

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 526**

51 Int. Cl.:

A61K 35/768 (2006.01)

A61K 47/24 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.05.2016** E **16725045 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018** EP **3277299**

54 Título: **Formulación de parvovirus para tratar tumores**

30 Prioridad:

23.06.2015 EP 15173308

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.03.2019

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(50.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE y
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEUCHS, BARBARA;
GELETNEKY, KARSTEN;
ROMMELAERE, JEAN;
DINSART, CHRISTIANE;
DAHM, MICHAEL y
KREBS, OTTHEINZ**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

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

ES 2 702 526 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

Formulación de parvovirus para tratar tumores

La presente invención se refiere a una formulación de parvovirus donde el parvovirus está presente en una concentración de al menos 2×10^9 pfu/mL en un portador farmacéuticamente aceptable que contiene un 40-50% de yodixanol (p/v), 0.7-0.9 mmol de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 50-60 mmol de NaCl, 0.9-1.2 mmol de KCl, 0.7-0.95 mg/mL de trometamina y 0.05-0.15 mg/mL de edetato de calcio y disodio. El portador tiene una viscosidad de entre 3 y 5 mPa·s a 37 °C-40 °C.

El cáncer es la segunda causa de mortalidad en el mundo. Se ha estimado que la mitad de los hombres y un tercio de las mujeres serán diagnosticados con alguna forma de cáncer a lo largo de su vida. Además, debido a que el cáncer es predominantemente una enfermedad asociada al envejecimiento, se prevé que el número de muertes por cáncer en todo el mundo aumente aproximadamente un 45% de 2007 a 2030 (de 7.9 millones a 11.5 millones de muertes) debido al aumento de la proporción de personas ancianas (estimaciones de la OMS, 2008). El cáncer es también la enfermedad más costosa. Las últimas estimaciones del Instituto Nacional del Cáncer mostraron que el coste económico global del cáncer en EE. UU. en 2007 fue de 226 800 millones de dólares y a menos que se desarrollen intervenciones preventivas que tengan más éxito, detección temprana y tratamientos más eficaces, esta carga económica, que ya es enorme, se espera que aumente aún más durante las siguientes dos décadas. A pesar de los significativos avances en la prevención, detección, diagnóstico y tratamiento de muchas formas de cáncer, que está evidenciado por un aumento en el porcentaje de supervivencia al cáncer de 5 años en EE. UU. y en Europa a lo largo de los últimos treinta años, algunos tipos de tumores, tales como el pancreático, de hígado, de pulmón y de cerebro siguen careciendo de tratamientos eficaces y demandan el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas. Los virus oncolíticos, que se aprovechan de vulnerabilidades específicas del cáncer para aniquilar las células cancerosas a la vez que no actúan sobre las células normales, están emergiendo con rapidez como herramientas prometedoras para luchar contra el cáncer. En la actualidad al menos doce virus oncolíticos diferentes están en ensayos clínicos de fase I-III contra diversas neoplasias malignas utilizados solos o combinados con otros agentes anticancerosos. Entre ellos, en la actualidad se está evaluando la seguridad del parvovirus de rata oncolítico H-1PV y las primeras señales de eficacia en un ensayo clínico de fase I/IIa en pacientes que padecen glioblastoma multiforme recurrente (GBM, por sus siglas en inglés) Geletneky *et al.*, *BMC Cancer*, Vol. 12, N.º 99, págs. 1-9 (2012), Geletneky *et al.*, *Comparative Medicine*, American Association for Laboratory Animal Science USA, Vol. 65, N.º 1, págs. 36-45 (2015); Geletneky *et al.*, *Comparative Medicine*, Vol. 65, N.º 1, págs. 23-35 (2015).

H-1PV es una partícula pequeña (diámetro de ~25 nm), icosaédrica, sin envoltura que contiene un genoma de ADN monocatenario con una longitud de 5.1 kb. La organización genómica de H-1PV consiste en dos unidades transcripcionales controladas por dos promotores, el promotor temprano P4 y el promotor tardío P38. P4 regula la expresión del gen que codifica las proteínas no estructurales (NS, por sus siglas en inglés) (NS1 y NS2) y P38 del que codifica las proteínas de la cápside (VP, por sus siglas en inglés) (VP1, VP2 y VP3). El virus se multiplica preferentemente en células cancerosas de división rápida. Esta oncoselectividad no se basa en una mejor captación del virus por parte de las células cancerosas, más bien se debe al hecho de que las células cancerosas sobreexpresan factores, tales como la ciclina A, E2F o CREB/ATF, necesarios para la replicación del ADN del virus (Marchini *et al.*, *Virology J.*, Vol. 12, N.º 1, 1-16 (2015)). La terapia contra el cáncer que utiliza un parvovirus y su combinación con la quimioterapia o un inhibidor de HDAC se ha descrito recientemente (WO 2009/083232 A1; WO 2011/113600 A1).

Un problema frecuente de la terapia local de tumores por inyección o infusión de virus oncolíticos es la distribución dirigida del inóculo y una pérdida de la sustancia activa. En particular, cuando se utiliza un catéter la distribución tiene lugar a lo largo de la vía del catéter debido a un área con una resistencia menor a lo largo del paso del catéter a través del tejido. Este fenómeno también se conoce como retroflujo.

Por lo tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que no presente el problema del retroflujo después de la administración y sea estable durante un tiempo de almacenamiento de al menos 12 meses, incluso en condiciones de temperatura elevada durante varios días y tratamiento UV.

De acuerdo con la invención, esto se logra mediante el contenido definido en las reivindicaciones.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) un parvovirus H1 (H-1PV) o un parvovirus de roedor relacionado seleccionado a partir del grupo constituido por Lull1, virus diminuto del ratón (MMV, por sus siglas en inglés), parvovirus del ratón (MPV, por sus siglas en inglés), virus diminuto de la rata (RMV, por sus siglas en inglés), parvovirus de la rata o virus de la rata (RV, por sus siglas en inglés) en una concentración de al menos 2×10^9 pfu/mL y (b) un portador farmacéuticamente aceptable que contiene un 40-50% de yodixanol (p/v), 0.7-0.9 mmol de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 50-60 mmol de NaCl, 0.9-1.2 mmol de KCl, 0.7-0.95 mg/mL de trometamina y 0.05-0.15 mg/mL de edetato de calcio y disodio. El portador farmacéuticamente aceptable tiene una viscosidad entre 3 y 5 mPa·s a 37-40 °C.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: H-1PV en Visipaque al 48%/solución de Ringer demuestra la distribución dirigida del inóculo alrededor de la punta del catéter sin señales de difusión aleatoria.

Figura 2: H-1PV es estable durante más de 24 meses en una formulación de Visipaque al 48%/Ringer.

