

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 012**

51 Int. Cl.:

A61K 39/15	(2006.01)
A61K 31/70	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01)
A61P 31/12	(2006.01)
A61P 31/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.12.2011 PCT/US2011/063037**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.06.2012 WO12075376**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2011 E 11845053 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2646052**

54 Título: **Formulaciones virales liofilizadas**

30 Prioridad:

02.12.2010 US 419020 P

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

17.08.2017

73 Titular/es:

**ONCOLYTICS BIOTECH INC. (100.0%)
Suite 210 1167 Kensington Crescent N. W.
Calgary, AB T2N 1X7, CA**

72 Inventor/es:

**COFFEY, MATTHEW C.;
SERL, SARAH y
PAVLIV, LEO**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 630 012 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

Formulaciones virales liofilizadas

Antecedentes

- 5 Los virus son importantes en varias aplicaciones terapéuticas, incluyendo, por ejemplo, la terapia viral y la generación de vacunas. En estas aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable que los virus retengan su infectividad o inmunogenicidad. Sin embargo, los virus a menudo pierden infectividad o inmunogenicidad después de periodos prolongados debido a formulaciones menos que óptimas o condiciones de almacenamiento inadecuadas.

Resumen

- 10 Se proporcionan aquí formulaciones virales liofilizadas útiles para la estabilización y almacenamiento de reovirus y métodos de preparación de estas formulaciones, como se define en las reivindicaciones adjuntas. Las formulaciones se pueden usar, por ejemplo, para preservar los reovirus (es decir, para retener la infectividad o inmunogenicidad de los reovirus) durante los períodos de almacenamiento. Las formulaciones pueden tener niveles más bajos de partículas, haciéndolas más adecuadas para infusión parenteral o inyección.

- 15 En un aspecto, la invención proporciona formulaciones virales que incluyen un reovirus (por ejemplo, un reovirus purificado) y una composición no viral que incluye excipientes. Las formulaciones virales incluyen un reovirus purificado y una composición no viral que comprende manitol, sorbitol, histidina y Mg^{2+} . Las formulaciones virales se liofilizan. Antes de la liofilización, la composición no viral es una composición no viral líquida que comprende además un portador líquido. La concentración de sorbitol en la composición no viral líquida es inferior al 3% en base al peso de la composición no viral líquida. La composición no viral está sustancialmente libre de sales catiónicas monovalentes.

- 20 También se describen aquí formulaciones virales que comprenden un reovirus purificado y una composición no viral que comprende manitol, sorbitol, histidina y Mg^{2+} . En estos ejemplos, las formulaciones virales pueden ser liofilizadas. Antes de la liofilización, la composición no viral puede ser una composición no viral líquida que comprende además un portador líquido. En algunos ejemplos, la concentración de azúcares en la composición no viral líquida puede ser inferior al 7,5% en peso con base en el peso de la composición no viral.

- 25 La concentración combinada de manitol y sorbitol en la composición no viral líquida puede ser inferior al 10% en peso (por ejemplo, 7% en peso) con base en el peso de la composición no viral líquida. En algunos ejemplos, la formulación viral está sustancialmente exenta de Zn^{2+} y/o trehalosa. Opcionalmente, la composición no viral incluye además un tensioactivo no iónico.

- 30 En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones virales que comprenden un reovirus purificado y una composición no viral que comprende sacarosa, Mg^{2+} y un tensioactivo no iónico. Las formulaciones virales se liofilizan. La composición no viral es, antes de la liofilización, una composición no viral líquida que comprende además un portador líquido. La concentración de sacarosa en la composición no viral líquida, antes de la liofilización, es inferior al 5% con base en el peso de la composición no viral líquida. Las composiciones no virales están sustancialmente exentas de sales catiónicas monovalentes, polioles diferentes a sacarosa y carboxilatos.

- 35 En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones virales que consisten esencialmente en un reovirus purificado y una composición no viral que comprende sacarosa, Mg^{2+} y un tensioactivo no iónico. Las formulaciones virales se liofilizan. Antes de la liofilización, la composición no viral es una composición no viral líquida que comprende además un portador líquido. La concentración de sacarosa en la composición no viral líquida es inferior al 5% en base al peso de la composición no viral líquida.

- 40 Opcionalmente, el Mg^{2+} está presente como cloruro de magnesio. El tensioactivo no iónico es opcionalmente polisorbato 80. El portador líquido puede ser un portador acuoso tal como agua. El reovirus incluido en las formulaciones virales liofilizadas descritas aquí puede ser, por ejemplo, un reovirus oncolítico. Se proporciona aquí una formulación liofilizada en la que el reovirus es un reovirus de mamífero. Un ejemplo de un reovirus de mamífero es un reovirus humano, tal como un virus de serotipo 3 (por ejemplo, el reovirus de cepa de Dearing). El reovirus es
45 opcionalmente un reovirus recombinante, un reovirus redistribuido, o IDAC #190907-01.

- Opcionalmente, las formulaciones virales son estables a una temperatura aproximadamente a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo (por ejemplo, al menos un día). Opcionalmente, las formulaciones virales son estables a una temperatura de aproximadamente 4 °C o menos durante al menos tres meses (por ejemplo, al menos seis meses, al menos doce meses, al menos dieciocho meses o cualquier cantidad de tiempo mayor de tres meses).
50 Opcionalmente, las formulaciones virales son adecuadas para la reconstitución antes de la administración. Las formulaciones virales reconstituidas pueden diluirse adicionalmente para conseguir una dosis preferida para la administración.

- También se proporcionan aquí métodos para preparar las formulaciones virales. Los métodos incluyen proporcionar el reovirus, combinar el reovirus y una composición no viral líquida (incluyendo los excipientes como se describe aquí y un portador líquido) para formar una formulación viral líquida y liofilizar la formulación viral líquida. La liofilización de la formulación viral líquida comprende opcionalmente las etapas de congelación de la formulación viral líquida a una temperatura inferior a 0 °C para formar una formulación viral congelada y aplicar un vacío a la formulación viral congelada. En algunos ejemplos, los métodos comprenden además la reconstitución de la formulación viral liofilizada (por ejemplo, disolución o suspensión de la formulación viral liofilizada en un medio). Los métodos opcionalmente comprenden además la adición de un tensioactivo no iónico a la composición. También se describen aquí formulaciones virales preparadas de acuerdo con estos métodos.
- 5
- 10 Se describen adicionalmente en la presente memoria métodos para preservar o estabilizar un reovirus. Los métodos incluyen la preparación de una formulación viral liofilizada como se describe aquí y el almacenamiento de la formulación viral liofilizada. En algunos ejemplos, el reovirus se almacena a una temperatura igual o inferior a la temperatura ambiente. Por ejemplo, la temperatura puede ser la temperatura ambiente o desde 2 °C a 8 °C (por ejemplo, 4 °C). En algunos ejemplos, la temperatura es de -20 °C o desde -60 °C a -80 °C.
- 15 También se describen aquí métodos para preparar formulaciones virales con niveles bajos de partículas antes de la liofilización, por ejemplo, formulaciones virales no agregadas. Opcionalmente, las formulaciones virales comprenden menos de 6.000 partículas que tienen un tamaño de partícula de 10 micras o mayor por contenedor (por ejemplo, menos de 3.000 partículas, menos de 2.000 partículas, menos de 1.000 partículas, menos de 500 partículas, menos de 300 partículas o menos de 100 partículas de 10 micras o más por contenedor). Opcionalmente, las formulaciones virales comprenden menos de 600 partículas que tienen un tamaño de partícula de 25 micras o más (por ejemplo, menos de 500 partículas, menos de 400 partículas, menos de 300 partículas, menos de 200 partículas, menos de 100 partículas, menos de 50 partículas, o menos de 10 partículas de 25 micras o más por contenedor). Los métodos incluyen la preparación de la formulación viral tal como se describe aquí y luego la liofilización de la composición para preparar una formulación viral liofilizada. Opcionalmente, la formulación viral liofilizada puede reconstituirse y las formulaciones virales reconstituidas pueden ser adecuadas para la administración por infusión parenteral o inyección.
- 20
- 25

Los detalles de uno o más aspectos se exponen en los dibujos adjuntos y en la siguiente descripción. Otras características, objetos y ventajas resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

- La figura 1 es un gráfico de barras que muestra la dosis media infectiva de cultivo de tejido, expresada como TCID₅₀ por mililitro, para formulaciones de reovirus liofilizadas antes del almacenamiento (t=0) a temperatura ambiente y después de 3 (t=3m), 6,5 (t=6,5m), 12 (t=12m) y 18,5 (t=18,5m) meses de almacenamiento a temperatura ambiente, 2-8 °C, -20 °C y -80 °C. Para cada formulación, de izquierda a derecha: t=0 a temperatura ambiente; t=18,5m a -80 °C; t=3m a -20 °C; t=6,5m a -20 °C; t=12m a -20 °C; t=18,5 m a -20 °C; t=3m a 2-8 °C; t=6,5m a 2-8 °C; t=12m a 2-8 °C; t=18,5m a 2-8 °C; t=3m a temperatura ambiente; t=6,5m a temperatura ambiente; t=12m a temperatura ambiente.
- 30
- 35 Para la Formulación 1, el reovirus eluido con solución salina regulada con fosfato se diluyó en 30 mg/mL de manitol, 20 mg/mL de histidina, 0,01% v/v de polisorbato 80, 20 mg/mL de sorbitol y 2 mM de MgCl₂, a un título viral de 3×10^{10} TCID₅₀/mL. Para la Formulación 2, el reovirus eluido con solución salina regulada con fosfato se diluyó en 40 mg/mL de sacarosa, 0,05% en v/v de polisorbato 80 y 2 mM de MgCl₂, a un título viral de 3×10^{10} TCID₅₀/ml.

- La figura 2 es un gráfico de barras que muestra la recuperación de partículas infecciosas con base en el porcentaje de la dosis media infectiva de cultivo de tejidos, expresada como TCID₅₀ por mililitro, para formulaciones de reovirus liofilizadas antes del almacenamiento (t=0) a temperatura ambiente y después de 3 (t=3m), 6,5 (t=6,5m), 12 (t=12m) y 18,5 (t=18,5m) meses de almacenamiento a temperatura ambiente, 2-8°C, -20 °C y -80 °C. Para cada formulación, de izquierda a derecha: t=0 a temperatura ambiente; t=18,5m a -80 °C; t=3m a -20 °C; t=6,5m a -20 °C; t=12m a -20 °C; t=18,5 m a -20 °C; t=3m a 2-8 °C; t=6,5m a 2-8 °C; t=12m a 2-8 °C; t=18,5m a 2-8 °C; t=3m a temperatura ambiente; t=6,5m a temperatura ambiente; t=12m a temperatura ambiente.
- 40
- 45

- La figura 3 es un gráfico de barras que muestra la evolución de los títulos virales totales normalizados medidos por HPLC, expresados como partículas virales por mililitro, para la Formulación 1 de reovirus liofilizado antes del almacenamiento (t=0) a temperatura ambiente y después de 2 semanas (tiempo=2 semanas), 1 mes (tiempo=1m), 2 meses (tiempo=2m), 3 meses (tiempo=3m), 6,5 meses (tiempo=6,5m), 12 meses (tiempo=12m) y 18,5 meses (tiempo=18,5m) de almacenamiento a 37 °C, temperatura ambiente, 2-8 °C, -20 °C y -80 °C. Para cada temperatura, de izquierda a derecha: tiempo=0, tiempo=2 semanas, tiempo=1m, tiempo=2m, tiempo=3m, tiempo=6,5m, tiempo=12m y tiempo=18,5m.
- 50

- La figura 4 es un gráfico de barras que muestra la evolución de los títulos virales totales normalizados medidos por HPLC, expresado como partículas virales por mililitro, para la Formulación 2 de reovirus liofilizado antes del (t=0) a temperatura ambiente y después de 2 semanas (tiempo=2 semanas), 1 mes (tiempo=1m), 2 meses (tiempo=2m), 3 meses (tiempo=3m), 6,5 meses (tiempo=6,5m), 12 meses (tiempo=12m) y 18,5 meses (tiempo=18,5m) de almacenamiento a 37 °C, temperatura ambiente, 2-8 °C, -20 °C y -80 °C. Para cada temperatura, de izquierda a
- 55

derecha: tiempo=0, tiempo=2 semanas, tiempo=1m, tiempo=2m, tiempo=3m, tiempo=6,5m, tiempo=12m y tiempo=18,5m. La muestra almacenada durante 3 meses a -20 °C, indicada con un asterisco (*), procede de un análisis de repetición realizado tres días después de las otras muestras de temperatura de almacenamiento.

