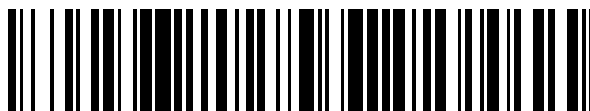


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 611 975**

51 Int. Cl.:

C12N 15/863 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C07K 14/82 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2007** **PCT/EP2007/005302**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2007** **WO07147528**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2007** **E 07764674 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016** **EP 2029756**

54 Título: **Procedimiento para producir poxvirus y composiciones de poxvirus**

30 Prioridad:

20.06.2006 EP 06360027
29.11.2006 US 861452 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
11.05.2017

73 Titular/es:

TRANSGENE S.A. (100.0%)
BOULEVARD GONTHIER D'ANDERNACH PARC
D'INNOVATION, CS80166
67405 ILLKIRCH GRAFFENSTADEN C, FR

72 Inventor/es:

MALARME, DANIEL;
CORDIER, YVES y
SENE, CLAUDE

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

Observaciones:

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

ES 2 611 975 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

Procedimiento para producir poxvirus y composiciones de poxvirus.

La presente invención se refiere a composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden poxvirus y más particularmente virus con envoltura extracelulares. La presente invención se refiere asimismo a un procedimiento para producir poxvirus y poxvirus obtenidos de los mismos. Además, la presente invención se refiere asimismo a la utilización de dicho poxvirus y de dicha composición para la preparación de un medicamento.

La aparición de nuevas amenazas (gripe aviar, virus del oeste del Nilo, ántrax, etc.) así como el desarrollo de la terapia del gen ha aumentado la necesidad de producir y purificar poxvirus para propósitos profilácticos o terapéuticos. Es particularmente el caso para el Mammalian Virus Ankara (MVA). Este poxvirus que fue utilizado inicialmente para vacunar a pacientes inmunodeficientes contra la viruela, ahora también se utiliza como un vector para los propósitos de terapia del gen. Por ejemplo, MVA es utilizado como un vector para el gen MUC1 para vacunar pacientes contra la expresión de tumor MUC1 (Scholl y colaboradores, 2003, J Biomed Biotechnol., 2003, 3, 194-201). El MVA portador del gen que codifica los antígenos HPV también es utilizado como un vector para el tratamiento terapéutico del carcinoma ovárico.

Los poxvirus son un grupo de virus con envoltura complejos que los distinguen principalmente por su morfología inusual, su genoma de ADN largo y su sitio citoplásmico de replicación. El genoma de varios miembros de poxviridae, incluyendo la cepa Copenhagen del virus vaccinia (VV) (Goebel y colaboradores, 1990, Virol. 179, 247-266 y 517-563; Johnson y colaboradores, 1993, Virol. 196, 381-401) y la cepa modificada del virus vaccinia Ankara (MVA) (Antoine y colaboradores, 1998, Virol. 244, 365-396), se ha mapeado y secuenciado. La VV presenta un genoma de ADN bicatenario de aproximadamente 192 kb que codifica aproximadamente 200 proteínas de las cuales aproximadamente 100 están involucrados en montaje del virus. El MVA es una cepa del virus vaccinia altamente atenuada generada por más de 500 pasajes seriados de la cepa de Ankara del virus vaccinia en fibroblastos del embrión de pollo (Mayr y colaboradores, 1975, Infection 3, 6-16). El virus MVA fue depositado antes en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) bajo el depositario N⁶⁰² 1-721. La determinación de la secuencia completa del genoma de MVA y de la comparación con el genoma VV Copenhagen permite la identificación exacta de las alteraciones que ocurrieron en el genoma viral y la definición de siete supresiones (I a VII) y numerosas mutaciones que conducen a ORF fragmentados (marco abierto de lectura -"Open Reading Frame"-) (Antoine y colaboradores, 1998, Virology 244, 365-396).

La ruta natural para la absorción intracelular de virus con envoltura implica una serie de etapas incluyendo la ligadura de un polipéptido viral expuesto en la superficie del virus a un receptor celular y a un mecanismo de fusión entre las membranas virales y celulares dando por resultado la liberación del genoma viral en el citoplasma de la célula infectada.

Sin embargo, en el caso especial del poxvirus, el análisis exacto de la ruta de suministro es complicado por la existencia de dos formas morfológicas distintas de virus infeccioso, llamadas virus maduro intracelular (IMV) y virus con envoltura extracelular (EEV). La forma IMV, entre otras particularidades, está caracterizada por una envoltura monolipídica que rodea el centro viral y está localizada principalmente en el citoplasma de las células infectadas, aunque puede ser liberada extracelularmente después de la lisis de las células infectadas. Muchos de los polipéptidos naturales expuestos en la superficie de la envoltura lipídica IMV han sido identificados, como por ejemplo el p14 kDa y las proteínas p21 kDa, codificadas respectivamente por el gen A27L (Rodríguez y colaboradores, 1985, J. Virol. 56, 482-488; Rodríguez y Estaban, 1987, J. Virol. 61, 3550-3554) y el gen A17L, así como las proteínas codificadas por L1R, A14L, D8L, A9L (Yeh y colaboradores, 2000, J. Virol. 74, 9701-9711), E10R (Senkevich y colaboradores, 2000, Virol. 5, 244-252) y genes H3L. Comparado con el IMV, la forma de EEV presenta una envoltura lipídica externa adicional de la membrana (bicapa lipídica) adquirida de las cisternas de la red trans-Golgi. Corresponde a la forma viral liberada fuera de las células infectadas. La envoltura superficial de la membrana de EEV muestra aproximadamente 10 proteínas las cuales están ausentes de la superficie de IMV, como por ejemplo el B5R codificado, productos del gen A34R y hemaglutinina (HA). La coexistencia de las formas de IMV y EEV se ha descrito para la mayoría de las cepas de vaccinia (por ejemplo las cepas de Copenhagen y MVA) así como para otros poxvirus tales como el poxvirus de las aves de corral (Boulanger y colaboradores, 2000, J. Gen. Virol. 81, 675-687).

Dado que son más estables en el ambiente, los IMV ejercen una función predominante en un anfitrión para la transmisión-huésped (Hooper y colaboradores Virology, 2003, 306, 181-185). A este respecto, las partículas IMV han sido los vectores de elección para los propósitos de terapia del gen. Por esta razón, los procedimientos posibles de purificación del poxvirus tratan solamente el virus presente en la célula empaquetadora (es decir IMV), mientras que las partículas de EEV vertidas en los medios de cultivo son desechadas. Debido a la presencia en su superficie de una variedad más grande de polipéptidos que sobre la superficie de IMV, el uso de recombinantes de EEV que tienen una especificidad de infección dirigida

("targeted") ya se ha propuesto (documento US20050208074; Galmiche y colaboradores, Gen Virol., 1997, 78, 3019-3027). Sin embargo, aun para este uso específico, las partículas de IMV son particularmente preferidas (documento US20050208074, página 4, capítulo 29).

- 5 Sorprendentemente, el solicitante ha descubierto que los EEV sin especificidad de infección dirigida tienen una mayor eficacia terapéutica y/o profiláctica en comparación con IMV.

A este respecto, la presente invención se refiere a un poxvirus y preferentemente un poxvirus recombinante, en el que el poxvirus es un EEV sin especificidad de infección dirigida. La presente invención también se
10 refiere a una composición y preferentemente una composición farmacéutica que comprende EEV recombinante sin especificidad de infección dirigida.

Como son utilizados a lo largo de la totalidad de la solicitud, los términos "un" y "uno" son utilizados en el sentido que significan "por lo menos uno", "por lo menos un primer", "uno o más" o "una pluralidad" de los
15 componentes o etapas referidas, a menos que el contexto lo especifique claramente de otra manera. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, que incluyen mezclas de las mismas.