5 Figura 3: Micrografías electrónicas que muestran partículas de H-1PV insulares en una formulación de Visipaque al 48%/Ringer.

a) Carga de H-1PV 1, b) Carga de H-1PV 2

Figura 4: Diseño del ensayo clínico.

10 Figura 5: Concentración del virus en la solución de yodixanol/Ringer [73.62% de Visipaque™ 320 (GE Healthcare) mezclado con 26.38% de solución de Ringer].

Figura 6: Tratamiento de H-1PV en solución de yodixanol/Ringer a temperatura elevada.

Figura 7: Tratamiento UV de H-1PV en dos soluciones de yodixanol/Ringer (A,B) y tampón Tris-EDTA (C).

15 Por lo tanto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) un parvovirus H1 (H-1PV) o un parvovirus de roedores relacionado seleccionado a partir del grupo constituido por Lulll, virus diminuto del ratón (MMV), parvovirus del ratón (MPV), virus diminuto de la rata (RMV), parvovirus de la rata o virus de la rata (RV) en una concentración de al menos 2×10^9 pfu/mL y (b) un portador farmacéuticamente aceptable que tiene preferentemente una viscosidad entre 3 y 5 mPa·s a 37-40 °C y que contiene un 40-50% de yodixanol (p/v), 0.7-0.9 mmol de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 50-60 mmol de NaCl, 0.9-1.2 mmol de KCl, 0.7-0.95 mg/mL de trometamina y 0.05-0.15 mg/mL de edetato de calcio y disodio.

20 El término "parvovirus", tal como se utiliza en la presente, comprende el tipo natural o derivados de este modificados competentes en la replicación. Con las competencias en la técnica sobre las que se basa la presente divulgación se pueden determinar fácilmente los parvovirus modificados adecuados que se puede utilizar para producir de manera activa dichos parvovirus y que son útiles para la terapia sin un esfuerzo empírico excesivo.

25 De acuerdo con la presente invención, el parvovirus de la composición incluye parvovirus H1 (H1PV) o un parvovirus relacionado tal como Lulll, virus diminuto del ratón (MMV), parvovirus del ratón (MPV), virus diminuto de la rata (RMV), parvovirus de la rata (RPV, por sus siglas en inglés) o virus de la rata (RV).

30 De acuerdo con la invención, el parvovirus está presente en una dosis eficaz en una concentración igual o superior a 2×10^9 pfu/mL y combinado con un portador farmacéuticamente aceptable que contiene un 40-50% yodixanol (p/v), 0.7-0.9 mmol de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 50-60 mmol de NaCl, 0.9-1.2 mmol de KCl, 0.7-0.95 mg/mL de trometamina y 0.05-0.15 mg/mL de edetato de calcio y disodio. En particular, el portador contiene un 45-49% de yodixanol (p/v), 0.75-0.85 mmol de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 50-55 mmol de NaCl, 0.95-1.1 mmol de KCl, 0.8-0.9 mg/mL de trometamina y 0.05-0.10 mg/mL de edetato de calcio y disodio. En una realización sumamente preferente, el portador contiene un 48% de yodixanol (p/v), 0.81 mmol de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 52.80 mmol de NaCl, 1.06 mmol de KCl, 0.88 mg/mL de trometamina y 0.07 mg/mL de edetato de calcio y disodio.

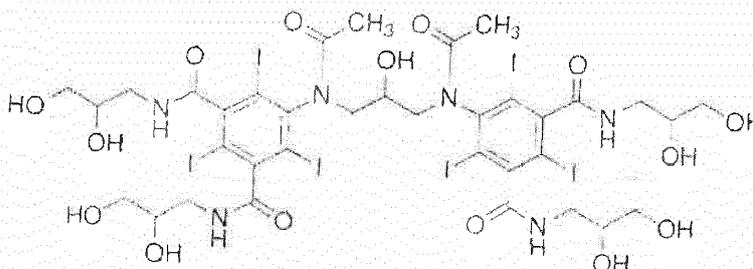
35 La expresión "farmacéuticamente aceptable" pretende englobar cualquier portador, que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del principio activo y que no sea tóxico para el paciente al cual se va a administrar. Además de la composición portadora definida anteriormente la formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede contener portadores farmacéuticos adicionales. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adicionales adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen manitol, sorbitol, glucosa o sacarosa. Tales portadores se pueden formular mediante métodos convencionales.

40 Una "dosis eficaz" se refiere a las cantidades de los principios activos que son suficientes para afectar al transcurso o la gravedad de la enfermedad, que dan lugar a la reducción o remisión de tal patología. Se puede determinar una "dosis eficaz" útil para tratar y/o prevenir estas enfermedades o trastornos utilizando métodos que conoce el experto en la técnica. Además, para garantizar la estabilidad en el almacenamiento de la formulación, el principio activo, es decir, el parvovirus, debe estar presente en una concentración de al menos 2×10^9 pfu/mL, especialmente al menos 5×10^9 pfu/mL, 1×10^{10} pfu/mL o 1×10^{11} pfu/mL. En una realización preferida, la concentración está entre 2×10^9 pfu/mL y 1×10^{10} pfu/mL, en particular 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x o 9x 10^9 pfu/mL. En otra realización preferida la concentración está entre 1×10^{10} pfu/mL y 1×10^{11} pfu/mL, en particular 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x o 9x 10^{10} pfu/mL.

50 De acuerdo con la presente invención, la viscosidad del portador está entre 3.5 y 4.5 mPa·s a 37-40 °C. Es más preferido un portador donde la viscosidad del portador está entre 4 y 5 mPa·s. Es aún más preferido un portador que tiene una viscosidad de aproximadamente 4.5 mPa·s. Esta viscosidad es similar a la viscosidad de la sangre

(Rosenson et al., *Clinical Chemistry*, 42:8, págs. 1189-1195 (1996); <http://www.ucke.de/christian/physik/medprak/Viskositaet.pdf>: página 84, Tabla 2).

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el portador es yodixanol en solución de Ringer que se prepara mezclando un 73.62% de VISIPAQUE™ 320 (GE Healthcare) con un 26.38% de solución de Ringer. VISIPAQUE™ 320 (GE Healthcare) contiene 652 mg/mL de yodixanol (= 65.2% de yodixanol) de manera que la concentración de yodixanol después de mezclarlo con la solución de Ringer es de un 48%. El término "yodixanol" es un sinónimo de "Visipaque" (para uso en inyecciones en seres humanos) o "yodixanolum" (grado de investigación). La estructura química es



El nombre IUPAC es 5-[acetil-[3-[N-acetil-3,5-bis(2,3-dihidroxiopropilcarbamoil)2,4,6,-triiodoanilino]2-hidroxiopropil]amino]-1-N,3,N-bis(2,3-dihidroxiopropil)-2,4,6-triyodobenceno-1,3-dicarboxamida. El número CAS es 92339-11-2. También es un agente de contraste muy conocido para la obtención de imágenes por CT.