Descripción detallada

5 Se describen aquí formulaciones virales útiles para el almacenamiento de reovirus y métodos para preparar estas formulaciones. Las formulaciones se pueden usar, por ejemplo, para retener la infectividad o inmunogenicidad de los reovirus durante los periodos de almacenamiento. Las formulaciones virales liofilizadas descritas aquí incluyen un reovirus y una composición no viral que incluye excipientes.

10 Las formulaciones liofilizadas incluyen un reovirus. Tal como se utiliza aquí, el reovirus se refiere a cualquier virus clasificado en el género de reovirus, incluyendo reovirus de origen natural y recombinantes. Los reovirus son virus con un genoma de ARN de doble cadena y segmentado. Los viriones miden 60-80 nm de diámetro y poseen dos cápsulas de cápside icosaédricas, concéntricas. El genoma consiste en ARN de doble cadena en 10-12 segmentos discretos con un tamaño total del genoma de 16-27 pares de kilobases (kbp). Los segmentos individuales de ARN varían en tamaño. Tres tipos distintos pero relacionados de reovirus han sido recuperados de muchas especies. Los tres tipos
15 comparten un antígeno común de fijación del complemento. El reovirus humano consiste en tres serotipos: tipo 1 (cepa Lang o T1L), tipo 2 (cepa Jones, T2J) y tipo 3 (cepa Dearing o cepa Abney, T3D o T3A).

20 Como se ha descrito anteriormente, el reovirus puede ser un reovirus recombinante, que puede ser de origen natural o no natural. El reovirus se describe como de origen natural cuando puede ser aislado de una fuente en la naturaleza y no ha sido intencionalmente modificado por humanos en el laboratorio. Por ejemplo, el reovirus puede ser de una fuente de campo (es decir, de un humano que ha sido infectado con el reovirus). El reovirus también se puede seleccionar o mutagenizar para mejorar la actividad (por ejemplo, actividad oncolítica). Ejemplos de reovirus específicos pueden encontrarse, por ejemplo, en las Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Nos. 2008/0226602 y 2008/0292594.

25 El reovirus puede ser modificado pero ser todavía capaz de infectar líticamente una célula de mamífero que tiene una vía ras activa. El reovirus puede pretratarse química o bioquímicamente (por ejemplo, mediante tratamiento con una proteasa, tal como quimi tripsina o tripsina) antes de la administración a las células proliferantes. El pretratamiento con una proteasa elimina la capa externa o la cápside del virus y puede aumentar la infectividad del virus. El reovirus puede recubrirse en un liposoma o micela (Chandran and Nibert, Journal of Virology, 72(1):467-75 (1998)). Por ejemplo, el virión puede tratarse con quimi tripsina en presencia de concentraciones formadoras de micelas de
30 tensioactivos de sulfato de alquilo para generar una nueva partícula subviral infecciosa (ISVP).

35 El reovirus puede ser un reovirus recombinante o redistribuido resultante de la recombinación/redistribución de segmentos genómicos a partir de dos o más reovirus genéticamente distintos. La recombinación/redistribución de segmentos genómicos de reovirus puede ocurrir en la naturaleza después de la infección de un organismo huésped con al menos dos reovirus genéticamente distintos. Los viriones recombinantes también pueden generarse en cultivo celular, por ejemplo, por coinfección de células huésped permisivas con reovirus genéticamente distintos. Por consiguiente, el reovirus recombinante para su uso en las formulaciones descritas aquí puede resultar de la redistribución de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente distintos, incluyendo, pero sin limitarse a, reovirus humano, tal como tipo 1 (por ejemplo, cepa Lang), tipo 2 (por ejemplo, la cepa Jones), y el tipo 3 (por ejemplo, la cepa Dearing o la cepa de Abney), los reovirus de mamíferos no humanos o el reovirus aviar. En algunos ejemplos, los reovirus recombinantes pueden resultar de la redistribución de segmentos genómicos de dos o más reovirus genéticamente distintos en los que por lo menos un virus parental ha sido modificado genéticamente, comprende uno o más segmentos genómicos sintetizados químicamente, ha sido tratado con agentes mutágenos químicos o físicos, o es en sí mismo el resultado de un evento de recombinación. El reovirus recombinante puede experimentar la recombinación, por ejemplo, en presencia de mutágenos químicos, incluyendo, pero sin limitarse a, sulfato de dimetilo y bromuro de etidio, o mutágenos físicos, incluyendo, pero sin limitarse a, luz ultravioleta y otras formas de radiación.
45

Otros ejemplos de reovirus recombinantes adecuados incluyen aquellos que comprenden eliminaciones o duplicaciones en uno o más segmentos del genoma, que comprenden información genética adicional como resultado de la recombinación con un genoma de célula huésped o que comprenden genes sintéticos. El reovirus también puede ser modificado por incorporación de proteínas de recubrimiento mutadas, tales como, por ejemplo, al, en la cápsida externa del virión. Las proteínas pueden ser mutadas por reemplazo, inserción o eliminación. El reemplazo incluye la inserción de diferentes aminoácidos en lugar de los aminoácidos nativos. Las inserciones incluyen la inserción de residuos de aminoácidos adicionales en la proteína en uno o más lugares. Las eliminaciones incluyen eliminaciones de uno o más residuos de aminoácidos en la proteína. Tales mutaciones pueden ser generadas por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida a un sitio de oligonucleótido, del gen que codifica para una de las proteínas de recubrimiento puede dar como resultado la generación de la proteína de recubrimiento mutante deseada. En una realización, el reovirus es IDAC #190907-01.
50
55

Los reovirus para uso en las formulaciones liofilizadas descritas aquí pueden ser reovirus purificados. Como se usa aquí, los reovirus purificados se refieren a reovirus que se han separado de componentes celulares que los acompañan de manera natural. Típicamente, los reovirus se consideran purificados cuando son al menos 70% (por ejemplo, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 99%) en peso seco, libres de las proteínas y otros componentes celulares con los que están asociados de manera natural. Los reovirus se pueden purificar, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en las Publicaciones de Solicitud de Patente de Estados Unidos Nos. 2002/0168764; 2004/0005693; 2005/0095692; 2006/0088869; y 2007/0269856. Por ejemplo, el reovirus puede separarse de otras partículas utilizando las técnicas de centrifugación por gradiente de densidad, ultrafiltración, diafiltración, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía líquida de alta resolución, o combinaciones de éstas.

Como se discutió anteriormente, las formulaciones virales incluyen una composición no viral que comprende excipientes. Opcionalmente, se incluyen al menos dos excipientes (por ejemplo, dos, tres o más excipientes) en la composición no viral. Los excipientes para uso en las composiciones no virales incluyen, pero no se limitan a, azúcares, aminoácidos, cationes divalentes y tensioactivos. Estos excipientes pueden contribuir a la estabilidad del reovirus. En algunos ejemplos, el uso de estos excipientes en las composiciones no virales y por lo tanto en las formulaciones virales permite el almacenamiento a largo plazo de reovirus (por ejemplo, almacenamiento durante doce meses o más) sin pérdida de la infectividad viral.

Los azúcares adecuados para uso en las composiciones no virales descritas aquí incluyen, por ejemplo, monosacáridos y disacáridos. En algunos ejemplos, las composiciones no virales incluyen manitol, sorbitol, sacarosa, o combinaciones de éstos. Otros ejemplos de azúcares adecuados incluyen lactosa, dextrosa, fructosa, glucosa y maltosa. Opcionalmente, las composiciones no virales y/o las formulaciones virales liofilizadas están sustancialmente libres de trehalosa. Sustancialmente libre significa que las composiciones no virales y/o las formulaciones virales liofilizadas pueden incluir menos de 0,1%, menos de 0,01%, menos de 0,001%, menos de 0,0001%, o 0% de trehalosa con base en el peso de la formulación. En algunos ejemplos, las composiciones no virales y/o las formulaciones virales liofilizadas están sustancialmente libres de azúcares distintos a la sacarosa (es decir, las composiciones no virales y/o la formulación viral liofilizada está sustancialmente libre de polioles diferentes a sacarosa).

Los azúcares para uso en las composiciones no virales y/o formulaciones virales liofilizadas pueden incluir un azúcar o una combinación de dos o más azúcares. Por ejemplo, la composición no viral puede incluir sacarosa como el azúcar presente en la formulación o puede incluir una combinación de manitol y sorbitol como los azúcares presentes en la formulación. La concentración de excipientes, incluidos los azúcares, presentes en las formulaciones virales liofilizadas, puede expresarse aquí como el porcentaje en peso con base en el peso de la composición no viral líquida (es decir, la composición no viral, antes de la liofilización, incluyendo un portador líquido). La concentración total de azúcar(es) presente(s) en la composición no viral puede ser de 10% en peso o menos con base en el peso de la composición no viral. Por ejemplo, la concentración total de azúcares puede ser inferior al 7,5% en peso con base en el peso de la composición no viral líquida (por ejemplo, menos del 7,4% en peso, menos del 7,3% en peso, menos del 7,2% en peso, menos del 7,1% en peso, menos del 7% en peso, menos del 6% en peso, menos del 5% en peso, menos del 4% en peso, menos del 3% en peso, menos del 2% en peso, o menos del 1% en peso con base en el peso de la composición no viral líquida). Por ejemplo, la sacarosa puede estar presente en la composición no viral en una concentración que varía desde 0,1% a 5%, desde 1% a 4,5%, o desde 2% a 4% (por ejemplo, 3%) en peso con base en el peso de la composición líquida no viral. Opcionalmente, manitol y sorbitol se pueden incluir en la composición no viral en una concentración combinada de menos del 7,5% (por ejemplo, 7%) con base en el peso de la composición no viral líquida. Por ejemplo, el manitol puede incluirse en una concentración que varía desde 0,01% a 7,4% (por ejemplo, desde 0,1% a 7%, desde 1% a 6%, desde 2% a 5%, o desde 3% a 4%) y sorbitol se puede incluir en una concentración que varía de 0,01% a 7,4% (por ejemplo, desde 0,1% a 7%, desde 1% a 6%, desde 2% a 5%, o desde 3% a 4%), de tal forma que la concentración combinada de los azúcares es inferior al 7,5% con base en el peso de la composición no viral líquida.