El término "y/o" cuando sea utilizado en la presente memoria incluye el significado de "y", "o" y "todos o
20 cualquier otra combinación de los elementos conectados por el término mismo".

El término "alrededor" o "aproximadamente" como son usados en la presente memoria significan dentro de 20%, preferentemente dentro de 10%, y más preferentemente dentro de 5% de un valor o de un intervalo
25 dado.

Como es utilizado en la presente memoria, el término "que comprende" está concebido para hacer referencia a que los productos, composiciones y métodos incluyen los componentes o las etapas referidas, pero sin
30 excluir otros. "Que consiste esencialmente en" cuando es utilizada para definir productos, composiciones y métodos, deberá significar que excluye otros componentes o etapas de cualquier significado esencial. Así, una composición que consiste esencialmente en los componentes mencionados no excluirá trazas de contaminantes y portadores aceptables farmacéuticamente. "Que consiste en" deberá hacer referencia a que
35 excluye más que las trazas de elementos de otros componentes o etapas.

La familia de Poxvirus comprende virus de las subfamilias de los Chordopoxvirus y Entomopoxvirus. Entre los
40 mismos, el poxvirus de acuerdo con la invención es seleccionado preferentemente de entre el grupo que comprende Ortopoxvirus, Parapoxvirus, Avipoxvirus, Capripoxvirus, Leporipoxvirus, Suipoxvirus, Molluscipoxvirus, Yatapoxvirus. De acuerdo con una forma de realización más preferida, el poxvirus de la invención es un ortopoxvirus.

El Ortopoxvirus es preferentemente un virus vaccinia y más preferentemente un virus vaccinia Ankara
45 modificado (MVA) en particular MVA 575 (ECACC V00120707) y MVA-BN (ECACC V00083008).

Como se ha mencionado anteriormente, una partícula de IMV comprende el centro viral que incluye el
50 genoma viral rodeado por una envoltura lipídica monocapa. El término "EEV" se refiere a una partícula de IMV rodeada por una envoltura bicapa lipídica adicional que se expone en su superficie celular así como en polipéptidos virales.

El término "especificidad de infección dirigida" como es utilizado en la presente memoria se refiere a una
55 especificidad de infección controlada, en la que una partícula poxviral es modificada para exhibir un tropismo nuevo o mejorado hacia las células diana, comparada a una partícula de poxvirus no modificada relacionada. Consecuentemente, una partícula poxviral con una especificidad de infección dirigida muestra una propensión de infectar las células diana a diferencia de su partícula poxviral no modificada relacionada, lo que significa que la partícula poxviral con una especificidad de infección dirigida infecta más eficientemente o más
60 rápidamente sus células diana (presentando en su superficie el antígeno reconocido por la fracción del ligando exhibida en la superficie de la partícula poxviral de la invención) que las células no diana (que no presentan en su superficie dicho antígeno), mientras que una partícula poxviral relacionada sin especificidad de infección dirigida infectará las células diana con una eficacia menor o similar comparada con las células no
65 dianas.

El término "virus recombinante" se refiere a un virus que comprende una secuencia exógena insertada en su
60 genoma. Como es utilizada en la presente memoria, una secuencia exógena se refiere a un ácido nucleico que no está presente naturalmente en el virus madre.

En una forma de realización, la secuencia exógena codifica una molécula que tiene una función directamente o indirectamente citotóxica. Por "directamente o indirectamente" citotóxica, se hace referencia a que la
65 molécula codificada por la secuencia exógena puede ella misma ser tóxica (por ejemplo la ricina, el factor de necrosis tumoral, interleucina-2, interferón-gamma, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, exotoxina A de

pseudomonas) o puede metabolizarse para formar un producto tóxico, o puede actuar en algo más para formar un producto tóxico. La secuencia ADNc de la ricina descrita en Lamb y colaboradores (Eur. J. Biochem., 1985, 148, 265-270) está incorporada a la presente memoria como referencia.

En una forma de realización preferida de la invención, la secuencia exógena es un gen suicida. Un gen suicida codifica una proteína que puede convertir un profármaco relativamente no tóxico en un fármaco tóxico. Por ejemplo, la enzima citosina desaminasa convierte 5-fluorocitosina (5FC) en 5-fluorouracil (5FU) (Mullen y colaboradores (1922) PNAS 89, 33); la enzima timidincinasa del herpes simple sensibiliza las células al tratamiento con el agente antiviral ganciclovir (GCV) o aciclovir (Moolten (1986) Cancer Res. 46, 5276; Ezzedine y colaboradores (1991) New Biol 3, 608). La citosina desaminasa de cualquier organismo, por ejemplo *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*, puede ser utilizada.

Así, en una forma de realización preferida de la invención, el gen codifica una proteína que presenta una actividad de citosina desaminasa y aun más preferentemente una proteína como la descrita en las solicitudes de patente WO2005007857 y WO9954481.

Otros ejemplos de combinaciones de profármaco/enzima incluyen los descritos por Bagshawe y colaboradores (WO88/07378), particularmente varios agentes alquilantes y las *Pseudomonas* spp. La enzima CPG2, y las descritas por Epenetos & Rowlinson-Busza (documento WO 91/11201), particularmente profármacos cianogénicos (por ejemplo amigdalina) y beta-glucosidasas derivados de plantas.

Las enzimas que son útiles en esta forma de realización de la invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en medicamentos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en medicamentos libres; proteasas, tales como proteasa de serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptido en medicamentos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen D-aminoácidos sustituyentes; enzimas cortadoras de carbohidrato tales como beta-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en medicamentos libres; beta-lactamasa útil para convertir los fármacos derivados con beta-lactamas en medicamentos libres; y penicilina amidasas, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útil para convertir fármacos derivados de sus nitrógenos de amina con los grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en medicamentos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como abzymas, pueden utilizarse para convertir profármacos de la invención en fármacos activos libres (Massey R. y colaboradores, Nature, 1987, 328, 457-458).

De manera similar, los profármacos incluyen, pero no se limitan a, los profármacos mencionados anteriormente, por ejemplo, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos con D-aminoácido modificado, profármacos glicosilados, profármacos que contienen beta-lactam, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituida o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden ser convertidos. Los ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivarse en una forma de profármaco para el uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, etoposida, teniposida, adriamicina, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, cisplatino y los análogos del cisplatino, bleomicinas, esperamicinas (ver por ejemplo la patente US nº 4.675.187), 5-fluorouracilo, melfalán y otras mostazas de nitrógeno relacionadas.

En otra forma de realización el gen exógeno codifica una ribozima que puede dividir el ARN o ADN marcado. El ARN o ADN marcado que se divide puede ser ARN o ADN que es esencial para la función de la célula y su división resulta en la muerte de la célula o el ARN o ADN que se dividirá puede ser ARN o ADN que codifica una proteína indeseable, por ejemplo un producto oncógeno, y la división de este ARN o ADN puede evitar que la célula llegue a ser cancerosa.

En aun otra forma de realización el gen exógeno codifica un ARN antisentido

Mediante "ARN antisentido" se hace referencia una molécula de ARN que hibrida con, e interfiere con la expresión de una molécula de ARNm que codifica una proteína o a otra molécula de ARN dentro de la célula tal como pre-ARNm o ARNt o ARNr, hibrida con, e interfiere con la expresión de un gen.

En otra forma de realización de la invención, la secuencia exógena sustituye la función de un gen defectuoso en la células diana. Existen varios miles de enfermedades genéticas heredadas de mamíferos, incluyendo los seres humanos, que son causadas por genes defectuosos. Los ejemplos de esas enfermedades genéticas incluyen la fibrosis quística, en la que es conocido que existe una mutación en el gen CFTR; la distrofia muscular de Duchenne, en la que es conocido que existe una mutación en el gen de distrofina; la enfermedad de los drepanocitos, en la que es conocido que existe una mutación en el gen de HbA. Muchos tipos de cáncer son causados por genes defectuosos, especialmente los protooncogenes, y los genes supresores de tumor que han experimentado una mutación.