La administración se puede llevar a cabo de diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intradérmica o intratumoral. La vía de administración, obviamente, depende del tipo de terapia y el tipo de compuestos contenidos en la composición farmacéutica. Una vía de administración preferida es la administración intratumoral o intravenosa. El régimen posológico puede ser determinado fácilmente, con las competencias de la técnica, por el médico a cargo del tratamiento con los datos del paciente, observaciones y otros factores clínicos, incluidos, por ejemplo, el tamaño, área superficial corporal, edad y sexo del paciente, el parvovirus, célula, etc., particular que se va a administrar, el momento y vía de administración, el tipo y características del tumor, el estado de salud general del paciente y otras terapias farmacológicas a las que se esté sometiendo el paciente.

La composición farmacéutica de la presente invención es útil para el tratamiento de cualquier tipo tumoral, en particular (pero no de manera exclusiva) un tumor cerebral (por ejemplo, glioma y glioblastoma), carcinoma pancreático, carcinoma del cuello del útero, cáncer de pulmón, cáncer de las vías digestivas y respiratorias altas, cáncer de mama o cáncer de colon.

Los pacientes que se pueden tratar con la composición farmacéutica de acuerdo con la invención incluyen seres humanos, así como también animales no humanos. Los ejemplos de los últimos incluyen, sin carácter limitante, animales tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros y gatos.

A partir de los datos clínicos tal como se muestra en el Ejemplo 1 se puede concluir que el uso de Visipaque al 48% permite (i) la visualización precisa del inóculo por CT, (ii) el suministro local preciso como resultado de la viscosidad más elevada y (iii) la ausencia de retroflujo incluso cuando se utiliza la inyección manual y no una inyección prolongada y automática tal como el suministro favorecido por convección (CED, por sus siglas en inglés). Este patrón de distribución favorable es debido con toda probabilidad a las diferentes propiedades físicas de Visipaque al 48% en comparación con soluciones acuosas. Visipaque al 48% en solución de Ringer con un índice de refracción de 1.41 tiene una viscosidad a 37 °C de 4 mPa·s, el agua a 37 °C de ~0.7 mPa·s. La sangre humana a 37 °C tiene una viscosidad de 3-5 mPa·s. Por lo tanto, la formulación de la inyección es similar a la sangre en lo que se refiere a un valor fisiológico de la sangre.

Los inventores han observado que la concentración del virus influye en la estabilidad de la formulación (Fig. 5). Para garantizar una estabilidad en el almacenamiento de al menos 12 meses, la concentración del virus debe ser de al menos 2×10^9 pfu/mL en yodixanol al 48%/solución de Ringer que se ha obtenido mezclando un 73.62% (p/v) de VISIPAQUE™ 320 (GE Healthcare) con un 26.30% (p/v) de solución de Ringer. La solución obtenida contiene un 48% de yodixanol (p/v), 0.81 mmol de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 52.80 mmol de NaCl, 1.06 mmol de KCl, 0.88 mg/mL de trometamina y 0.07 mg/mL de edetato de calcio y disodio.

En una realización preferida, la estabilidad en el almacenamiento es de al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 30 meses, al menos 36 meses o incluso hasta 48 meses.

Tal como se puede concluir a partir de las Figs. 6 y 7, el virus en yodixanol al 48%/solución de Ringer sigue siendo

activo varios días incluso después de un incremento de la temperatura y con radiación UV.

Los siguientes ejemplos explican la invención más detalladamente.

Ejemplo 1

Visipaque al 48% evita el retroflujo

5 Se inició un ensayo clínico de fase I/IIa en 18 pacientes que padecían glioma maligno recurrente. El objetivo de este ensayo fue estudiar la seguridad, biodistribución, dosis máxima tolerada y señales de actividad antitumoral del parvovirus H-1. De acuerdo con los datos preclínicos el parvovirus no solamente incluirá la aplicación intratumoral del virus sino también el tratamiento intravenoso.

10 La aplicación del parvovirus H-1 (GMP-grado preparación) en Visipaque al 48% se realizó en 2 grupos de 12 (grupo I) y 6 (grupo II) pacientes. La vía de administración difiere entre el grupo 1 y el grupo 2 (Figura 4).

Dentro de cada grupo el modo de aplicación es idéntico, pero la dosis se incrementará si no se observan eventos limitantes de la dosis. En el grupo I el parvovirus H-1 (también denominado “producto medicinal de investigación”; IMP, por sus siglas en inglés) se administró en cuatro niveles posológicos y en el grupo II en 2 niveles posológicos (Tabla 1).

15 Tabla 1 Programa posológico para ambos grupos de estudio

GRUPO I	Tiempo de estudio	Dosis y ruta de administración	Duración
Nivel de aumento de la escala	Nivel 1 Dosis total: 1 x 10 ⁶ pfu	Día 1 5 x 10 ⁵ pfu, intratumoral (mediante catéter)	15 minutos
		Día 10 5 x 10 ⁵ pfu, intracerebral (inyección directa en múltiples ubicaciones de la pared de resección)	15-30 minutos
Nivel 2 Dosis total: 5 x 10 ⁷ pfu	Día 1	2.5 x 10 ⁷ pfu, intratumoral (mediante catéter)	15 minutos
	Día 10	2.5 x 10 ⁷ pfu, intracerebral (inyección directa en múltiples ubicaciones de la pared de resección)	15-30 minutos
Nivel 3 Dosis total: 1 x 10 ⁹ pfu	Día 1	5 x 10 ⁸ pfu, intratumoral (mediante catéter)	15 minutos
	Día 10	5 x 10 ⁸ pfu, intracerebral (inyección directa en múltiples ubicaciones de la pared de resección)	15-30 minutos
Nivel 4 Dosis total: 5 x 10 ⁹ pfu	Día 1	2.5 x 10 ⁹ pfu, intratumoral (mediante catéter)	15 minutos
	Día 10	2.5 x 10 ⁹ pfu, intracerebral (inyección directa en múltiples ubicaciones de la pared de resección)	15-30 minutos
GRUPO II			
Nivel de aumento de la escala			
Nivel 2 Dosis total: 5 x 10 ⁷ pfu	Día 1-5	0.5 x 10 ⁷ pfu, infusión intravenosa	2 horas

	Día 10	2.5 x 10 ⁷ pfu, intracerebral (inyección directa en múltiples ubicaciones de la pared de resección)	15-30 minutos
Nivel 3 Dosis total: 1 x 10 ⁹ pfu	Día 1-5	1 x 10 ⁸ pfu, infusión intravenosa	2 horas
	Día 10	5 x 10 ⁸ pfu, intracerebral (inyección directa en múltiples ubicaciones de la pared de resección)	15-30 minutos

En el grupo 1, los pacientes recibieron el IMP en el interior del tejido tumoral en el día 1 mediante inyección guiada por imágenes. En este día, al paciente se le inyecta un 50% de la dosis global prevista. Después de un periodo de observación de 9 días se reseco el tumor en el día 10. Después de la retirada del tumor, se administró la segunda mitad de la dosis en las paredes de la cavidad de resección mediante inyección directa. Con esta inyección durante la cirugía abierta, se completa la administración del IMP y no se aplicaron más virus.

