



PGT



Organización y
Promoción CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

10-92654

**DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

**SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION**

**TITULO: PARAMIXOVIRUS ONCOLITICOS ATENUADOS QUE CODIFICAN
CITOQUINAS DE AVES**

SOLICITANTE: BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT

DIRECCIÓN: Müllerstrasse 178, 13353, Berlín, Alemania

APODERADO: J. IAN RAISBECK

BOGOTÁ 29 de Julio de 2010

29-08-2010

11-08-2010



No. 10-092654- -00000-0000

Fecha: 2010-07-29 17:05:21 Dep: 2020 DIR NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 181

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2010/000105

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: BAYER SCHERING PHARMA
AKTIENGESELLSCHAFTDirección: Müllerstrasse 178, 13353 Berlín,
AlemaniaNacionalidad o Domicilio: AlemanaLugar de Constitución: Alemania

Teléfono: _____ Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: J. IAN RAISBECKDirección: Diagonal 34 No. 5-28 BogotáTeléfono: 601-7700 Fax: 601-7799E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.376.996 Btá
TP 135.799INVENTOR (ES)
(72)Nombre: 1) Rudolf BEIER; 2) Florian PÜHLERDirección: 1) Kiautschoustrasse 1, 13353 Berlin Alemania;2) Jules-Verne-Strasse 50, 14089 Berlín, AlemaniaNacionalidad o Domicilio: Alemana

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2009/000308Fecha Enero 20, 2009Publicación Internacional No. WO 2009/095167Fecha Agosto 6, 2009

6

Título (54) PARAMIXOVIRUS ONCOLÍTICOS ATENUADOS QUE CODIFICAN
CITOQUINAS DE AVESClasificación Internacional (51) A61K 35/76

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP

US

(32) Fecha

Enero 29, 2008

Enero 29, 2008

(31) Número de Solicitud

08001643.9

61/024,333

9

Comprobante de pago No. 10- 61319Fecha Julio 28 de 2010

10

ANEXOS

2

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple. Ver expediente No. **06-042750**☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA). (IPRP)

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

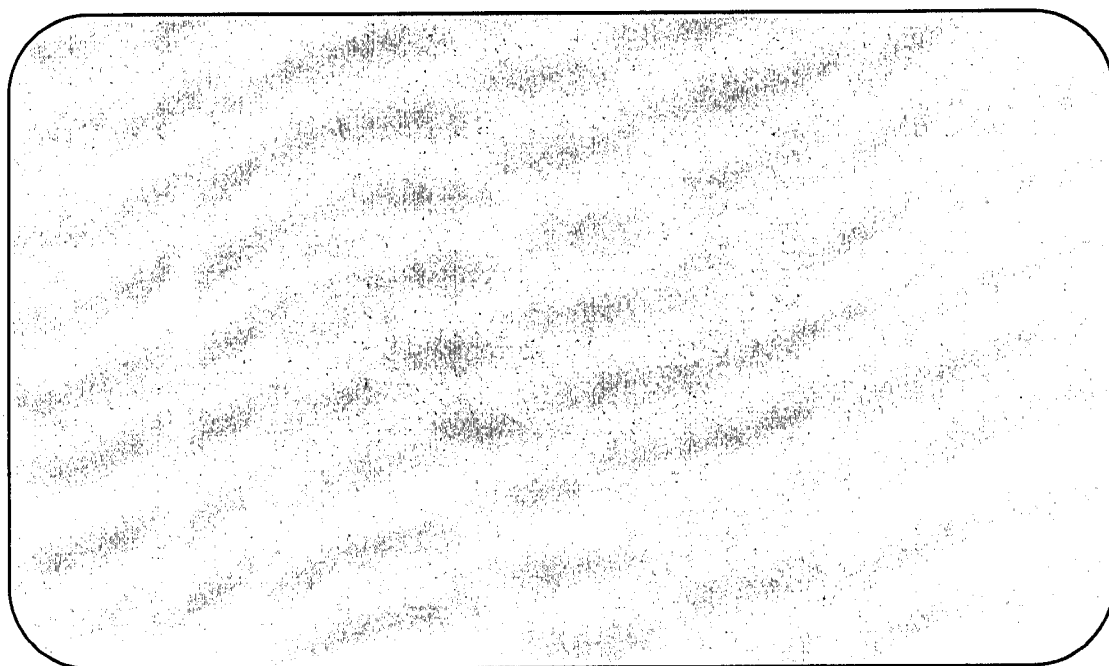
☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional. Formulario PCT/IB/306.

☒

Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: J. IAN PAISBECK

FIRMA:

C.C. 79.376.996 Etá T.P. 135.799

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 80017

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-092654- -00000-0000

Fecha: 2010-07-29 17:05:21

Tra: 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR NULVASCR

Evo: 378 FASLNACIONALI

Folios: 181

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 61,319

FECHA : JULIO 28 DE 2010

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	379540140	28/07/2010	4,095,000.00

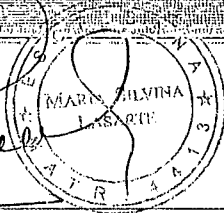
***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
	TOTAL :	\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____



N 007422051

1 FOLIO 85.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: VEINTICUATRO.-
2 SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER; MESSERER, Dagmar a favor de
3 OLARTE, Carlos Reinaldo y otro del Poder otorgado por BAYER SCHERING
4 PHARMA AG.- En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Capital de la República
5 Argentina, el día NUEVE de MARZO del año DOS MIL SIETE, ante mí María
6 Silvina Lasarte, Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial número 1788,
7 COMPARECE: Dagmar MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968,
8 hija de Walter Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Na-
9 cional de Identidad Número 20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria 27-
10 20383892-7, con domicilio especial en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º,
11 de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es mayor de edad.- INTERVIE-
12 NE: por su propio derecho.- Y la compareciente EXPRESA: PRIMERO: Que la
13 Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con domicilio en Müllerstrasse
14 178, 13353, Berlín, Alemania, le confirió con fecha 22 de enero de 2007 en dicho pa-
15 ís, un Poder, el cual mediante escritura número 14 de fecha 16 de febrero de 2007,
16 otorgada ante la Escribana Mariela Vanina Scardaccione, al folio 44, protocolo co-
17 rriente de este Registro Notarial interinamente a su cargo, fue incorporado y transcrip-
18 to al mismo, cuya primera copia tengo para este acto a la vista, doy fe y en lo perti-
19 nente transcribiré en la presente.- SEGUNDO: Manifiesta bajo juramento que el refe-
20 rido poder se encuentra plenamente vigente en virtud de no haberle sido revocado,
21 suspendido ni limitado en ninguna de sus partes.- TERCERO: En consecuencia, DI-
22 CE: Que en uso de la facultad conferida SUSTITUYE PARCIALMENTE el poder
23 mencionado a favor de Carlos Reinaldo OLARTE y/o James Ian RAISBECK, al
24 solo y único objeto de que en nombre y representación de la Sociedad "BAYER
25 SCHERING PHARMA AG", y actuando en forma individual, indistinta y/o alterna-

LEGALIZATION

0703'211-346



13:51:46
\$20.00
12/03/2007

LEGALIZATION

0-031'954713



13:51:54
\$35.00
12/03/2007



N 007422051

damente, se presente exclusivamente ante las autoridades de COLOMBIA que co-
rrespondan y realicen los actos enumerados en el citado poder y con las facultades que
surgen del mismo, el que transcripto en lo pertinente dice: "FOLIO 44.- PRIMERA
COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: CATORCE.-- En la Ciudad Autónoma de
Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día DIECISEÍS de FEBRERO del
año DOS MIL SIETE, ante mí ..., Escribana Autorizante, ..., COMPARECE: Dagmar
MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter Messerer y
Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Nacional de Identidad Número
20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria 27-20383892-7, domiciliada
legalmente en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad de Buenos
Aires.- La compareciente es mayor de edad.- INTERVIENE: por su propio derecho.-
Y la compareciente EXPRESA: Que a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la
Autorizante, LA INCORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo del
PODER que le fuera conferido en Berlín, Alemania, el 22 de enero de 2007, por la
Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con domicilio en Müllerstrasse 178,
13353, Berlín, Alemania, sobre cuya plena vigencia responde la requirente bajo jura-
mento.- Yo, la Autorizante, hago constar: a) Que el instrumento de poder cuya incor-
poración y transcripción a este protocolo solicita la compareciente, se encuentra ex-
tendido en idioma castellano, certificadas las firmas por notario en idioma alemán,
debidamente legalizado en idioma alemán (Sello de Apostilla de la Convención de La
Haya del 5 de octubre de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional por la
Traductora Pública Laura Thieberger.- b) Que la compareciente en virtud de lo mani-
festado tiene interés legítimo en su requerimiento.- En consecuencia, me hace entrega
en este acto del original del instrumento de poder relacionado con su respectiva tra-
ducción al idioma nacional, el que agrego a la presente y transcripto dice: "MOE-



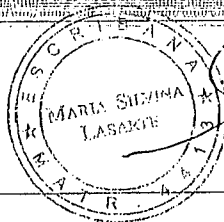
N 007422052

1 LLER & CO. (Sigue aclaración en idioma inglés) - PODER Los abajo firmante/s
2 BAYER SCHERING PHARMA AG domiciliados en Müllerstrasse 178 13353 Berlín
3 - Alemania declaran por el presente otorgar a Dagmar MESSERER poder general am-
4 plio y suficiente para recabar de las autoridades ..., sud y centroamericanas ... que co-
5 rrespondan, la obtención de patentes de invención, el registro y la renovación de mar-
6 ca, modelos y/o derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, a cuyo
7 efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas autoridades todas las gestiones nece-
8 sarias al objeto indicado, presentar solicitudes, formular descripciones, oposiciones,
9 protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, justificar explota-
10 ciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias, recibir documentos y valores, per-
11 cibir y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas de cualquier
12 orden. Por otra parte, les confieren mandato para que en su nombre y representación
13 puedan iniciar y proseguir cualquier juicio que actualmente los que suscriben tengan o
14 en el futuro tuvieran ..., en Sudamérica, Centroamérica ..., con motivo de su nombre,
15 marcas de fábrica o de comercio, patentes de invención y modelos y/o de sus derechos
16 de propiedad intelectual que actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover
17 juicios de cualquier jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales,
18 contra los falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos
19 que infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por oposi-
20 ción u otros en que fueran parte como actores o demandados, defender el nombre, las
21 marcas, patentes y modelos y/o de derechos de propiedad intelectual y/o nombres de
22 dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto, podrán pre-
23 sentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier auto-
24 ridad judicial, presentar testigos, documentos y demás justificativos, rendir pruebas de
25 cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver posiciones, asistir



N 007422052

a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, recusar, apelar, transar, someter a arbitraje o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar cauciones, pedir embargos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, pedir la venta de los bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de sentencias, prestar juramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en general practicar todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este mandato. Podrán asimismo substituir el presente poder en todo o en parte.- Dado y firmado en Berlín (Sigue fecha en idioma inglés). Bayer Schering Pharma AG (Sigue texto en idioma inglés). ppa. Sigue una firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Noeske-Jungblut. ppa. Sigue otra firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Klose". ES COPIA FIEL, doy fe.- En hoja adjunta consta la certificación notarial de las firmas obrantes en el poder en idioma alemán, efectuada el 22 de enero de 2007 por el Escribano Dimitri Rempen, de Berlín, Alemania, y a continuación consta la respectiva legalización de la firma y sello del nombrado Notario (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961), en idioma alemán, efectuada por el Presidente del Tribunal Regional de Berlín, Alemania.- En hojas adjuntas sigue la referida traducción al idioma nacional la que transcripta textualmente, dice: "TRADUCCIÓN PUBLICA - (Sobre papel con membrete de "MOELLER y CO" - América Latina - Agentes de la Propiedad Intelectual - figura un Poder otorgado por la Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con sede en Berlín, Alemania, redactado en idioma nacional, luego del que aparecen los siguientes textos, que traducidos dicen:) "BAYER SCHERING PHARMA AG" -- Patentes y licencias - (Firmado y Aclarado:) pp Dr. Noeske-Jungblut - pp (Firmado y Aclarado:) Dr. Klose.- La versión en inglés es para su información únicamente.- Registro de Actas N° R 17/2007.- Me he referido a la prohibición de intervención según el artículo 3, párrafo 1, N° 7, de la Ley de Certificaciones. Mi pregunta de si ha existi-



N 007422053

6

do una intervención previa en el sentido de la norma me fue contestada por la negati-
va.- Las firmas trazadas ante mí por el Dr. Walter Klose, que nació el 26 de diciembre
de 1952, y de la Dra. Chistiane Noeske-Jungblut de soltera Noeske, que nació el 26 de
junio de 1957 – Ambos de mi personal conocimiento – Ambos con domicilio comer-
cial en 13353 Berlín, Müllerstrasse 173 son auténticas, de lo que doy fe.- Al mismo
tiempo certifico en base a que tuve a la vista en el día de hoy las actas del Registro de
Comercio del Tribunal de Primera Instancia de Charlottenburg, N° de Registro HR B
2007, que la Sociedad “Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft”, con sede en Ber-
lín, está inscrita con el número mencionado arriba en el Registro de Comercio y que
la arriba mencionada Dra. Noeske-Jungblut y el arriba mencionado Dr. Walter Klose
están facultados en su carácter de mandatarios a representar en forma conjunta a la
Sociedad “Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft” de Berlín. Berlín, 22 de enero
de 2007.- El escribano (firma ilegible) y liquidación de derechos. (Hay un sello en
bolsa sobre precinto:) Dimitri Rempen, Escribano de Berlín.- 9101ª E-F.- APOSTI-
LLA – (Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961) - País: República Federal
de Alemania - Este instrumento público fue firmado por Dimitri Rempen, actuando en
su carácter de escribano de Berlín, estando provisto del sello del escribano.- Certifica-
do en Berlín, el 24 de enero de 2007, por el Presidente del Tribunal Regional de Ber-
lín, con el N° 9101 a E-F 536/07 - Sello (hay un sello:) el Presidente del Tribunal Re-
gional de Berlín – Firma el Funcionario autorizado (firmado y aclarado:) Holldorf –
Juez Principal del Tribunal Regional.- ES TRADUCCIÓN FIEL de las partes perti-
nentes en los idiomas alemán e inglés del documento que se acompaña, que he vertido
al idioma nacional, en Buenos Aires, a 6 de febrero de 2007.- Hay una firma ilegible.
Hay un sello que dice: “LAURA THIEBERGER – MATRÍCULA DE TRADUCTO-
RES ALEMÁN – FRANCÉS – Tomo II Folio 254 (Cap.) Tomo III – 98 – (La Plata) –



N 007422053

INGLÉS – Tomo III: Folio 14 (Cap.) – Tomo III Folio 329 (La Plata) – COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS N° 173”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- A continuación hay un sello que dice: “COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES Corresponde a la Legalización N° T4-3278/07. Sigue una firma ilegible: Esteban Santiago Allegretti”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- Al dorso en el margen superior hay un sello timbrador ...”.- A continuación sigue la legalización de la firma de la nombrada traductora, ...”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- En este estado la compareciente DICE: que en la forma expresada deja INCORPORADO y TRANSCRIPTO en este Protocolo el Poder que agrego a la presente, solicitando de mí, la Escribana Autorizante, expida primera copia de la presente para la nombrada apoderada Dagmar MESSERER.- Constancias Notariales: Identidad de la compareciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de la Autorizante.- ...- LEO esta escritura a la compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad, la firma ante mí, doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARIELA VANINA SCARDACCIONE. Escribana. Está mi sello. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 44 del Registro Notarial número 1788, interinamente a mi cargo.- PARA LA APODERADA expido la presente PRIMERA COPIA en tres (3) sellos de actuación notarial numerados correlativamente desde el número N 007376153 al presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.- Sigue una firma ilegible y un sello que dice: Mariela V. Scardaccione – Escribana – Mat. 4527.”.- **ES COPIA FIEL**, de las partes pertinentes de la escritura de referencia, doy fe.- **CUARTO**: Finalmente la compareciente expresa: a) Que el presente otorgamiento no significa renunciar al ejercicio de las facultades sustituidas; y b) Que los nombrados apoderados sustitutos no podrán sustituir el presente poder en ninguna de sus partes.- Constancias Notariales: Identidad de la Compare-

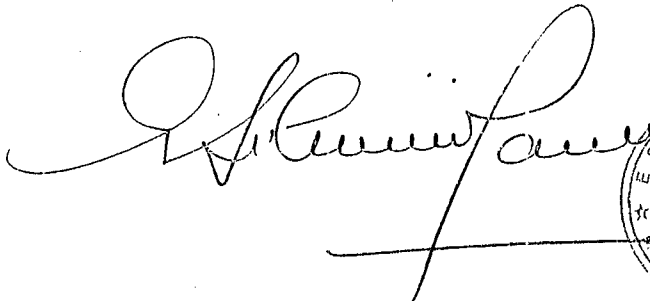


X

N 007422054

1 ciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de
2 la Autorizante.-Yo, la Escribana Autorizante impongo y advierto a la compareciente, a
3 tenor de lo dispuesto en el artículo 77 inciso h) de la Ley Orgánica Notarial Número
4 404, respecto de los alcances y consecuencias de las cláusulas contenidas en la presen-
5 te escritura y del derecho de leer por sí este instrumento.- LEO esta escritura a la
6 compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad la firma ante mí, doy
7 fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARIA SILVINA LASARTE. Escribana. Está
8 nullo. **CONCUERDA** con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 85 del Re-
9 gistro Notarial número 1788, a mi cargo. PARA LA PODERDANTE expido la pre-
10 sente **PRIMERA COPIA** en cuatro (4) sellos de actuación notarial numerados corre-
11 lativamente desde el número N 007422051 al presente inclusive, que sello y firmo en
12 la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.-

13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25






N 007422054

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50



L 007495419

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República

Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, LEGALIZA la firma

y sello del escribano MARIA SILVINA LASARTE

obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo

el N° 070312117346/0

La presente legalización no juzga sobre

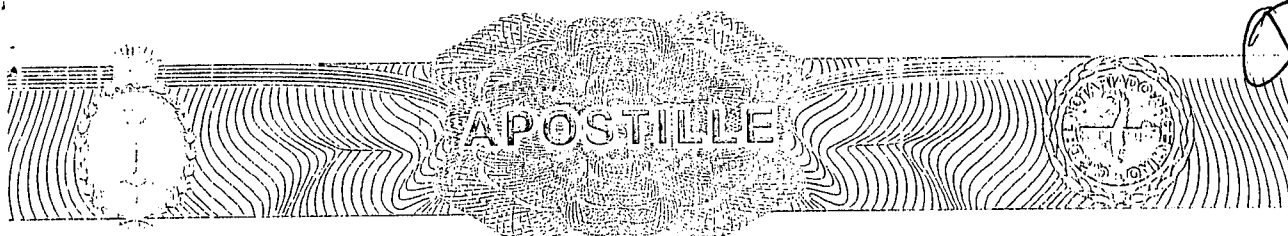
el contenido y forma del documento.