Los ejemplos de protooncogenes son ras, src, bcl etcétera; los ejemplos de genes supresores de tumores son p53 y Rb.

- 5 En una forma de realización adicional de la invención, la secuencia exógena codifica un antígeno asociado a tumores (TAA). El TAA se refiere a una molécula que es detectada en una frecuencia o densidad más alta en células tumorales que en células no tumorales del mismo tipo de tejido. Los ejemplos de TAA incluyen pero no se limitan a CEA, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GP-100, MUC-1, MUC-2, oncógeno mutado dirigido ras, p53 mutado dirigido o normal, p53 sobreexpresado, CA-125, PSA, C-erb/B2, BRCA I, BRCA II, PSMA, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, NY-ESO-1, TAG72, KSA, HER-2/neu, bcr-abl, pax3-fkhr, ews-fli-1, superviviente y LRP. De acuerdo con una forma de realización más preferida el TAA es MUC1.

15 El poxvirus recombinante puede comprender más de una secuencia exógena y cada secuencia exógena puede codificar más de una molécula. Por ejemplo, puede ser útil para asociarse en un mismo poxvirus recombinante, un exógeno secuenciado que codifica un TAA con una secuencia exógena que codifica una citocina.

20 En otra forma de realización de la invención, el gen exógeno codifica un antígeno. Como es utilizado en la presente memoria, "antígeno" se refiere a un ligando que pueda ser ligado por un anticuerpo; un antígeno no necesita ser inmunógeno por sí mismo.

25 El antígeno deriva preferentemente de un virus como por ejemplo HIV-1, (tal como gp 120 o gp 160), cualquier virus de inmunodeficiencia felina, virus del herpes humano o animal, tal como gD o derivados de los mismos o proteína temprana inmediata tal como ICP27 de HSV1 o HSV2, citomegalovirus (tal como gB o derivados de los mismos), virus varicela zoster (tal como gpl, II o III), o de un virus de hepatitis tal como el virus de la hepatitis B por ejemplo antígeno de superficie de la hepatitis B o un derivado de los mismos, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C (preferentemente proteína no estructural del genotipo 1b cepa ja) y el virus de la hepatitis E, o de otro patógeno viral, tal como virus respiratorio sincicial virus del papiloma humano (preferentemente la proteína E6 y E7 de la cepa HPV16) o virus de la gripe, o derivado de patógenos bacterianos tales como salmonela, Neisseria, Borrelia (por ejemplo OspA u OspB o derivados de los mismos), o Clamidia, o Bordetella por ejemplo P.69, PT y FHA, o derivado de parásitos tales como Plasmodium o Toxoplasma.

35 En una forma de realización particularmente preferida de la invención, el poxvirus recombinante codifica las mismas proteínas que TG4010 (Rochlitz y colaboradores, J Gene Med. 2003 Aug;5(8):690-9) y TG4001 (Liu y colaboradores, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14567-71). En otra forma de realización particularmente preferida de la invención, el poxvirus de la invención tiene una secuencia que es más de 90% homóloga a la secuencia de TG4010 o de TG4001.

40 Ventajosamente, el poxvirus recombinante además comprende los elementos necesarios para la expresión de la secuencia exógena. Los elementos necesarios para la expresión comprenden el conjunto de elementos que permiten la transcripción de una secuencia del nucleótido al ARN y la traducción de un ARNm a un polipéptido, en particular las secuencias promotoras y/o las secuencias reguladoras que son eficaces en la célula para ser infectada por el poxvirus recombinante de la invención, y opcionalmente las secuencias requeridas para permitir la excreción o la expresión en la superficie de las células para el polipéptido. Estos elementos pueden ser inducibles o constitutivos. Por supuesto, el promotor esta adaptado al poxvirus recombinante seleccionado y a la célula huésped. Se puede mencionar, a título de ejemplo, los promotores del virus vaccinia p7.5K pH5R, pK1L, p28, p11 o una combinación de estos promotores. La literatura proporciona una gran cantidad de información en referencia a tales secuencias promotoras.

50 Los elementos necesarios pueden, además, incluir elementos adicionales que mejoren la expresión de la secuencia exógena o de su mantenimiento en la célula huésped. Se puede mencionar en particular las secuencias intrón (documento WO 94/29471), secuencias de señales de secreción, secuencias de localización nuclear, sitios internos para la reiniciación de la traducción del tipo IRES, secuencias poli A para la terminación de la transcripción.

60 Los procedimientos de producción de poxvirus disponibles comprenden la replicación del virus en una línea celular (por ejemplo HelaS3), en huevos embrionados o en fibroblastos del embrión de pollo. Después de la replicación del virus, los medios de cultivo son descartados, las células son lisadas y el poxvirus liberado de las células es purificado por la centrifugación del amortiguador de sacarosa (Kotwal y Abraham; Poxvirus growth, Purification and titrating in Vaccinia Virus and Poxvirology, 2004, 101-108, Humana Press Inc., Totowa; NJ; U.S.A.). Con estos procedimientos, no se encuentran EEV presentes en la composición purificada.

65 Sin embargo, los procedimientos de producción de virus disponibles no son satisfactorios. En primer lugar, comprenden el uso de compuestos derivados de animales tal como suero y enzimas. El uso de compuestos

derivados de animales en procedimientos de producción presenta varias desventajas. Por ejemplo, la composición química de estos compuestos puede variar entre los lotes, aun de un solo fabricante. Los compuestos pueden también estar contaminados con agentes infecciosos (por ejemplo, micoplasma y virus) que pueden minar seriamente la salud de las células cultivadas cuando estos suplementos contaminados son utilizados en formulaciones de los medios de cultivo celulares. Por otra parte, el uso de suplementación de suero en los medios de cultivo puede complicar y aumentar los costes de la purificación de las sustancias deseadas de los medios de cultivo debido a la copurificación no específica del suero o extracto de proteínas. De manera más importante, el uso de compuestos indefinidos pueden obstaculizar la aprobación por las agencias médicas de la composición farmacéutica obtenida por el procedimiento.

La presente invención además proporciona un procedimiento para producir una partícula poxviral según la invención, que comprende las etapas de:

- a) preparar un cultivo de célula empaquetadoras,
- b) infectar el cultivo de la célula,
- c) cultivar las células infectadas durante un período de tiempo apropiado,
- d) recuperar las partículas poxvirales producidas del cultivo sobrenadante y/o célula empaquetadoras, y
- e) opcionalmente, purificar las partículas poxvirales recuperadas.

El procedimiento de acuerdo con la invención se encuentra preferentemente libre de productos animales.

El procedimiento de acuerdo con la invención puede también utilizarse para la producción de un tipo de poxvirus salvaje, y/o atenuado.

Como es utilizado en la presente memoria, el término "poxvirus atenuado" se refiere a cualquier poxvirus que haya sido modificado de modo que su patogenicidad en el sujeto previsto es reducida sustancialmente. Preferentemente, el poxvirus es atenuado al punto que no es patógeno desde un punto de vista clínico, es decir, que los sujetos expuestos al poxvirus no exhiben un nivel de patología creciente estadísticamente significativo respecto a los sujetos de control. De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, el virus atenuado es un virus vaccinia atenuado tal como MVA.

El término "infección" se refiere a la transferencia del ácido nucleico viral a una célula, en la que el ácido nucleico viral es replicado, las proteínas virales, o las nuevas partículas virales montadas.

De acuerdo como es utilizado en la presente memoria, el término "célula empaquetadora" se refiere a una célula que pueda infectarse por el poxvirus que será producido. La célula empaquetadora puede ser una célula primaria, una célula recombinante y/o una línea celular. Por ejemplo, puede ser utilizada una célula recombinante que contenga los elementos necesarios para la producción de un virus recombinante necesario en un vector viral recombinante.