Los aminoácidos también se pueden incluir en las composiciones no virales descritas aquí. Los aminoácidos adecuados incluyen, por ejemplo, histidina, arginina, lisina, metionina, ácido glutámico o mezclas de éstos. Uno o más aminoácidos pueden estar presentes en la composición no viral en una concentración de 5% o menos con base en el peso de la composición no viral líquida. Por ejemplo, la concentración de aminoácidos puede ser de 4,5% o menos, 4,0% o menos, 3,5% o menos, 3,0% o menos, 2,5% o menos, 2,0% o menos, 1,5% o menos, 1,0% o menos, o 0,5% o menos con base en el peso de la composición no viral líquida.

Los cationes divalentes también se pueden incluir en las composiciones no virales descritas en la presente memoria. Un catión divalente adecuado para uso en la composición no viral incluye el catión de magnesio (es decir, Mg^{2+}). Mg^{2+} se puede introducir en la composición no viral en combinación con un anión como una sal, tal como $MgCl_2$. Opcionalmente, las composiciones no virales y/o las formulaciones virales están sustancialmente libres de Zn^{2+} . El catión divalente puede estar presente en la composición no viral líquida en una concentración que varía desde 0,01 mM a 5 mM. Por ejemplo, Mg^{2+} puede estar presente en la formulación viral como $MgCl_2$ en una concentración que varía desde 0,1 mM a 4,5 mM, 0,5 mM a 4 mM, o 1 mM a 3 mM (por ejemplo, 2 mM). Opcionalmente, los excipientes presentes en la formulación no viral, excluyendo el vehículo líquido, pueden estar sustancialmente libres de sales

catiónicas monovalentes, tales como, por ejemplo, sales que contienen sodio (Na⁺), litio (Li⁺), potasio (K⁺) y amonio (NH₄⁺).

Un excipiente adicional para uso en las composiciones no virales descritas aquí puede incluir, por ejemplo, un tensioactivo. Un tensioactivo se refiere a una sustancia que tiene, en combinación, una fracción hidrofílica y una fracción hidrófoba. Como se usan aquí, los tensioactivos incluyen, por ejemplo, detergentes. Los tensioactivos adecuados para uso en las composiciones no virales descritas aquí incluyen tensioactivos iónicos y no iónicos. En algunos ejemplos, el polisorbato 80 se incluye opcionalmente como tensioactivo no iónico en las composiciones no virales. Uno o más tensioactivos pueden estar presentes en las composiciones no virales, opcionalmente en una cantidad de menos del 1% en peso con base en el peso de la composición no viral líquida. Por ejemplo, el tensioactivo(s) puede estar presente en la composición no viral en una cantidad de menos de 0,5% en peso, menos de 0,1% en peso, o menos de 0,05% en peso (por ejemplo, 0,01% en peso) .

Opcionalmente, las composiciones no virales y/o las formulaciones virales liofilizadas están sustancialmente exentas de carboxilatos. Ejemplos de carboxilatos incluyen succinato y citrato.

Una combinación de ejemplo de la composición de reovirus y no viral (incluyendo excipientes) para formar una formulación viral incluye un reovirus purificado, manitol, sorbitol, histidina y Mg²⁺. Como se ha descrito anteriormente, la composición no viral, antes de la liofilización, puede incluir además (es decir, además de los excipientes) un vehículo líquido para formar una composición líquida no viral. La concentración combinada de los azúcares en la composición no viral líquida puede ser inferior al 7,5% en peso con base en el peso de la composición no viral líquida. Por ejemplo, la concentración de manitol puede ser del 3% y la concentración de histidina puede ser del 2% para proporcionar una concentración combinada del 5%. Opcionalmente, el sorbitol puede estar presente en una concentración de menos del 3% con base en el peso de la composición no viral líquida. Por ejemplo, el sorbitol puede estar presente en una concentración de menos de 2,9%, menos de 2,8%, menos de 2,7%, menos de 2,6%, menos de 2,5%, menos de 2,4%, menos de 2,3%, menos de 2,2%, menos de 2,1%, menos de 2%, menos de 1,9%, menos de 1,8%, menos de 1,7%, menos de 1,6%, menos de 1,5%, menos de 1,4%, menos de 1,3%, menos de 1,2%, menos de 1,1%, o menos de 1%. La formulación también puede incluir un tensioactivo no iónico, tal como polisorbato 80, en una cantidad menor que 0,1% en peso de la composición no viral líquida (por ejemplo, 0,01%). Además, la composición no viral y/o la formulación viral pueden estar sustancialmente libres de sales catiónicas monovalentes, Zn²⁺ y/o trehalosa.

Otra formulación viral adecuada incluye un reovirus purificado y una composición no viral que incluye sacarosa, Mg²⁺ y un tensioactivo no iónico. Antes de la liofilización, la composición no viral puede incluir adicionalmente un portador líquido, formando así una composición líquida no viral. La concentración de sacarosa en la composición no viral líquida puede ser menos de 5% en base al peso de la composición no viral líquida. Opcionalmente, la sacarosa está presente en una concentración de 4,5% o menos, 4% o menos, 3,5% o menos, 3% o menos, 2,5% o menos, o 2% o menos con base en el peso de la composición no viral líquida. Además, la composición no viral y/o la formulación viral pueden estar sustancialmente libres de polioles diferentes a sacarosa y carboxilatos (por ejemplo, succinato y citrato).

También se describen aquí métodos para preparar las formulaciones virales liofilizadas. Los métodos incluyen proporcionar un reovirus (por ejemplo, un reovirus purificado), combinar el reovirus con una composición no viral que incluye los excipientes en un portador líquido para formar una formulación viral líquida y liofilizar la formulación viral líquida. En algunos ejemplos, se proporciona una cantidad adecuada de reovirus para preparar una formulación viral a un título que varía de 1×10^5 a 4×10^{12} partículas virales por mililitro (VP/mL) de portador líquido.

Los portadores líquidos adecuados pueden ser portadores acuosos o no acuosos. Ejemplos de portadores no acuosos adecuados incluyen propilenglicol, polietilenglicol y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, aceite de oliva y similares. Los ésteres orgánicos tales como oleato de etilo también son portadores no acuosos adecuados. Los portadores acuosos incluyen agua, etanol, glicerol, soluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medio regulado. Se prefiere el agua o un portador acuoso cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. La composición, si se desea, también puede contener agentes humectantes o emulsionantes, lubricantes, deslizantes, emolientes, humectantes, espesantes, agentes aromatizantes, conservantes o reguladores de pH. Pueden incluirse reguladores de pH para controlar el pH de la composición no viral y, por tanto, la formulación viral. En algunos ejemplos, se incluye el regulador para mantener el pH de la formulación viral entre 5 y 8,5. Por ejemplo, se puede incluir el regulador para mantener el pH de la formulación viral entre 6,8 y 8,0 o entre 7,0 y 7,8 (por ejemplo, 7,4). Ejemplos de reguladores adecuados incluyen reguladores de fosfato tales como solución salina regulada con fosfato (PBS), por ejemplo 0,01-0,1 M y preferiblemente regulador de fosfato 0,05 M, reguladores de acetato, reguladores de benzoato, reguladores de citrato, reguladores de lactato, reguladores de maleato y reguladores de tartrato. Pueden usarse portadores regulados como solución de Hanks, solución de Ringer, solución de dextrosa, albúmina de suero humano al 5%, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer y aceites fijos, polietilenglicol, polivinilpirrolidona o lecitina. También se pueden usar soluciones de monoetanolamina, dietanolamina, trometamina y glicina como reguladores adecuados. También se pueden usar como portadores liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. Otros ejemplos

de portadores adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E. W. Martin. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

Alternativamente, la composición no viral que contiene los excipientes en un portador líquido se puede añadir a un cultivo de células infectadas con reovirus. Tal como se utiliza aquí, un cultivo de células se refiere a una población de células cultivadas tal como se encuentran en sus condiciones de cultivo (por ejemplo, las células infectadas con reovirus y el medio de cultivo).

La liofilización se puede llevar a cabo utilizando técnicas y equipos conocidos en la técnica. El proceso de liofilización se puede realizar, por ejemplo, usando un liofilizador. La liofilización puede implicar congelación y secado subsiguiente de la formación viral líquida. Opcionalmente, la liofilización implica una etapa de carga del producto, etapa de congelación y etapa de secado primario y secado secundario. El producto se carga en el liofilizador y los estantes se ajustan a un punto fijo de temperatura objetivo por una duración predeterminada. La etapa de congelación implicó que los estantes se enfriaran hasta un punto fijo objetivo a un índice controlado (°C/hora). El producto se mantiene en la etapa de congelación durante un tiempo predeterminado. En la etapa de congelación, la formulación viral líquida puede enfriarse, durante un periodo de tiempo apropiado, a una temperatura inferior a 0 °C para formar una formulación viral congelada. Opcionalmente, la formulación viral líquida puede enfriarse a una temperatura de -50 °C o menos. En algunos ejemplos, la formulación viral líquida puede enfriarse durante 10 horas o menos. Por ejemplo, la formulación viral puede enfriarse durante 9 horas o menos, 8 horas o menos, 7 horas o menos, 6 horas o menos, 5 horas o menos, 4 horas o menos, 3 horas o menos, 2 horas o menos, 1 hora o menos, o 30 minutos o menos. Opcionalmente, el proceso de liofilización puede incluir una etapa de recocido en la que la formulación viral congelada se calienta a una temperatura igual o inferior a la temperatura ambiente y, a continuación, se enfría de nuevo para formar una formulación viral congelada. En algunos ejemplos, el paso de recocido no se realiza. La formulación viral congelada se puede secar entonces a presión reducida (por ejemplo, aplicando un vacío) para formar la formulación viral liofilizada. Opcionalmente, se puede aplicar una presión de vacío que varía desde 50 a 80 µm Hg (por ejemplo, 60 µm Hg) a la formulación viral congelada. La etapa de secado se puede llevar a cabo a una temperatura de, por debajo o por encima de la temperatura ambiente. Por ejemplo, la etapa de secado se puede llevar a cabo a una temperatura de 40 °C o menos, 30 °C o menos, 20 °C o menos, 10 °C o menos, o 0 °C o menos. Opcionalmente, la formulación viral liofilizada puede secarse adicionalmente en una o más etapas de secado adicionales a una temperatura de, por debajo o por encima de la temperatura ambiente para eliminar el agua residual. Por ejemplo, las etapas de secado adicionales pueden llevarse a cabo a una temperatura que varía desde -10 °C a 50 °C (por ejemplo, desde 0 °C a 40 °C, desde 10 °C a 30 °C, o desde 20 °C a 25 °C). Además, la formulación viral liofilizada puede secarse en presencia de un gas inerte (por ejemplo, nitrógeno) o una combinación de gases inertes. Por ejemplo, el recipiente de liofilización y/o el recipiente de almacenamiento viral pueden ser purgados con un gas inerte y tapados para evitar la exposición de la formulación viral al aire. La formulación viral liofilizada, después de una o más etapas de secado, puede tener un contenido de humedad de, por ejemplo, menos del 20%. En algunos ejemplos, el contenido de humedad de la formulación viral liofilizada es menos del 15%, menos del 10%, menos del 5%, menos del 4%, menos del 3%, menos del 2%, menos del 1%, menos del 0,5%, o menos del 0,1%.