Buenos Aires, Lunes 12 de Marzo de 2007



[Handwritten signature]
ESC. EDDA ENRIQUETA SINELLI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

CONSEJERO



REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00115229

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por EDDA ENRIQUETA SINELLI

3. Quien actúa en calidad de CONSEJERA

4. Lleva el sello / timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS

AIRES

5. En LA CIUDAD DE BUENOS AIRES 6. El día 12/03/2007

7. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 070312054713

9. Sello / Timbre
COLEGIO DE ESCRIBANOS
LA CIUDAD DE BUENOS AIRES



10. Firma

COLEGIO DE ESCRIBANOS
LA CIUDAD DE BUENOS AIRES
CONSEJERA

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 August 2009 (06.08.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/095167 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 35/76 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/EP2009/000308

(22) International Filing Date: 20 January 2009 (20.01.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
08001643.9 29 January 2008 (29.01.2008) EP
61/024,333 29 January 2008 (29.01.2008) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BAYER
SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT
[DE/DE]; Müllerstrasse 173, 13353 Berlin (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BEIER, Rudolf
[DE/DE]; Kiautschoustrasse 1, 13353 Berlin (DE). PÜH-
LER, Florian [DE/DE]; Jules-Verne-Strasse 50, 14089
Berlin (DE).

(74) Common Representative: BAYER SCHERING
PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT; Müllerstrasse
178, 13353 Berlin (DE).

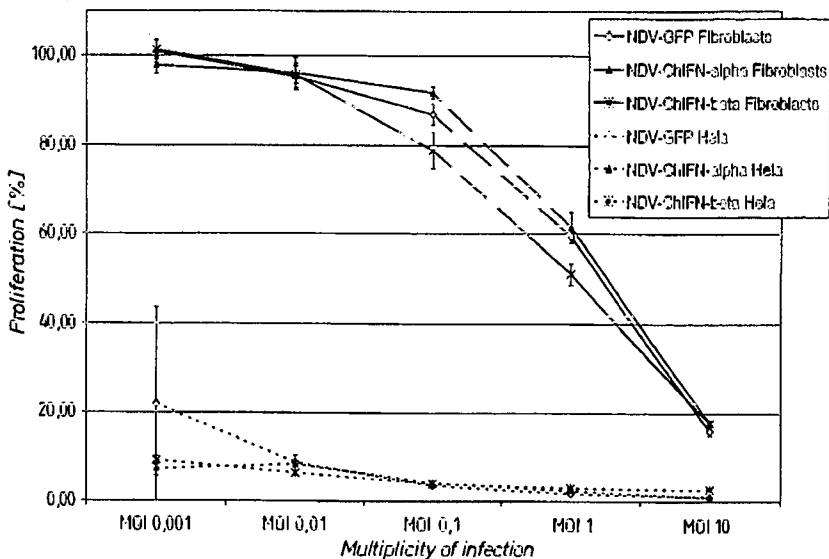
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,
CH, CN, CO, CP, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GE, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LF,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, HE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, EG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GE, GR, HE, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Published:
— with international search report

(54) Title: ATTENUATED ONCOLYTIC PARAMYXOVIRUSES ENCODING AVIAN CYTOKINES

Fig.4



(57) Abstract: The invention refers to a recombinant oncolytic F1A Newcastle Disease Virus for the treatment of a proliferative disease, comprising at least one transgene coding for an avian cytokine, wherein the recombinant oncolytic F1A Newcastle Disease Virus is obtainable from a velogenic or mesogenic oncolytic F1A Newcastle Disease Virus. Virus-mediated expression of the cytokine in the natural host cells leads to a reduced pathogenicity of the virus for avian species. Furthermore the virus genome can encode binding proteins, prodrug-converting enzymes or/and proteases. The selective expression of these molecules in virus-infected tumor cells increases the anti-tumor effect of the virus.



Attenuated oncolytic paramyxoviruses encoding avian cytokines

Introduction

5

The present invention refers to a recombinant oncolytic RNA Newcastle Disease Virus comprising at least one transgene coding for an avian cytokine, wherein the recombinant oncolytic RNA Newcastle Disease Virus is obtainable from a velogenic or mesogenic oncolytic RNA Newcastle Disease Virus. Virus-mediated expression of the cytokine in the natural host cells leads to a reduced pathogenicity of the virus for avian species.

The virus in the present invention is suitable for the treatment of diseases, especially for oncolytic tumor treatment. Recombinant viruses are produced that encode an avian cytokine, wherein the pathogenicity of the virus is reduced for an avian species leading to a diminished environmental toxicity of the virus. The oncolytic activity of the virus is not impaired by the described method of pathogenicity reduction. The virus genome may encode additional therapeutic transgenes, preferably binding proteins (antibodies, ankyrin repeat molecules, peptides etc.), prodrug-converting enzymes or/and proteases. The activity of these binding proteins, prodrug-converting enzymes and/or proteases increases the anti-tumor effect of the virus. Further the invention describes manufacture and the use of such modified viruses for treatment of cancer.

25

Description of the State of the Art

Newcastle Disease Virus

Oncolytic viruses in general for the treatment of tumors are reviewed in Chiocca (2002). Newcastle Disease Virus (NDV) has been used as an experimental therapeutic agent for more than 40 years and is reviewed by Sinkovics and Horvath (2000). The Newcastle Disease Virus in general is

30

12

described in the book by Alexander (1988). NDV strain PV701 is being developed as an anticancer treatment for glioblastoma (Lorence et al., 2003). The NDV strain MTH68 has been used as an experimental cancer treatment and has been administered to humans for more than 30 years

5 (Csatary et al., 2004).

In the paper by Stojdl et al. (2003) it is described that in the range of 80% of all tested tumor cell lines, there is a defect in the interferon response following infection with Vesicular Stomatitis Virus (VSV). It may be assumed

10 that a similar percentage of tumor cell lines will be susceptible to infection with NDV because both VSV and NDV are members of the order mononegavirales. It has also been shown that the mechanism of selective replication of NDV in tumor cells is based on a defect in the cellular interferon response against the virus (see e.g. US: 20030044384).

15 Paramyxoviruses contain single-stranded RNA genomes of negative polarity having genomes of 15-19 kb in length (wild-type) and the genomes contain 6-10 genes. The viral envelope is formed by the surface glycoproteins and a membrane part derived from the host cell. The surface glycoproteins (F and

20 HN or H or G) mediate entry and exit of the virus from the host cell. The nucleocapsid is inside the envelope and contains the RNA genome and the nucleocapsid protein (NP), phospho- (P) and large (L) proteins responsible for intercellular virus transcription and replication. The matrix (M) protein connects the viral envelope and the nucleocapsid. In addition to these genes

25 encoding structural proteins, Paramyxoviridae may contain "accessory" genes which may be additional transcriptional units interspersed with the genes mentioned above. The accessory genes are mostly ORFs that overlap with the P gene transcriptional unit. A comprehensive description of paramyxoviridae can be found in (Lamb, 2001).

30 NDV is the prototypic member of the genus Avulavirus in the family Paramyxoviridae belonging to the order Mononegavirales. The viral genome is a single-stranded negative-sense RNA coding for six major proteins: the

13

- 3 -

nucleocapsid protein (NP), phosphoprotein (P), matrix protein (M), fusion protein (F), hemagglutinin protein (HN), and the polymerase protein (L). By editing of the P protein mRNA, one or two additional proteins, V (and W), are translated.

5

NDV is in detail characterized in Alexander (1988) and Lamb (2001).

Newcastle Disease virus as an avian pathogen

10 NDV strains are classified on their pathogenicity for chicken as velogenic strains (highly virulent) leading to acute lethal infection of chicken of all ages, mesogenic isolates (intermediate virulence) that are only lethal in young chicks, and lentogenic strains (nonvirulent) manifested in a mild or unapparent form of the disease. Classification of NDV isolates in velogen,
15 mesogen or lentogen is determined by the mean death time (MDT) of the chicken embryo in 9 day-old embryonated eggs after inoculation with the minimum lethal dose to kill the embryo. One of the determinants of NDV virulence seems to be the cleavage site of the precursor F protein.

20 The first outbreak of NDV were observed in the year 1926 in Newcastle-upon-Tyne, England and in Java, Indonesia. Three NDV panzootics have been described since the first appearance of the disease.

NDV is primarily transmitted by aerosols or large droplets that are inhaled by
25 susceptible birds. During the course of infection new infectious virus particles will be shed from the infected respiratory tract or excreted in the feces. By ingestion of this virus-containing material by healthy birds, new infections can be established and virus-spreading from one bird to another can be maintained.

30

NDV as an avian pathogen is described in detail in Alexander (1997), Diseases of Poultry.

- 4 -

Newcastle Disease Vaccination

NDV as a threat for poultry farming and the need for vaccination has been already recognised at the beginning of the last century. Iyer and Dobson
5 have performed studies in the 1930s on the attenuation of virulent NDV strains, leading to the development of some mesogenic NDV vaccine strains. The development of live vaccines was moved forward by the establishment of the lentogenic vaccine strains Hitchner B1 and LaSota, which are now the most widely used NDV vaccines. Further vaccination strategies includes the
10 use of inactivated NDV vaccines (e.g. by formaline, β -propiolactone), given together with a carrier adjuvant (aluminum hydroxide, oil emulsion).

The history and the actual state of development of NDV vaccines is depicted in detail in Alexander (1997) Diseases of Poultry.

15

Next generation vaccines for veterinary use based on recombinant NDV generated by reverse genetic technology are reviewed in Huang et al. (2003) and recombinant NDV vaccines are described in the following patents.

20 US 6,699,479 B1 describes a Newcastle disease virus (NDV) mutant that expresses its V protein at a reduced level and is used for vaccination of embryos before hatch.

US 2004/0043035 relates to a recombinant NDV mutant that is not able to
25 express an immunodominant epitope of the nucleoprotein (NP) and is suited as a marker vaccine strain.

US 2003/0224017 describes a reverse genetic system for NDV for the production of a recombinant NDV vaccine. This system allows the
30 expression of transgenes, e.g. avian cytokines (chicken IL-2, chicken IL-4) from the NDV genome to generate NDV vaccine strains.

EP 1 300 157 relates to an attenuated mutant Newcastle disease virus strain

15

- 5 -

suitable for in ovo vaccination of avian species comprising a mutation in the gene sequences encoding the HN and/or F glycoproteins.

5 US 6,719,979 relates to a process for generating infectious Newcastle disease virus (NDV) entirely from cloned full-length cDNA and to the use of vaccines and diagnostic assays generated with and derived from the process.

10 WO 2007/025431 describes a method for producing a recombinant attenuated Newcastle Disease La Sota strain and its use in the preparation of vaccine for the prevention of the diseases caused by Newcastle Disease virus (NDV).

15 WO 2000/067786 concerns cDNAs for making attenuated, infectious Newcastle disease virus (NDV). Within the scope of the invention are vaccines comprising attenuated, infectious NDV.

Recombinant paramyxoviruses

20 EP-A-0 702 085 relates to genetically manipulated infectious replicating non-segmented negative-stranded RNA virus mutants, comprising an insertion and/or deletion in an open reading frame, a pseudogen region or an intergenic region of the virus genome.

25 WO 99/66045 relates to genetically modified NDV viruses obtained from full-length cDNA molecules of the virus genome.

30 WO 00/62735 relates to a method of tumor treatment comprising administering an interferon-sensitive, replication-competent clonal RNA virus, e.g. NDV.

In WO 01/20989 (PCT/US00/26116) a method for treating patients having tumor with recombinant oncolytic paramyxoviruses is described. The tumor is

16

- 6 -

reduced by administering a replication-competent Paramyxoviridae virus. Various methods are described that can be used to engineer the virus genome in order to improve the oncolytic properties.

- 5 WO 03/005964 relates to recombinant VSV comprising a nucleic acid encoding a cytokine.

US 2004/0170607 relates to the treatment of melanoma by administering a virus which is not a common human pathogen.

10

Genetic manipulation of NDV

- NDV can be genetically manipulated using the reverse genetics technology as described e.g. in EP-A-0 702 085. For example, it is known to make
15 recombinant NDV constructs comprising additional nucleic acids coding for secreted alkaline phosphatase (Zhao and Peeters, 2003), green fluorescent protein (Engel-Herbert et al., 2003), VP2 protein of infectious bursal disease virus (Huang et al., 2004), influenza virus hemagglutinin (Nakaya et al., 2001) and chloramphenicol acetyl transferase (Huang et al., 2001)
20 (Krishnamurthy et al., 2000). None of these recombinant NDV has been constructed for use in the treatment of human disease. The recombinant NDVs were made to study either basic virology of NDV or to develop vaccine strains for poultry. As parental virus strains served lentogenic strains of NDV. These strains do not have significant oncolytic properties.

25

Genetic manipulation of viruses

- Methods for genetically manipulating RNA viruses are well known as stated above. Further, genetic manipulation of oncolytic viruses is reviewed e.g. in
30 Bell et al. (2002). RNA viruses as virotherapy agents are reviewed in Russell (2002). The content of any of these documents is herein incorporated by reference.

- 7 -

Avian Cytokines

Avian cytokines are reviewed in Staeheli et al. (2001). A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines was described in Kaiser et al. (2005).

5

Summary of the Invention

10 Oncolytic NDV strains have been studied since the early 1960s as tumor therapeutics. Most virus strains used for oncolytic tumor therapy are belonging to the class of mesogenic viruses, that are described as pathogens for poultry. To develop an oncolytic NDV as an antitumoral biological drug, potential existing environmental toxicity, especially the pathogenicity for poultry should be reduced. However NDVs attenuated for poultry must have the continuing ability to lyse tumor cells and keep its
15 oncolytic potential. Existing strategies for the development of vaccines can not be applied, because they are focussing on the stimulation of the bird immune system either by application of completely inactivated virus particles or apathogenic lentogenic virus strains. Both vaccine types are no more able to replicate in cancer cells and subsequently have lost the
20 potential to lyse tumor cells.

In the present invention, the attenuation of NDV for poultry without diminishing the oncolytic activity of the virus can be reached with the help of the reverse genetic technology. Recombinant attenuated NDVs are created
25 by the insertion of transgenes coding for cytokines, in particular antiviral or immune-stimulating cytokines.

Furthermore a NDV vaccine is not suitable for such an approach because the objective of a vaccine is to induce a strong immune response with a long
30 lasting immunity to protect the animal against a secondary infection. In the present invention the described attenuation of NDV has the main goal to allow an animal to control the (undesired) primary infection and thus to decrease environmental toxicity and to increase safety of the virus when



- 8 -

applied in a therapy of a proliferative disease.

5 A subject of the present invention is the lysis of tumor cells by an oncolytic virus. An indication for such an oncolytic virus approach is cancer therapy in humans. In contrast a NDV vaccine for poultry as disclosed in US 2003/0224017 is applied to animals and therefore located in the field of animal health care.