En una forma de realización de la invención, la célula empaquetadora es una célula aviar inmortal.

En una forma de realización de la invención, la célula empaquetadora es una célula DF1 (patente US nº 5.879.924), que es una línea celular de pollo inmortalizada espontáneamente derivada a partir de huevos (ELL-0) de East Lansing Line de 10 días.

La célula aviar inmortal puede derivarse de células troncales embrionarias por la separación progresiva de los factores de crecimiento y capa alimentadora, manteniendo de esta manera las características de crecimiento y esperanza de vida infinita características del precursor no diferenciado). Por ejemplo, la línea celular de pollo Ebx (documento WO2005007840) se ha obtenido por este procedimiento.

De acuerdo con una forma de realización preferida, puede también utilizarse una línea celular permanente del embrión de pato. Por ejemplo, la línea celular, designada como DEC 99 (Ivanov y colaboradores Experimental Pathology And Parasitology, 4/2000 Bulgarian Academy of Sciences) se ha cultivado a lo largo de 140 pases consecutivos y no es tumorigénica para los pájaros. La línea celular DEC 99 es un sistema estándar de cultivo celular que se ha utilizado para investigación y puede aplicarse por necesidades de la biotecnología. De acuerdo con una forma de realización más preferida, la célula empaquetadora es una línea celular obtenida por el procedimiento descrito en la solicitud de patente EP06360001.9.

De acuerdo con otra forma de realización preferida, la célula empaquetadora usada en el procedimiento de acuerdo con la invención es un fibroblasto de embrión de pollo (CEF). La preparación y el uso del CEF para la producción de virus son bien conocidos para los expertos en la materia.

Los CEF son extraídos preferentemente de los huevos específicos libres de patógenos (SPF). Los huevos SPF están comercialmente disponibles, por ejemplo en Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA.). Los huevos son preferentemente de más de 9 días, más preferentemente entre, 10 y 14 días y aun más preferentemente de 12 días.

Antes de la extracción del embrión, el huevo es desinfectado preferentemente. Muchos métodos y productos dedicados a la desinfección de huevos están disponibles en la técnica anterior. Es particularmente preferida la incubación en una solución de formol (por ejemplo 2% formol, 1 minuto) seguido por enjuague en 70% de etanol.

Las células de los embriones son posteriormente disociadas y purificadas. De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, las células son sometidas a una etapa de digestión enzimática que permita la destrucción de la matriz intercelular. Para este propósito, el uso de la enzima que puede digerir la matriz intercelular es particularmente útil. Tal enzima puede seleccionarse del grupo que comprende pero no se limita a tripsina, colagenasa, pronasa, dispasa, hialuronidasa y neuraminidasa. Esta enzima puede utilizarse sola o en combinación. En una forma de realización particularmente preferida de la invención dispasa y tripsina (por ejemplo TrypLE seleccionado de Gibco™) son utilizadas en combinación. El experto en la materia puede determinar la concentración de enzima, la temperatura y la longitud de incubación permitiendo una separación eficiente de las células.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención está libre de productos animales (excepto la célula empaquetadora). A este respecto, la(s) enzima(s) utilizada(s) para la preparación de CEF es (son) preferentemente de origen recombinante. De acuerdo a como es utilizado en la presente memoria, "productos animales" significa cualquier compuesto o colección de compuestos que fue producido dentro o por una célula animal en un organismo vivo.

La preparación de CEF puede además incluir una etapa de filtración (y/o una etapa de centrifugación para retirar contaminantes).

Esta célula primaria de CEF puede utilizarse ya sea directamente o después de un pase celular adicional como célula CEF secundaria.

El experto en la materia puede seleccionar la célula más apropiada para la producción de un virus específico. De acuerdo con una forma de realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende el uso de CEF o de una célula de acuerdo con el documento EP06360001.9 para la producción de un MVA.

La célula empaquetadora usada en el procedimiento de acuerdo con la invención es cultivada en un medio de cultivo celular apropiado. Es posible utilizar más de un medio de cultivo en el procedimiento de acuerdo con la invención. Por ejemplo, un primer medio de cultivo puede utilizarse durante la preparación de la célula empaquetadora (es decir durante la etapa a) y un segundo medio de cultivo de célula para la infección (es durante la etapa c y/o etapa b).

De acuerdo con una forma de realización preferida, los medios de cultivo celular de acuerdo con la invención están libres de producto animal.

Muchos medios libres de producto animal han sido descritos ya y algunos de ellos están comercialmente disponibles. Por ejemplo 293 SFM II; células 293-F, SFM adaptado; células 293-H, SFM adaptado; reactivo de transfección 293fectin™; CD 293 AGT™; medio de CD 293; sistema de expresión FreeStyle™ 293; medio de FreeStyle™ 293; células de FreeStyle™ 293-F, SFM adaptado; medio de expresión de adenovirus (AEM); medio de crecimiento para las células PER.C6®; CD 293 AGT™; medio De CD 293; células COS-7L, SFM adaptado; medio EPISERF®; OptiPro™ SFM; VP-SFM; VP-SFM AGT™. (Todos disponibles de invitrogen) pueden utilizarse como medios de cultivo celular en el procedimiento de acuerdo con la invención.

Cuando la célula empaquetadora es un CEF, son particularmente preferidos VP-SFM (invitrogen) para la etapa a y medio basal de Eagle (invitrogen) para la etapa b y c.

En la forma de realización específica donde las células de empaquetado son CEF, el medio de cultivo celular es sembrado con entre 0,5 a 1,5 y preferentemente entre 1,1 y 1,3 y más preferentemente aproximadamente 1,2 embriones/l del medio de cultivo celular. En esta forma de realización, los CEF son cultivados preferentemente durante entre 1 y 5 días, más preferentemente entre 1 y 2 días y aun más preferentemente 2 días antes de la infección.

En la forma de realización específica donde el poxvirus que se producirá es MVA, el virus es introducido en el recipiente del cultivo celular en un MOI que está comprendido preferentemente entre 0,001 y 0,1, más preferentemente entre 0,03 y 0,07 y aun más preferentemente aproximadamente 0,05.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, durante la etapa c, las células empaquetadoras son cultivadas a una temperatura que es inferior a 37°C, preferentemente entre 30°C y 36,5°C o entre aproximadamente 32°C y aproximadamente 36°C, más preferentemente entre 33°C y 35°C, todavía más preferentemente 34°C.

De acuerdo a la forma de realización preferida de la invención, la etapa c dura entre uno y seis días, más preferentemente entre dos y cuatro días y todavía más preferentemente aproximadamente 72 horas.

Después de la etapa de infección, el medio de cultivo celular usado para cultivar la célula empaquetadora es recogido. El medio de cultivo celular comprende las partículas de EEV vertidas por la célula empaquetadora infectada. De acuerdo con una forma de realización preferida, después de la etapa de infección, se recogen el medio de cultivo celular y la célula empaquetadora. El medio de cultivo celular y la célula empaquetadora se pueden reunir o recoger por separado.

Para recuperar los poxvirus presentes en las células empaquetadoras, el procedimiento de acuerdo con la invención puede comprender una etapa que permita la rotura de la membrana de la célula empaquetadora. Esta etapa conduce a la liberación del poxvirus de la célula empaquetadora. La rotura de la membrana de la célula empaquetadora puede inducirse por varias técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Estas técnicas comprenden pero no se limitan a sonicación, a congelación/descongelación, lisis hipotónica y microfluidización.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, la membrana de la célula empaquetadora se rompe usando un homogenizador de alta velocidad. Los homogenizadores de alta velocidad son comercializados por Silverson Machina Inc (East Longmeadow, U.S.A.) o Ika-Labortechnik (Staufen, Germany). De acuerdo con la forma de una realización particularmente preferida, el homogenizador de alta velocidad es un SILVERSON L4R.

