica o un tampón. Si la inyección es la vía preferente, el vehículo debería ser preferentemente isotónico y tener restricciones de pH que lo hagan adecuado para inyección. Tales vehículos, sin embargo, son ampliamente conocidos en la técnica.

Los ejemplos de vehículos farmacéuticamente aceptables, útiles en la presente invención incluyen estabilizantes tales como SPGA, carbohidratos (por ejemplo, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, glucosa, dextrano), proteínas tales como albúmina o caseína, proteínas que contienen agentes tales como suero bovino o leche desnatada y tampones (por ejemplo, tampón de fosfato). Especialmente, cuando se añaden tales estabilizantes a la vacuna, la vacuna es muy adecuada para la liofilización. La liofilización es un método muy adecuado para prevenir que el APMV se inactive. Por lo tanto, en una forma más preferida, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención está en forma liofilizada.

Los AMPV recombinantes que llevan un gen heterólogo pueden, entre otros, prepararse mediante técnicas, bien conocidas, de genética inversa para muchos virus de ARN de cadena negativa no segmentada que incluyen APMV. Véase por ejemplo, Conzelmann, J. Gen. Virol. 77: 381-389 (1996), Conzelmann, Ann. Rev. Genet. 32, 123-162 (1998), Palese *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 11354-11358 (1996), Peeters *et al.*, J. Virology 73: 5001-5009 (1999), Römer-Oberdörfer *et al.*, J. Gen virol. 80: 2987-2995 (1999).

Ejemplos

Ejemplo 1

Seguridad y replicación de diferentes cepas lentogénicas de APMV en perros

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El objetivo de este experimento fue evaluar si los paramixovirus aviares (APMV) lentogénicos NDV clon 30, NDV Ulster y AMPV 3, eran seguros y se replicaban en perros.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Breve descripción del experimento

Los tres (3) grupos de perros de raza Beagle, cada grupo con 2 animales, se inocularon por vía: oral, nasal, ocular y s.c. con un NDV clon 30 activo lentogénico, NDV Ulster o APMV 3 como se indica en la Tabla 1 "Agrupamiento y dosificación". Se usaron como controles de contacto (centinelas), 4 perros, que se dividieron en 3 grupos (1-1-2). Después de 3-6-9-13 y 15 días tras la inoculación, se tomaron hisopos orales, oculares y rectales. Los hisopos nasales se tomaron solamente el día 3 y 6 tras la inoculación. Se tomaron muestras de sangre todas las semanas hasta las 8 semanas tras la inoculación. A las 6 semanas tras la primera inoculación, los perros se inocularon por segunda vez por vía oral, nasal, ocular y s.c., ya sea con NDV clon 30 o con APMV 3 (véase la Tabla 1 "Agrupamiento y dosificación"). 3 y 6 días tras la 2ª inoculación, se tomaron hisopos orales, nasales, oculares y rectales. Se planea usar los hisopos en el reaislamiento del virus. 3 y 6 días tras la 1ª y la 2ª inoculación se tomaron muestras de orina por la vejiga urinaria (si fuese necesario, se usó un diurético). Tras un periodo de 14 días después de cada inoculación, se midió la temperatura de cada perro usando el chip implantado. Se observó diariamente a los perros, para detectar la aparición de signos clínicos de enfermedad o de otras anomalías. Después de ocho

semanas tras la 1ª inoculación, es decir, dos semanas tras la 2ª inoculación, los perros se sacrificaron y se investigaron macroscópicamente. Se tomaron muestras para histología del páncreas, bazo, hígado, riñón, cerebro, corazón, tráquea, pulmones y ganglio linfático inguinal.

5 2.2 Cepas utilizadas:

NDV Ulster activo: - 9,7 log₁₀ EID₅₀ por ml
 NDV clon 30 activo: - 9,5 log₁₀ EID₅₀ por ml
 APMV 3 activo: - 8,7 log₁₀ EID₅₀ por ml

Tabla 1: Agrupación y dosificación

grupo	N	1ª inoc.	2ª inoc.	Protocolo de inoculación (volumen en ml)			
				oral	ocular: izq. y dcha.	*intranasal: izq. & dcha.	s.c. (flanco izq.)
1	2	NDV Ulster	NDV. Clon 30	5,0	1x 0,25	1 descarga	1,0
2	1	--	--	--	--	--	--
3	2	NDV Clon 30	NDV Clon 30	5,0	1 x 0,25	1 descarga	1,0
4	2	--	--	--	--	--	--
5	2	APMV3	APMV3	5,0	1x 0,25	1 descarga	1,0
6	1	--	--	--	--	--	--

*La inoculación intranasal se realizó usando un nebulizador manual. 1 descarga es igual a ~ 72 ml.