Las formulaciones virales liofilizadas descritas aquí pueden usarse para preservar y estabilizar un reovirus durante un periodo de tiempo, incluyendo periodos de almacenamiento extendidos. Por ejemplo, el reovirus preparado de acuerdo con las formulaciones descritas aquí puede almacenarse por hasta doce meses (por ejemplo, un día, una semana, un mes, tres meses, seis meses, nueve meses o doce meses) sin perder la infectividad viral. Las formulaciones virales liofilizadas descritas aquí son estables a aproximadamente la temperatura ambiente y pueden presentar una estabilidad aumentada a temperaturas inferiores que aproximadamente la temperatura ambiente.

Como se usa aquí, temperatura ambiente se refiere a una temperatura entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 30 °C. Los reovirus se pueden almacenar en las formulaciones virales a temperaturas por debajo de la temperatura ambiente sin pérdida significativa de infectividad o inmunogenicidad. En algunos ejemplos, las formulaciones virales liofilizadas se almacenan a temperaturas de 9 °C y menos (por ejemplo, 8 °C y menos, 7 °C y menos, 6 °C y menos, 5 °C y menos, 4 °C y menos, 3 °C y menos, 2 °C y menos, y 1 °C y menos. Por ejemplo, la temperatura de almacenamiento puede oscilar desde 2 °C a 8 °C (por ejemplo, 4 °C). Además, las formulaciones virales liofilizadas pueden almacenarse a temperaturas inferiores a 0 °C, tales como, por ejemplo, -20 °C o desde -60 °C a -80 °C, manteniendo al mismo tiempo la infectabilidad viral.

Las formulaciones virales liofilizadas son estables, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente la temperatura ambiente durante un periodo de tiempo (por ejemplo, al menos un día). En algunos ejemplos, las formulaciones virales son estables a una temperatura de aproximadamente 4 °C o menos durante al menos tres meses (por ejemplo, al menos cuatro meses, al menos cinco meses, al menos seis meses, al menos siete meses, al menos ocho meses, al menos nueve meses, al menos diez meses, al menos once meses, al menos doce meses, al menos trece meses, al menos catorce meses, al menos quince meses, al menos dieciséis meses, al menos diecisiete meses, al menos dieciocho meses, o cualquier cantidad de tiempo superior a tres meses). Adicionalmente se describen aquí métodos de preparación de formulaciones virales con niveles bajos de partículas, por ejemplo, formulaciones virales bajas o no agregadas. Los métodos incluyen la preparación de la formulación viral tal como se describe aquí y luego la liofilización de la formulación para preparar una formulación viral liofilizada. Las formulaciones virales preparadas

de acuerdo con estos métodos incluyen bajos niveles de partículas y son por lo tanto adecuadas para la administración por infusión parenteral o inyección. En algunos ejemplos, los niveles de partículas en los métodos se determinan usando la prueba de conteo de partículas de oscurecimiento de luz y/o la prueba de recuento de partículas microscópicas según USP <788>. Opcionalmente, las formulaciones virales comprenden menos de 6,000 partículas que tienen un tamaño de partícula de 10 micrómetros o más por contenedor. Por ejemplo, las formulaciones virales pueden comprender menos de 5,000 partículas, menos de 4,000 partículas, menos de 3,000 partículas, menos de 2,000 partículas, menos de 1,000 partículas, menos de 900 partículas, menos de 800 partículas, menos de 700 partículas, menos de 600 partículas, menos de 500 partículas, menos de 400 partículas, menos de 300 partículas, menos de 200 partículas o menos de 100 partículas de 10 micras o más por contenedor. Opcionalmente, las formulaciones virales comprenden menos de 600 partículas que tienen un tamaño de partícula de 25 micrómetros o más (por ejemplo, menos de 500 partículas, menos de 400 partículas, menos de 300 partículas, menos de 200 partículas, menos de 100 partículas, menos de 50 partículas, o menos de 10 partículas de 25 micras o más por contenedor).

También se proporcionan aquí composiciones farmacéuticas que incluyen las formulaciones virales liofilizadas. Las composiciones proporcionadas aquí se pueden administrar in vitro o in vivo en un portador farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, las formulaciones virales liofilizadas pueden reconstituirse disolviendo o suspendiendo la formulación viral liofilizada en un medio antes de combinar con un portador farmacéuticamente aceptable. Un portador farmacéuticamente aceptable puede ser un material sólido, semisólido o líquido que puede actuar como vehículo, portador o medio para la formulación viral liofilizada. Por lo tanto, la formulación viral liofilizada puede estar en forma de tabletas, cápsulas de gelatina blanda o dura, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (en un medio líquido) y soluciones inyectables estériles. Opcionalmente, las formulaciones virales liofilizadas son adecuadas para infusión. En estos ejemplos, las formulaciones virales liofilizadas preparadas de acuerdo con los métodos descritos aquí pueden reconstituirse y diluirse adicionalmente, según sea apropiado, para infusión. Por ejemplo, las formulaciones virales no agregadas que tienen niveles más bajos de partículas como se describen aquí pueden reconstituirse y las formulaciones virales reconstituidas pueden ser adecuadas para infusión parenteral o inyección.

Una composición farmacéutica puede incluir adicionalmente, sin limitación, agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes tales como metil y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del reovirus incluido en la formulación viral liofilizada después de la administración empleando procedimientos conocidos en la técnica. Además de las formulaciones representativas descritas a continuación, se pueden encontrar otras formulaciones adecuadas para uso en una composición farmacéutica en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21 ed.) ed. David B. Troy, Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Las formulaciones líquidas que incluyen las formulaciones virales liofilizadas (por ejemplo, formulaciones virales liofilizadas reconstituidas) para administración oral o para inyección incluyen generalmente soluciones acuosas, jarabes aromatizados adecuadamente, suspensiones acuosas u oleosas y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Otra formulación que se emplea opcionalmente en los métodos de la presente descripción incluye dispositivos de administración transdérmica (por ejemplo, parches). Dicha administración transdérmica puede usarse para proporcionar una infusión continua o discontinua del reovirus incluido en las formulaciones virales liofilizadas como se describe aquí. La construcción y el uso de parches transdérmicos para el suministro de agentes farmacéuticos es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5,023,252. Dichos parches pueden construirse para el suministro continuo, pulsátil o a demanda, de los reovirus.

En los métodos proporcionados, la formulación viral liofilizada se administra de una manera tal que el reovirus puede contactar en última instancia las células diana, por ejemplo, sistémicamente. La vía por la que se administra la formulación viral depende de la localización, así como del tipo de las células diana. Se puede emplear una amplia variedad de vías de administración. Para las vacunas, el reovirus se puede administrar sistémicamente, intradérmicamente o subcutáneamente, de manera que su objetivo son las células que presentan el antígeno, con el fin de provocar una respuesta inmune. Para los reovirus oncolíticos en los que el objetivo es un tumor sólido accesible, la formulación viral puede administrarse por inyección directa al tumor o por vía intravenosa. Opcionalmente, la formulación es adecuada para la reconstitución antes de la administración. Para un tumor hematopoyético, por ejemplo, la formulación viral puede reconstituirse y administrarse por vía intravenosa o intravascular. Para tumores que no son fácilmente accesibles dentro del cuerpo, tales como metástasis, la formulación viral puede administrarse de tal manera que pueda ser transportada sistémicamente a través del cuerpo del mamífero y así llegar al tumor (por ejemplo, intravenosa o intramuscularmente). Alternativamente, la formulación viral puede administrarse directamente a un solo tumor sólido, donde luego se transporta sistémicamente a través del cuerpo a las metástasis. Para la terapia de vacuna u oncolítica, la formulación viral también puede administrarse por vía subcutánea, intraperitoneal, intratecal (por ejemplo, para tumor cerebral), tópica (por ejemplo, para melanoma), oral (por ejemplo, para cáncer oral o

esofágico), rectal (por ejemplo, para cáncer colorrectal), vaginal (por ejemplo, para cáncer cervical o vaginal), nasalmente, por pulverizador de inhalación o por formulación en aerosol (por ejemplo, para cáncer de pulmón).

Opcionalmente, la formulación viral se administra continuamente a un sujeto al menos una vez al día o hasta durante el día en días consecutivos, durante un periodo de tiempo. Para la administración de la vacuna, normalmente son necesarias una administración primaria y una o más administraciones de refuerzo. De este modo, la formulación viral se administra, por ejemplo, a un sujeto, en cualquier solución farmacológicamente aceptable (por ejemplo, mediante administración intravenosa o infusión) durante un periodo de tiempo o intermitentemente. Por ejemplo, la formulación puede administrarse sistémicamente por inyección (por ejemplo, IM o por vía subcutánea) o tomada por vía oral diariamente al menos una vez al día, o administrada por infusión de una manera que da como resultado el suministro diario al tejido o corriente sanguínea del sujeto. Cuando la formulación viral se administra por infusión durante un periodo de tiempo, el periodo de tiempo es, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 o 24 horas, o en cualquier momento entre 1 y 24 horas, inclusive, o más. Opcionalmente, el periodo de tiempo es 5, 15, 30, 60, 90, 120, 150 o 180 minutos, o en cualquier momento entre 5 y 180 minutos, inclusive, o más. Así, por ejemplo, la formulación vírica se administra por infusión por 60 minutos. Las administraciones pueden repetirse diariamente durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 21, 28 días, o cualquier número de días entre 2 y 28 días, inclusive, o más.

Opcionalmente, la formulación viral incluye un adyuvante cuando se usa para provocar una respuesta inmune. Los adyuvantes incluyen, por ejemplo, sales de aluminio, aceite mineral, macropartículas, lipopolisacáridos, saponinas y similares.

Las formulaciones virales tal como se describen aquí pueden administrarse en una cantidad que sea suficiente (es decir, una cantidad eficaz) para tratar un trastorno proliferativo o para provocar una respuesta inmune. Se trata un trastorno proliferativo cuando la administración de la formulación de virus líquido a células en proliferación afecta la lisis (por ejemplo, oncólisis) de las células afectadas, dando como resultado una reducción en el número de células anormalmente proliferantes, una reducción en el tamaño de una neoplasia y/o una reducción en o eliminación de los síntomas (por ejemplo, dolor) asociados con la proliferación del trastorno. Tal como se utiliza aquí, el término oncólisis significa que al menos el 10% de las células proliferantes son sometidas a lisis (por ejemplo, son sometidas a lisis al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50% o 75% de las células). El porcentaje de lisis se puede determinar, por ejemplo, midiendo la reducción en el tamaño de una neoplasia o en el número de células proliferantes en un mamífero, o midiendo la cantidad de lisis de células in vitro (por ejemplo, a partir de una biopsia de células proliferantes).