Cuando son recogidos la célula empaquetadora y el medio de cultivo celular, la rotura de la membrana de la célula empaquetadora no es inducida por congelación/descongelación ya que esta técnica conduce a la destrucción de las partículas de EEV (Ichihashi y colaboradores, 1996, virology, 217(2), 478-85).

De acuerdo con una forma de realización preferida, la etapa d) comprende además una etapa de clarificación que permite la retirada de los residuos celulares. De acuerdo con una forma de realización más preferida de la invención, la etapa de clarificación es una etapa de filtración en profundidad.

La filtración en profundidad incluye pero no se limita al uso de uno o más productos comercialmente disponibles: filtros de profundidad de CUNO Incorporated series AP (los ejemplos incluyen AP01), filtros de profundidad de CUNO Incorporated series CP (el ejemplo incluye CP10, CP30, CP50, CP60, CP70, CP90), filtros de profundidad de CUNO Incorporated series HP (los ejemplos incluyen HP10, HP30, HP50, HP60, HP70, HP90), filtros de profundidad de CUNO Incorporated series Calif. (los ejemplos incluyen CA10, CA30, CA50, CA60, CA70, CA90), filtros de profundidad de CUNO Incorporated series SP (los ejemplos incluyen SP10, SP30, SP50, SP60, SP70, SP90), filtros de CUNO Delipid y Delipid Plus, filtros de profundidad de Millipore Corporation series CE (los ejemplos incluyen CE15, CE20, CE25, CE30, CE31, CE40, CE45, CE50, CE70, CE75), filtros de profundidad de Millipore Corporation series DE (los ejemplos incluyen DE25, DE30, DE35, DE40, DE45, DE50, DE55, DE560, DE65, DE70, DE75) filtros HC de Millipore Corporation (los ejemplos incluyen A1HC, B1HC, COHC) filtros de CUNO Polynet (un ejemplo incluye Polynet-PB), Los filtros de Millipore Clarigard y Polygard, los filtros Life Assure de CUNO, los filtros de profundidad de ManCel Associates (los ejemplos incluyen pero no se limitan a PR12 UP, PR12, PR5 UP), y o los filtros PALL O SeitzSchenk Incorporated. Para mejorar la capacidad de clarificación de las unidades de filtración de profundidad disponibles, puede ser útil acoplar dos o más unidades con tamaños de poro decrecientes. En esta forma de realización, la mezcla que debe ser clarificada pasa a través de la primera unidad de filtración de profundidad en la que son retenidos los contaminantes más grandes y posteriormente pasa a través de la segunda unidad de filtración de profundidad. De acuerdo con una forma de realización aún más preferida de la invención, un sartopure© (sartorio) con un tamaño de poro de 8 µm acoplado a un sartopure© con un tamaño de poro de 5 µm es utilizado para la etapa de filtración de profundidad.

De acuerdo con una forma de realización preferida, el procedimiento de acuerdo con la invención comprende además una etapa de concentración. Más preferentemente, la etapa de concentración permite además la eliminación de las proteínas presentes en la mezcla obtenida de las etapas descritas anteriormente.

De acuerdo con una forma de realización más preferida de la invención, la etapa de concentración es una etapa de microfiltración. La microfiltración es un procedimiento de membrana conducido presión que concentra y purifica las moléculas grandes. Más específicamente, una solución se pasa a través de una membrana semipermeable cuyos tamaños de poro se han seleccionado para rechazar las partículas grandes (virus) en el retenido, y permite las moléculas pequeñas (por ejemplo proteínas) al paso a través de la

membrana en el filtrado. La microfiltración reduce el volumen de la solución de extracción.

De acuerdo con una forma de realización preferida de la invención, la etapa de microfiltración es seguida por una etapa de diafiltración. Estas dos etapas pueden hacerse ventajosamente con las mismas membranas de filtración. La diafiltración es una mejora de la microfiltración e implica diluir el retenido con una solución para efectuar una reducción en la concentración de las impurezas en el retenido. La dilución del retenido permite lavar más de las impurezas del retenido. Se entiende que la diafiltración puede realizarse en un modo por lotes, modo semicontinuo, o un modo continuo. La etapa de diafiltración puede ser utilizada ventajosamente para cambiar el tampón en el cual está comprendido el virus. Por ejemplo, puede ser útil intercambiar el tampón usado en el procedimiento de purificación contra un tampón aceptable farmacéuticamente.

Preferentemente, las membranas de filtración usadas en la microfiltración y/o en la etapa de diafiltración presenta un tamaño de poro comprendido entre 0,01 y 0,15 μm , y más preferentemente aproximadamente 0,1 μm .

Los ácidos nucleicos pueden adherirse a las partículas derivadas de la célula tales como virus. A este respecto, el procedimiento de acuerdo con la invención puede opcionalmente comprender además una etapa que consiste en retirar los ácidos nucleicos contaminantes presentes en la solución. Para este propósito, las nucleasas pueden utilizarse. Las nucleasas ejemplificativas incluyen benzonasa o cualquier otro DNasa o RNasa usado comúnmente dentro de la técnica, entre ellos, la benzonasa es particularmente preferida.

La benzonaze degrada el ácido nucleico y no tiene ninguna actividad proteolítica. La benzonasa desintegra rápidamente el ácido nucleico hidrolizando los enlaces de fosfodiéster internos entre los nucleótidos específicos. Después de la digestión completa, todos los ácidos nucleicos libres presentes en la solución son reducidos a oligonucleótidos de bases de 2 a 4 de longitud.

La benzonasa puede utilizarse en una concentración final comprendida entre 50 y 400 U/ml, preferentemente entre 100 y 300 U/ml y más preferentemente entre 150 y 250 U/ml. El tratamiento de benzonasa puede durar entre 1 y 4 horas y aún más preferentemente entre 1,5 y 2,5 horas.

Sin embargo, cuando la filtración de profundidad, la microfiltración y la diafiltración descritas anteriormente son utilizadas, el uso de nucleasas y más particularmente, el uso de benzonasa no es necesario. A este respecto, la presente invención también se refiere a un procedimiento para la producción de poxvirus en donde no se utiliza ninguna nucleasa y más particularmente ninguna benzonasa.

En esta etapa, el poxvirus obtenido por el procedimiento descrito previamente se purifica suficientemente. Puede ser deseable cambiar el tampón en el cual está comprendido el virus. Por ejemplo, puede ser útil intercambiar el tampón usado en el procedimiento de purificación contra un tampón farmacéutico aceptable. Muchos métodos que pueden utilizarse para cambiar el tampón son conocidos para el experto en la materia. Entre ellos, la filtración tangencial es particularmente preferida.

La filtración tangencial es una técnica de filtración en la que la suspensión que debe ser filtrada se mueve a una alta velocidad a lo largo de una dirección que es paralela a la superficie de filtración para crear una turbulencia de la suspensión que prevenga la formación de la torta de filtración así como el bloqueo frecuente del filtro.

Mientras que la suspensión fluye a alta velocidad paralela a la superficie de filtración, el soluto pasa a través de los orificios superficiales de filtración debido a la diferencia de presión y es retirada continuamente. La superficie de filtración debe ser tal como para resistir mecánicamente la diferencia de presión entre el compartimiento del retenido (es decir la suspensión que concentra el compartimiento) y el compartimiento de filtrado (solución filtrada clara libre de partículas suspendidas).

Las varias etapas comprendidas en el procedimiento de acuerdo con la invención pueden implementarse en lugares de trabajo separados y/o en diferentes períodos. Por ejemplo, la infección de la célula empaquetadora y la purificación de los poxvirus puede hacerse en diferentes lugares de trabajo. También, la célula empaquetadora y/o el medio de cultivo celular pueden almacenarse (por ejemplo a -80°C) cuanto sea necesario, antes de ser purificada.