En el grupo 2, la administración inicial del IMP fue mediante vía intravenosa. Los sujetos recibieron un 50% de la dosis prevista mediante 5 infusiones en los días 1-5, conteniendo cada infusión un 10% de la dosis total. Después de la última infusión en el día 5 hay un periodo de observación hasta el día 9 y en el día 10 se realizó la resección del tumor como en el grupo 1. De manera análoga al grupo 1, los pacientes reciben la segunda mitad de la dosis mediante inyección en el tejido que rodea a la cavidad tumoral después de la retirada del tumor y no se realizaron más inyecciones de virus en cada individuo durante el transcurso del ensayo.

Después de la resección del tumor, se reapió virus en las paredes de la cavidad tumoral.

Tal como se muestra en la Figura 1, el uso de Visipaque al 48% (VISIPAQUE™ 320, GE Healthcare, Alemania) y solución de Ringer (IDT Biologika GmbH, Alemania) como solución portadora no dio como resultado ningún retroflujo significativo en la totalidad de los 12 pacientes. Se realizó CT en los 30 minutos posteriores a la finalización de la inyección. El volumen de inyección estuvo entre 0.5 mL y 1.2 mL por catéter insertado (se trataron 3 pacientes con 2 catéteres). La inyección se realizó manualmente durante un periodo de 30 minutos por catéter y en todos los casos se utilizaron catéteres estándar para punción de quistes con una abertura en el extremo del catéter. La Figura 1 también demuestra la distribución dirigida del inóculo alrededor de la punta del catéter sin señales de difusión aleatoria.

A partir de estos datos clínicos se puede concluir que el uso de Visipaque al 48% permite (i) la visualización precisa del inóculo por CT, (ii) el suministro local preciso como resultado de la viscosidad más elevada y (iii) la ausencia de retroflujo incluso cuando se utiliza la inyección manual y no una inyección prolongada y automática tal como el suministro favorecido por convección (CED). Este patrón de distribución favorable es debido con toda probabilidad a las diferentes propiedades físicas de Visipaque al 48% en comparación con soluciones acuosas. Visipaque al 48% en solución de Ringer con un índice de refracción de 1.41 tiene una viscosidad a 37 °C de 4 mPa·s, el agua a 37 °C de ~0.7 mPa·s. La sangre humana a 37 °C tiene una viscosidad de 3-5 mPa·s. Por lo tanto, la formulación de la inyección es similar a la sangre, en lo que se refiere a un valor fisiológico de la sangre.

Ejemplo 2

Estabilidad

El virus H-1PV (almacenado a -20 °C o ≤-60 °C en yodixanol al 48%/solución de Ringer obtenida mezclando un 73.62% (p/v) de VISIPAQUE™ 320 (GE Healthcare) con un 26.30% (p/v) de solución de Ringer (Delta Select GmbH, Dreieich, Alemania)) tiene una actividad estable medida según unidades de formación de placas (PFU, por sus siglas en inglés) durante más de 2 años. Los ensayos en placas se realizaron esencialmente tal como han descrito Tattersall y Bratton (*J. Virol.* 46 (1983), 944-55). Las células NB-324K se cultivaron en cultivos en monocapa en medio MEM que contenía un 5% de FBS, 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomycin y L-glutamina 2 mM. Se infectaron cuando estaban en un 60% de confluencia con diluciones en serie de H-1PV y se incubaron durante 1 h a 37 °C. A continuación, el inóculo se reemplazó con un recubrimiento de bacto-agar (1.7% en MEM que contenía un 5% de FBS). En el día cuatro después de la infección, las células vivas se tiñeron durante 18-24 h añadiendo solución de tinción de rojo tolúeno al 0.02% (Sigma, Alemania) que contenía bacto-agar (Becton Dickinson, Alemania). Las placas se incubaron a 37 °C con un 5% de CO₂. Las unidades formadoras de placas se contaron 5 días después de la infección en una caja de luz y se expresó su concentración en PFU/mL.

Los resultados se muestran en la Fig. 5. Se puede apreciar que una concentración de virus inferior a 1 x 10⁸ pfu/mL es más inestable en yodixanol al 48%/solución de Ringer que una concentración de virus más elevada de

aproximadamente 1×10^9 o 1×10^{10} pfu/mL.

Ejemplo 3

Partículas de H-1PV insulares: Las imágenes del microscopio electrónico muestran que el virus H-1PV no se agrega en la formulación de acuerdo con la invención

- 5 Para el análisis cualitativo de preparados de virus, se tomaron imágenes con un microscopio electrónico. Para esto, se añadieron 5 μ L de una suspensión de virus a una rejilla de cobre recubierta con carbono lista para usar y se incubaron durante 2 minutos. La rejilla se lavó a continuación con 5 μ L de agua destilada dos veces y se recubrió con acetato de uranilo al 2% durante 30 s. Se absorbieron las gotas de la rejilla con papel de filtro Whatman 50 y la
 10 rejilla se secó durante aproximadamente 1 min. Se tomaron fotos con un microscopio de transmisión electrónica Zeiss con una amplificación de 20, 100x.

Ejemplo 4

Influencia del incremento de la temperatura en H-1PV en Visipaque al 48%/solución de Ringer

Parámetro:

Volumen: 100 μ L

- 15 Vial: 500 μ L de tapón roscado

Temperatura: 37 °C, 50 °C

Tiempo de incubación: 1 h, 4 h

Almacenamiento adicional: 4 °C

Concentración de H-1PV: 2.3×10^{10} PFU/mL:

		Tiempo 1	Tiempo 2
Temp.	37 °C	60 min	240 min
	50 °C	60	240 min

- 20 Los resultados se muestran en la Fig. 6.

La Fig. 6 muestra que el virus todavía está vivo después de 1-4 horas de tratamiento a 37 °C y 50 °C. Incluso después de 4 semanas a 4 °C el H-1 PV es estable.