Una cantidad eficaz de la formulación viral se determinará de forma individual y puede ser en base, al menos en parte, en el reovirus particular usado en la formulación viral; el tamaño del individuo, edad, sexo; el objetivo del tratamiento (por ejemplo, para tratar una enfermedad proliferativa o para provocar una respuesta inmune); y el tamaño y otras características de las células diana que se proliferan anormalmente. La concentración viral en la formulación viral puede medirse determinando el número de unidades formadoras de placa (PFU) en análisis con base en placas. Por ejemplo, para el tratamiento de un ser humano con una enfermedad proliferativa, se utilizan aproximadamente 10^3 a 10^{12} PFU de un reovirus contenido en una formulación viral, dependiendo del tipo, tamaño y número de células proliferantes o neoplasias presentes. La cantidad eficaz puede ser, por ejemplo, desde aproximadamente 1,0 PFU/kg de peso corporal a aproximadamente 10^{15} PFU/kg de peso corporal (por ejemplo, desde aproximadamente 10^2 PFU/kg de peso corporal a aproximadamente 10^{13} PFU/kg de peso corporal). Por ejemplo, la cantidad eficaz de la formulación viral administrada diariamente puede ser 1×10^{10} PFU y la formulación viral puede administrarse durante cinco días para dar como resultado una cantidad de tratamiento total de 5×10^{10} . Opcionalmente, la concentración viral en la formulación viral puede ser medida mediante la determinación de la dosis infectiva de cultivo de tejidos al 50% (TCID₅₀), que es la cantidad de reovirus necesaria para producir un efecto citopático en el 50% de las células infectadas con el reovirus. En algunos ejemplos, la proporción entre TCID₅₀ y PFU es 3:1. La cantidad eficaz de la formulación viral para tratar un ser humano con una enfermedad proliferativa puede ser desde aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{15} TCID₅₀ por día. La cantidad eficaz de la formulación viral puede administrarse durante un periodo de tiempo, referido aquí como un ciclo. Un ciclo puede representar, por ejemplo, un día, dos días, tres días, cuatro días, cinco días, seis días, siete días, ocho días, nueve días o diez días, cuando una cantidad igual o diferente de la formulación viral puede ser administrada diariamente. Por ejemplo, se pueden administrar 3×10^{10} TCID₅₀ por día durante cinco días para dar como resultado una cantidad total de $1,5 \times 10^{11}$ TCID₅₀ por ciclo. Opcionalmente, la cantidad eficaz es aproximadamente 3×10^{10} TCID₅₀ por día. Opcionalmente, la formulación viral se administra como una infusión intravenosa de una hora.

Las dosificaciones óptimas de las formulaciones virales dependen de una diversidad de factores. La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, la gravedad de la enfermedad tratada, el reovirus particular utilizado en la formulación y su modo de administración. Por lo tanto, no es posible especificar una cantidad exacta para cada formulación. Sin embargo, una persona con habilidades normales en la técnica puede determinar una cantidad apropiada utilizando únicamente una experimentación rutinaria dada la orientación proporcionada aquí.

Los intervalos de dosificación para la administración de las formulaciones son aquellos lo suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el que los síntomas de la enfermedad se ven afectados o son lo suficientemente

grandes para provocar una respuesta inmune. La dosificación no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas y reacciones anafilácticas. La dosificación puede ser ajustada por el médico en caso de cualquier contraindicación.

5 Las dosificaciones varían y se administran diariamente en una o más administraciones de dosis, durante uno o varios días. La formulación viral proporcionada puede administrarse en una dosis única o en dosis múltiples (por ejemplo, dos, tres, cuatro, seis o más dosis). Por ejemplo, cuando la administración es por infusión, la infusión puede ser una única dosis sostenida o puede administrarse por infusiones múltiples. El tratamiento puede durar de varios días a varios meses o hasta que se logre una disminución de la enfermedad.

10 Las combinaciones de las formulaciones virales se pueden administrar ya sea concomitantemente (por ejemplo, como una mezcla), separadamente pero simultáneamente (por ejemplo, a través de líneas intravenosas separadas en el mismo sujeto), o secuencialmente (por ejemplo, una de las formulaciones se da primero seguida de la segunda). Por lo tanto, el término combinación se utiliza para referirse a la administración concomitante, simultánea o secuencial de dos o más agentes.

15 Se contempla que las formulaciones virales proporcionadas se pueden combinar con otras terapias tumorales tales como quimioterapia, radioterapia, cirugía, terapia hormonal y/o inmunoterapia. De este modo, las formulaciones virales pueden administrarse conjuntamente con cirugía o la extirpación de la neoplasia. Por lo tanto, se proporcionan aquí métodos para el tratamiento de una neoplasia sólida que comprende la extirpación quirúrgica de la neoplasia y la administración de la formulación viral en o cerca del sitio de la neoplasia.

20 Se contempla además que las formulaciones virales en los métodos proporcionados se administran opcionalmente en combinación con o además de compuestos anticancerosos conocidos o agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos son compuestos que pueden inhibir el crecimiento de tumores. Tales agentes, incluyen, pero no se limitan a, agentes antineoplásicos tales como Acivicin; Aclarubicina; clorhidrato de Acodazol; AcrQnina; Adozelesin; Aldesleucina; Altretamina; Ambomicina; acetato de Ametantrona; Aminoglutetimida; Amsacrina; Anastrozol; Antramincina; Asparaginasa; Asperlin; Azacitidina; Azetepa; Azotomicina; Batimastat; Benzodepa; Bicalutamida; clorhidrato de Bisantreno; Dimesilato de Bisnafida; Bizelesin; sulfato de Bleomicina; sodio de Brequinar; Bropirimina; Busulfan; Cactinomicina; Calusterona; Caracemida; Carbetimer; Carboplatino; Carmustina; clorhidrato de Carrubicina; Carzelesin; Cedefingol; Clorambucil; Cirolemicina; Cisplatino; Cladribina; Crisnatol Mesilato; Ciclofosfamida; Citarabina; Dacarbazina; Dactinomicina; clorhidrato de Daunorubicina; Decitabina; Dexormaplatino; Dezaguanina; mesilato de Dezaguanina; Diaziquona; Docetaxel; Doxorubicina; clorhidrato de Doxorubicina; Droloxifeno; citrato de Droloxifeno; propionato de Dromostanolona; Duazomicina; Edatrexato; clorhidrato de Eflomitiina; Elsamitrucina; Enloplatino; Enpromate; Epiropidina; Epirubicina; clorhidrato de Epirubicina; Erbulozol; clorhidrato de Esorubicina; Estramustina; Estramustina fosfato sódico; Etanidazol; aceite Etiodizado I 131; Etopósido; Fosfato de Etopósido; Etoprina; clorhidrato de Fadrozol; Fazarabina; Fenretinida; Floxuridina; fosfato de Fludarabina; 5-Fluorouracilo; Flurocitabina; Fosquidona; Fostriecina de sodio; Gemcitabina; clorhidrato de Gemcitabina; Oro Au 198; Hidroxiurea; clorhidrato de Idarubicina; Ifosfamida; Ilmofosina; Interferón Alfa-2a; Interferón Alfa-2b; Interferón Alfa-n1; Interferón Alfa-n3; Interferón Beta-1a; Interferón Gamma-1b; Iproplatino; clorhidrato de Irinotecán; acetato de lanreotida; Letrozol; acetato de leuprolida; clorhidrato de Liarozol; Lometrexol de sodio; Lomustina; clorhidrato de Losoxantrona; Masoprocol; Maytansina; clorhidrato de Mecloretamina; acetato de Megestrol; acetato de Melengestrol; Melfalán; Menogaril; Mercaptopurina; Metotrexato; Metotrexato de sodio; Metoprina; Meturedpa; Mitindomida; Mitocarcin; Mitocromina; Mitogilina; Mitomalcina; Mitomicina C; Mitosper; Mitotano; Mitoxantrona; clorhidrato de Mitoxantrona; ácido Micofenólico; Nocodazol; Nogalamincina; Ormaplatino; Oxisurano; Paclitaxel; Pegaspargaso; Peliomicina; Pentamustina; sulfato de Peplomicina; Perfosfamida; Pipobroman; Pipsulfan; clorhidrato de Piroxantrona; Plicamicina; Plomestano; sodio de Porfímero; Porfiromicina; Prednimustina; clorhidrato de Procarbazona; Puromicina; clorhidrato de Puromicina; Pirazofurina; Riboprina; Rogletimida; Safmgol; clorhidrato de Safingol; Semustina; Simtrazeno; Sparfosato de sodio; Sparsomicina; clorhidrato de Spirogermanio; Spiromustina; Espiropatino; Estreptonigrina; Estreptozocina; cloruro de Estroncio Sr 89; Sulofenur; Talisomicina; Taxano; Taxoid; sodio de Tecogalan; Tegafur; clorhidrato de Teloxantrona; Temporfina; Teniposida; Teroxirona; Testolactona; Tiamiprina; Tioguanina; Tiotepa; Tiazofurina; Tirapazamina; clorhidrato de Topotecan; citrato de Toremifeno; acetato de Trestolona; fosfato de Triciribina; Trimetrexato; Trimetrexato Glucuronato; Triptorelina; clorhidrato de Tubulozol; Mostaza de Uracil; Uredopa; Vapreotida; Verteporfina; sulfato de Vinblastina; sulfato de Vincristina; Vindesina; sulfato de Vindesina; sulfato de Vinepidina; sulfato de Vinglicinato; sulfato de Vinleurosina; tartrato de Vinorelbina; sulfato de Vinrosidina; sulfato de Vinzolidina; Vorozol; Zeniplatino; Zinostatina; clorhidrato de Zorubicina.

55 Otros ejemplos de compuestos antineoplásicos incluyen 20-epi-1,25 dihidroxivitamina D3; 5-etiniluracilo; abiraterona; aclarrubicina; acilfulvene; adecipenol; adozelesina; aldesileucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; amrubicina; atrsacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolido; inhibidores de la angiogénesis; antagonista D; antagonista G; antarelix; antraciclinas; proteína-1 morfogenética anti-dorsalizante; antiandrógenos; carcinoma prostático; antiestrógenos; antineoplastones; oligonucleótidos antisentido; glicinato de afidicolina; moduladores del gen de la apoptosis; reguladores de la apoptosis; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminasa; inhibidores de la aromatasa; asulacrina; atamestano; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetrón; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastato; antagonistas de