La presente invención también se refiere a composiciones obtenidas por el procedimiento descrito anteriormente y a una composición que comprende el poxvirus de la invención.

Preferentemente, la composición de la invención comprende más de 1%, preferentemente más de 5%, más preferentemente más de 10% y todavía más preferentemente por lo menos 20% de los poxvirus comprendidos en la composición son EEV.

De acuerdo con una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención presenta un

valor de por lo menos 10^5 , preferentemente de por lo menos 10^6 , más preferentemente de por lo menos 10^7 , todavía más preferentemente por lo menos 10^8 pfu por ml.

De acuerdo con otra forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención presenta un valor de por lo menos 10^3 , preferentemente 10^4 y más preferentemente por lo menos 3×10^5 pfu por μg de proteína.

La presente invención también se refiere a la composición farmacéutica que comprende el poxvirus obtenido por el procedimiento de la invención, y/o composición de acuerdo con la invención. Como es utilizado en la presente memoria, "composición farmacéutica" se refiere a una composición que comprende un portador aceptable farmacéuticamente.

Tal portador es preferentemente isotónico, hipotónico o débilmente hipertónico y presenta una fuerza iónica relativamente baja, como por ejemplo una solución de sacarosa. Por otra parte, tal portador puede contener cualquier solvente, o líquido acuoso o parcialmente acuoso tal como agua estéril no pirógena. El pH de la composición farmacéutica es, además, ajustado y amortiguado para cumplir los requisitos para el uso *in vivo*. La composición farmacéutica puede también incluir un diluyente, un coadyuvante o un excipiente aceptable farmacéuticamente, así como agentes solubilizantes, estabilizantes y conservantes. Para la administración inyectable, se prefiere una formulación en solución acuosa, no acuosa o isotónica. Puede ser proporcionada en una sola dosis o en multidosis en forma (polvo, liofilizado y similares) líquida o seca que puede reconstituirse a la hora de usarse con un diluyente apropiado.

La presente invención también se refiere al poxvirus y la composición obtenida por el procedimiento de acuerdo con la invención.

La presente invención también se refiere al uso de un procedimiento de acuerdo con la invención para la producción de un virus, una composición y/o una composición farmacéutica.

La presente invención también se refiere al uso de un poxvirus, una composición y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento.

De acuerdo con una forma de realización preferida el medicamento de acuerdo con la invención está destinado al tratamiento terapéutico o profiláctico del cáncer.

Entre las utilizaciones que pueden ser consideradas, puede mencionarse cánceres de mama, del útero (en particular los inducidos por los virus del papiloma), de la próstata, de los pulmones, de la vejiga, del hígado, del colon, del páncreas, del estómago, del esófago, de la laringe, del sistema nervioso central (en particular glioma) y de la sangre (linfomas, leucemia y similares).

Una composición de acuerdo con la invención puede fabricarse convencionalmente para la administración por la ruta local, parenteral o digestiva. Las rutas de administración que pueden ser consideradas son muchas. Puede mencionarse, por ejemplo, la ruta intragástrica, subcutánea, intracardiaca, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, intranasal, intrapulmonar o intratraqueal. Para las últimas tres formas de realización, la administración por aerosol o instilación es ventajosa. La administración puede ser como una sola dosis o repetida una vez o varias veces después de cierto intervalo de tiempo. La ruta de administración y dosificación apropiadas varían en función de varios parámetros, por ejemplo, del individuo, de la enfermedad que se tratará o del (de los) gen(es) de interés para ser transferido.

De acuerdo con una primera posibilidad, el medicamento puede administrarse directamente *in vivo* (por ejemplo por inyección intravenosa, en un tumor accesible o en su periferia, subcutáneamente para una vacunación terapéutica o profiláctica). También es posible adoptar una aproximación *ex vivo* que consiste en recoger células del paciente (células troncales de la médula, linfocitos de la sangre periférica, células del músculo y similares), transfectándolas o infectándolas *in vitro* de acuerdo con las técnicas anteriores y readministrándoselas al paciente.

Es por otra parte posible considerar, cuando sea apropiado y sin apartarse del alcance de la presente invención, realizar administraciones simultáneas o sucesivas, por diferentes rutas, de los varios componentes contenidos en la composición farmacéutica o composición de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una forma de realización ventajosa de la invención, el uso terapéutico o el método de tratamiento es combinado con un segundo tratamiento del paciente por cirugía (retiro parcial o completo del tumor), por radioterapia o quimioterapia. En este caso particular, el tratamiento de acuerdo con la invención se aplica antes de, concomitante con o subsecuente al segundo tratamiento. Preferentemente, este tratamiento será aplicado subsecuente al segundo tratamiento.

De acuerdo con otra forma de realización preferida el medicamento de acuerdo con la invención es para el

tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades infecciosas, en particular de origen viral, inducido virus de hepatitis B o C, VIH, herpes, retrovirus y similares

Los ejemplos siguientes están concebidos para ilustrar los varios temas de la presente invención y consecuentemente no están limitados en carácter.

Tabla 1: representa el índice de supervivencia de los ratones C57BL/6 que se han implantado con células TC1 que expresan HPV 16 E6 y E7 y oncógeno C-Ha-ras. Los diferentes grupos de ratones son tratados con composiciones que comprenden IMV y EEV que codifican antígenos HPV, IMV que codifica los antígenos HPV o IMV que no codifica antígenos.

Tabla 2: representa el porcentaje de ratones C57BL/6 libres de tumor después de la implantación con células TC1 que expresan HPV 16 E6 y E7 y oncógeno C-Ha-ras. Los diferentes grupos de ratones son tratados con composiciones que comprenden IMV y EEV que codifican los antígenos HPV, IMV que codifica los antígenos HPV o IMV que no expresan antígenos.

Tabla 3: representa el índice de supervivencia de los ratones C57BL/6 que se han implantado con células TC1 que expresan MUC1. Los diferentes grupos de ratones son tratados con composiciones que comprenden IMV y EEV que codifica MUC1 e IL2, IMV que codifica MUC1 e IL2 o IMV que no expresa antígenos.

Ejemplos

1. Preparación de composiciones que comprenden IMV y EEV.

A. Preparación de CEF.

Sesenta seis huevos SPF son incubados durante 60s. en una solución de 2% de formol. Después de ser lavados con 70% de etanol, los huevos son abiertos, se extraen y se disecan los embriones. Los tejidos obtenidos son posteriormente digeridos a 36,5°C durante 120 minutos por dispasa (UI/ml) y selección triple (UI/ml).

La mezcla es filtrada para extraer los tejidos indigeridos y los CEF son recogidos por centrifugación (2300 rpm, 15 minutos.)

B. Cultivación e infección de CEF.

Los CEF son incubados en 55 l de VP-SFM (invitrogen) durante 2 días a 36,5°C. El medio de cultivo celular es posteriormente desechado y el poxvirus (0.05 MOI) es agregado en 55 l del medio basal de Eagle (invitrogen). Las células empaquetadoras infectadas son incubadas posteriormente durante tres días.

C. Purificación de Poxvirus.

Se recogen la célula empaquetadora y el medio de cultivo celular. La mezcla es posteriormente homogenizada durante 15 minutos con un homogenizador de alta velocidad L4R de Silverson®. La mezcla obtenida es posteriormente clarificada por filtración de profundidad en un sartopure de 8 µm (sartorio) acoplado a un sartopure de 5 µm en un índice de flujo de 1l/min.

La mezcla además es concentrada 18 veces a través de un Prostack Microfiltration Module de 0,1 µm (ref: PSWAG021, Millipore).

La composición poxviral además es diafiltrada en el mismo módulo contra el portador aceptable farmacéuticamente deseado.

2. Comparación de la eficacia terapéutica entre una composición que comprende EEV e IMV y una composición que comprende IMV solamente.