Ejemplo 5

Influencia de la radiación UV en H-1PV en Visipaque al 48%/solución de Ringer

- 25 Desactivación por UV de H-1PV en Visipaque (yodixanol al 48%/solución de Ringer y Visipaque (yodixanol al 24%/solución de Ringer

exp n.º 1 (UV 254 nm, 0.35 mW/cm²)

		PFU/mL	Vg/mL	PP/mL
Carga 1 en Visipaque (yod al 48%)/Ringer	antes de UV	1.80E+09	1.40E+12	1.00E+13
volumen: 500 μ L	después de UV	2.00E+09	1.30E+12	8.00E+12
Carga 2 en Visipaque (yod al 48%)/Ringer	antes de UV	1.30E+08	7.30E+10	2.00E+11
volumen: 500 μ L	después de UV	6.40E+07	8.10E+10	2.10E+11

exp n.º 2 (UV 254 nm, 0.35 mW/cm²)

		PFU/mL	Vg/mL	PP/mL
Carga 1 en Visipaque (yod al 48%)/Ringer	antes de UV	1.80E+09	1.40E+12	1.00E+13
volumen: 250 µL	después de UV	>3E7	1.40E+12	1.00E+13
Carga 2 en Visipaque (yod al 48%)/Ringer	antes de UV	1.30E+08	7.30E+10	2.00E+11
volumen: 250 µL	después de UV	>3E7	7.30E+10	3.10E+11
Carga 3 en VTE	antes de UV	3.00E+07	5.40E+11	4.10E+13
	después de UV	<1E2	2.80E+10	5.60E+13

exp n.º 3 (UV 254 nm, 0.35 mW/cm²)

		PFU/mL	Vg/mL	PP/mL
Carga 1 en Visipaque (yod al 48%)/Ringer	antes de UV	1.40E+09	9.50E+11	1.00E+13
volumen: 100 µL	después de UV	2.40E+09	1.00E+12	1.10E+13
Carga 2 en Visipaque (yod al 48%)/Ringer	antes de UV	5.10E+07	5.00E+10	2.00E+11
volumen: 100 µL	después de UV	5.80E+07	5.00E+10	2.00E+11

5

exp n.º 4 (UV 254 nm, 2.4 mW/cm²)

		PFU/mL	Vg/mL	PP/mL
Carga 1 en Visipaque (yod al 48%)/Ringer	antes de UV	1.70E+09	1.40E+12	9.80E+12
volumen: 100 µL	después de UV	1.80E+09	1.70E+12	7.70E+12
Carga 2 en Visipaque (yod al 24%)/Ringer	antes de UV	4.60E+09	6.80E+11	1.00E+13
volumen: 100 µL	después de UV	1.20E+09	4.10E+11	3.50E+11

Los resultados se muestran en la Fig. 7. El virus H-1 PV en Visipaque (yodixanol al 48%)/solución de Ringer está protegido frente al tratamiento UV a lo largo de la formulación. La estabilidad del virus en Visipaque (yodixanol al 24%)/solución de Ringer muestra una disminución de 0.5 log después del tratamiento UV. En una formulación acuosa (tampón Tris-EDTA = VTE) el virus se podría desactivar.

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende (a) al menos 2×10^9 pfu/mL de un parvovirus H1 (H-1PV) o un parvovirus de roedores relacionado seleccionado a partir del grupo constituido por Lulll, virus diminuto del ratón (MMV), parvovirus del ratón (MPV), virus diminuto de la rata (RMV), parvovirus de la rata o virus de la rata (RV) y (b) un portador farmacéuticamente aceptable que contiene un 40-50% de yodixanol (p/v), 0.7-0.9 mmol de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 50-60 mmol de NaCl, 0.9-1.2 mmol de KCl, 0.7-0.95 mg/mL de trometamina y 0.05-0.15 mg/mL de edetato de calcio y disodio.
- 10 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, donde el portador farmacéuticamente aceptable contiene un 48% de yodixanol (p/v), 0.81 mmol de $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 52.80 mmol de NaCl, 1.06 mmol de KCl, 0.88 mg/mL de trometamina y 0.07 mg/mL de edetato de calcio y disodio.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, donde la concentración de parvovirus está entre 2×10^9 pfu/mL y 1×10^{10} pfu/mL.
4. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de un tumor mediante inyección intratumoral o intravenosa.
- 15 5. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el tumor es un tumor cerebral, carcinoma pancreático, carcinoma del cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de las vías digestivas y respiratorias altas, cáncer de mama o cáncer de colon.