BCR/ABL; benzoclorinas; benzoilstaurosporina; derivados de beta lactama; beta-alethina; betaclamina B; ácido betulínico; inhibidor de bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilspermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfofina C; derivados de camptotecina; viruela de canario IL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inhibidor derivado de cartilago; carzelesina; inhibidores de caseína quinasa (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetrorelix; clorinas; cloroquinoxalina sulfonamida; cicaprost; cis-porfirina; cladribina; análogos del clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo de combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crísnatol; criptoficina 8; derivados de criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocofosfato de citarabina; factor citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; deshidrodidemina B; deslorelina; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diaziquona; didemina B; didox; dietilnorspermina; dihidro-5-azacitidina; dihidrotaxol, 9-; dioxamicina; difenil-espiromustina; docosanol. dolasetrón; doxiluridina; droloxifeno; dronabinol; duocannicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemeno; emitefur; epirubicina; epristerido; análogo de estramustina; agonistas de estrógeno; antagonistas de estrógeno; etanidazol; fosfato de etopósido; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; fmasteride; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; clorhidrato de fluorodaunorubicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio texafirina; nitrato de galio; galocitabina; ganirelix; inhibidores de la gelatinasa; gemcitabina; inhibidores de glutatión; hepsulfam; heregulina; hexametileno bisacetamida; terapias hormonales; hipericina; ácido ibandrónico; idarrubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastato; imidazoacridonas; imiquimod; péptidos inmunoestimulantes; inhibidor del receptor del factor-1 de crecimiento similar a la insulina; agonistas de interferón; interferones; interleucinas; iobenguano; yododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; irinotecan; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetrón; jasplakinolida; kahalalida F; triacetato de lamellarina-N; lanreotide; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinan; leptostatina; letrozol; factor inhibidor de la leucemia; interferón alfa de leucocitos; leuprolida+estrógeno+progesterona; leuporelina; levamisol; análogos de LHRH; liarozol; análogo de poliamina lineal; péptido disacárido lipófilo; compuestos lipofílicos de platino; lissoclinamida 7; lobaplatino; lombricina; lometrexol; lonidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecan; lutecio texafirina; lisofilina; péptidos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspin; inhibidores de matrilisina; inhibidores de metaloproteinasas de matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninasa; metoclopramida; inhibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; ARN de doble cadena no coincidente; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; factor de crecimiento de fibroblastos de mitotoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticuerpo monoclonal, gonadotropina coriónica humana; monofosforil lípido A + pared celular de miobacteria sk; mopidamol; inhibidor génico de resistencia a múltiples fármacos; terapia con base-1 en un supresor de tumores múltiple; agente contra el cáncer de mostaza; micaperoxido B; extracto micobacteriano de la pared celular; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-sustituidas; nafarelina; nagrestip; naloxona + pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; ácido neridróico; endopeptidasa neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; nítróido antioxidante; nitrulina; O6-bencilguanina; octreotida; okicenona; oligonucleótidos; onapristona; ondansetrón; ondansetrón; oracina; inductor oral de citoquinas; ormaplatino; osaterona; oxaliplatino; oxanomicina; análogos de paclitaxel; derivados de paclitaxel; palauamina; palmitoilrixoxina; ácido pamidróico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazelliptina; pegaspargaso; peldesina; polisulfato de pentosano sódico; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; alcohol perilífico; fenazinomicina; fenilacetato; inhibidores de la fosfatasa; picibanil; clorhidrato de pilocarpina; pirarrubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inhibidor del activador del plasminógeno; complejo de platino; compuestos de platino; complejo platino-triamina; porfímero sódico; porfiromicina; prednisona; agentes progestacionales; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inhibidores de proteasoma; modulador inmune con base en la proteína A; inhibidor de la proteína quinasa C; inhibidores de la proteína quinasa C, microalgas; inhibidores de la proteína tirosina fosfatasa; inhibidores de purina nucleósido fosforilasa; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado de polioxietileno de hemoglobina piridoxilada; antagonistas de raf; raltitrexed; ramosetrón; inhibidores ras de la transferasa proteica farnesil; inhibidores ras; inhibidor ras-GAP; retelliptina desmetilada; renio Re 186 etidronato; rizoxina; ribozimas; RII retinamida; rogletimida; rohituquina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina; SarCNU; sarcófitol A; sargramostim; Sdi 1 miméticos; semustina; inhibidor 1 derivado de la senescencia; oligonucleótidos de sentido; inhibidores de la transducción de señales; moduladores de transducción de señales; Proteína de cadena sencilla enlazadora de antígeno; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato sódico; fenilacetato sódico; solverol; proteína enlazadora de somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongiatrina 1; escualamina; inhibidor de células madre; inhibidores de la división de las células madre; estiapiamida; inhibidores de la estromelina; sulfmosina; antagonista de péptido intestinal vasoactivo superactivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; tallimustina; tamoxifeno; metioduro de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; sodio de tecogalan; tegafur; telurapirilio; inhibidores de la telomerasa; temoporfina; temozolomida; tenipósido; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; talidomida; tiocoralina; trombopoyetina; trombopoyetina mimética; timalfasina; agonista del receptor de timopoyetina; timotrinan; hormona estimulante de la tiroides; estannoetil etiopurpurina; tirapazamina; dicloruro de titanoceno; topotecan; topsentina; toremifeno; factor totipotente de las células madre; inhibidores de la traducción; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetrón; turosterido; inhibidores de la tirosina quinasa; tirfostinas; inhibidores de UBC; ubenimex; factor inhibidor del crecimiento derivado del seno urogenital; antagonistas del receptor uroquinasa; vapreotida; variolina B; sistema de vectores, terapia génica de eritrocitos; velaresol; veramina; verdins; verteporfina; vinorrelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatino; zilascorb; zinostatina estimalámero.

Otros ejemplos de agentes quimioterapéuticos adecuados para su uso en las formulaciones víricas descritas aquí incluyen agentes potenciadores suplementarios anticancerígenos, incluyendo fármacos antidepresivos tricíclicos (por

ejemplo, imipramina, desipramina, amitriptilina, clomipramina, trimipramina, doxepina, nortriptilina, protriptilina, amoxapina y maprotilina); fármacos antidepressivos no tricíclicos (por ejemplo, sertralina, trazodona y citalopram); agentes que reconocen o bloquean VEGF (por ejemplo, Avastina); Antagonistas de Ca²⁺ (por ejemplo, verapamilo, nifedipina, nitrendipina y caroverina); inhibidores de la calmodulina (por ejemplo, prenilamina, trifluoroperazina y clomipramina); Anfotericina B; análogos de triparanol (por ejemplo, tamoxifeno); fármacos antiarrítmicos (por ejemplo, quinidina); fármacos antihipertensivos (por ejemplo, reserpina); anticuerpos a receptores, tales como herceptina; agotadores de tiol (por ejemplo, butionina y sulfoximina); y múltiples agentes reductores de la resistencia a fármacos tales como Cremafor EL. Las formulaciones virales descritas en la presente invención también se pueden administrar con citoquinas tales como factor estimulante de colonias de granulocitos.

10 Como se usa aquí, el término trastorno proliferativo se refiere a cualquier trastorno celular en el que las células proliferan más rápidamente que el crecimiento normal de tejido. Un trastorno proliferativo incluye, pero no se limita a, neoplasmas, que también se denominan tumores. Una neoplasia puede incluir, pero no se limita a, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma), cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer suprarrenal, cáncer de hígado, neurofibromatosis 1 y leucemia.

15 Una neoplasia puede ser una neoplasia sólida (por ejemplo, sarcoma o carcinoma) o un crecimiento canceroso que afecta al sistema hematopoyético (por ejemplo, linfoma o leucemia). Otros trastornos proliferativos incluyen, pero no se limitan a neurofibromatosis.

Como se usa aquí, los términos tratamiento, tratar, tratando o mejorando se refieren a un método para reducir los efectos de una enfermedad o condición o síntoma de la enfermedad o condición. Por lo tanto, en el método descrito, el tratamiento puede referirse a una reducción o mejora del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% en la severidad de una enfermedad establecida o condición o síntoma de la enfermedad o condición. Por ejemplo, se considera que el método para tratar el cáncer es un tratamiento si hay un 10% de reducción en uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto en comparación con el control. Por lo tanto, la reducción puede ser un 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% o cualquier porcentaje de reducción entre 10 y 100 en comparación con los niveles nativos o de control. Se entiende que el tratamiento no necesariamente se refiere a una cura o ablación completa de la enfermedad, condición o síntomas de la enfermedad o condición.

Tal como se utiliza aquí, el término sujeto puede ser un vertebrado, más específicamente un mamífero (por ejemplo, un ser humano, caballo, cerdo, conejo, perro, oveja, cabra, primate no humano, vaca, gato, cobaya o roedor) un pez, un ave o un reptil o un anfibio. El término no indica una edad o sexo en particular. Por lo tanto, está previsto cubrir los sujetos adultos y recién nacidos, tanto hombres como mujeres. Tal como se utiliza aquí, paciente o sujeto puede usarse indistintamente y puede referirse a un sujeto con una enfermedad o trastorno. El término paciente o sujeto incluye sujetos humanos y veterinarios.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de la composición no viral

35 Las composiciones 1 y 2 se prepararon mezclando los componentes mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1:

	Composición 1		Composición 2	
	Componente	Cantidad	Componente	Cantidad
Azúcar(es)	Manitol	30 mg/mL	Sacarosa	40 mg/mL
	Sorbitol	20 mg/mL		
Aminoácido	Histidina	20 mg/mL	N/A	N/A
Catión Divalente	MgCl ₂ (2mM)	2 mM	MgCl ₂	2mM
Tensioactivo	Polisorbato 80	0,01%	Polisorbato 80	0,05%
Portador	Solución salina reguladora de fosfato (PBS)		Solución salina reguladora de fosfato (PBS)	

El PBS utilizado contenía 0,20 mg/mL de cloruro de potasio, 8,00 mg/mL de cloruro de sodio, 0,24 mg/mL de fosfato de potasio monobásico y 2,71 mg/mL de fosfato sódico dibásico de heptahidrato.

Ejemplo 2: Preparación de la formulación viral liofilizada

5 Se preparó una formulación de reovirus de control (Formulación de Control) proporcionando reovirus en solución salina reguladora de fosfato (PBS), diluyendo adicionalmente la mezcla con PBS adicional para obtener un título objetivo de partícula viral total de 3×10^{10} TCID₅₀/mL y liofilizando la formulación viral. La Formulación 1 se preparó proporcionando reovirus en PBS, diluyendo la mezcla con la Composición 1 para obtener un título objetivo de partícula viral total de 3×10^{10} TCID₅₀/mL, y liofilizando la formulación viral. La formulación 2 se preparó proporcionando reovirus en PBS, diluyendo la mezcla con la Composición 2 para obtener un título objetivo de partícula viral total de 3×10^{10} TCID₅₀/mL, y liofilizando la formulación viral.

15 Para liofilizar las formulaciones víricas, cada composición diluida se añadió individualmente a un recipiente de liofilización y se colocó en un estante dentro de un LIOFILIZADOR DE MESA ADVANTAGE PLUS EL-85 (The Virtis Co., Inc., Gardiner, NY). Los estantes se ajustaron a un punto fijo de temperatura objetivo de 5 °C y las composiciones se mantuvieron a esta temperatura por 120 minutos. Las composiciones se enfriaron entonces, a un índice de 15 °C por hora, hasta -50 °C y la composición se mantuvo a -50 °C por tres horas. El condensador del liofilizador se enfrió entonces a una temperatura entre -75 °C y -50 °C y la cámara se evacuó a una presión objetivo de 60 µm de Hg. La presión de la cámara se controló añadiendo 0,2 µm de aire ambiente filtrado a la cámara. Las composiciones se calentaron después a -35 °C durante 30 minutos y se secaron a esta temperatura durante 48 horas. La temperatura se elevó después a 25 °C y las composiciones se secaron durante 15 horas adicionales a esta temperatura. Las proporciones de dilución para cada una de las formulaciones se determinaron por HPLC analítica.