10 Thus, an object of the present invention is a recombinant oncolytic RNA Newcastle Disease Virus comprising at least one transgene coding for an avian cytokine, wherein the recombinant oncolytic RNA Newcastle Disease Virus is obtainable from a velogenic or mesogenic oncolytic RNA Newcastle Disease Virus.

15 The virus of the present invention may comprise at least one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell.

20 The at least one further transgene is partially allogene or syngene for the host.

In another aspect of the present invention, the virus of the present invention may be an attenuated virus.

25 "Attenuation" or "attenuated" includes reduction of the pathogenicity of the virus for an avian species and reduction of pathogenicity in a biological assay system that is predictive for avian species (see Example 5).

30 A further aspect of the present invention is a recombinant oncolytic RNA virus attenuated for poultry comprising a nucleic acid comprising at least one transgene coding for a cytokine. In particular, the virus is attenuated for chicken. The "transgene coding for a cytokine" is in particular the "a transgene coding for an avian cytokine" as described herein.

19

- 9 -

Further, the invention relates to the nucleocapsid of the recombinant virus of the present invention comprising viral RNA complexed with capsid proteins. Further, the invention relates to an RNA which is RNA of the virus of the present invention. The invention also relates to an RNA complementary to the RNA of the virus of the present invention.

Furthermore, the invention relates to a DNA, e.g. a cDNA encoding the RNA of the present invention and/or a DNA complementary to the RNA of the present invention. Furthermore, the invention relates to the prevention or treatment of tumor diseases, cancer or/and proliferative diseases.

The RNA or/and the DNA of the present invention may be provided in an isolated form.

15

In the present invention, the cytokine encoded by the transgene as described herein may be secreted from a bird cell infected by the virus of the present invention and, after binding to its appropriate interferon-receptor on the neighbouring cell, may induce an antiviral state in the receptor-carrying cell. Therefore replication of the virus of the present invention in the interferon stimulated bird cell can be inhibited at least partially. The similarity between chicken type I interferons and mammalian type I interferons is very low (<25% identity at amino acid level) (Staeheli et al. 2001). For this reason a cytokine exhibiting such antiviral effect in a bird cell does not show essentially biological activity in a human cell and may have essentially no influence on virus replication in human tumor cells. Furthermore, essentially no adverse effects by these cytokines are expected in the human organism.

The expression of the transgene encoding a cytokine as described herein leads to a reduced pathogenicity of the virus for an avian species, especially poultry, especially chicken and thereby to a diminished environmental toxicity. The activity of the transgene encoding a cytokine as described herein has essentially no detrimental effect on the therapeutic effect of the

30

20

- 10 -

virus.

Detailed description of Preferred Embodiments:

5 Viruses

The invention generally relates to RNA viruses, preferably negative strand RNA viruses, more preferably such viruses that have both oncolytic properties and can be genetically engineered. Such viruses are:

- 10 - paramyxoviruses, preferably Newcastle Disease Virus (NDV), measles virus, mumps virus, Sendai virus;
- orthomyxoviruses, preferably influenza virus;
- rhabdoviruses, preferably vesicular stomatitis virus.

- 15 It is preferred that the virus of the present invention is an avian pathogen, in particular a pathogen of poultry, more particular a pathogen of chicken.

- It is also preferred that the virus of the present invention is a negative strand RNA virus. The recombinant RNA virus of the present invention may be a
20 paramyxovirus, preferably a Newcastle Disease Virus (NDV). The NDV may be a mesogenic or velogenic strain. It is preferred that the NDV is a mesogenic NDV.

- The virus of the present invention is obtainable from a velogenic or
25 mesogenic oncolytic RNA Newcastle Disease Virus, in particular from strain MTH68.

The virus of the present invention is preferably replication competent.

- 30 The virus of the present invention may have a pathogenicity reduced for an avian species, in particular with respect to the virus from which the recombinant virus is obtainable.

It is preferred that in the virus of the present invention, the pathogenicity reduction is a capability of the virus to reduce bird cell lysis about 48h after infection with MOI 0,01 measured by increasing cell viability, whereby cell viability is increased to at least about 25% (such as at least about 25% up to about 50%) surviving cells, more preferably to at least about 50% (such as at least about 50 % up to about 75%) surviving cells and most preferably to at least about 75% (such as at least about 75% up to 100%) surviving cells with respect to the virus from which the recombinant virus is obtainable.

It is also preferred that in the virus of the present invention, the pathogenicity reduction is a survival time prolongation of virus infected chicken embryos in 11 day old embryonated eggs measured by mean death time (MDT) determination, whereby the MDT is prolonged by at least about 15h (such as at least 15 h up to about 20h), more preferably at least about 20h (such as at least 20 h up to about 30h and most preferably by more than 30h compared to the virus from which the recombinant virus is obtainable.

In yet another embodiment, the oncolytic activity of the virus of the present invention for human tumor cells is essentially not reduced.

It is preferred that in the virus of the present invention, the oncolytic activity of the virus for human tumor cells measured by cell viability after 48h after infection is not reduced to more than 50% compared to the virus from which the recombinant virus is obtainable and more preferably is essentially not reduced with respect to the virus from which the recombinant virus is obtainable.

Cytokines

The cytokine encoded by the at least one transgene as indicated herein may be any cytokine. In particular, the cytokine may be a cytokine capable of inhibiting at least partially virus replication in a bird cell, in particular in poultry cell, more particular in chicken cell. It is preferred that virus replication is



- 12 -

essentially completely inhibited.

5 The cytokine may be a cytokine having essentially no biological activity in a mammal, in particular in a human being. In this context, "biological activity" refers in particular to the ability of a cytokine to inhibit at least partially virus replication, in particular replication of a virus of the present invention. "Biological activity" also refers to any other activity a cytokine may exhibit in a non-mammalian cell or/and in a non-mammal.

10 The cytokine may be a cytokine capable of inhibiting at least partially virus replication in a bird, in particular in poultry, more particular in chicken, and may have essentially no biological activity in a mammal, in particular in a human being.

15 The cytokine may be selected from avian cytokines, in particular from poultry cytokines, more particular from chicken cytokines.

20 The cytokine may be selected from interferons, in particular from avian interferons, more particular from chicken interferons, more particular from chicken type I interferons.

The interferon may be interferon-beta or a member of the interferon-alpha family.

25 In a preferred embodiment, the recombinant oncolytic RNA virus is an NDV comprising a nucleic acid comprising a transgene encoding a chicken interferon-alpha or/and chicken interferon-beta.

Transgenes

30

A transgene is defined in the context of the NDV genome as additional nucleic acids that are introduced in the viral genome. The nucleic acids can be selected from different genomic sources (e.g. NDV genome, different

13

- 13 -

virus class, prokaryotic or eukaryotic sources, mammalian or non-mammalian species). Also fused transgenes from two or more different genomic sources are possible. Also synthetic transgenes based on de novo synthesis of nucleic acid sequences can be constructed. The nucleic acids must be located within at least one transcriptional cassette. Preferably the transgene is translated into a protein in the infected cell. For this reason the transgenic sequence should include a translational start and stop-codon.

The recombinant oncolytic virus of the present invention may comprise a nucleic acid encoding at least one further transgene independently selected from transgenes coding for binding proteins, prodrug-converting enzymes, and proteases.

The at least one further transgene codes preferably for a binding protein that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.

In another preferred embodiment, the at least one further transgene codes for a prodrug-converting enzyme that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.

In yet another preferred embodiment, the at least one further transgene codes for a protease that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.

If not indicated otherwise, "transgene" or "at least one transgene" as used herein refers to a transgene encoding an avian cytokine, or the at least one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell, or a combination thereof. This definition of "transgene" applies in particular in the position and number of transgenes within the virus genome, as described herein, if not indicated otherwise.

The RNA virus, the genome, antigenome, nucleocapsid and/or DNA molecule of the present invention may comprise the transgene as described

- 14 -

herein which may be located within the transcriptional cassette as described herein.

5 The recombinant oncolytic virus of the present invention may comprise at least two, at least three, at least four, or at least five nucleic acids each comprising a transgene as described herein. The recombinant oncolytic virus of the present invention may comprise at the maximum five nucleic acids each comprising a transgene as described herein. In particular, recombinant oncolytic virus of the present invention comprises one, two, three, four, or 10 five nucleic acids each comprising a transgene as described herein. If the recombinant virus of the present invention comprises at least two transgenes, they may be identical or different.

15 The nucleic acid comprising the at least one transgene may be located at any position between the reading frames of the viral genes. In particular, the nucleic acid comprising the at least one transgene may be located 5' of the N gene, between the N and the P gene, between the P and the M gene, between the M and the F gene, between the F and the HN gene, between the HN and the L gene, or/and 3' of the L gene. It is preferred that the nucleic acid is located in a more 5' position, such as 5' of the N gene, between the N and the P gene, or/and between the P and the M gene, as such location 20 leads to an improved expression compared with a more 3' location.

25 Preferably the virus of the present invention exhibits a tumor-selective infection that leads to a tumor-selective expression of the transgene as described herein.

The recombinant RNA virus of the present invention may comprise in total up to five transgenes, up to four transgenes, or up to three transgenes.

30 In the present invention, the transgene encoding an avian cytokine, or the at least one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell, or a combination thereof is preferably heterologous

25

- 15 -

to the oncolytic RNA virus on which the recombinant RNA virus of the present invention is based. The term "heterologous" as used herein refers to the complete gene or a part thereof, which may be the coding region of the gene or a part thereof.

5

The heterologous nucleic acid may be an artificial nucleic acid or may be obtained from natural sources or by recombination of at least two nucleic acids selected from nucleic acids obtained from natural sources and/or artificial nucleic acids. "Natural sources" include animals such as mammals, plants, fungi, and microorganisms such as bacteria, protozoa and viruses, which may be different from oncolytic RNA viruses of the present invention.

10

The transgene may also encode for a fusion protein.

15

In another embodiment of the present invention, the transgene encoding an avian cytokine and the at least one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell may be located on at least two separated transcription units.

20

At least one transcription unit comprising the nucleic acid comprising the at least one transgene encoding an avian cytokine may also be transcribed in a tumor cell as described herein.

25

At least one transcription unit comprising the nucleic acid comprising the at least one second transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor may also be transcribed in a bird cell as described herein.

30

At least two separated transcription units each may be transcribed in a tumor cell as described herein and in a bird cell as described herein.

In an alternative preferred embodiment, at least one transgene encoding an avian cytokine and the at least one further transgene having therapeutic



- 16 -

activity when expressed by a virus-infected tumor cell are translated in a tumor cell as described herein and in a bird cell as described herein.

Binding proteins

5

In the oncolytic recombinant RNA virus of the present invention, the at least one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell may code for a binding protein.

10

Therefore subject of the present invention is a pharmaceutical composition comprising a recombinant oncolytic virus of the present invention, a virus genome of the present invention, a virus antigenome of the present invention, and/or a DNA molecule of the present invention as an active ingredient optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants, which virus, virus genome, antigenome and/or DNA molecule comprises at least one one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell encoding for a binding protein.

15

20

Binding proteins are proteins, which, when expressed in a target cell, are capable of binding to a component of said cell and/or a neighbouring cell. Preferably, binding proteins are proteins which bind to intracellular components.

25

In a preferred embodiment, a binding protein is selected from the following group consisting of a natural ligand, a genetically modified ligand, a recombinant soluble domain of a natural receptor and a modified version thereof, a peptide ligand, a polypeptide ligand, an antibody molecule and fragments and derivatives thereof, and an antibody-like molecule like an ankyrin-repeat protein and fragments and derivatives thereof.

30

An incomplete review of high-affinity binding frameworks is given by Ladner and Ley (2001).



- 17 -

The binding proteins as described herein might be of human, murine or closely related origin or a chimeric version, i.e. a protein which may be a fusion protein comprising sequences from different species, e.g. human and mouse.

5

The recombinant binding molecules based on the description above can be monomeric, dimeric, trimeric, tetrameric or multimeric. The recombinant binding molecules based on the description above can be monospecific, bispecific or multispecific.

10

The preferred binding proteins are selected from binding proteins having a therapeutic activity.

15 A natural ligand as described herein can be a growth factor or a peptide. A genetically modified ligand may be an analogue of a naturally occurring growth factor or peptide.

20 Recombinant soluble domains of a natural receptor or modified versions of it as described herein are recombinantly expressed soluble extracellular domains of a cell-surface receptor and/or fragments of it, a recombinantly expressed soluble extracellular domain of a cell adhesion molecule and/or fragments thereof.

25 Antibody molecules as mentioned above may be monoclonal immunoglobulin antibodies of any known specificity and isotype, fragments thereof and/or fragments thereof fused to effector proteins. The antibody molecules may be chimeric, humanized or human antibodies. Antibody fragments contain at least one antigen-binding domain of an antibody. Antibody fragments have been described extensively in the literature
30 (reviewed eg. in Allen (2002), herein incorporated by reference). Preferred examples are single-chain Fv fragments, Fab fragments, F(ab2'), domain-deleted versions called minibodies, and other immunoactive portions, fragments, segments and other smaller or larger partial antibody structures



- 18 -

wherein the latter possess sufficient targeting properties or immunological stimulatory or inhibitory activity so as to be therapeutically useful within the methods of the present invention.

- 5 Such antibodies may be derived from hybridoma cloning experiments by use of transgenic mice or from phage display selections, ribosome display selections, or colony filter screening of antibody libraries containing human antibody sequences or related methodologies.
- 10 Binding proteins with antibody like properties as described herein may be genetically modified proteins or domains of it in which one or more peptide loops are randomized on the level of amino acids in such a way that high affinity binding molecules with high specificity can be enriched against any antigen from libraries of such molecules by phage display, ribosome display,
- 15 colony filter screen or related methodologies. The selected proteins usually have high thermal and thermodynamic stability and are well expressed in recombinant expression systems such as *E. coli*, yeast, insect and mammalian expression system. Examples for such binding proteins with antibody like properties are ankyrin repeat proteins as described in Binz et al.
- 20 (2004), the lipocalins as described in Skerra (2000), the gamma-crystallins as described in DE 199 32 688.6, the modified protein A scaffold (affibodies) as described in Hogbom et al. (2003), or Nord et al. (2000) or the fibronectin framework and others. Antibody-like molecules can be monomeric or repetitive molecules either constructed as single-chain molecules or as
- 25 multichain molecules wherein the antibody-like molecule possesses sufficient targeting properties or immunological stimulatory or inhibitory activity so as to be therapeutically useful within the methods of the present invention.
- 30 Another subject of the present invention is a method for treatment of a proliferative disease, in particular a hyperproliferative disease, such as a tumor or cancer, comprising administering in a pharmaceutically effective amount to a subject in need thereof a recombinant oncolytic virus of the



- 19 -

present invention, a virus genome of the present invention, a virus antigenome of the present invention, and/or a DNA molecule of the present invention comprising at least one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell encoding for a binding protein as described herein.

Binding molecules with additional function

The binding protein may be a fusion protein comprising at least one binding domain, e.g. from an antibody, and at least one heterologous domain. "Heterologous" has the meaning as discussed above in the context of heterologous genes.

The binding proteins described above are able to deliver a payload to a disease specific site (e.g. a tumor) as a so called intrabody or as extracellular available binding protein. The delivered payload can be a heterologous domain, e.g. a toxin such as human RNase (De Lorenzo et al., 2004) (Zewe et al., 1997) Pseudomonas exotoxin (Chaudhary et al., 1989) (Kreitman and Pastan, 1995) (Batra et al., 1992) , Diphtheria toxin (Kreitman et al., 1993) (Chaudhary et al., 1990) (Batra et al., 1991), or an enzyme such as beta-galactosidase, beta-glucuronidase (Roffler et al., 1991) (Wang et al., 1992) (Bosslet et al., 1992), beta-glucosidase (Rowlinson-Busza, 1992), carboxypeptidase, (Antoniw et al., 1990), (Bagshawe et al., 1988), beta-lactamase with therapeutic efficacy, or an immune-stimulatory protein with cytokine activity such as IL-2, IL-12, TNF-alpha, IFN-beta or GM-CSF (see e. g. review by Allen (2002)).

In another example the binding proteins described above have themselves antagonistic or agonistic efficacy which is therapeutically useful. Examples for antagonistic/blocking binding molecules are the VEGF inhibitory antibody Avastin (Ferrara et al., 2004), the HER2/neu receptor blocking antibody Herceptin (Noonberg and Benz, 2000) or the EGF-receptor blocking antibody Erbitux (Herbst and Langer, 2002). Agonistic binding proteins can be binding

30

- 20 -

proteins which induce for example apoptosis (Georgakis et al., 2005) or have regulatory activity on DNA, RNA or proteins (e.g. induce transcription, stabilize proteins). The review by (Adams and Weiner, 2005) describes various therapeutic antibodies that could also be incorporated into an oncolytic virus

Prodrug-converting enzymes

In the oncolytic recombinant RNA virus of the present invention, the at least one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell may code for a prodrug-converting enzyme.