10 2.3 Inoculaciones

Se inocularon a los perros con APMV activo de acuerdo con la Tabla 1 en T=0. Seis semanas tras la 1ª inoculación los animales recibieron la 2ª inoculación, como se indica en la tabla 1.

15 2.4 Muestras de sangre

Se tomaron muestras de sangre para serología de todos los animales cada semana, hasta las 8 semanas. Se tomaron muestras de sangre (coaguladas y heparinizadas) después de la 1ª y 2ª inoculación, a los 6 días en vez de a los 7 días. Se tomaron muestras de sangre (al menos 4-5 ml por perro) a través de la vena yugular de acuerdo con SOP 5619.074 y antes de la inoculación. Se usaron muestras de sangre (coagulada) para determinar los títulos de HI y de IFT.

20 2.5 Ensayo HI

25 Los niveles en suero de anticuerpos específicos de NDV se determinaron a las T=4, T=6 y T=8 semanas mediante un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI). Se prepararon diluciones dobles en serie de suero en placas de microtitulación y se mezclaron con un volumen igual que contenía 8 unidades de hemaglutinina/50 µl de antígeno de NDV. Los títulos se expresan como el recíproco de la mayor dilución que da la inhibición completa de la hemaglutinación de glóbulos rojos de pollo (en tampón salino al 1 % (v/v)). Las muestras se consideraron positivas para la inhibición de la hemaglutinación a dilución ≥1:2. Se examinó el suero de cada perro inoculado para ver la reactividad cruzada contra los 3 AMPV.

30 2.6 Ensayo IFT

35 Los niveles de suero de anticuerpos específicos de NDV a las T=4, T=6 y T=8 semanas también se determinaron mediante un ensayo de inmunofluorescencia (IFT). Las placas microtituladas se "recubrieron" durante la noche con 100 µl/pocillo de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) a 1.5 x 10⁶/ml en medio RPMI 1640 + una mezcla de antibióticos convencional + FCS al 5 % a 37 °C/CO₂ al 5 %. Después de 24 horas el medio se reemplazó con 100 µl a 1:100 en medio RPMI 1640 + virus de APMV diluido en medio de mezcla convencional de antibióticos (NDV Clon 30, NDV Ulster o APMV 3). Después de 24 horas las placas se vaciaron y las CEF infectadas se fijaron con 100 µl/pocillo de etanol helado al 96 % (-70 °C) durante 30 minutos. Se prepararon diluciones dobles de suero en serie en placas microtituladas (cerca de varios sueros de pollo NDV positivos y NDV negativos), se añadieron a las placas recubiertas (lavadas) y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, las placas se lavaron (3 veces) y se incubaron con anticuerpos policlonales IgG de cabra anti-perro (H+L) o de IgG de Cabra anti-pollo (H+L) marcados con FITC diluidos 1:20. Después de 1 hora a 37 °C las placas se lavaron (3 veces) y se añadió a cada pocillo 20 µl de PBS/glicerol (1:1). Los títulos se expresan como el recíproco de la mayor dilución que produce una señal

fluorescente específica. Los títulos de ≥ 12 se expresan como 13 (log2). Se examinó el suero de cada perro inoculado para ver la reactividad cruzada contra los 3 APMV.

5 2.7 Hisopos

A las T=3-6-9-13 y 15 días tras la 1ª inoculación, se tomaron hisopos orales, oculares y rectales. Se tomó un hisopo nasal solamente el día 3 y 6 tras la 1ª y la 2ª inoculación. El día 3 y 6 tras 2ª inoculación, se tomaron hisopos orales, oculares y rectales. Se recogieron hisopos en 2.5 ml de Triptosa al 2.5 % a los que se les añadió 1000 U/1000 µg por ml de Pen/Estrep (almacenado a -70 °C).

10 2.8 Orina

El día 3 y 6 tras la 1ª y la 2ª inoculación se tomó una muestra de orina por la vejiga urinaria (si fuese necesario, se usó un diurético).