Ejemplo 3: Almacenamiento de formulación viral liofilizada

25 Los títulos de partículas infecciosas (TCID₅₀/mL) para la Formulación de Control, Formulación 1 y Formulación 2, como se prepararon en el Ejemplo 2, se determinaron a temperatura ambiente después de la preparación (es decir, a tiempo = 0). A t=0, la Formulación de Control estaba por debajo del límite de detección, demostrando que no había virus viable. Por lo tanto, la Formulación de Control no se probó en ningún otro momento. Las Formulaciones 1 y 2 se almacenaron durante 0, 3, 6,5, 12 y 18,5 meses a diferentes temperaturas, incluyendo 37 °C, temperatura ambiente, temperaturas comprendidas desde 2 °C a 8 °C, -20 °C y -80 °C. Después de los períodos de almacenamiento, los datos de TCID₅₀ para cada una de las formulaciones a las diferentes temperaturas se determinaron por triplicado. Los datos de media para las Formulaciones 1 y 2 se muestran en la Figura 1. Las recuperaciones de los títulos de partícula infecciosa para las Formulaciones 1 y 2 se muestran en la Figura 2. Los títulos virales se normalizaron para tener en cuenta las variaciones interanálisis en los títulos de control. Los títulos virales totales normalizados, medidos por HPLC, se muestran en la Figura 3 para la Formulación 1 y en la Figura 4 para la Formulación 2.

35 Los títulos de partícula infecciosa de la Formulación 1 almacenados durante 3, 6,5, 12 y 18,5 meses a -80 °C, -20 °C y 2-8 °C no fueron significativamente diferentes de los títulos iniciales obtenidos en el tiempo = 0 a temperatura ambiente. Sin embargo, en la Formulación 1, se observaron disminuciones en el título a temperatura ambiente después de 3, 6,5 y 12 meses. Los títulos de partículas infecciosas de la Formulación 2 almacenados por 3, 6,5, 12 y 18,5 meses a -80 °C, -20 °C y 2-8 °C fueron estables o mostraron ligeras disminuciones en la infectividad en comparación con el tiempo = 0 datos. De forma similar, se observaron ligeras disminuciones en la infectividad en comparación con el tiempo = 0 datos después del almacenamiento durante 3 y 6,5 meses a temperatura ambiente. La Formulación 2 mostró una disminución de la infectividad después de 12 meses.

Ejemplo 4: Formulaciones virales no agregadas

45 Las muestras de la Formulación de Control y la Composición 1, como se describió anteriormente, se probaron, antes de la liofilización, para material de micropartícula usando la prueba de recuento de partículas de oscurecimiento de luz USP <788>. Los resultados, como se muestran en la Tabla 2, indican que las formulaciones virales preparadas con la Composición 1 tenían muchas menos partículas que las formulaciones virales usando la Formulación de Control.

ES 2 630 012 T3

Tabla 2:

#	Lote de llenado final #	Lote a granel #	Formulación	Diámetro medio de Partícula (nm)	Material en partículas ≥ 10 micrones #/recipiente	Material en partículas ≥ 25 micrones #/recipiente
1	122-08002	160-08001	Control	122,3	2349	32
2	122-08003	160-08001	Control	114,3	2490	53
3	160-10006	160-10004	Comp. 1	121,8	50	4
4	160-10011	160-10008	Comp. 1	124,9	20	1

REIVINDICACIONES

1. Una formulación viral, que consiste esencialmente en:
 - (a) un reovirus purificado; y
 - (b) una composición no viral que comprende:
 - 5 (i) sacarosa;
 - (ii) Mg^{2+} ; y
 - (iii) un tensioactivo no iónico,en el que la formulación viral se liofiliza;en la que la composición no viral, antes de la liofilización, es una composición no viral líquida que comprende además un portador líquido; y
- 10 en la que la concentración de sacarosa en la composición no viral líquida, antes de la liofilización, es inferior al 5% con base en el peso de la composición no viral líquida.
2. Una formulación viral que comprende:
 - (a) un reovirus purificado; y
 - 15 (b) una formulación no viral que comprende:
 - (i) manitol;
 - (ii) sorbitol;
 - (iii) histidina; y
 - (iv) Mg^{2+} ,
- 20 en la que la formulación viral se liofiliza;
- en la que la composición no viral, antes de la liofilización, es una composición no viral líquida que comprende además un portador líquido;
- en la que la concentración de sorbitol en la composición no viral líquida, es inferior al 3% con base en el peso de la composición no viral líquida, y
- 25 en la que la composición no viral está sustancialmente libre de sales catiónicas monovalentes.
3. La formulación de la reivindicación 2, en la que la concentración combinada de manitol y sorbitol es menor que 10% en peso con base en el peso de la composición no viral líquida.
4. La formulación de la reivindicación 2 o 3, en la que la composición no viral comprende además un tensioactivo no iónico.
- 30 5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en la que la formulación viral está sustancialmente libre de Zn^{2+} , trehalosa, o ambas.
6. Una formulación viral, que comprende:
 - (a) un reovirus purificado; y
 - (b) una composición no viral que comprende:

- (i) sacarosa;
 - (ii) Mg^{2+} ; y
 - (iii) un tensioactivo no iónico,
- en la que la formulación viral se liofiliza;
- 5 en la que la composición no viral, antes de la liofilización, es una composición no viral líquida que comprende además un portador líquido; y
- en la que la concentración de sacarosa en la composición no viral líquida, antes de la liofilización, es inferior al 5% con base en el peso de la composición no viral líquida, y
- 10 en la que la composición no viral está sustancialmente exenta de sales catiónicas monovalentes, polioles diferentes a sacarosa y carboxilatos.
7. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el reovirus es un reovirus de mamífero, un reovirus humano, un virus de serotipo 3, un virus de serotipo 3 de la cepa Dearing, un reovirus recombinante o reorganizado, o IDAC # 190907-01.
8. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el Mg^{2+} está presente como cloruro de magnesio.
- 15 9. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 4 o 6, en la que el tensioactivo no iónico es polisorbato 80.
10. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que el portador líquido es un portador acuoso, en la que opcionalmente el portador acuoso es agua.
- 20 11. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la formulación viral es estable a una temperatura a temperatura ambiente.
12. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en la que la formulación viral es estable a una temperatura de 4 °C o menos por al menos tres meses, al menos seis meses, al menos doce meses o al menos dieciocho meses.
- 25 13. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que la formulación se reconstituye antes de la administración.
14. Un método para preparar una formulación viral, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un reovirus;
 - (b) combinar, para formar una formulación viral líquida, el reovirus y una composición no viral líquida, en donde la composición no viral líquida consiste esencialmente de:
- 30 (i) sacarosa en una concentración de menos del 5% con base en el peso de la composición no viral líquida;
- (ii) Mg^{2+} ;
 - (iii) un tensioactivo no iónico; y
 - (iv) un portador líquido; y
 - (c) liofilizar la formulación viral líquida,
- 35 para formar una formulación viral.
15. Un método para preparar una formulación viral, que comprende las etapas de:
- (a) proporcionar un reovirus;

(b) combinar, para formar una formulación viral líquida, el reovirus y una composición no viral líquida, en donde la composición no viral líquida comprende:

(i) manitol;

(ii) sorbitol en una concentración de menos del 3% con base en el peso de la composición no viral líquida;

5 (iii) histidina;

(iv) Mg^{2+} ; y

(v) un portador líquido, y

en el que la composición no viral está sustancialmente libre de sales catiónicas monovalentes; y

(c) liofilizar la formulación viral líquida,

10 para formar una formulación viral.

16. Un método para preparar una formulación viral, que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un reovirus;

(b) combinar, para formar una formulación viral líquida, el reovirus y una composición no viral líquida, en donde la composición no viral líquida comprende:

15 (i) sacarosa en una concentración de menos del 5% con base en el peso de la composición no viral líquida;

(ii) Mg^{2+} ;

(iii) un tensioactivo no iónico; y

(iv) un portador líquido, y

20 en el que la composición no viral está sustancialmente libre de sales catiónicas monovalentes, polioles diferentes a sacarosa y carboxilatos; y

(c) liofilizar la formulación viral líquida,

para formar una formulación viral.

17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14-16, en el que la liofilización de la formulación viral líquida comprende:

25 (a) congelar la formulación viral líquida a una temperatura inferior a 0 °C para formar una formulación viral congelada; y

(b) aplicar un vacío a la formulación viral congelada.

30 18. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14-17, que comprende además reconstituir la formulación viral liofilizada, en la que opcionalmente reconstituir la formulación viral liofilizada comprende disolver o suspender la formulación viral liofilizada en un medio.

19. Un método para conservar o estabilizar un reovirus, que comprende:

preparar una formulación viral de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13; y

almacenar la formulación viral, en la que opcionalmente el reovirus se almacena a una temperatura igual o inferior a la temperatura ambiente.

35 20. El método de la reivindicación 19, en el que la temperatura es la temperatura ambiente, desde 2 °C a 8 °C, 4 °C, -20 °C, o desde -60 °C a -80 °C.

21. Un método para preparar una formulación viral no agregada, que comprende preparar una formulación viral de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13.