A prodrug is a derivative or a precursor of a therapeutically active compound, which can be enzymatically converted into the active compound. Prodrug-converting enzymes are enzymes capable of converting a prodrug into the therapeutically active drug.

Therefore subject of the present invention is a pharmaceutical composition comprising a recombinant oncolytic virus of the present invention, a virus genome of the present invention, a virus antigenome of the present invention, and/or a DNA molecule of the present invention as an active ingredient optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants, which virus, virus genome, antigenome and/or DNA molecule comprises at least one one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell encoding for a prodrug-converting enzyme.

The pharmaceutical composition may further comprise a prodrug which can be converted into a therapeutically active compound by the prodrug-converting enzyme encoded by the virus, virus genome, antigenome and/or DNA molecule. The pharmaceutical composition may be suitable for treatment and/or alleviation of a proliferative disorder.

31

- 21 -

The prodrug may be formulated in a single composition with the recombinant oncolytic virus of the present invention, a virus genome of the present invention, a virus antigenome of the present invention, and/or a DNA molecule of the present invention as an active ingredient, or may be
5 formulated in a composition distinct from the oncolytic virus formulation.

If the oncolytic recombinant RNA virus of the present invention encodes for a prodrug-converting enzyme, the oncolytic virus of the present invention causes selective expression of the prodrug-converting enzyme in a virus-
10 infected target cell (in particular a tumor cell) which is usually not or not sufficiently expressing the prodrug converting enzyme. Thus, during treatment of a subject in need thereof, the prodrug is specifically converted into the pharmaceutical active compound in a target cell, in particular in a
15 tumor cell, but may essentially not be converted into the therapeutically active compound in a non-target cell, in particular in a healthy cell of the subject to be treated. Thus, undesired side-effect of the therapeutically active compound are reduced compared with treatment of the therapeutically active compound alone.

20 In the context of the present invention, the prodrug may be a derivative or a precursor of a therapeutically active compound suitable for treatment and/or alleviation of a proliferative disorder, tumor or/and cancer, which prodrug can be converted by a prodrug converting enzyme. The prodrug may be a compound known by a person skilled in the art. Derivatives and/or
25 precursors are known by a person skilled in the art.

It is preferred that the prodrug is essentially pharmaceutically inactive and/or nontoxic.

30 Examples of prodrug-converting enzymes of the present invention are beta-glucuronidase, beta-galactosidase, beta-glucosidase, carboxypeptidase, beta-lactamase, D-amino acid oxidase. Further examples are known by a person skilled in the art.

32

- 22 -

It is preferred that the prodrug-converting enzyme is essentially not expressed in non-tumor cells.

- 5 The prodrug-converting enzyme may be obtained from an organism selected from mammals, plants, fungi, and microorganisms such as bacteria, protozoa and viruses.

- 10 A most preferred combination of the prodrug-converting enzyme and a prodrug is *E. coli* beta-glucuronidase and a prodrug which can be converted by beta-glucuronidase into an active cytotoxic compound. An example is HMR1826 (doxorubicin-glucuronide) which can be converted into doxorubicin which is a known compound for treatment of cancer.

- 15 Another subject of the present invention is a method for treatment of a proliferative disease, in particular a hyperproliferative disease, such as a tumor or cancer, comprising administering in a pharmaceutically effective amount to a subject in need thereof a recombinant oncolytic virus of the present invention, a virus genome of the present invention, a virus antigenome of the present invention, and/or a DNA molecule of the present invention comprising at least one further transgene encoding for a prodrug converting enzyme as described herein.
- 20

- 25 In particular, subject of the present invention is a method for treatment of a proliferative disease, in particular a hyperproliferative disease, such a cancer, comprising administering in a pharmaceutically effective amount to a subject in need thereof

- (i) a recombinant oncolytic virus of the present invention, a virus genome of the present invention, a virus antigenome of the present invention, and/or a DNA molecule of the present invention comprising at least one transgene encoding for a prodrug-converting enzyme, and
- 30
- (ii) a prodrug suitable for treatment of the proliferative disease, which prodrug can be converted into a pharmaceutically active compound by

33

- 23 -

the prodrug-converting enzyme of (i).

The method may comprise the administration of a single pharmaceutical composition comprising both components (i) and (ii), or may comprise the administration of two distinct pharmaceutical compositions, one of which comprises component (i) and the other comprises (ii).

Proteases

10 In the oncolytic recombinant RNA virus of the present invention, at least one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell may code for a protease.

15 Therefore subject of the present invention is a pharmaceutical composition comprising a recombinant oncolytic virus of the present invention, a virus genome of the present invention, a virus antigenome of the present invention, and/or a DNA molecule of the present invention as an active ingredient optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants, which virus, virus genome, antigenome and/or
20 DNA molecule comprises at least one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell encoding for a protease. The pharmaceutical composition may be suitable for treatment and/or alleviation of a proliferative disorder.

25 If the oncolytic recombinant RNA virus of the present invention encodes for a protease, the oncolytic virus of the present invention may cause selective expression of the protease in a virus-infected target cell (in particular a tumor cell) which is usually not or not sufficiently expressing the protease. Thus, during treatment of a subject in need thereof, the protease may irreversibly
30 cleave a target polypeptide in a target cell, thereby inhibiting proliferation and/or growth of the target cell or killing the target cell, but may essentially not cleave the target molecule in a non-target cell, in particular in a healthy cell of the subject to be treated. By this strategy, undesired side-effects of

34

- 24 -

protease treatment are reduced.

It is preferred that the protease is a sequence-specific protease. More preferred is a protease specifically cleaving a target polypeptide. The protease may either be of natural origin and may be derived from any species or it may be engineered. Amino acid sequences suitable for a specific cleavage of a predetermined target polypeptide can be determined by a person skilled in the art, e.g. on the basis of publicly available sequence databases. US 2005-0175581 and US 2004-0072276 describe the generation of protein-engineered proteases with a predetermined substrate specificity. These two documents are herein included by reference.

The target molecule of the protease may be any target molecule as described below for targets of binding proteins.

Another subject of the present invention is a method for treatment of a proliferative disease, in particular a hyperproliferative disease, such as a tumor or cancer, comprising administering in a pharmaceutically effective amount to a subject in need thereof a recombinant oncolytic virus of the present invention, a virus genome of the present invention, a virus antigenome of the present invention, and/or a DNA molecule of the present invention comprising at least one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell encoding for a protease.

The transgene of the present invention may encode a fusion protein of a prodrug-converting enzyme as defined above, a binding molecule as defined above and/or a protease as defined above. Especially preferred is a fusion protein of a prodrug-converting enzyme and a binding molecule or a fusion protein of a protease and a binding molecule.

35

- 25 -

Therapeutic Applications

The present invention relates to a pharmaceutical composition which comprises as an active ingredient a virus as described herein, a
5 nucleocapsid of the virus, a genome of the virus or a DNA molecule encoding the genome or/and an antigenome of the virus, optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants.

The pharmaceutical composition may be provided as a solution, suspension,
10 a lyophilisate or in any other suitable form. In addition to the active ingredient, the composition may comprise carriers, buffers, surfactants and/or adjuvants as known in the art. The composition may be administered e.g. orally, topically, nasally, pulmonally or by injection locally or intravenously. The pharmaceutical composition is administered in a
15 pharmaceutically effective amount depending on the type of disorder, the patient's condition and weight, the route of administration etc. Preferably 10^9 to 10^{12} virus particles, 10^8 to 10^{11} , 10^7 to 10^{10} , or 10^6 to 10^9 virus particles are administered per application. The oncolytic therapy may be optionally combined with other tumor therapies such as surgery, radiation and/or
20 chemotherapy such as cyclophosphamide treatment and/or hyperthermia treatment.

Yet another aspect is a method for treatment of a proliferative disease or/and cancer, comprising administering in a pharmaceutically effective amount to a
25 subject in need thereof a recombinant oncolytic virus comprises as described herein, a nucleocapsid of the virus, a genome of the virus or a DNA molecule encoding the genome or/and an antigenome of the virus, optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants.

30 According to the present invention, a recombinant oncolytic paramyxovirus can express a soluble binding protein, a prodrug-converting enzyme and/or a protease that may remain either in the infected cell or may be secreted, such as an antibody, an antibody fragment, an ankyrin repeat protein or another

26

- 26 -

binding molecule as specified below.

As an example NDV, the strain MTH68 was chosen in the present application because it has an inherent oncolytic property with promising data from experimental clinical treatments of patients (Sinkovics and Horvath, 2000). In principle, however, most NDV strains with multibasic fusion protein cleavage sites may be used as oncolytic agents for the treatment of tumors. The reverse genetics technology is applicable to all strains.

10 Binding proteins as described herein have been demonstrated to be of high therapeutic potential.

The combination of oncolytic NDV with therapeutic binding proteins, prodrug-converting enzymes and/or proteases of the above described properties will have additional or even synergistic efficacy of two therapeutical principles. The oncolytic self-replicating virus targets the binding protein drug, the prodrug-converting enzyme and/or the protease to the preferred site of action where it is expressed in situ in high local concentrations. Such protein expression is expected to be very selective and the binding protein, the prodrug-converting enzyme and/or the protease with its respective mode of action will add to the intrinsic therapeutic oncolytic activity of the NDV. Based on the replication competent nature of the used virus and the selective replication in tumor cells the amount of expressed transgene [binding protein, the prodrug-converting enzyme and/or protease] is expected to be roughly proportional to the mass of the tumor.

Antibody molecules or antibody like molecules or derivatives thereof are ideal binding proteins to be used with the NDV-system. Antibody molecules have been the subject of intensive research and technologies are now available to generate antibody molecules which are non-immunogenic, very selective and of high affinity. The local expression of antibody molecules at high concentrations lead to very significant agonistic or antagonistic efficacy or efficient targeting of effector molecules with reduced toxicity profile

37

- 27 -

compared to standard therapy.

The use of antibody-like molecules in the NDV system is expected to be even superior. These molecules are designed for selective high affinity
5 binding with very high thermal stability and yield compared to normal antibodies. In the case of the ankyrin-based antibody-like molecules the repetitive nature of the molecule can be finetuned according to the respective target for optimized targeting, binding, inhibition or activation. Also
10 different binding specificities can be combined within one ankyrin molecule, exploiting the possibility of joining in one ankyrin-repeat molecule several units with different binding specificities. This modular structure allows the multivalent binding of greater protein surfaces than it is possible for antibodies, which can be extremely important in blocking protein-protein interactions. The modular structure can also be exploited to block several
15 effectors with only one single blocking ankyrin-repeat-protein.

Since the ankyrin-repeat-molecules are extremely stable even under reducing condition these molecules can be designed to target proteins inside the cell ("Intrabody").
20

Also possible is the use of libraries of binding protein-coding sequences with NDV for in vivo target identification.

Possible targets for binding molecules or/and proteases can be all structures
25 of a target cell or of the extracellular matrix surrounding the target cell which can be recognized by the described binding proteins or/and proteases and which are relevant to a certain type of pathological phenotype. These can be structural proteins, enzymes, growth factors, growth factor receptors, integrins, transcription factors etc.

30 Even targets that are not drugable by small molecules (protein-protein interactions, DNA-binding etc.) can be addressed by this invention.

38

- 28 -

The combination of the oncolytic NDV and therapeutic binding proteins, prodrug-converting enzymes and/or proteases as described herein are envisaged for the treatment of inflammatory disease e.g. rheumatoid arthritis and of cancer.

5

For the treatment of cancer all pathways which contribute to the development of cancer can be targeted. These pathways are: self-sufficiency in growth signals, insensitivity to growth-inhibitory (antigrowth) signals, evasion of apoptosis, limitless replicative potential, sustained angiogenesis, and tissue invasion and metastasis. A summary of these pathways is given in (Hanahan and Weinberg, 2000). Signaling pathways that are involved in the tumorigenesis process and can be targeted by the described approach are the receptor tyrosine kinase pathway (RTK) pathway, RB and p53 pathway, apoptosis pathway, APC pathway, HIF1 pathway, GLI pathway, PI3K pathway and the SMAD pathway. A detailed description of these signaling pathways are given in Vogelstein and Kinzler (2004).

Other signaling pathways where described binding proteins could interfere with are the ras, Wnt and Hedgehog pathway, where for example protein protein interactions can be blocked.

Examples of binding proteins intervening beneficially in the above described pathways in cancer cells are:

- blocking proteins of autonomous active growth factor receptors (eg. EGFR, Met)
- competitive binders for growth factors (antagonists)
- blocking proteins for Rb-phosphorylation
- blocking proteins for E2F-dependent transcription
- stabilizers for p53
- antagonistic binders for antiapoptotic proteins (e.g. Bcl-2)
- antagonistic binders for cyclins
- antagonistic binders for Ras effectors (eg. GEFs)
- antagonistic binders for hypoxia induced proteins (e.g. HIF1 α)

39

- 29 -

- inhibitors of transcription factors that interfere with dimerization, DNA-binding or/and cofactor binding (eg. Myc/Max)
- inducers of differentiation
- inhibitors of smad signalling/translocation
- 5 - inhibitors of cellular adhesion interactions (cadherins, integrins, eg. $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$)
- inhibitors of enzymes that degrade the extracellular matrix (eg. MMPs)
- antagonistic binders for proangiogenic ligands (eg. soluble VEGF-R)
- inhibitors of mitotic kinases (eg. Plk-1)
- 10 - antagonistic binders to proangiogenic receptors
- inhibitors of scaffold complex formation (eg. KSR/Ras)
- inhibitors of translation initiation (eIF4E, EIF2a)

15 The protease of the present invention, the prodrug-converting enzyme and/or the therapeutically active compounds derived from prodrugs of the present invention by the prodrug-converting enzyme may also beneficially intervene in the above described pathways of cancer cells.

Recombinant virus

20

Recombinant virus means a virus that has an engineered defined alteration in its genomic RNA sequence. This alteration may be one or more insertions, deletions, point mutations or combinations thereof.

25 A recombinant RNA virus of the present invention may comprise the full genomic sequence of a natural (unmodified) RNA virus or a sequence derived thereof and may additionally comprise at least one recombinant transcriptional cassette. The at least one transcriptional cassette may be located in between two genes (transcriptional units) of the viral genome. In
30 this case, the at least one transcriptional cassette is flanked by transcriptional start and stop sequences. The at least one transcriptional cassette may also be located within a transcriptional unit of the viral genome. In this case, no additional transcriptional start and stop sequences are

40

- 30 -

required.

The at least one transcriptional cassette may comprise restriction sites, such as PacI or/and Ascl, which may be unique. If two transcriptional cassettes
5 are present, they may comprise different restriction sites.

It is preferred that the RNA virus of the present invention comprises one or two recombinant transcriptional cassettes.

10 In the at least one transcriptional cassette of the present invention, there is a transgene located, which may encode for a binding protein, a prodrug-converting enzyme and/or a protease as described herein.

Any intergenic region between each of two genes (transcriptional units) of
15 the viral genome is suitable for introducing the at least one recombinant transcriptional cassette. If more than one recombinant transcriptional cassette is present, they may be located in the same or different intergenic regions. It is preferred that at least one recombinant transcriptional cassette is located between the viral F and HN genes, in particular if the RNA virus of
20 the present invention is a recombinant Newcastle Disease Virus.

There is no known upper limit for the size of the genome of Paramyxoviridae. Therefore, there is no upper limit for the number and size of transgenes introduced into the recombinant RNA virus of the present invention. It is
25 preferred that the transgene (transgene encoding an avian cytokine, or the at least one further transgene having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell, or a combination thereof, as described herein) independently have a size of up to about 10 kb, more preferred up to about 5 kb, most preferred up to about 2 kb.

30

In the expression (including transcription of the viral RNA into mRNA and translation of the mRNA) of the transgene as described herein, expression control sequences such as transcriptional start and stop sequences and

sequences controlling the translation are used. The expression control sequences of an RNA virus may be used which may be the RNA virus on which the recombinant RNA virus of the present invention is based. In particular, transcriptional start and stop sequences may be obtained from an RNA virus. Expression control sequences may also be obtained from a target cell, in particular sequences controlling the translation and/or protein transport.

Due to the replication mechanism of Paramyxoviridae, the genomic or antigenomic RNAs usually do not appear as naked RNAs. The genomic and antigenomic RNAs are assembled with the nucleoprotein. Therefore, a further subject of the present invention is a nucleocapsid of a recombinant oncolytic RNA virus of the present invention. The nucleocapsid comprises the RNA molecule encoding the genome or/and the antigenome of the RNA virus and the nucleocapsid protein. The nucleocapsid may also comprise the polymerase protein L or/and the phosphoprotein P.

Also subject of the present invention is the anti-genome of the genome of the present invention as described herein.

A further aspect of the present invention is a DNA molecule encoding the genome or/and the anti-genome of a recombinant oncolytic RNA virus of the present invention. The DNA molecule may be a plasmid. The DNA molecule of the present invention can be used for genetically engineering the RNA virus of the present invention. Further, the DNA molecule may be used for producing the RNA virus of the present invention. Therefore, the DNA molecule may be operatively linked to a transcriptional control sequence e.g. a prokaryotic or eukaryotic transcription control sequence.