Figura 1

Aire (área negra) provocado por el proceso de inyección

5 Hueso craneal

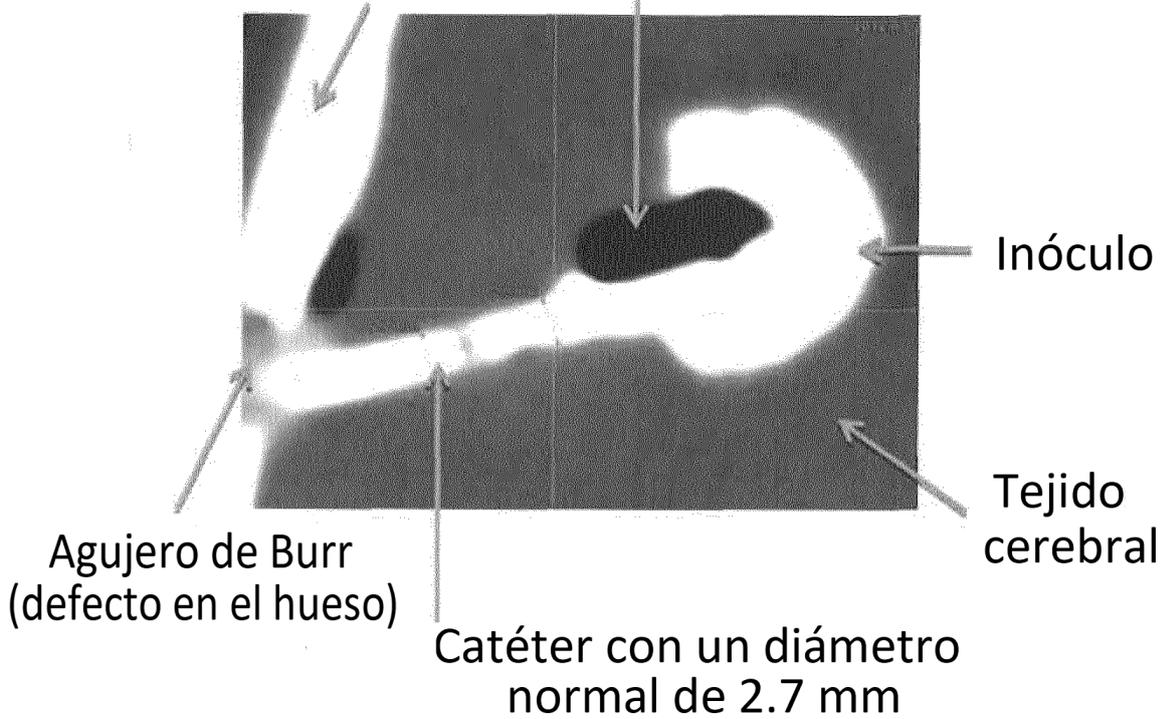


Figura 2

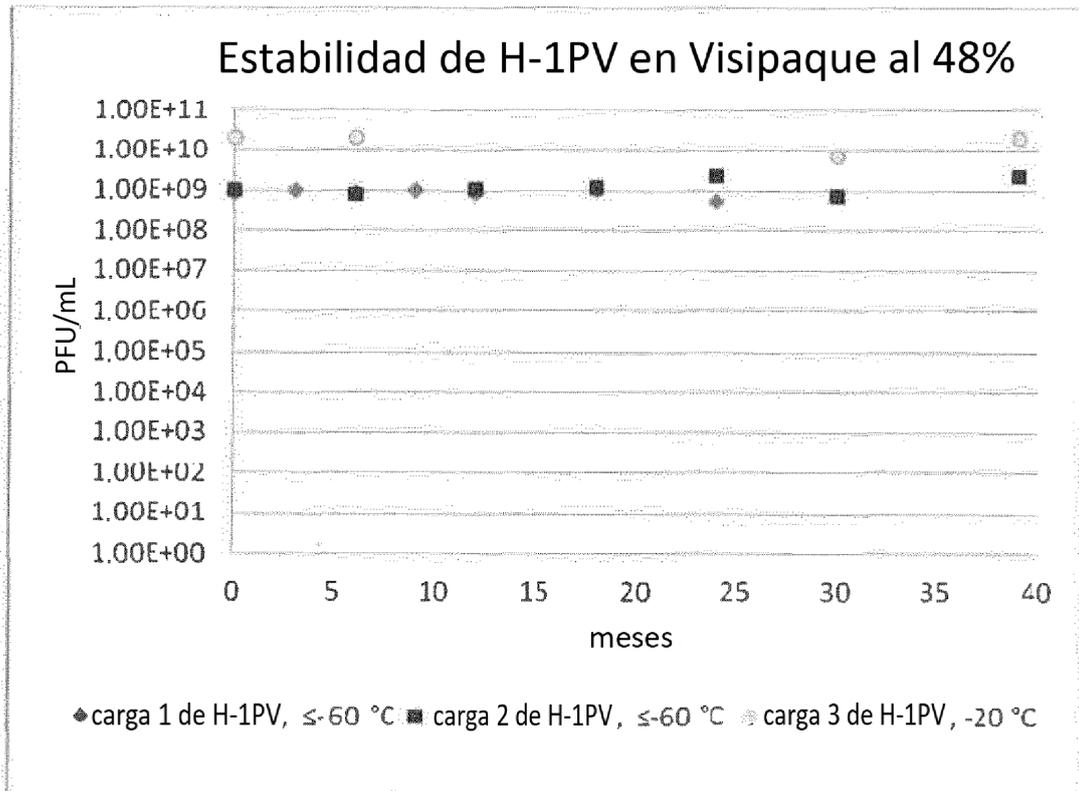
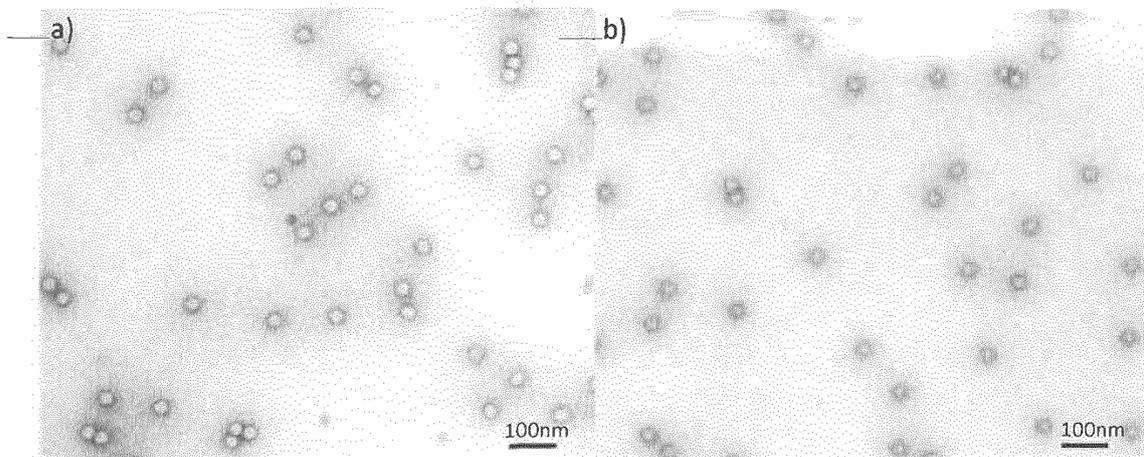
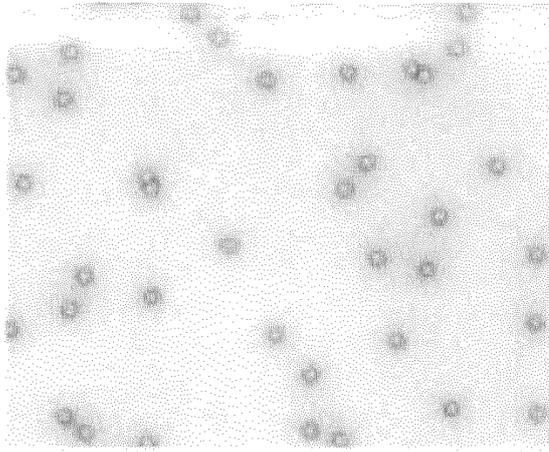