22. El método de la reivindicación 21, en el que la formulación se reconstituye para infusión parenteral o inyección.

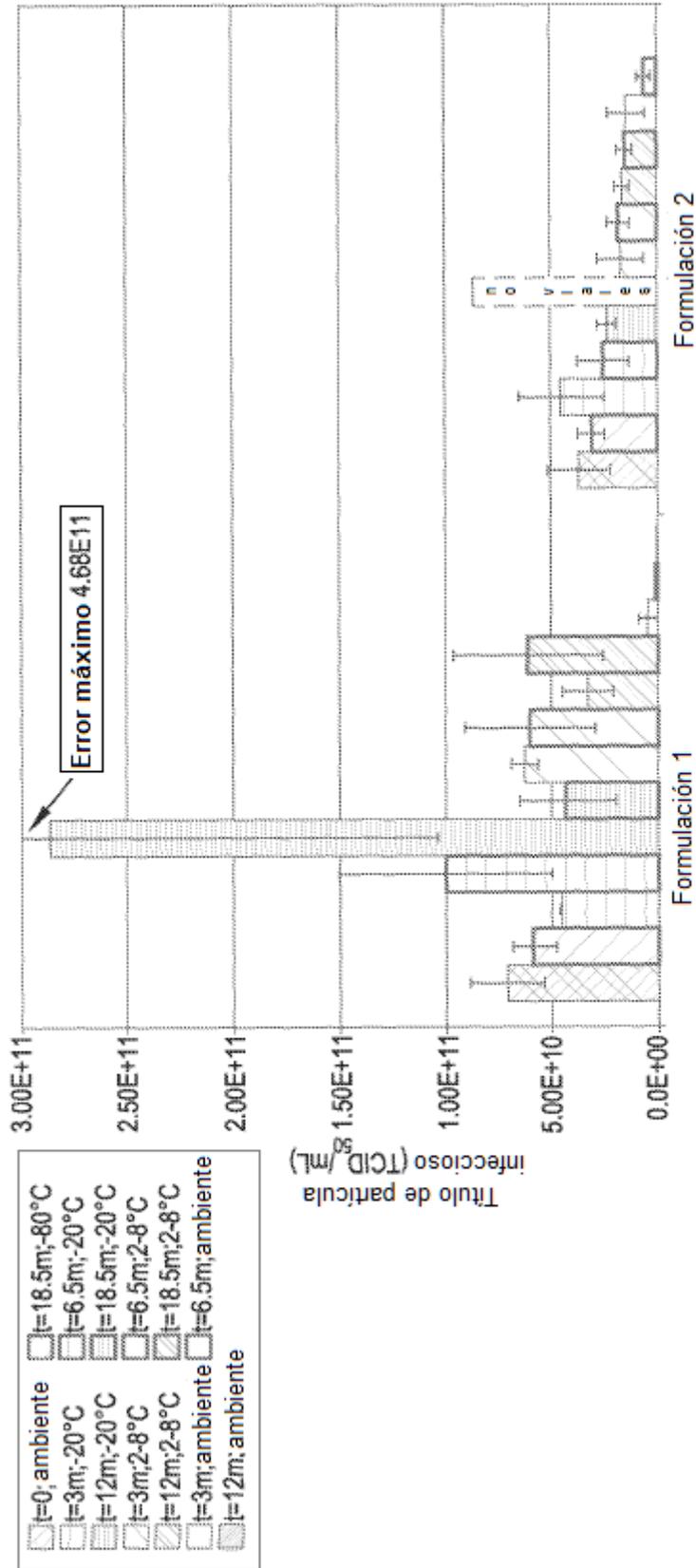


FIG. 1

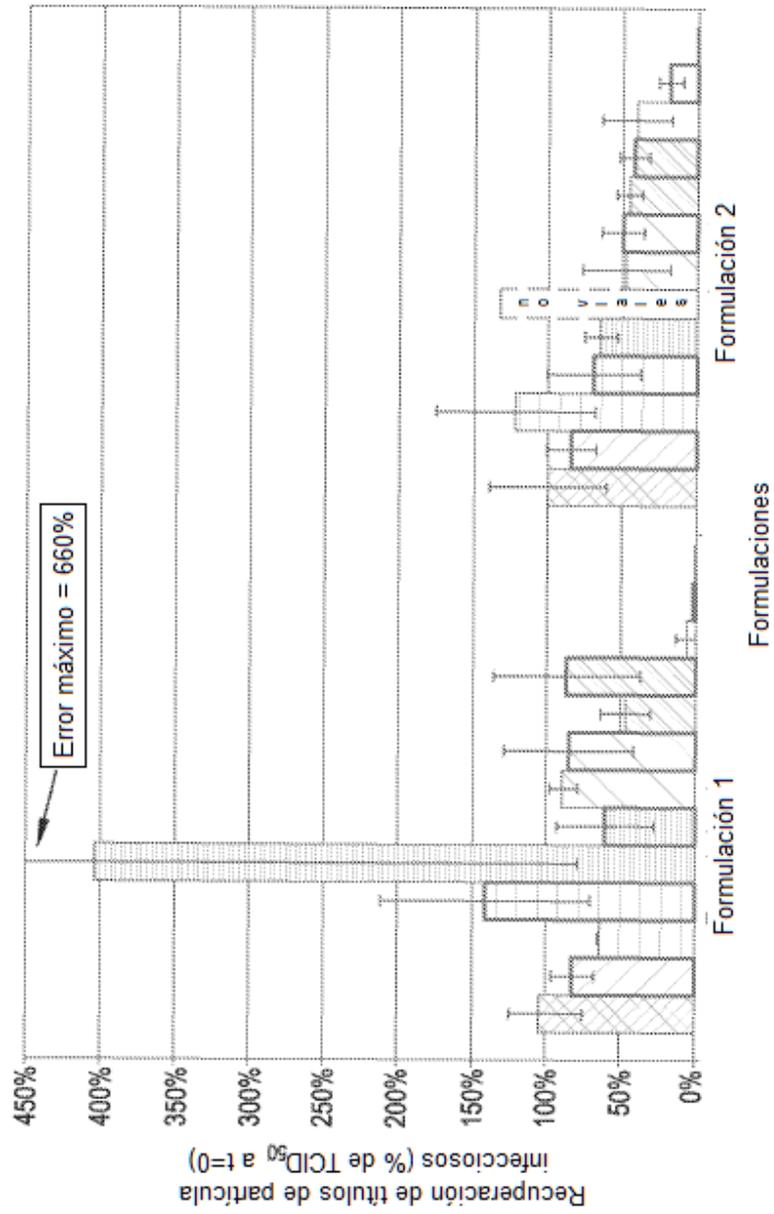
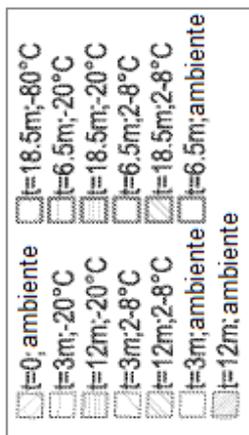
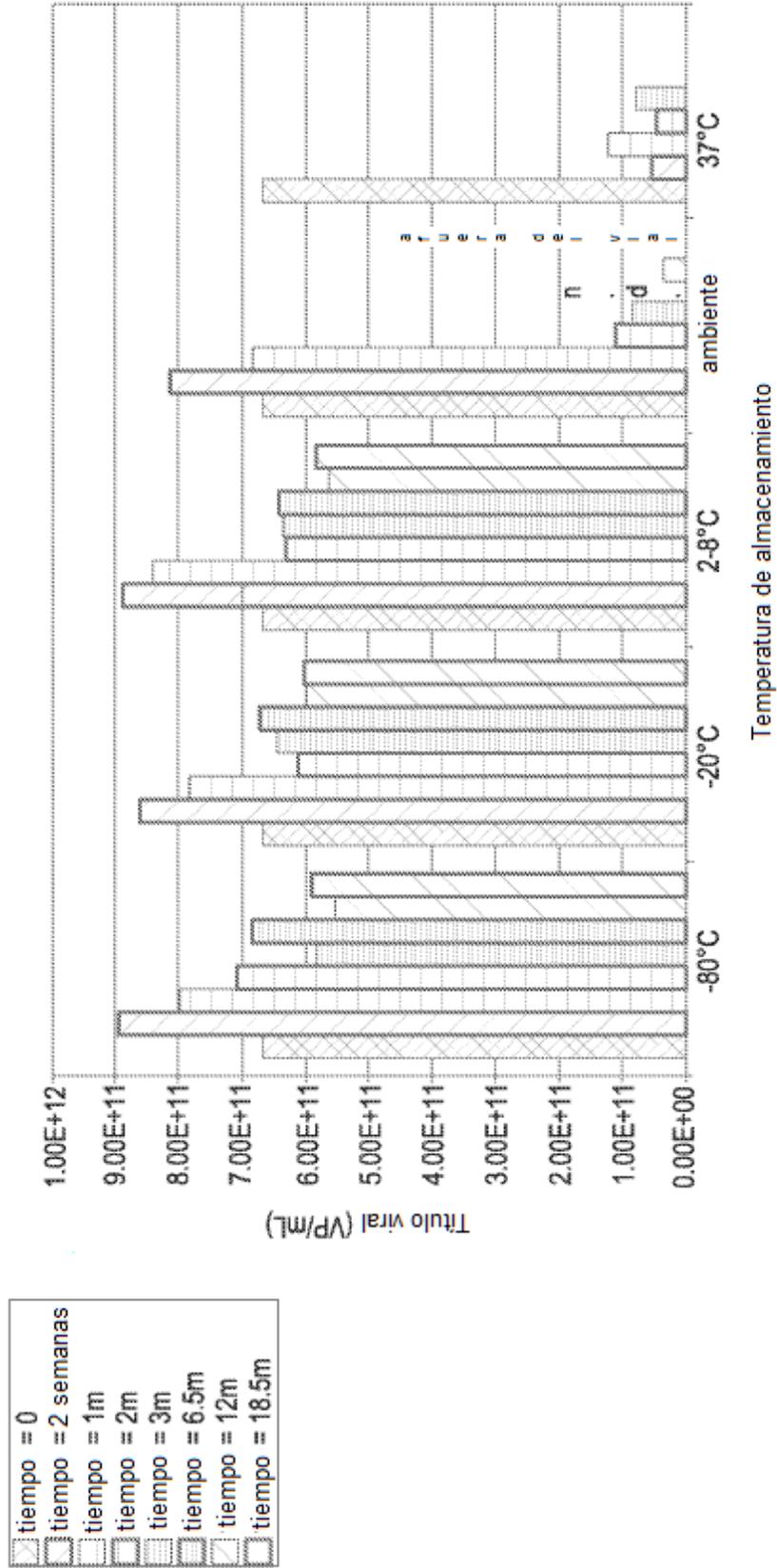
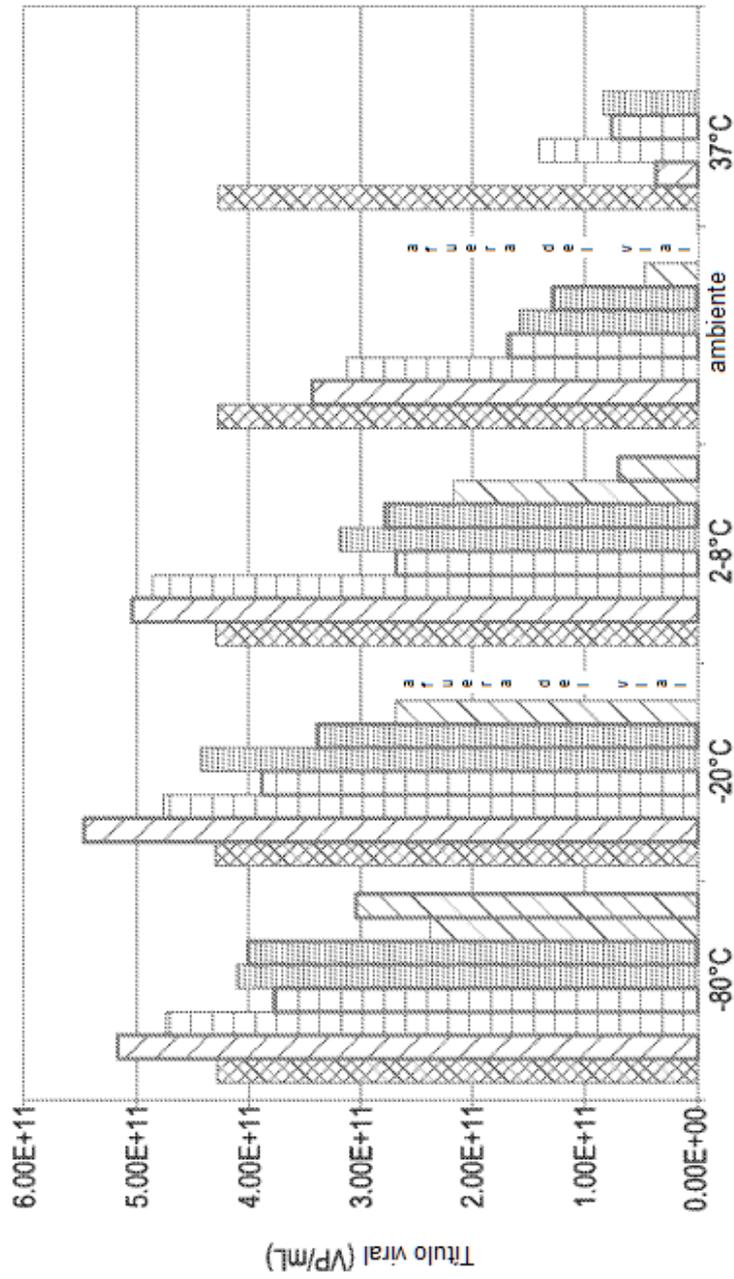


FIG. 2







Temperatura de almacenamiento

FIG. 4

tiempo = 0
tiempo = 2 semanas
tiempo = 1m
tiempo = 2m
tiempo = 3m
tiempo = 6.5m
tiempo = 12m
tiempo = 18.5m