Another aspect of the present invention is a method for producing a recombinant oncolytic RNA virus expressed from a DNA molecule encoding the genome and/or the anti-genome of a recombinant oncolytic virus of the present invention, in particular the recombinant oncolytic NDV of the present

- 32 -

invention.

A further aspect of the present invention is a cell comprising the recombinant oncolytic virus of the present invention, a virus genome of the present invention, a virus anti-genome of the present invention and/or a DNA molecule of the present invention. The cell may be a prokaryotic cell or a eukaryotic cell. The cell may be a cell line, in particular a mammalian cell line, more particularly a human or murine cell line. The cell may be used in the method of the present invention for producing the RNA virus of the present invention. Suitable systems for transcribing a DNA molecule are known by a person skilled in the art, e.g. in prokaryotic systems such as *E. coli* or eukaryotic systems such as HeLa or CHO.

Yet another aspect is an oncolytic RNA virus, a genome or anti-genome thereof or a DNA molecule comprising the full set of genes of Paramyxoviridae or a set of genes of Paramyxoviridae in which at least one gene or intergenic region is genetically modified, and further comprising at least one recombinant transcriptional cassette as described herein. Such a virus, genome or antigenome or DNA molecule may be used for the manufacture of a medicament and/or treatment of cancer. Such RNA virus, genome, anti-genome or DNA molecule is suitable for constructing a recombinant Paramyxoviridae virus, in particular a recombinant Newcastle Disease Virus by genetic engineering techniques in order to introduce a recombinant sequence into the transcription cassette. For this purpose, the at least one transcription cassette may comprise a restriction site. If more than one transcription cassettes are present, the unique restriction sites of the transcriptional cassettes may be different. An example is plasmid pflMTH68_Asc_Pac of Fig. 1 of WO 2006/050984, the disclosure of which is included herein by reference. Another example is pflMTH68 murine IgG EDB as disclosed in Fig. 2 of WO 2006/050984, the disclosure of which is included herein by reference.

H3

- 33 -

Therapeutical relevance

Treatment of cancer or/and of a tumor includes inhibition of tumor growth, preferably the killing of the tumor cells or the blocking of proliferation in a time gap by infection. NDV replicates selectively in tumor cells.

The virus of the present invention can be used to treat proliferative disorders, in particular hyperproliferative disorders. Preferably neoplasms can be treated with the described virus, preferably cancers from the group consisting of lung, colon, prostate, breast and brain cancer can be treated.

More preferably a solid tumor can be treated.

More preferably a tumor with low proliferation rate can be treated. Examples of tumors with low proliferation rate are prostate cancer or breast cancer.

More preferably a brain tumor can be treated.

More preferably a glioblastoma can be treated.

Mammals include human beings, mice, and rats.

Manufacture of the recombinant RNA virus

The recombinant RNA virus of the present invention, in particular the recombinant NDV, can be constructed as described in Romer-Oberdorfer et al. (1999). The construction of the new nucleic acid sequences is on the level of the cDNA which then is translated into RNA within a eucaryotic cell using the following starting plasmids: pCITE P, pCITE N, pCITE L, pX8δT flNDV.

NDV can be any strain of Newcastle Disease Virus, more preferred a strain that is oncolytic in its wildtype form.

- 34 -

The plasmid pX85T is described in EP 0 702 085 (Conzelmann KK).

5 The recombinant RNA virus of the present invention, in particular the recombinant NDV, can be recovered initially from T7 polymerase expressing cells, eg. BHK T7 cells or transiently with T7 polymerase transfected CHO cells. It can be amplified in cells like 293, CEC32, HT29 or A431. It can also be amplified in the allantoic fluid of embryonated chicken eggs.

10 The recombinant RNA virus, in particular the recombinant NDV, is stored under the following conditions. The recombinant RNA-virus, in particular NDV is stable in 5% D-mannitol / 1% (w/v) L-lysine / pH 8,0 or standard cell culture medium.

At -20°C for up to one month.

At -80°C for up to 10 years.

15 The recombinant RNA virus of the present invention may be manufactured using a wild type-virus or a recombinant virus as starting material. Also a nucleic acid, such a DNA, including such wild-type or recombinant sequence, may be used. For instance, the recombinant RNA virus or/and DNA molecule as described in WO 2006/050984 may be employed as starting material. An example is plasmid pflMTH68_Asc_Pac of Fig. 1 of WO 2006/050984. Another example is pflMTH68 murine IgG EDB of Fig. 2 of WO 2006/050984. The disclosure of WO 2006/050984 is included herein by reference. In particular, the disclosure of WO 2006/050984 concerning recombinant oncolytic RNA viruses and the construction thereof is included herein by reference.

Use of the recombinant NDV as a Medicament

30 The recombinant RNA virus of the present invention, in particular the purified recombinant NDV according to the invention can be used as a medicament, because it shows pharmacological effects.



- 35 -

The recombinant RNA virus, in particular the NDV of the invention, the virus genome, antigenome, nucleocapsid and/or DNA molecule of the present invention can be used for the manufacture of a medicament especially for prevention, alleviation or/and treatment of cancer, a tumor or/and a proliferative disease, especially for prevention, alleviation or/and treatment of cancer, such as lung cancer, prostate cancer, brain cancer, colon cancer, breast cancer.

The pharmaceutical composition of the present invention optionally comprises pharmaceutically acceptable carrier and diluents. Such carrier and diluents are described in Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed. Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (1980). The virus titers used in the pharmaceutical composition or/and applied in the method of treatment of the present invention may be in the range of 10^9 to 10^{12} pfu per dose, in a range of 10^8 to 10^{11} pfu, in a range of 10^7 to 10^{10} pfu or in a range of 10^6 to 10^9 pfu dependent on the indication of treatment.

The pharmaceutical composition of the present invention may be used for the prevention or/and treatment of a proliferative disorder, such as cancer.

The pharmaceutical composition of the present invention may comprise an emulsion of the recombinant oncolytic RNA virus of the present invention, in particular the NDV of the invention and may be administered by inhalation, intravenous infusion, subcutaneous injection, intraperitoneal injection or intratumoral injection.

In the method of the present invention for the prevention or/and treatment of a proliferative disorder, in particular cancer, a pharmaceutically effective amount is a titre of the oncolytic RNA virus of the present invention, in particular the NDV of the present invention, the virus genome of the present invention, or the DNA molecule of the present invention which prevents, alleviates or/and suppresses the disease.

- 36 -

yfb

For the therapeutic effect the acceptable dosis may depend for example on the construct, the patient, the ways of administration and the type of cancer.

5 It is preferred that the subject (the patient) is a mammal, more preferably a human patient.

The present invention is further illustrated by the following Figures and Examples.

10 **Figure legends**

Figure 1 describes plasmid pflMTH68 ChIFN-alpha comprising the full genome of NDV and one transcription cassette comprising the chicken interferon-alpha (ChIFN-alpha) transgene.

15

Figure 2 describes plasmid pflMTH68 ChIFN-beta comprising the full genome of NDV and one transcription cassette comprising the chicken interferon-beta (ChIFN-beta) transgene.

20 **Figure 3a** demonstrates that the avian CEC-32 cell line is partial protected from lysis 48h after infection with NDV-ChIFN-alpha and strong protected after infection with NDV-ChIFN-beta. Infection with a GFP expressing NDV completely destroys the CEC-32 monolayer. In contrast no difference in the lytic effect between the three viruses NDV-GFP, NDV-ChIFN-alpha and
25 NDV-ChIFN-beta is seen after infection of the tumorigenic Hela cell line. Independent of the used virus the Hela cell monolayer is 48h after infection completely destroyed.

30 **Figure 3b** shows a quantification of the cell survival of CEC-32 and Hela cells 48h after infection with the viruses NDV-GFP, NDV-ChIFN-alpha and NDV-ChIFN-beta. After infection with NDV-GFP nearly a complete killing of the CEC-32 cells is observed, only 3% of the cells are viable. The infection of the quail cells with the NDV-ChIFN-alpha keeps 26% of the infected cells

- 37 -

alive. The best protection is observed after infection with the NDV-ChIFN-beta virus, 96% of the CEC-32 cells are viable. In contrast 48h after infection the viability of the tumorigenic Hela cells is reduced under 10% independent of the used recombinant NDV.

5

Figure 4 shows that a large therapeutic window exists after the infection of tumor and fibroblast cells with NDV-ChIFN-alpha and NDV-ChIFN-beta. The proliferation inhibition of the oncolytic viruses NDV-ChIFN-alpha and NDV-ChIFN-beta is very strong on tumor cells and in contrast nearly no growth inhibition is observed after infection of primary fibroblast cells, especially at low MOIs like 0.1 and MOI 0.01.

10

Figure 5a depicts the survival curves of NDV infected embryonated chicken eggs with the four viruses NDV-GFP, NDV-ChIFN-alpha, NDV-ChIFN-beta and the apathogenic strain LaSota. Chick embryos infected with NDV-ChIFN-alpha or NDV-ChIFN-beta are surviving longer than the NDV-GFP infected embryos. The curves are shifted clearly in the direction of the survival curve of the lentogenic NDV LaSota strain.

15

Figure 5b: From the results of the survival curves a MDT (Mean Death Time) is calculated for each infection group. The MDT is increased for the viruses NDV-ChIFN-alpha and ChIFN-beta compared with NDV-GFP. The highest MDT was observed with the apathogenic strain LaSota.

20

Example 1:

25

Generation of a recombinant NDV with an avian derived transgene that lead to the expression of a chicken cytokine

The oncolytic strain MTH68 of NDV was used to obtain viral RNA. Using RT-PCR several fragments of cDNA were obtained and in a multi-step cloning procedure they were assembled into a full-genome cDNA that was cloned into the vector pX8δT (Schnell et al., 1994) yielding the plasmid pflMTH68. This vector can be used for transfection in order to rescue recombinant virus

30

- 38 -

from a T7-polymerase expressing cell line.

One additional transcriptional cassette were cloned into the full-length genomic plasmid of NDV MTH68 (pflMTH68) between the genes encoding the F-protein and the HN-protein into the unique SfiI restriction site. The two DNA-oligonucleotides

SfiI fw (5'-aggccttaaftaaccgacaactaagaaaaatacgggtagaacggcctgag-3', SEQ. ID. NO: 1) and

SfiI back (5'-aggccgttctacccgtatTTTTCTTAAGTTGTCGGTTAATTAAGGCCTCTC-3', SEQ. ID. NO: 2)

were annealed and subsequently ligated into the SfiI-site of pflMTH68.

Two DNA transgenes coding for ChIFN-alpha (NM_205427) and ChIFN-beta (NM_001024836) were amplified by PCR. As templates for the polymerase chain reaction ChIFN-alpha and ChIFN-beta expression constructs described in Schultz et al, 1995 and Sick et al, 1996 were used. For the amplification of the ChIFN-alpha transgene the following primer pair: ChIFN-alpha fw (5'-ccttaattaagccaccatggctgtgcctgcaagccc-3' SEQ. ID NO:3) and ChIFN-alpha-rev (5'-ccttaattaactaagtgcgcgtgttgctgtg-3' SEQ. ID NO:4) were used and for the amplification of ChIFN-beta coding sequence the two primers PacI ChIFN-beta fw (5'-ccttaattaacgcaccatgactgcaaaccatcagtctccagg-3' SEQ. ID NO:5) and ChIFN-beta-rev (5'-ccttaattaatcactgggtgttgagacgtttggatg-3' SEQ. ID NO:6) were used.

Each of the two chIFN-transgenes were cloned into the PacI site of the plasmid pflMTH68Pac, respectively. The total length of the genome was adjusted to be a multiple of 6 to follow the "rule of six" for the length of the viral genome. The sequence identity of the ChIFN-beta insert was confirmed by nucleotide sequencing. In the ChIFN-alpha insert one G to A nucleotide exchange in position 89 in comparison with the sequence NM_205427 was detected. Recombinant virus was rescued from T7-expressing cells transfected with the full-length viral genomic plasmid containing the genes for ChIFN-alpha (Fig. 1) or ChIFN-beta (Fig. 2) by a standard virus rescue

- 39 -

technique. The resulting ChIFN-alpha-expressing virus was designated NDV-ChIFN-alpha and the ChIFN-beta expressing NDV was named NDV-ChIFN-beta. The viruses were cultivated either in tissue culture or in the allantoic fluid of chicken eggs to produce high titres.

5

Example 2:

ChIFN-alpha and ChIFN-beta expressed from a recombinant NDV is biological active.

10 **Materials and Methods:**

CEC-32 cells (avian quail cell line) or Hela cells (cervical cancer cell line) were seeded in a 6 well plate at 1×10^5 cells/well. After becoming adherent the cells were infected using a MOI of 0.01 with the GFP-expressing control virus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alpha, NDV-ChIFN-beta or MOCK. After 64 h
15 the supernatants were harvested and infectious virus particles were inactivated by UV irradiation.

To demonstrate the biological activity of ChIFN-alpha or ChIFN-beta in the supernatant of the virus-infected cells, a chicken interferon-specific bioassay
20 was used (Schwarz et al, JICR, 2005). The assay is based on the stable transfected quail cell line CEC-511 carrying a luciferase-gene controlled by the IFN-responsive chicken Mx promotor. The luciferase activity is induced when the CEC-511 indicator cells where incubated with ChIFN-alpha or ChIFN-beta. To perform this assay 15.000 CEC-511 cells were seeded in 96-
25 well plate. 24 h after seeding the cells were treated with the UV-treated supernatant of the virus-infected Hela or CEC-32 cells. Cells were incubated with 75 µl of a 1:100 dilution of the respective supernatants. As positive controls, cells were incubated with a 1:1000 dilution of supernatant from 293T-cells transfected with an expression plasmid for ChIFN-alpha or
30 ChIFN-beta (Sick et al, 1996) or only medium. After 6h incubation time the Steady-Glo[®] Luciferase Assay (Promega) was performed, following the protocol provided by the manufacturer. To determine mean values each datapoint was measured as triplicate.

50

Results:

64 h after infection the supernatants of the NDV-ChIFN-alpha and NDV-ChIFN-beta infected CEC-32 and Hela cells have a strong luciferase inducing activity on CEC-511 cells indicating virus-mediated expression of ChIFN-alpha and ChIFN-beta in the infected cells. In contrast supernatant of MOCK-infected cells or infected with a control virus expressing GFP show no luciferase-inducing activity on the CEC-511 indicator cell line. A 1:1000 dilution of supernatant containing recombinant ChIFN-alpha or ChIFN-beta also demonstrate a ChIFN-dependent Mx promotor inducing activity.

Tab. 1: Interferon activity in the supernatant of CEC-32 and Hela cells infected with recombinant NDVs expressing ChIFN-alpha or ChIFN-beta. IFN response is measured in indicator cells carrying an Mx promotor-controlled luciferase reporter gene. Measured values are given in relative luciferase counts.

	CEC-32			
	NDV-GFP	NDV-ChIFN-alpha	NDV-ChIFN-beta	MOCK
Mean value	308	11991	8033	246
Standard dev.	86	283	423	27

	Hela			
	NDV-GFP	NDV-ChIFN-alpha	NDV-ChIFN-beta	MOCK
Mean value	237	11739	5095	290
Standard dev.	19	1835	78	39

	ChIFN-alpha	ChIFN-beta	Medium
Mean value	4549	2123	237
Standard dev.	107	15	21

S1

Example 3:

Avian cells but not tumor cells infected with recombinant NDVs expressing ChIFN-alpha or ChIFN-beta are protected from viral lysis

5

Materials and Methods:

3 a.) CEC-32 cells (avian quail cell line) or Hela cells (cervical cancer cell line) were seeded in a 6 well plate at 1×10^5 cells/well. After becoming adherent the cells were infected with a MOI of 0.01 either with the control virus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alpha, NDV-ChIFN-beta or MOCK. After 48h the cells were fixed with 4% formaldehyde solution and stained with Giemsa solution. Subsequent photodocumentation was performed with a Zeiss Axiophot imaging system.

15 3 b.) CEC-32 cells (avian quail cell line) or Hela cells (cervical cancer cell line) were seeded in a 96 well plate at 15.000 cells/well. After becoming adherent the cells were infected with a MOI of 0.01 either with the control virus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alpha, NDV-ChIFN-beta or MOCK (= non-infected). After 48h incubation time the CellTiter-Glo[®] Luciferase Assay (Promega) was performed to measure cell viability, following the protocol provided by the manufacturer. To determine the mean values, each datapoint was generated from six independent values.

Results:

25 **Fig 3. a.)** After 48h the avian CEC-32 cells are lysed by the GFP expressing NDV (NDV-GFP). In contrast cells infected with the ChIFN-alpha expressing virus are partially protected from lysis. The NDV-ChIFN-alpha infected CEC-32 monolayer is to 25-50% intact. An even stronger protection is seen with NDV expressing ChIFN-beta. After 48h nearly 90-100% of the CEC-32 monolayer is intact and protected from viral lysis. The density of this monolayer is comparable with the monolayer of the MOCK infected CEC-32 cells.