Figura 3



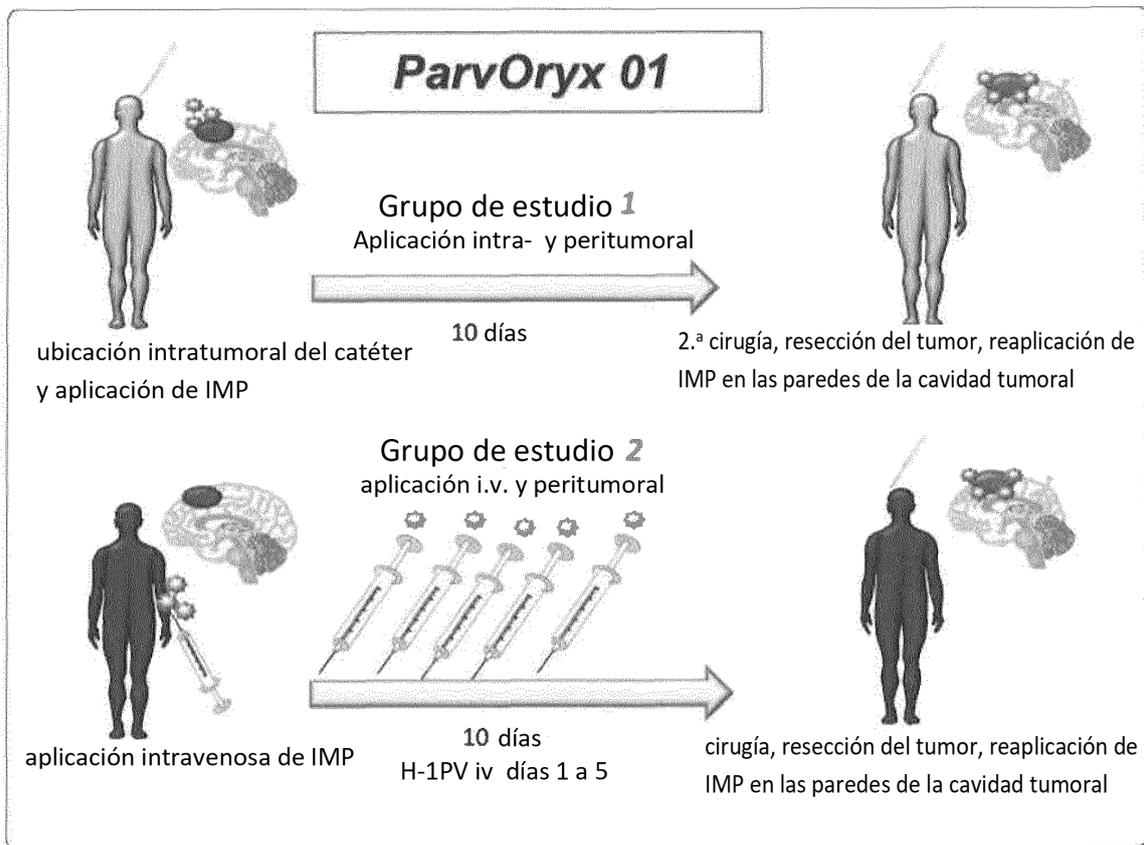


Figura 4

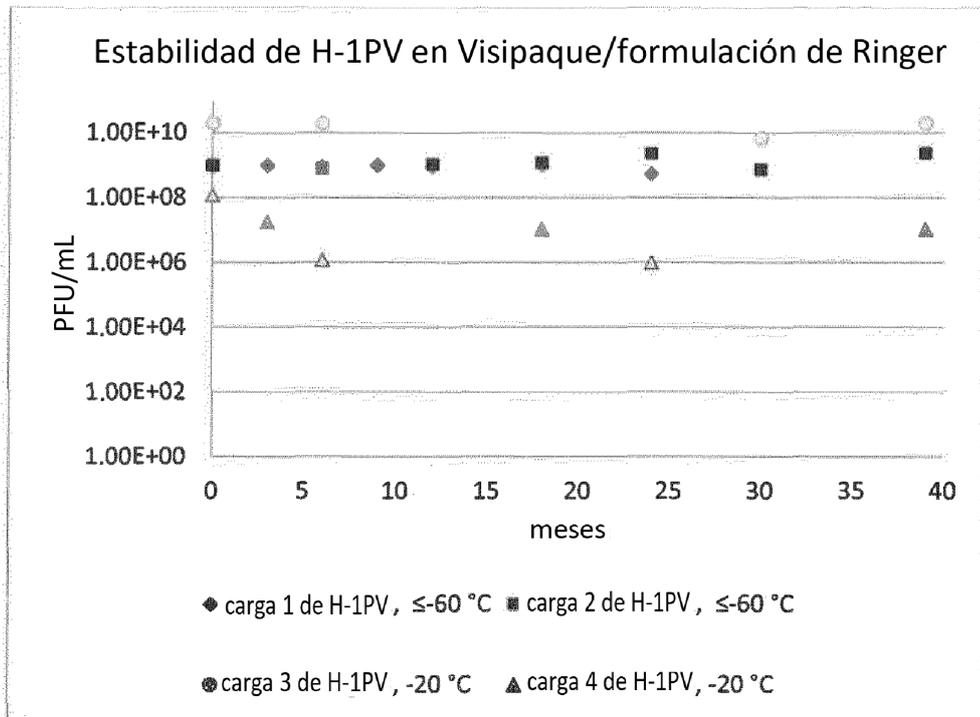


Fig. 5

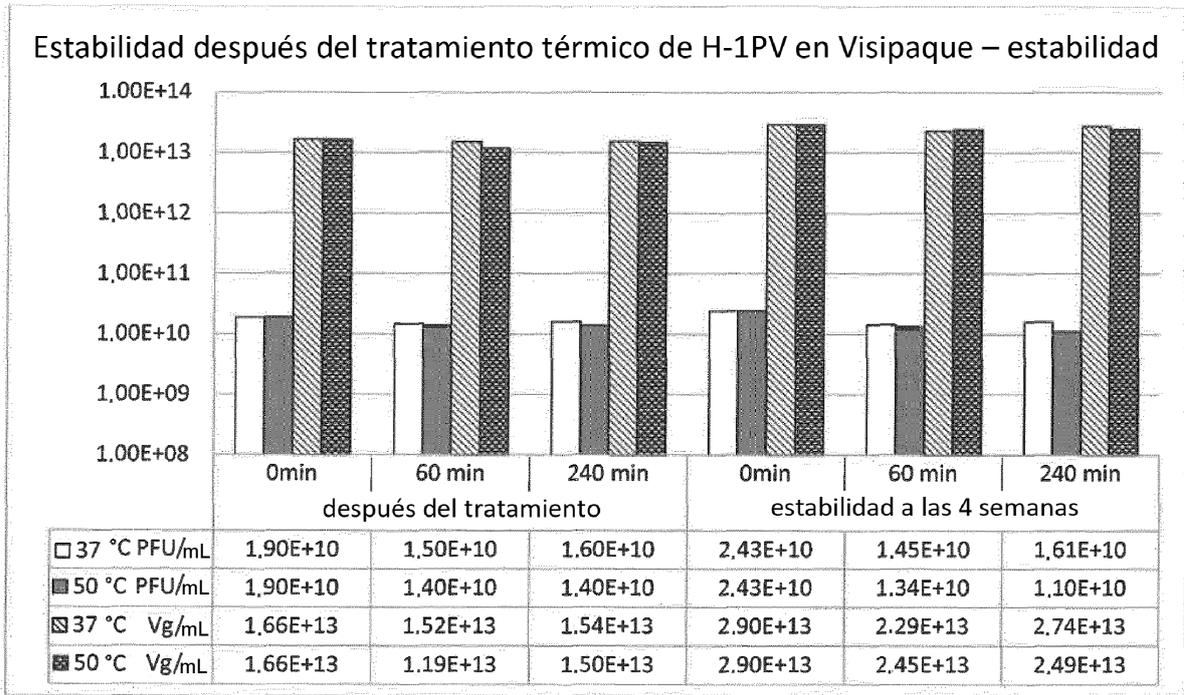