A. Tratamiento terapéutico de ratones que padecen un tumor que expresa antígenos HPV.

Denominación y breve descripción de cada construcción de vector

TG4001: El vector MVA portador de las secuencias de codificación para las proteínas de HPV, E6 y E7, (bajo control del promotor p7.5) e IL2 (bajo control del promotor pH5R). Fueron probados dos lotes, uno que comprende IMV y EEV (preparado de acuerdo con lo descrito anteriormente) y uno que comprende solamente IMV.

N33: el vector MVA vacío que no expresa ni las proteínas de HPV E6 y E7 ni IL2 fue utilizado como control

negativo.

Modelo animal

5 Los ratones femeninos C57Bl/6 con 6 a 8 semanas de edad fueron utilizados a través de este estudio. Estos ratones fueron obtenidos de Charles River (Rouen, France).

Especificación: Los animales eran de 6 semanas de edad en el día de la llegada. Al principio de la experimentación, eran menores a 8 semanas de edad.

10 Ambiente: Los animales fueron alojados en un solo cuarto, exclusivo con aire acondicionado para proporcionar un mínimo de 11 cambios de aire por hora. La temperatura y los intervalos de humedad relativa estaban dentro de 18°C y de 22°C y 40 a 70% respectivamente. La iluminación fue controlada automáticamente para proporcionar un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

15 El estado libre de patógeno específico es comprobado por el control regular del ambiente.

Dieta: a través del estudio los animales tuvieron acceso *ad libitum* a dieta esterilizada tipo D04 (UAR, Epinay sur Orge, France). El agua era proporcionada *ad libitum* a través de botellas.

20 Procedimientos de aclimatación y salud: A todos los animales se les proporcionó una inspección clínica de salud a la llegada. Fueron aclimatados en una instalación animal libre de patógenos específica (SPF) entre una y dos semanas antes del comienzo del experimento para asegurar su conveniencia para el estudio.

25 Características de las células tumorales y condiciones de uso:

La línea TC1 se ha derivado de las células epiteliales del pulmón primario de los ratones C57Bl/6 cotransformadas con los oncogenes HPV-16 E6 y E7 y c-Ha-ras. Estas células crecen en DMEM con Glutamina (2 mM), el suero de feto de becerro (10%), aminoácidos no esenciales (0,1 mM), piruvato de Na (1 mM), β mercapto-etanol (362 μ M), higromicina (0,2 mg/ml) y G418 (0,5 mg/ml). Después de descongelar, las células fueron amplificadas dos veces, el último pase fue realizado dos días antes de la inyección de la célula.

Inyección de las células

35 El primer día del experimento, las células TC1 fueron inyectadas subcutáneamente en ratones en una dosis de $2,0 \times 10^5$ cel/ratón en el flanco.

Inyecciones virales

40 Tras 7 días de la inyección de las células, $5,0 \times 10^5$ pfu/50 μ l/ratón de los lotes probados (TG4001 IMV/EEV o IMV solo) MVATGN33 (vector vacío) fueron inyectados en ratones. Veinte ratones fueron utilizados por lote probado.

45 Las inyecciones virales fueron realizadas subcutáneamente en el mismo lado pero en un sitio distante del punto de la inyección de las células y realizadas 3 veces en intervalos de 7 días.

Parámetros de supervisión:

50 El crecimiento del tumor fue supervisado durante 90 días después de la inyección de las células, con un calibrador. Los ratones fueron sacrificados por razones éticas cuando el tamaño del tumor era superior a 25 milímetros de diámetro o cuando demostraron dolor incluso si el tumor era más pequeño.

Los ratones sobrevivientes fueron registrados.

Resultados

60 Todos los grupos tratados con el vector MVA que codifica el antígeno HPV mostraron un índice más alto de supervivencia que el grupo tratado con un vector MVA vacío. Los ratones tratados con la composición que comprende EEV e IMV mostraron un índice más alto de supervivencia que los ratones tratados con la composición que comprende IMV solamente. Por otra parte, 35% de los ratones tratados con la composición que comprende EEV e IMV estaban libres de tumor 77 días después de ser inyectados en comparación con solamente 10% de los ratones tratados por la composición que comprende solamente IMV.

B. Tratamiento terapéutico de ratones portadores del tumor que expresa MUC1.

Denominación y breve descripción de cada construcción de vector

5 TG4010: el vector MVA portador de las secuencias de codificación de las proteínas MUC1 (bajo control del promotor p7.5) e IL2 (bajo control del promotor pH5R). Fueron probados dos lotes, uno que comprende IMV y EEV y uno que comprende solamente IMV.

Un vector MVATGN33 vacío que no expresa ni MUC1, ni IL2 fue utilizado como control negativo.

Modelo de ratón y sistema de experimentos con animales

Especie, cepa y proveedor: ratones femeninos C57Bl/6 de 6 a 8 semanas de edad fueron utilizados a través de este estudio. Estos ratones fueron obtenidos de Charles River (Rouen, France).

Especificación: Los animales eran de 6 semanas de edad en el día de llegada. Al principio de la experimentación, eran menos de 8 semanas de edad.

Ambiente: Los animales fueron alojados en un solo cuarto exclusivo, con aire acondicionado para proporcionar un mínimo de 11 cambios de aire por hora. La temperatura y los índices de humedad relativa estaban dentro de 18°C y de 22°C y de 40 a 70% respectivamente. La iluminación fue controlada automáticamente para proporcionar un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Los animales fueron alojados en grupos de 10 por jaula de 43 x 27 x 15 centímetros, superficie del piso 1161 cm².

Dieta: A través del estudio los animales tuvieron acceso *ad libidum* a una dieta esterilizada tipo RM (SDS, Le Bord'Haut de Vigny, France).

El agua era proporcionada *ad libidum* a través de las botellas.

No hubo contaminantes presentes en dieta o agua en niveles, que pudieran haber interferido con el alcance de los objetivos del estudio.

Procedimientos de aclimatación y salud: a todos los animales se les proporcionó una inspección clínica de salud a la llegada. Fueron aclimatados en una instalación animal libre de patógenos específica (SPF) entre una y dos semanas antes del comienzo del experimento para asegurar su conveniencia para el estudio.

Características de las células tumorales y condiciones de uso:

La línea tumoral RMA se ha derivado de un linfoma C57Bl/6. Las células RMA-MUC1 fueron obtenidas después de la transfección con una expresión de plásmido que contenía el gen MUC1 a. Estas células fueron desarrolladas en DMEM con Glutamina (2 mM), suero de feto de becerro (10%), aminoácidos no esenciales (0,1 mM), piruvato de Na (1 mM), β mercapto-etanol (36 μ M) e Higromicina (550 μ g/ml). Después de descongelar, las células fueron amplificadas dos veces, el último pase fue realizado el día antes de la prueba de provocación.

Inmunización

Los ratones fueron inmunizados con 1,0 10⁴ o 3,0 10⁴ pfu/ratón para el virus TG4010 y con 3,0 10⁴ pfu/ratón para MVATGN33.

Fueron utilizados 20 ratones para los lotes probados.

Las inmunizaciones virales fueron realizadas subcutáneamente en un flanco y realizadas 3 veces en intervalos de 14 días.

Prueba de provocación del tumor

Dos semanas después de la última inmunización, los ratones fueron provocados subcutáneamente en el mismo flanco pero en un sitio distante de los puntos de las inyecciones virales, con 1,0 E+06 RMA-MUC1 cel viable/50 μ l/ratón.

Parámetros de supervisión:

El crecimiento del tumor fue supervisado durante 6 semanas después de la prueba de provocación de tumor,

con un calibrador. Los ratones fueron sacrificados por razones éticas cuando el tamaño del tumor era superior a 25 milímetros de diámetro o cuando mostraron dolor incluso si el tumor era más pequeño.