- 42 -



Infection with the three viruses on the tumorigenic Hela cell line shows a comparable oncolytic activity between the viruses NDV-GFP, NDV-ChIFN-alpha and NDV-ChIFN-beta. After 48h the monolayer of Hela cells infected with NDV-GFP, NDV-ChIFN-alpha or NDV-ChIFN-beta is nearly completely destroyed. The cell monolayer of MOCK-infected Hela cells is intact, indicated by the blue color of Giemsa-stained cells.

Fig 3. b) In a second experiment cell viability was quantified 48h after infection with the ChIFN-expressing NDVs. The NDV-GFP infected avian CEC-32 cells showed only 3% remaining cell viability. In the NDV-ChIFN-alpha infected CEC-32 cells 26% of the remaining cells are intact. 48h after NDV-ChIFN-beta infection of the CEC-32 quail cell line 94% of the cells are viable and protected against viral lysis.

In contrast nearly any difference in cell destruction can be observed after infection with the three viruses NDV-GFP, NDV-ChIFN-alpha or NDV-ChIFN-beta on the tumorigenic Hela cell line. After 48 h the value for the viable cells is for all three viruses between 3%-9% indicating nearly a complete tumor cell destruction.

Example 4:

Selective oncolysis of tumor cells but not primary cells by recombinant NDV expressing ChIFN-alpha or ChIFN-beta.

Materials and Methods:

5000 primary fibroblast cells or 3000 Hela cells were seeded in each well of a 96 well plate. 16h after seeding virus dilutions of NDV-GFP (NDV-GFP), NDV-ChIFN-alpha (NDV-ChIFN-alpha) and NDV-ChIFN-beta (NDV-ChIFN-beta) were prepared. Fibroblast cells were infected with the indicated virus concentrations. As a negative control fibroblasts cells were MOCK infected. After 1 h the inoculum was removed, cells were washed with PBS and incubated with 200 µl cell culture medium for 4 days in the cell culture incubator. Afterwards the remaining cells were fixed with 4% formaldehyde

S3

- 43 -

solution and stained with crystal violet. The stain was solubilized with 10% glacial acetic acid and the absorbence of each well was measured at 595 nm in an ELISA Reader.

5 Results:

Four days after infection the primary fibroblasts infected with the three viruses NDV-GFP, NDV-ChIFN-alpha and NDV-ChIFN-beta using MOIs between MOI 0,001 up to MOI 0,1 show nearly no proliferation inhibition (Fig. 4). The first signs of proliferation inhibition are only observed at MOIs where 1 or 10 viral particles per cell were used for infection. In contrast tumorigenic Hela cells infected with MOIs between MOI 0,001 and MOI 10 show a very strong proliferation inhibition. This results indicates that the recombinant NDVs have a very good therapeutic window especially at low MOIs like MOI 0,1 and MOI 0,001 where nearly no lytic effect is measured in the primary cells and a very strong growth inhibitory effect is measured in the tumorigenic Hela cells. No difference in the kill curve shape on tumor and primary cells is observed between the control virus NDV-GFP and the ChIFN-expressing viruses NDV-ChIFN-alpha and NDV-ChIFN-beta.

20 Example 5:

Prolonged survival time of chicken embryos infected with recombinant NDV expressing ChIFN-alpha or ChIFN-beta

Materials and Methods:

25 Groups of fifteen 11d old embryonated chicken eggs were infected with NDV-ChIFN-alpha, NDV-ChIFN-beta, NDV-GFP or the non-pathogenic NDV strain LaSota, respectively. As infectious material egg-grown virus in allantoic fluid diluted with sterile PBS was used. An infectious dose of 4000 PFU in a total volume of 200 µl was applied. The inoculum was injected into the allantoic cavity. After infection the eggs were incubated at 37°C and 50%-60% humidity in a egg breeder. Eggs were candled two times a day at the indicated time points (Fig. 5) and embryos were checked for signs of vitality. This assay allows to compare the pathogenicity of different NDV strains by

54

- 44 -

comparing the survival time of the infected embryos. The method is based on the "Mean Death Time of the Minimum Lethal Dose (MDT/MLD)" determination described in R.P. Hanson (1980). The protocol was modified in that way that not serial dilutions of the virus stock were inoculated in the eggs, instead of one defined virus dose injection with a concentration higher than the minimal lethal dose. For ethical reasons this assay modification reduces the number of embryos used for the test. The MDT is determined by the following formula:

10 ***MDT = ((no. dead at X hr) x (X hr) + (no. dead at Y hr) x (y hr) etc.)/total number dead***

Results:

15 The survival of the NDV-ChIFN-alpha and NDV-ChIFN-beta infected chick embryos is improved in comparison with the NDV-GFP infected embryos. The NDV-GFP infected embryonated eggs are losing signs of vitality between 24h and 62h, leading to a MDT (Mean Death Time) of 50h. The NDV-ChIFN-beta infected embryos are surviving up to 96h with a calculated
20 MDT of 69h. A comparable survival time with a MDT of 74h is measured in the NDV-ChIFN-beta infected embryos. Most of the NDV-ChIFN-beta infected embryos are dying between 48h and 96h. The sensitivity of the assay is indicated by usage of the apathogenic or lentogenic strain LaSota. Even embryonated eggs inoculated with the NDV LaSota strain are dying
25 between 62h to 115h with a calculated MDT of 85h. This experiments shows that the MDT of the mesogenic NDV MTH68 is shifted towards a lentogenic NDV strain.



References

- 5 Adams, G.P. and Weiner, L.M. (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 23, 1147-1157.
- Alexander, D.J. (1988) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.
- 10 Allen, T.M. (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2, 750-763.
- 15 Amstutz, P., Binz, H.K., Parizek, P., Stumpp, M.T., Kohl, A., Grutter, M.G., Forrer, P. and Pluckthun, A. (2005) Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed ankyrin repeat proteins. *J Biol Chem*, 280, 24715-24722.
- 20 Antoniwi, P., Springer, C.J., Bagshawe, K.D., Searle, F., Melton, R.G., Rogers, G.T., Burke, P.J. and Sherwood, R.F. (1990) Disposition of the prodrug 4-(bis (2-chloroethyl) amino) benzoyl-L-glutamic acid and its active parent drug in mice. *Br J Cancer*, 62, 909-914.
- 25 Bagshawe, K.D., Springer, C.J., Searle, F., Antoniwi, P., Sharma, S.K., Melton, R.G. and Sherwood, R.F. (1988) A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites. *Br J Cancer*, 58, 700-703.
- 30 Batra, J.K., Fitzgerald, D.J., Chaudhary, V.K. and Pastan, I. (1991) Single-chain immunotoxins directed at the human transferrin receptor containing *Pseudomonas* exotoxin A or diphtheria toxin: anti-TFR(Fv)-PE40 and DT388-anti-TFR(Fv). *Mol Cell Biol*, 11, 2200-2205.

56

- Batra, J.K., Kasprzyk, P.G., Bird, R.E., Pastan, I. and King, C.R. (1992)
Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing *Pseudomonas*
exotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5867-5871.
- 5
- Bell, J.C., Garson, K.A., Lichty, B.D. and Stojdl, D.F. (2002) Oncolytic
viruses: programmable tumor hunters. *Curr Gene Ther*, 2, 243-
254.
- 10
- Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C., Forrer, P.,
Grutter, M.G. and Pluckthun, A. (2004) High-affinity binders
selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat*
Biotechnol, 22, 575-582.
- 15
- Bosslet, K., Czech, J., Lorenz, P., Sedlacek, H.H., Schuermann, M. and
Seemann, G. (1992) Molecular and functional characterisation of
a fusion protein suited for tumor specific prodrug activation. *Br J*
Cancer, 65, 234-238.
- 20
- Carnemolla, B., Borsi, L., Balza, E., Castellani, P., Meazza, R., Berndt, A.,
Ferrini, S., Kosmehl, H., Neri, D. and Zardi, L. (2002)
Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its
targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix.
Blood, 99, 1659-1665.
- 25
- Chaudhary, V.K., Gallo, M.G., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1990) A
recombinant single-chain immunotoxin composed of anti-Tac
variable regions and a truncated diphtheria toxin. *Proc Natl Acad*
Sci U S A, 87, 9491-9494.
- 30
- Chaudhary, V.K., Queen, C., Junghans, R.P., Waldmann, T.A., FitzGerald,
D.J. and Pastan, I. (1989) A recombinant immunotoxin
consisting of two antibody variable domains fused to

57

- 47 -

Pseudomonas exotoxin. *Nature*, 339, 394-397.

Chiocca, E.A. (2002) Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer*, 2, 938-950.

- 5 Csatory, L.K., Gosztanyi, G., Szeberenyi, J., Fabian, Z., Liszka, V., Bodey, B. and Csatory, C.M. (2004) MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol*, 67, 83-93.

- 10 De Lorenzo, C., Arciello, A., Cozzolino, R., Palmer, D.B., Laccetti, P., Piccoli, R. and D'Alessio, G. (2004) A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Res*, 64, 4870-4874.

- 15 Engel-Herbert, I., Werner, O., Teifke, J.P., Mebatsion, T., Mettenleiter, T.C. and Romer-Oberdorfer, A. (2003) Characterization of a recombinant Newcastle disease virus expressing the green fluorescent protein. *J Virol Methods*, 108, 19-28.

- 20 Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P. and Novotny, W. (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 391-400.

- 25 Ford, K.G., Souberbielle, B.E., Darling, D. and Farzaneh, F. (2001) Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene Ther*, 8, 1-4.

- 30 Georgakis, G.V., Li, Y., Humphreys, R., Andreeff, M., O'Brien, S., Younes, M., Carbone, A., Albert, V. and Younes, A. (2005) Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death. *Br J Haematol*, 130, 501-510.

58

- 48 -

- Gerber, H.P. and Ferrara, N. (2005) Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*, 65, 671-680.
- 5
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.
- Hanson, R.P: (1980) Newcastle Disease. In Hitchner, S. B. (ed.). Isolation and identification of avian pathogens. College Station, Tex: American Association of Avian Pathologists.
- 10
- Herbst, R.S. and Langer, C.J. (2002) Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. *Semin Oncol*, 29, 27-36.
- 15
- Hogbom, M., Eklund, M., Nygren, P.A. and Nordlund, P. (2003) Structural basis for recognition by an in vitro evolved affibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3191-3196.
- 20
- Huang, Z., Elankumaran, S., Panda, A. and Samal, S.K. (2003) Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Poult Sci*. 82, 899-906.
- 25
- Huang, Z., Elankumaran, S., Yunus, A.S. and Samal, S.K. (2004) A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *J Virol*, 78, 10054-10063.
- 30
- Huang, Z., Krishnamurthy, S., Panda, A. and Samal, S.K. (2001) High-level expression of a foreign gene from the most 3'-proximal locus of a recombinant Newcastle disease virus. *J Gen Virol*, 82, 1729-

59

- 49 -

1736.

- 5 Kreitman, R.J., Chaudhary, V.K., Waldmann, T.A., Hanchard, B., Cranston, B., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1993) Cytotoxic activities of recombinant immunotoxins composed of *Pseudomonas* toxin or diphtheria toxin toward lymphocytes from patients with adult T-cell leukemia. *Leukemia*, 7, 553-562.
- 10 Kaiser, P., Poh, T.Y., Rothwell, L., Avery, S., Balu, S., Pathania, U.S., Hughes, S., Goodchild, M., Morrell, S., Watson, M., Bumstead, N., Kaufman, J. and Young, J.R. (2005) A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *J Interferon Cytokine Res.* 25: 467-484.
- 15 Kreitman, R.J. and Pastan, I. (1995) Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of *Pseudomonas* exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. *Biochem J*, 307 (Pt 1), 29-37.
- 20 Krishnamurthy, S., Huang, Z. and Samal, S.K. (2000) Recovery of a virulent strain of newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. *Virology*, 278, 168-182.
- 25 Kuan, S.F., Byrd, J.C., Basbaum, C.B. and Kim, Y.S. (1987) Characterization of quantitative mucin variants from a human colon cancer cell line. *Cancer Res*, 47, 5715-5724.
- 30 Ladner, R.C. and Ley, A.C. (2001) Novel frameworks as a source of high-affinity ligands. *Curr Opin Biotechnol*, 12, 406-410.
- Lamb, R.A., Kolakofsky, D. (2001) Paramyxoviridae: The Viruses And Their Replication. In Fields, B.N. (ed.), *Virology*. Lippincott Williams &

60

- 50 -

Wilkins, pp. 1305-1485.

- 5 Lorence, R.M., Pecora, A.L., Major, P.P., Hotte, S.J., Laurie, S.A., Roberts, M.S., Groene, W.S. and Bamat, M.K. (2003) Overview of phase I studies of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus. *Curr Opin Mol Ther*, 5, 618-624.
- 10 Mizukami, Y., Jo, W.S., Duerr, E.M., Gala, M., Li, J., Zhang, X., Zimmer, M.A., Iliopoulos, O., Zukerberg, L.R., Kohgo, Y., Lynch, M.P., Rueda, B.R. and Chung, D.C. (2005) Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nat Med*, 11, 992-997.
- 15 Nakaya, T., Cros, J., Park, M.S., Nakaya, Y., Zheng, H., Sagrera, A., Villar, E., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2001) Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J Virol*, 75, 11868-11873.
- 20 Noonberg, S.B. and Benz, C.C. (2000) Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs*, 59, 753-767.
- 25 Nord, K., Gunneriusson, E., Uhl inverted question mark, M. and Nygren, P.A. (2000) Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and taq DNA polymerase. *J Biotechnol*, 80, 45-54.
- 30 Roffler, S.R., Wang, S.M., Chern, J.W., Yeh, M.Y. and Tung, E. (1991) Anti-neoplastic glucuronide prodrug treatment of human tumor cells targeted with a monoclonal antibody-enzyme conjugate. *Biochem Pharmacol*, 42, 2062-2065.
- Romer-Oberdorfer, A., Mundt, E., Mebatsion, T., Buchholz, U.J. and

61

- 51 -

Mettenleiter, T.C. (1999) Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. J Gen Virol, 80 (Pt 11), 2987-2995.

- 5 Rowlinson-Busza, G., Bamias, A., Krausz, T. and Epenetos, A.A. (1992) Antibody guided enzyme nitrile therapy (Agent): in vitro cytotoxicity and in vivo tumor localisation. In Epenetos, a. (ed.), Monoclonal Antibodies 2. Applications in Clinical Oncology. Chapman and Hall, London, pp. 111-118.
- 10 Russell, S.J. (2002) RNA viruses as virotherapy agents. Cancer Gene Ther, 9, 961-966.
- 15 Salgaller, M.L. (2003) Technology evaluation: bevacizumab, Genentech/Roche. Curr Opin Mol Ther, 5, 657-667.
- Schnell, M.J., Mebatsion, T. and Conzelmann, K.K. (1994) Infectious rabies viruses from cloned cDNA. Embo J, 13, 4195-4203.
- 20 Schultz, U., Rinderle, C., Sekellick, M.J., Marcus, P.I. and Staeheli, P. (1995) Recombinant chicken interferon from Escherichia coli and transfected COS cells is biologically active. Eur J Biochem. 229:73-76.
- 25 Schwarz, H., Harlin, O., Ohnemus, A., Kaspers, B. and Staeheli, P. (2004) Synthesis of IFN-beta by virus-infected chicken embryo cells demonstrated with specific antisera and a new bioassay. J Interferon Cytokine Res. 24:179-184.
- 30 Sick, C., Schultz, U. and Staeheli, P. (1996) A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. J Biol Chem., 271, 7635-7639.

- 52 -

- Sinkovics, J.G. and Horvath, J.C. (2000) Newcastle disease virus (NDV):
brief history of its oncolytic strains. J Clin Virol, 16, 1-15.
- 5 Skerra, A. (2000) Lipocalins as a scaffold. Biochim Biophys Acta, 1482, 337-350.
- 10 Staeheli, P., Puehler, F., Schneider, K., Gobel, T.W. and Kaspers, B. (2001)
Cytokines of birds: conserved functions--a largely different look.
J Interferon Cytokine Res. 2001 21:993-1010.
- 15 Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T.,
Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H.,
Brown, E.G., Durbin, R.K., Durbin, J.E., Hiscott, J. and Bell, J.C.
(2003) VSV strains with defects in their ability to shutdown innate
immunity are potent systemic anti-cancer agents. Cancer Cell, 4,
263-275.
- 20 Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways
they control. Nat Med, 10, 789-799.
- 25 Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. and Heldin,
C.H. (1994) Different signal transduction properties of KDR and
Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. J Biol
Chem, 269, 26988-26995.
- 30 Wang, S.M., Chern, J.W., Yeh, M.Y., Ng, J.C., Tung, E. and Roffler, S.R.
(1992) Specific activation of glucuronide prodrugs by antibody-
targeted enzyme conjugates for cancer therapy. Cancer Res, 52,
4484-4491.
- Warren, R.S., Yuan, H., Matli, M.R., Gillett, N.A. and Ferrara, N. (1995)
Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon
cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver

63

- 53 -

metastasis. J Clin Invest, 95, 1789-1797.