15 2.9 Re-aislamiento del virus

20 Se realizó el reaislamiento del virus mediante la inoculación de huevos embrionados de 10 días de edad (N=8) con 0.1 ml de material de muestra sin diluir. Después de incubarse durante 4-6 días, el fluido alantoideo de todos los huevos, se ensayó con respecto a la actividad de HA, de acuerdo con el método de Spaerman y Kaerber (*en*: B. Bibrack y G. Whittmann, Editores, Virologische arbeitmethoden, Fisher Verlag, Stuttgart (1974), pp. 37-39).

25 2.10 Temperatura corporal

El día de la inoculación y durante un periodo de 14 días después de cada inoculación, se midió la temperatura de cada perro usando un chip implantado.

30 2.11 Observación

Los animales se observaron diariamente para detectar la presencia de señales clínicas de enfermedad u otras anomalías.

35 2.12 Histología y patología

Al final del experimento, es decir, 8 semanas después de la 1ª inoculación / 2 semanas después de la 2ª inoculación, todos los perros se sacrificaron y se investigaron macroscópicamente. Se tomaron muestras de histología del páncreas, bazo, riñones, cerebro, tráquea, pulmones y ganglio linfático inguinal.

RESULTADOS

Tabla 2: títulos de anticuerpo de IF y HI de NDV

Grupo	Sensibilización	Refuerzo	Número de animal	Log2 del título de anticuerpo IF de NDV a las...								
				4 semanas tras la sensibilización			6 semanas tras la sensibilización			2 semanas tras el refuerzo		
				PMV-3	Ulster	Clon 30	PMV-3	Ulster	Clon 30	PMV-3	Ulster	Clon 30
1	NDV Ulster	Clon 30 de NDV	4053	<4	8	8	<4	8	7	<4	10	13
			4184	<4	9	8	<4	8	7	<4	11	13
2	-	-	4824	<4	6	7	<4	<4	<4	<4	<4	<4
3	Clon 30 de NDV	Clon 30 de NDV	4086	<4	9	10	<4	9	9	<4	11	13
			4781	<4	9	10	<4	9	9	<4	11	13
4	-	-	4758	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
			4792	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4
5	PMV-3	PMV-3	4171	5	<4	<4	<4	<4	<4	7	<4	<4
			4757	5	<4	<4	<4	<4	<4	11	<4	<4
6	-	-	4829	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4	<4

Nota: Los perros se reforzaron a las 6 semanas tras la sensibilización

Los títulos de ≥ 12 están en la tabla expresados como 13 (log2)

Grupo	Sensibilización	Refuerzo	Número de animal	Log2 del título de anticuerpo HI de NDV a las...								
				4 semanas tras la sensibilización			6 semanas tras la sensibilización			2 semanas tras el refuerzo		
				PMV-3	Ulster	Clon 30	PMV-3	Ulster	Clon 30	PMV-3	Ulster	Clon 30
1	NDV Ulster	Clon 30 de NDV	4053	<1	3	4	<1	<1	3	<1	7	7
			4184	<1	<1	4	<1	<1	<1	<1	7	8
2	-	-	4824	<1	<1	3	<1	<1	<1	<1	<1	<1
3	Clon 30 de NDV	Clon 30 de NDV	4086	<1	<1	4	<1	<1	3	<1	6	8
			4781	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	5	7
4	-	-	4758	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
			4792	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
5	PMV-3	PMV-3	4171	<1	<1	<1	<1	<1	<1	7	<1	<1
			4757	<1	<1	<1	<1	<1	<1	10	<1	<1
6	-	-	4829	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1

Nota: Los perros se reforzaron a las 6 semanas tras la sensibilización

3.1 Títulos de anticuerpos IF y HI de NDV

Títulos de anticuerpos IF de NDV: 4 semanas después de la 1ª inoculación, se pudieron detectar los anticuerpos contra el APMV inoculado en Gr1, Gr3 y Gr5, lo que indica que estas cepas de APMV se replicaron en el perro e indujeron anticuerpos. A partir de los datos también queda claro que los anticuerpos inducidos contra el NDV Ulster presentan una reacción cruzada con el NDV clon 30 y viceversa. Esto no sucede para los anticuerpos específicos del APMV 3 que no tienen ninguna reacción cruzada con el NDV Ulster ni con el NDV clon 30. A las 6 semanas tras la 1ª inoculación, los títulos de anticuerpos son comparables con los datos de las 4 semanas. Curiosamente, a las 2 semanas tras la 2ª inoculación (los perros recibieron una 2ª inoculación a las T=6 semanas) se pudo detectar en todos los grupos un aumento en el título de anticuerpos. Esto indica que la segunda inoculación con virus activo induce un efecto de refuerzo, lo que dio lugar a un mayor título de anticuerpos debido a la replicación del virus.