Los ratones sobrevivientes fueron registrados.

5

Fueron utilizados 20 ratones por dosis.

Resultados.

- 10 Todos los grupos tratados con el vector MVA que codifica el antígeno MUC 1 mostraron un crecimiento del tumor menor y mayor índice de supervivencia que el grupo tratado con un vector MVA vacío. Los ratones tratados con la composición que comprende EEV e IMV mostraron un crecimiento de tumor menor que los ratones tratados con la composición que comprende solamente IMV.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una composición que comprende un virus con envoltura extracelular (EEV) y un virus maduro intracelular (IMV) de un virus vaccinia modificado recombinante Ankara (MVA) sin especificidad de infección dirigida, en el que dicho virus vaccinia modificado recombinante Ankara comprende una secuencia exógena insertada en su genoma, y en el que más de 1% del MVA recombinante comprendido en dicha composición son EEV, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
 - a) preparar un cultivo de células empaquetadoras,
 - b) infectar dicho cultivo celular con dicho MVA recombinante,
 - c) cultivar dichas células infectadas durante un periodo de tiempo apropiado, y
 - d) recuperar las partículas víricas producidas a partir del sobrenadante de cultivo y las células empaquetadoras,en el que dicha etapa d) comprende una etapa que permite la ruptura de la membrana de las células empaquetadoras.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento está exento de productos animales.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que dicha célula empaquetadora es un CEF.
4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la etapa c) dura entre dos y cuatro días.
5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la etapa d) comprende la ruptura de la célula empaquetadora utilizando un homogeneizador de alta velocidad.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho procedimiento comprende además una etapa de clarificación de la mezcla obtenida a partir de la etapa d), que permite la retirada de los restos celulares, siendo ventajosamente dicha etapa de clarificación una etapa de filtración en profundidad.
7. Procedimiento según la reivindicación 6, en el que dicho procedimiento comprende además una etapa de concentración, siendo ventajosamente dicha etapa de concentración una etapa de microfiltración.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que dicho procedimiento comprende además una etapa de diafiltración.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que no se utiliza ninguna nucleasa y más particularmente ninguna benzonasa.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que más de 5%, más preferentemente más de 10% y todavía más preferentemente por lo menos 20% del MVA recombinante comprendido en dicha composición son EEV.
11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho virus MVA recombinante comprende una secuencia exógena que codifica un antígeno asociado a tumor (TAA).
12. Procedimiento según la reivindicación 11, en el que el TAA es el MUC1.
13. Procedimiento según la reivindicación 11 o 12, en el que dicho virus MVA recombinante comprende una secuencia exógena que codifica un TAA con una secuencia exógena que codifica una citocina.
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en el que dicho virus MVA recombinante es un vector MVA portador de las secuencias codificantes para la proteína MUC1 bajo el control del promotor p7.5 y la proteína IL2 bajo el control del promotor pH5R.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho virus MVA recombinante comprende una secuencia exógena que codifica un antígeno derivado de un virus.
16. Procedimiento según la reivindicación 15, en el que dicho virus MVA recombinante es un vector MVA portador de las secuencias codificantes para las proteínas de HPV E6 y E7 bajo el control del promotor p7.5 y la proteína IL2 bajo el control del promotor pH5R.

- 5 17.Composición que comprende un virus con envoltura extracelular (EEV) y un virus maduro intracelular (IMV) de un virus vaccinia modificado recombinante Ankara (MVA) sin especificidad de infección dirigida, en la que dicho virus vaccinia modificado recombinante Ankara comprende una secuencia exógena insertada en su genoma, o que se obtiene mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que más de 1% del MVA recombinante comprendido en dicha composición son EEV.
- 10 18.Composición según la reivindicación 17, en la que dicho virus vaccinia modificado recombinante Ankara comprende una secuencia exógena que codifica una molécula que presenta una función citotóxica directa o indirectamente; siendo preferentemente dicha secuencia exógena un gen suicida.
- 19.Composición según la reivindicación 17, en la que dicho virus vaccinia modificado recombinante Ankara comprende una secuencia exógena que codifica un antígeno asociado a tumor (TAA).
- 15 20.Composición según la reivindicación 19, en la que el TAA es MUC1.
- 21.Composición según la reivindicación 19 o 20, en la que dicho virus MVA recombinante comprende una secuencia exógena que codifica un TAA con una secuencia exógena que codifica una citocina.
- 20 22.Composición según la reivindicación 21, en la que dicho virus MVA recombinante es un vector MVA portador de las secuencias codificantes para la proteína MUC1 bajo el control del promotor p7.5 y la proteína IL2 bajo el control del promotor pH5R.
- 25 23.Composición según la reivindicación 17, en la que dicho virus vaccinia modificado recombinante Ankara comprende una secuencia exógena que codifica un antígeno, procediendo preferentemente dicho antígeno de un virus.
- 24.Composición según la reivindicación 23, en la que dicho virus MVA recombinante es un vector MVA portador de las secuencias codificantes para las proteínas de HPV E6 y E7 bajo el control del promotor p7.5 y la proteína IL2 bajo el control del promotor pH5R.
- 30 25.Composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, en la que dicho virus vaccinia modificado recombinante Ankara comprende los elementos necesarios para la expresión de la secuencia exógena.
- 35 26.Composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, en la que más de 5%, más preferentemente más de 10% y todavía más preferentemente por lo menos 20% del MVA recombinante comprendido en dicha composición son EEV.
- 40 27.Composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 26, que presenta un valor de por lo menos 10^5 , preferentemente de por lo menos 10^6 , más preferentemente de por lo menos 10^7 , todavía más preferentemente de por lo menos 10^8 pfu por ml.
- 45 28.Composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 27, que presenta un valor de por lo menos 10^3 , preferentemente 10^4 y de la manera más preferente por lo menos $3 \cdot 10^5$ pfu por μg de proteína.
- 29.Utilización de una composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28 para la preparación de un medicamento.
- 50 30.Utilización según la reivindicación 29 para el tratamiento terapéutico o profiláctico del cáncer o de enfermedades infecciosas.
- 31.Composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28, para su utilización como un medicamento.
- 55 32.Composición según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 28, para su utilización en el tratamiento terapéutico o profiláctico del cáncer o de las enfermedades infecciosas.

Figura 1

Índice de supervivencia

		DOSIS Pfu/ratón	Días posteriores a la prueba de provocación tumoral										
Grupo	VIRUS		9	13	20	27	34	41	49	56	63	70	77
1	IMV/EEV	5,0 E+05 pfu	100	100	100	100	100	100	90	65	60	60	60
2	IMV	5,0E+05 pfu	100	100	100	100	95	95	60	40	35	30	20
3	N33	5,0 E+05 pfu	100	100	100	100	100	90	70	25	10	5	5

Figura 2

Porcentaje de ratones libres de tumor

		Dosis pfu/50µL / ratón	días posteriores a la prueba de provocación tumoral										
			9	13	20	27	34	41	49	56	63	70	77
VIRUS													
IMV/EEV		5,0 E+05 pfu	0	0	0	10	20	30	35	35	35	35	35
IMV		5,0 E+05 pfu	0	0	0	0	0	5	10	10	10	10	10
N33		5,0 E+05 pfu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 3

Índices de supervivencia de ratones

Grupo	VIRUS	DOSIS pfu/50µL / ratón	días posteriores a la prueba de provocación tumoral						
			9	15	20	23	27	30	38
1	IMV	1,0 E+04	100	100	100	95	75	60	55
2	IMV	3,0 E+04	100	100	100	100	90	60	55
3	IMV/EEV	1,0 E+04	100	100	100	95	85	75	70
4	IMV/EEV	3,0 E+04	100	100	100	100	100	80	75
5	IMV vacío	1,0 E+04	100	100	100	60	30	10	5