5 Zewe, M., Rybak, S.M., Dubel, S., Coy, J.F., Welschof, M., Newton, D.L. and
Little, M. (1997) Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic
RNase immunofusion. Immunotechnology, 3, 127-136.

10 Zhao, H. and Peeters, B.P. (2003) Recombinant Newcastle disease virus as
a viral vector: effect of genomic location of foreign gene on gene
expression and virus replication. J Gen Virol, 84, 781-788.

- 54 -

Claims

1. A recombinant oncolytic RNA Newcastle Disease Virus comprising at
5 least one transgene coding for an avian cytokine, wherein the
recombinant oncolytic RNA Newcastle Disease Virus is obtainable from
a velogenic or mesogenic oncolytic RNA Newcastle Disease Virus.
2. The virus according to claim 1, comprising at least one further transgene
10 having therapeutic activity when expressed by a virus-infected tumor cell.
3. The virus according to claim 2, wherein the at least one further transgene
is partially allogene or syngene for the host.
- 15 4. The virus according to any of the claims 1 to 3, wherein the pathogenicity
of the virus is reduced for an avian species.
5. The virus of claim 4, wherein the pathogenicity of the virus is reduced for
an avian species with respect to the virus from which the recombinant
20 virus is obtainable.
6. The virus of claim 4 or 5, wherein the avian species is selected from
poultry.
- 25 7. The virus of any of the claims 4 to 6, wherein the avian species is
chicken.
8. The virus of any of the claims 1 to 7, which is an avian pathogen, in
particular a pathogen of poultry, more particular a pathogen of chicken.
30
9. The virus of any of the claims 1 to 8, obtainable from the mesogenic
strain MTH68.

10. The virus of any of the claims 1 to 9, wherein the at least one further transgene codes for a binding protein that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.
- 5 11. The virus according to claim 10, wherein the binding protein is selected from the following group consisting of a natural ligand, a genetically modified ligand, a recombinant soluble domain of a natural receptor and a modified version thereof, a peptide ligand, a polypeptide ligand, an antibody molecule and fragments and derivatives thereof, and an
- 10 antibody-like molecule like an ankyrin-repeat protein and fragments and derivatives thereof.
12. The virus according to claim 10 or 11, wherein the binding protein is of mammalian, e.g. human, murine or closely related origin or a chimeric
- 15 protein.
13. The virus according to any of one the claims 10 to 12, wherein the binding protein is a monomeric, dimeric, trimeric, tetrameric or multimeric protein.
- 20 14. The virus according to any one of the claims 10 to 13, wherein the binding protein is monospecific, bispecific or multispecific.
15. The virus according to any one of the claims 10 to 14, wherein the
- 25 binding protein is a fusion protein comprising at least one binding domain and at least one heterologous domain.
16. The virus according to claim 15, wherein the binding protein is a fusion protein comprising a toxin such as human RNase (pseudomonas exotoxin, Diphtheria toxin), or a fusion protein comprising an enzyme like
- 30 beta-glucuronidase, beta-galactosidase, beta-glucosidase, carboxypeptidase, beta-lactamase, or a fusion protein comprising an immune-stimulatory protein with cytokine activity like IL-2, IL-12, TNF-

66

- 56 -

alpha, IFN-beta or GM-CSF.

17. The virus according to any one of the claims 10 to 16, wherein the binding protein is selected from the group consisting of blocking proteins of autonomous active growth factor receptors (eg. EGFR, Met), competitive binders for growth factors (antagonists), blocking proteins for Rb-phosphorylation, blocking proteins for E2F-dependent transcription; stabilizers for p53; antagonistic binders for antiapoptotic proteins (eg. Bcl-2); antagonistic binders for cyclins; antagonistic binders for Ras effectors (eg. GEFs); antagonistic binders for hypoxia induced proteins (eg. HIF1 α); inhibitors of transcription factors that interfere with dimerization, DNA-binding or/and cofactor binding (eg. Myc/Max); Inducers of differentiation; Inhibitors of smad signalling/translocation; inhibitors of cellular adhesion interactions (cadherins, integrins, eg. α 5 β 1, α v β 3); inhibitors of enzymes that degrade the extracellular matrix (eg. MMPs); antagonistic binders for proangiogenic ligands (eg. soluble VEGF-R); antagonistic binders to proangiogenic receptors; inhibitors of scaffold complex formation (eg. KSR/Ras); inhibitors of translation initiation (eg. eIF4E, EIF2a); and inhibitors of mitotic kinases (eg. Plk-1).
18. The virus of any of the claims 1 to 9, wherein the at least one further transgene codes for a prodrug-converting enzyme that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.
19. The virus of any of the claims 1 to 9, wherein the at least one further transgene codes for a protease that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.
20. The virus of any of the preceding claims, wherein the at least one transgene encoding an avian cytokine is selected from chicken interferons.
21. The virus of claim 20, wherein the at least one transgene encoding an

- 57 -

avian cytokine is selected from chicken type I interferons.

22. The virus of any of the claims 5 to 21, wherein the pathogenicity reduction is a capability of the virus to reduce bird cell lysis about 48h after infection with MOI 0,01 measured by increasing cell viability, whereby the cell viability is increased to at least about 25% up to about 50% surviving cells, more preferably to at least about 50% up to about 75% surviving cells and most preferably to at least about 75% up to 100% surviving cells with respect to the virus from which the recombinant virus is obtainable.
23. The virus of any of the claims 5 to 21, wherein the pathogenicity reduction is a survival time prolongation of virus infected chicken embryos in 11 day old embryonated eggs measured by mean death time (MDT) determination, whereby the MDT is prolonged by at least about 15h up to about 20h, more preferably at least about 20h up to about 30h and most preferably by more than 30h compared to the virus from which the recombinant virus is obtainable.
24. The virus of any of the claims 1 to 23, wherein the oncolytic activity of the virus for human tumor cells is essentially not reduced.
25. The virus of any of the claims 1 to 23, wherein the oncolytic activity of the virus for human tumor cells measured by cell viability after 48h after infection is not reduced by more than 50% compared to the virus from which the recombinant virus is obtainable and more preferably is essentially not reduced with respect to the virus from which the recombinant virus is obtainable.
26. A nucleocapsid of a recombinant oncolytic RNA virus of any one of claims 1-25.
27. A genome of a recombinant oncolytic RNA virus of any one of claims 1-

68

- 58 -

25.

28. A DNA molecule encoding the genome and/or antigenome of a recombinant oncolytic RNA virus of any one of the claims 1-25.

5

29. The DNA molecule of claim 27 operatively linked to a transcriptional control sequence.

10

30. A cell comprising a recombinant oncolytic virus of any one of claims 1-25, a virus genome of claims 27 or/and a DNA molecule of claim 28 or 29.

15

31. A pharmaceutical composition comprising a recombinant oncolytic virus of any one of claims 1-25, a virus genome of claims 27 or/and a DNA molecule of claim 28 or 29 as an active ingredient optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants.

20

32. The pharmaceutical composition of claim 31 further comprising a prodrug which can be converted into a therapeutically active compound by the prodrug-converting enzyme encoded by the at least one further transgene.

25

33. A method for treatment of a proliferative disease, comprising administering in a pharmaceutically effective amount to a subject in need thereof a recombinant oncolytic virus of any one of claims 1-25, a virus genome of claim 27 or/and a DNA molecule of claim 28 or 29.

30

34. The method of claim 33, comprising administering in a pharmaceutically effective amount to a subject in need thereof
(i) a recombinant oncolytic virus of any one of claims 1-25, a virus genome of claims 27 or/and a DNA molecule of claim 28 or 29 comprising at least one transgene encoding for a prodrug-converting enzyme and

69

- 59 -

(ii) a prodrug suitable for treatment of the proliferative disease in combination with the virus, which prodrug can be converted into a pharmaceutically active compound by the prodrug-converting enzyme of (i).

5

35. The method of any of the claims 33 to 34, wherein the subject is a human patient.

10

36. A recombinant oncolytic RNA virus attenuated for poultry comprising a nucleic acid comprising at least one transgene coding for a cytokine.

37. The virus of claim 36 which is attenuated for chicken.

L

20

Fig. 1

- 1 / 5 -

plasmid *pflMTH68 ChIFN-alpha*

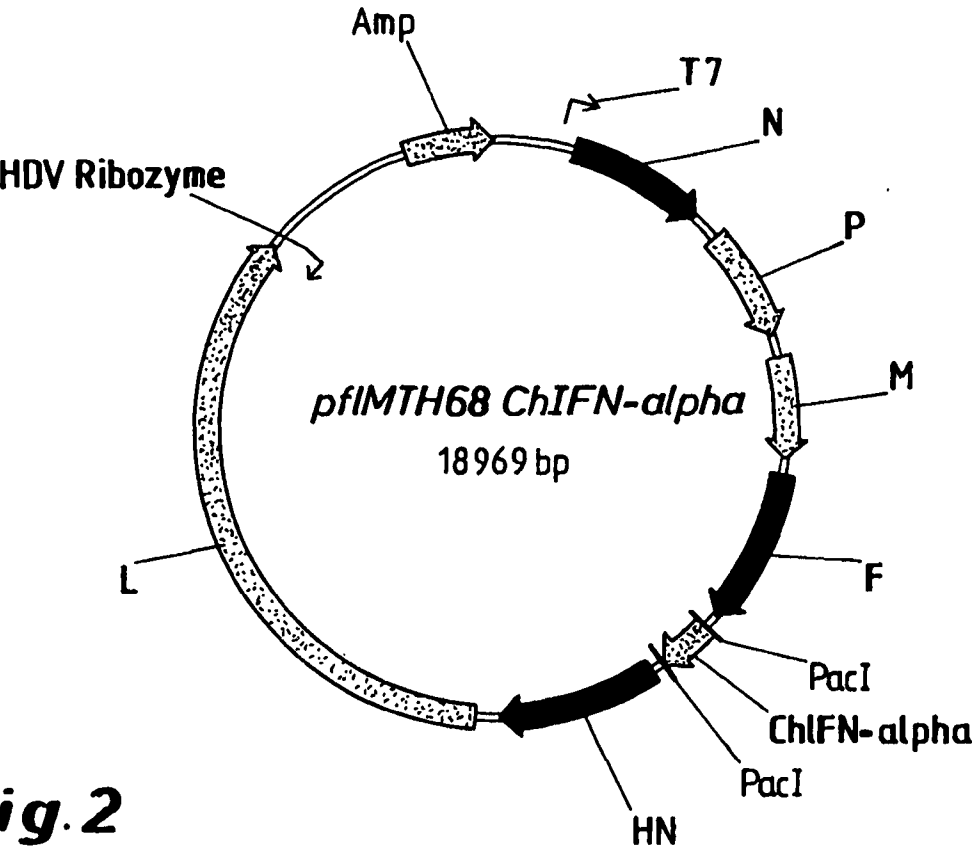
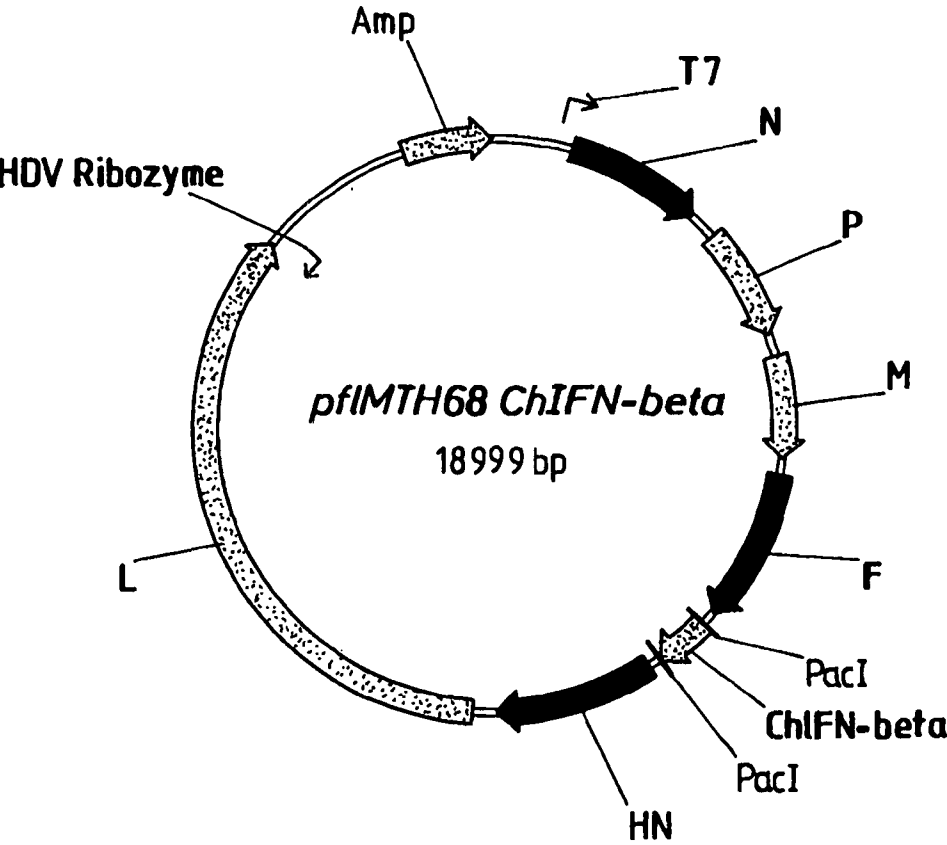