Títulos de anticuerpos HI de NDV: a partir de estos datos, queda aún más claro que la segunda inoculación con virus activo, induce un fuerte efecto de refuerzo, lo que dio lugar a altos títulos de anticuerpos. Especialmente en Cr1 y en Gr3, queda claro que el título de anticuerpos se redujo a las T=6 semanas en comparación con las T=4 semanas, y que a las 2 semanas tras la 2ª inoculación, los títulos de anticuerpos se incrementan de nuevo y son más altos en comparación con las T=4 semanas. Estos datos también indican que el virus se replica en el perro.

3.2 Hisopos y muestras de orina

Los hisopos orales, oculares y rectales y las muestras de orina que se recogieron de todos los perros a los 3 y 6 días tras la primera inoculación se usaron para el reaislamiento del virus. Todas las muestras se puntuaron negativas.

3.3 Temperatura corporal y observación

El día de la inoculación y durante un periodo de 14 días tras cada inoculación, se midió la temperatura corporal de cada perro usando el chip implantado. No se observaron cambios de temperatura destacables. Durante el experimento no se hicieron observaciones destacables con respecto a la aparición de signos clínicos de enfermedad o de otro tipo de anomalías en los perros.

3.4 Histología y patología

Al final del experimento, todos los perros se sacrificaron y se investigaron macroscópicamente. Las observaciones macroscópicas revelaron que en 1 perro de Gr5, se observó una gran mancha blanca en el bazo, de 3 mm de espesor. Esto correspondió microscópicamente a un hematoma subcapsular agudo moderado focal. Los hematomas de bazo en perros son casi siempre de origen traumático. Todos los otros animales no presentaron lesiones macroscópicas en la necropsia. Se tomaron muestras de histología del páncreas, bazo, hígado, riñón, cerebro, corazón, tráquea, pulmones y ganglio linfático inguinal. Se concluyó que la inoculación de paramixovirus aviares lentogénicos a través de la vía nasal, ocular y oral, dio lugar a lesiones inflamatorias en los pulmones, especialmente en perros que fueron inoculados con NDV clon 30 y con NDV Ulster. Se observó una lesión inflamatoria de páncreas y una hemorragia grave, en un perro inoculado con APMV 3.

Conclusión:

- 1) El NDV Clon 30, el NDV Ulster y el APMV 3 son infecciosos para perros y son capaces de replicarse en perros.
- 2) No se encontraron signos clínicos en los perros, y no se pudo reaislar ningún virus. Esto demuestra que el uso de tales virus en perros es seguro.
- 3) No existe ninguna inmunidad cruzada entre las cepas de NDV y la cepa de APMV 3.

Ejemplo 2

Crecimiento de APMV 3 en una línea celular tumoral humana

Células utilizadas para el cultivo celular:

Línea celular de cáncer de colon humano CL 188

Medio de cultivo utilizado:

CL 188:

RPMI 1640 + FBS al 10 %+ 1x mezcla convencional de antibióticos + L-glutamina + anfotericina B 2 µg/ml (medio de cultivo)

RPMI 1640 + FBS al 2 %+ 1x mezcla convencional de antibióticos + anfotericina B 2 µg/ml (medio de mantenimiento).

ES 2 492 691 T3

Cepa del virus:

Paramixovirus Aviar de tipo 3
9,7 log₁₀ EID₅₀/ml

5

Fuente del huevo:

L11103 huevos embrionados de 10 días de edad
L11203 huevos embrionados de 11 días de edad

10

Titulación y ensayo HA:

- Triptosa al 2,5 %
- Pen-Estrep
- 15 - Glóbulos rojos de pollo al 5 %
- PBS al 0,1 M

Inoculación de células con APMV 3

20 Se recogió 1 matraz de cada línea celular / medio de cultivo después del pase.

Las células se contaron para determinar el factor de dilución para la inoculación viral con un MOI de 0,1 (CL 188).