Fig. 6

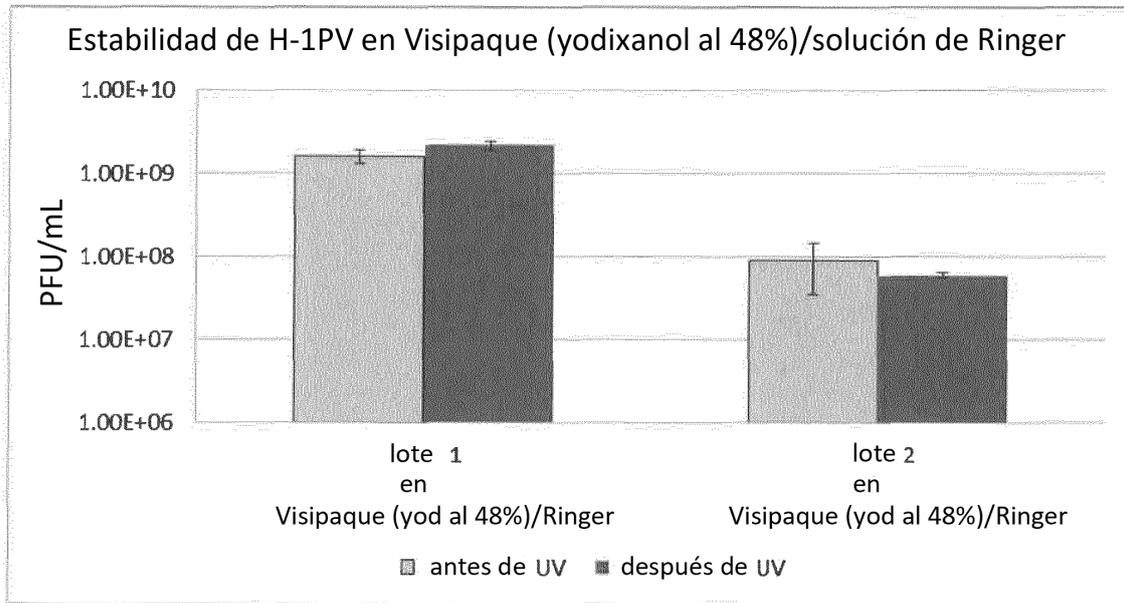


Fig. 7A

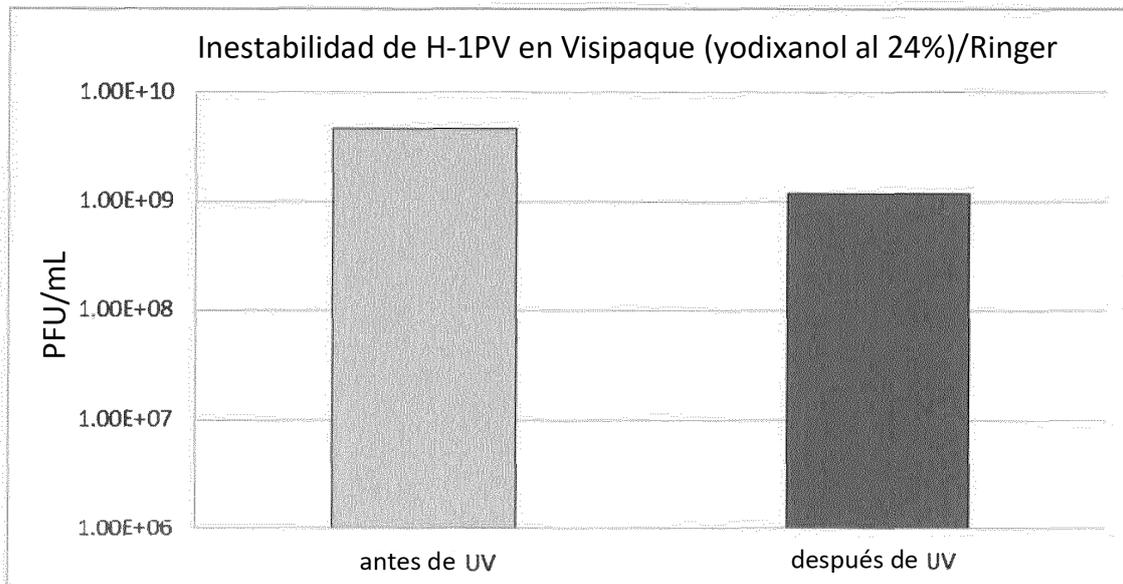


Fig. 7B

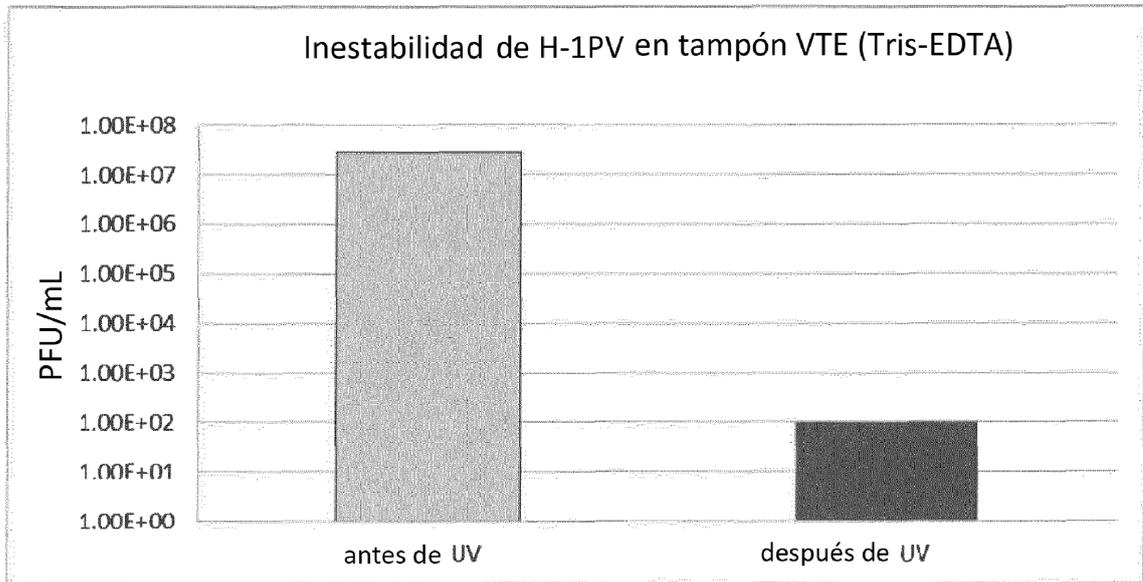


Fig. 7C