Las diluciones se hicieron en el medio de cultivo apropiado.

25

La inoculación de las células se realizó como sigue: se retiró el medio de cultivo de células adherentes (CL 188). A continuación, se añadió a las células 1 ml de virus. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C después de lo cual, se añadieron a las células 4 ml de medio de cultivo nuevo + virus.

30 Las células se incubaron a 37 °C durante otros 4 días.

Después de la inoculación, el resto de virus diluido se almacenó a -20 °C.

Después de 4 días, los matraces de cultivo se congelaron-descongelaron a -20 °C tres veces.

35

Después de la última descongelación las células se transfirieron a un tubo de 15 ml y se centrifugaron durante 5 minutos a 200 x G.

El sobrenadante se recogió y se almacenó en tubos criogénicos a -70 °C.

40

Determinar el crecimiento viral por titulación en los huevos:

Las titulaciones se realizaron en la recolección y el inóculo del virus se cultivó en células CL 188 con FBS al 2 %.

45 Las muestras se diluyeron 10 veces en triptosa hasta conseguir una dilución de 10⁻⁷.

Se inyectaron huevos embrionados de 10 días de edad con 0,2 ml de muestra diluida (dilución 10⁻² /10⁻⁷). Los huevos se incubaron durante cuatro días a 37 °C.

50 Los títulos se determinaron mediante el ensayo HA.

Las titulaciones se repitieron en la recolección y el inóculo de virus se cultivó en células CL 188 con FBS al 2 %.

55 Las muestras se diluyeron 10 veces en triptosa hasta conseguir una dilución de 10⁻⁴ (inóculo de CL 188) o de 10⁻⁵ (cosecha de CL 188).

Se inyectaron huevos embrionados de 11 días de edad con 0,2 ml de muestra diluida (dilución de 10⁻¹/10⁻⁴ para el inóculo CL 188 o una dilución de 10⁻²/10⁻⁵ para la recolección de CL 188).

60 Los huevos se incubaron durante tres días a 37 °C.

Los títulos (log₁₀) se determinaron mediante el ensayo HA.

RESULTADOS

Después de 4 días de incubación, fue visible un CPE claro (células muertas) en las células CL 188 infectadas con APMV 3.

5

Resultados de la titulación

Muestra	1ª titulación	2ª titulación
inóculo de CL 188 APMV 3	-*	-
recolección de CL 188 APMV 3	log en base 10 4,8 EID ₅₀ /ml	log en base 10 4,9 EID ₅₀ /ml
* -= no se encontró ningún título.		

10

Conclusión: Se demostró que el virus APMV 3 crece bien en la línea celular de cáncer de colon humano CL 188 con CPE visible.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende un paramixovirus aviar (APMV) para su uso en el tratamiento de un tumor en un mamífero, en donde dicho tratamiento comprende la etapa de administrar una cantidad citotóxica de un primer APMV a dicho mamífero, seguido de la etapa de administrar una cantidad citotóxica de un segundo APMV a dicho mamífero en un periodo de 2-56 semanas desde dicha administración del primer AMPV y en donde dicho segundo APMV tiene una proteína HN que es inmunológicamente diferente de la del primer APMV, y en donde dicho Segundo APMV tiene adicionalmente una proteína F que es inmunológicamente diferente de la del primer APMV.
- 10 2. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el primer APMV es un virus de la enfermedad de Newcastle.
- 15 3. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el primer APMV es un APMV 3.
- 20 4. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el primer APMV es un virus de la enfermedad de Newcastle y el segundo APMV es un APMV 3.
- 25 5. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el primer APMV es un APMV 3 y el segundo APMV es un virus de la enfermedad de Newcastle
- 30 6. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizada por que** al menos el primer o el segundo APMV es lítico.
- 35 7. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizada por que** tanto el primer como el segundo APMV son líticos.
8. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, **caracterizada por que** el mamífero es de una especie equina, canina o felina.
9. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, **caracterizada por que** durante la administración de al menos el primer o el segundo APMV, se coadministra una cantidad de agente antitumoral.
10. Composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, **caracterizada por que** al menos el primer o el segundo APMV es un APMV recombinante que lleva un gen adicional.