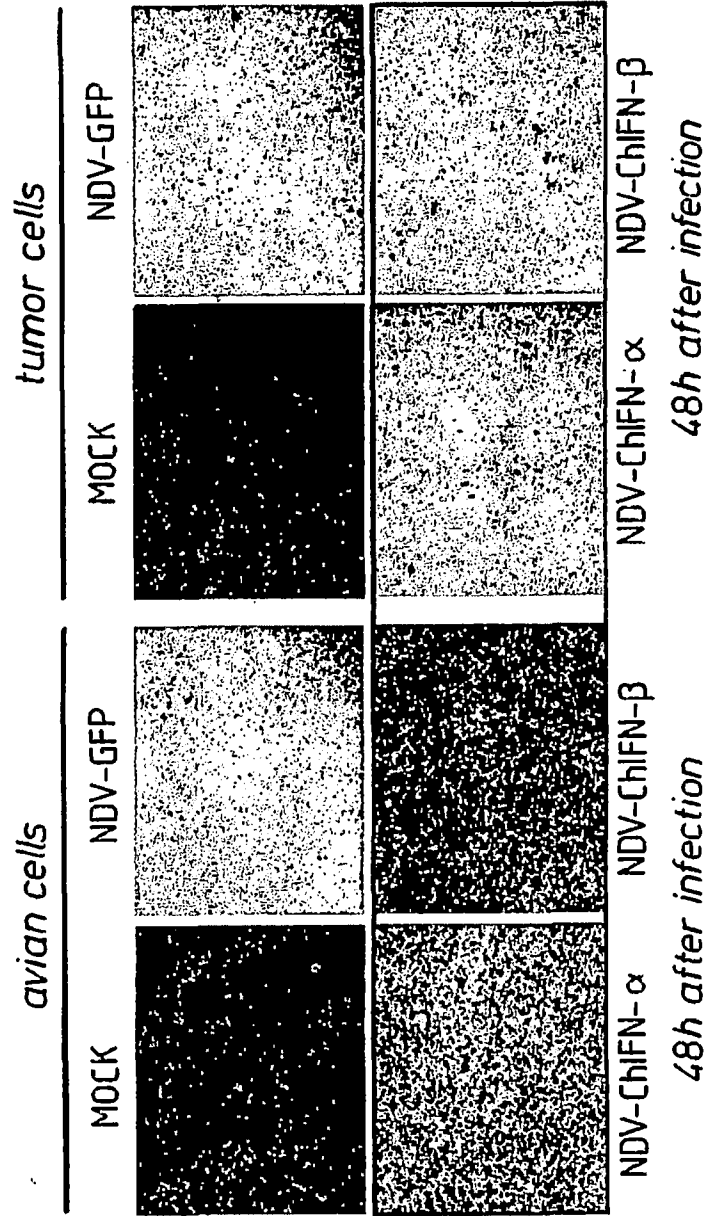
Fig. 2

plasmid *pflMTH68 ChIFN-beta*



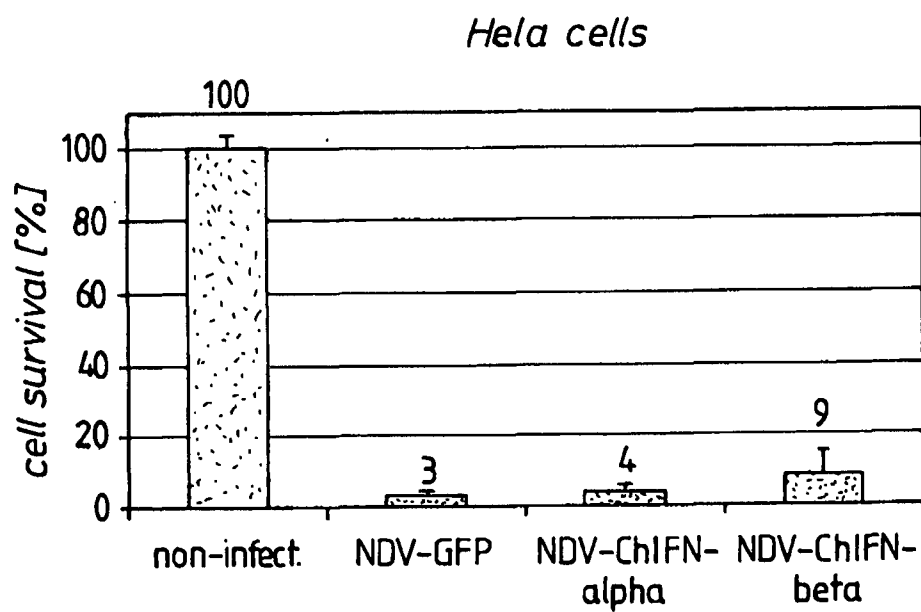
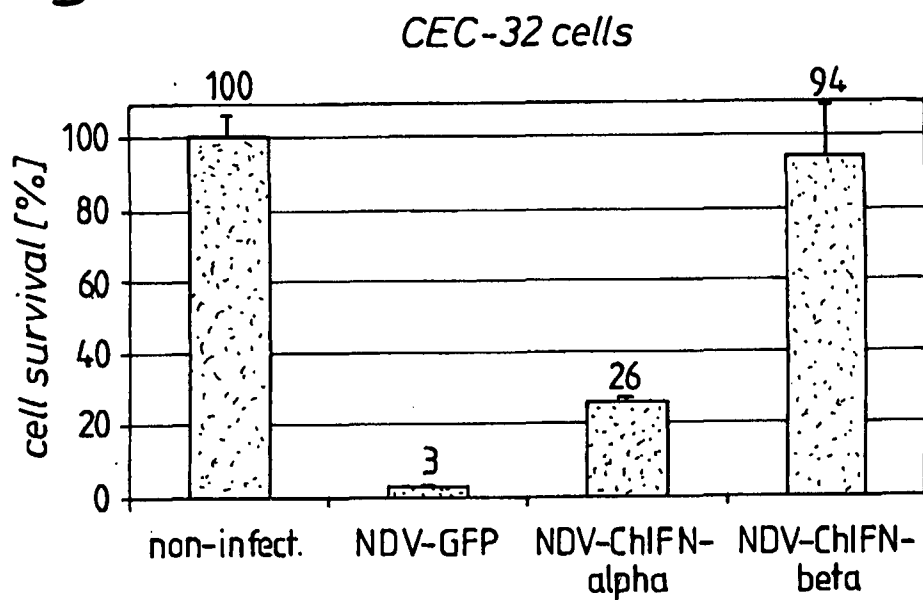
21

Fig. 3a



- 3 / 5 -

22

Fig. 3b

23

Fig.4

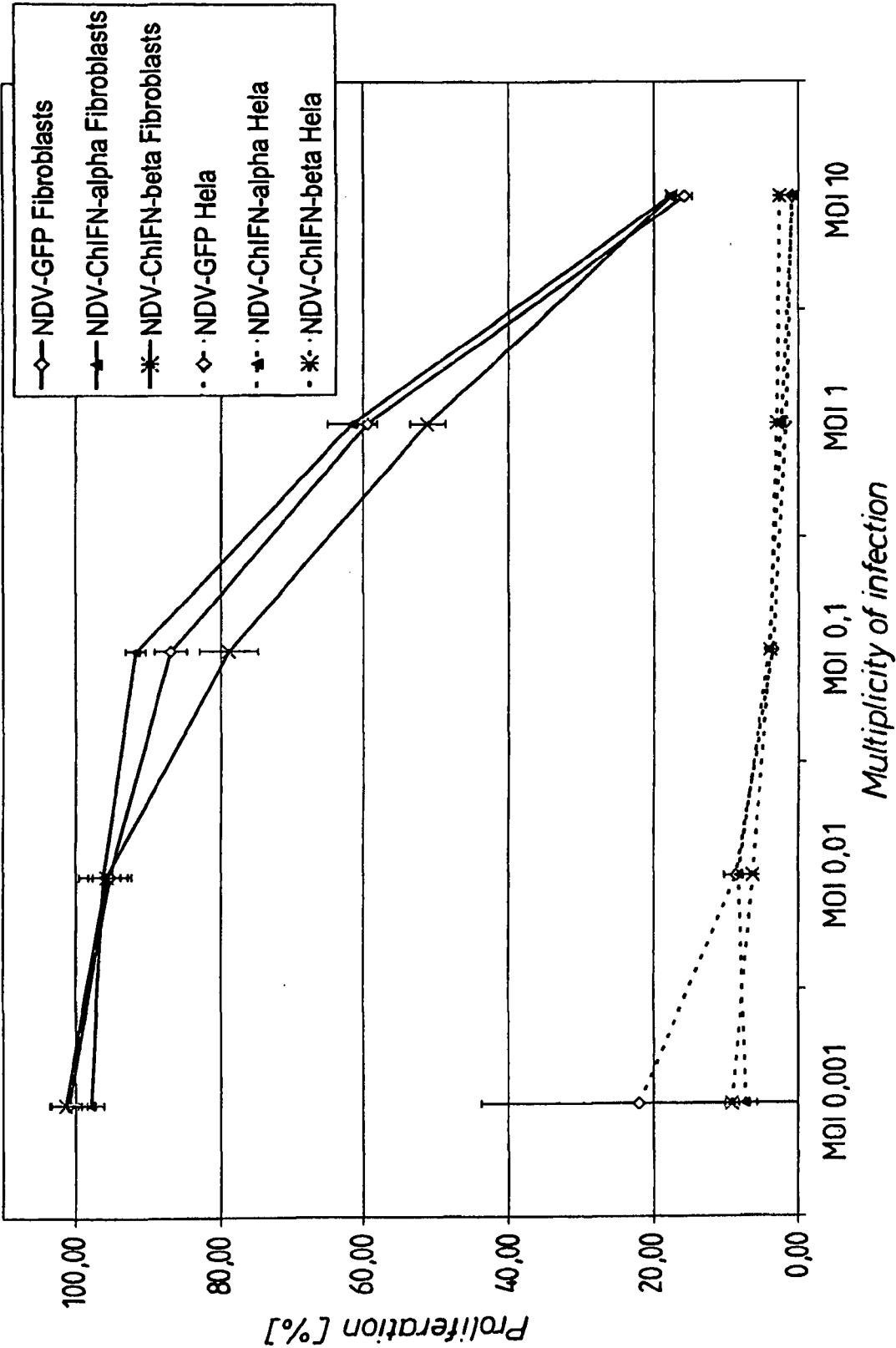


Fig.5a

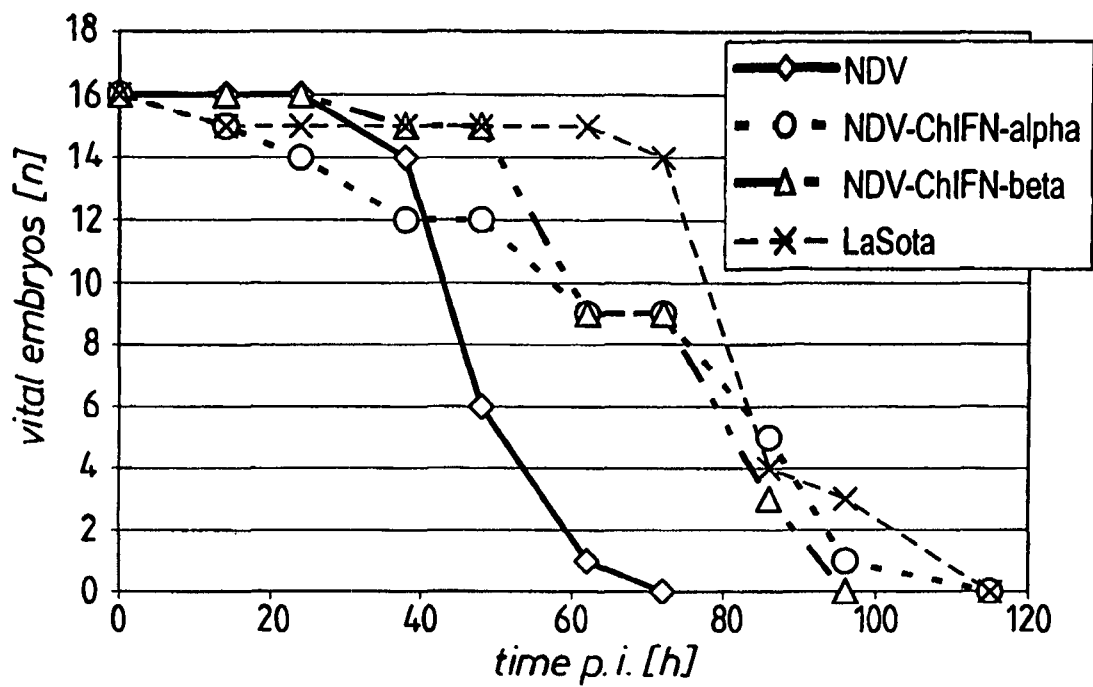
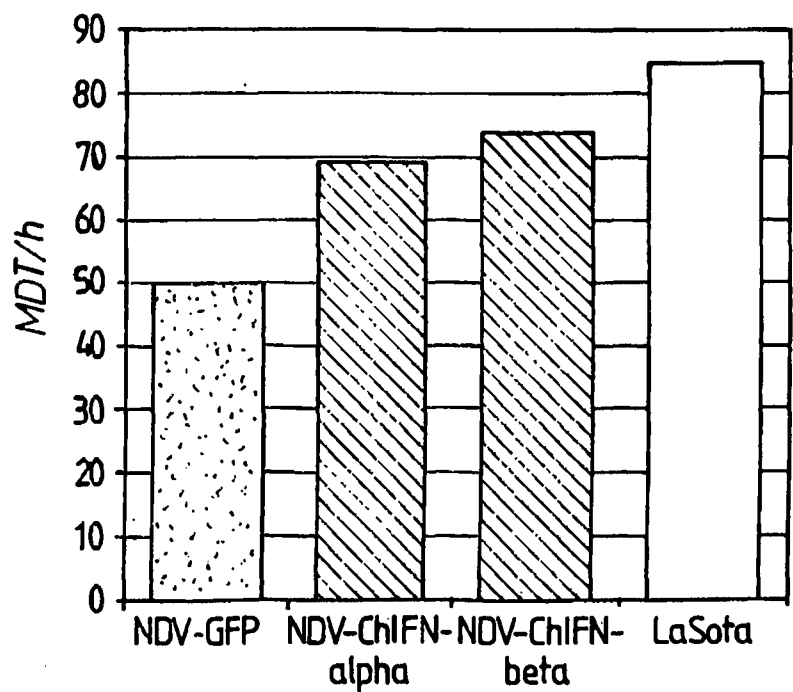


Fig.5b



as-90073-Sequenzprotokoll-en
SEQUENCE LISTING

25

<110> Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft

<120> Attenuated oncolytic paramyxoviruses encoding avian cytokines

<130> 53671AWO

<140> PCT/EP2009/000308

<141> 2009-01-20

<150> EP 08001643.9

<151> 2008-01-29

<150> US 61/024,333

<151> 2008-01-29

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 52

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 1

aggccttaat taaccgacaa ctttaagaaaa aatacgggta gaacggcctg ag

52

<210> 2

<211> 52

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 2

aggccgttct acccgatttt tttcttaagt tgtcgggttaa ttaaggcctc tc

52

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 3

ccttaattaa gccaccatgg ctgtgcctgc aagccc

36

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 4

ccttaattaa ctaagtgcgc gtgttgccctg tg

32

<210> 5

<211> 42

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 5

ccttaattaa cgcaccatga ctgcaaacca tcagtctcca gg

42

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> Newcastle disease virus

<400> 6

ccttaattaa tcactgggtg ttgagacgtt tggatg

36

PCT
WO 2009/095167 A1

Título:

Paramixovirus oncolíticos atenuados que codifican citoquinas de aves

Resumen:

Figura 4

La invención se refiere a un virus a APN oncolítico recombinante de la enfermedad de Newcastle para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, que comprende al menos un transgen que codifica una citoquina de aves, en donde el virus a APN oncolítico recombinante de la enfermedad de Newcastle se puede obtener a partir de un virus a APN de la enfermedad de Newcastle oncolítico velogénico o mesogénico. La expresión mediada por virus de la citoquina en las células huésped natural conduce a una patogenicidad reducida del virus para especies de aves. **Aún más, el** genoma del virus puede codificar proteínas de unión, enzimas convertidoras de prodrogas o/y proteasas. La expresión selectiva de estas moléculas en célula tumorales infectadas con virus incrementa el efecto antitumoral del virus.

Insertar figuras al final

2
28

**Paramixovirus oncolíticos atenuados que codifican
citoquinas de aves**

Introducción

La presente invención se refiere a un virus a ADN oncolítico recombinante de la enfermedad de Newcastle que comprende al menos un transgen que codifica una citoquina de aves, en donde dicho virus a ADN oncolítico recombinante de la enfermedad de Newcastle se pueda obtener a partir de un virus a ADN de la enfermedad de Newcastle oncolítico velogénico o mesogénico. La expresión mediada por virus de la citoquina en las células huésped natural conduce a una patogenicidad reducida del virus para especies de aves.

El virus en la presente invención es adecuado para el tratamiento de enfermedades, en especial para el tratamiento de tumores oncolíticos. Se producen virus recombinantes que codifican una citoquina de aves, en donde la patogenicidad del virus está reducida para una especie de ave lo que conduce a una menor toxicidad del virus. La actividad oncolítica del virus no es deteriorada por el método descrito de reducción de la patogenicidad. El genoma del virus puede codificar transgenes terapéuticos adicionales, preferentemente proteínas de unión (anticuerpos, moléculas de repetición de anquirina, péptidos, etc.), enzimas convertidoras de prodrogas o/y proteasas. La

actividad de estas proteínas de unión, enzimas convertidoras de prodrogas y/o proteasas incrementa el efecto antitumoral del virus. Además, la invención describe la elaboración y el uso de dichos virus modificados para el tratamiento del cáncer.

Descripción del estado de la técnica

Virus de la enfermedad de Newcastle

Los virus oncolíticos para el tratamiento de tumores se revisan en general en Chicco (2002). El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) se ha usado como un agente terapéutico experimental durante más de 40 años, y fue revisado en Sinkovics y Horvath (2000). El virus de la enfermedad de Newcastle se describe en general en el libro de Alexander (1988). La cepa FV701 del NDV se está desarrollando como un tratamiento contra el cáncer para glioblastoma (Lorence et al., 2003). La cepa MTH62 del NDV se ha usado como tratamiento experimental de cáncer y se lo ha administrado a humanos durante más de 20 años (Csatary et al., 2004).

En el trabajo de Stojdl et al. (2003) se describe que en el rango del 80% de todas las líneas celulares que se evaluaron, hay un defecto en la respuesta de interferón que sigue a la infección con el virus de estomatitis vesicular (VSV). Se puede asumir que un porcentaje similar de líneas



celulares tumorales serán susceptibles a la infección con NDV debido a que tanto el VSV como NDV son miembros del orden Mononegavirales. También se ha demostrado que el mecanismo de replicación selectiva de NDV en las células tumorales se basa en un defecto de la respuesta de interferón celular contra el virus (véase por ejemplo US 20030044384).

Los paramixovirus contienen genomas de ARN de cadena simple de polaridad negativa que tienen entre 15 y 19 kb de longitud (tipo salvaje) y los genomas contienen entre 6 y 10 genes. La envoltura viral está formada por las glicoproteínas de superficie y una parte de membrana que deriva de la célula huésped. Las glicoproteínas de superficie (F y HN o H o G) intervienen en la entrada y salida del virus de la célula huésped. La nucleocápside está dentro de la envoltura y contiene al genoma de ARN y la proteína de la nucleocápside (NP), fosfoproteínas (P) y proteínas grandes (L) responsables de la transcripción y traducción intracelular del virus. La proteína de la matriz (M) une a la envoltura viral con la nucleocápside. Además de estos genes que codifican proteínas estructurales, los Paramyxoviridae pueden contener genes "accesorios" que pueden ser unidades de transcripción adicionales interpuestas entre los genes que se mencionaron anteriormente. Los genes accesorios son

mayormente ORF que se superponen con la unidad de transcripción del gen P. Se puede consultar una descripción amplia de Paramyxoviridae en (Lamb, 2001).

El NDV es el miembro prototípico del género Avulavirus en la familia Paramyxoviridae que pertenece al orden Mononegavirales. El genoma Gviral es un APN de cadena simple de orientación negativa que codifica seis grandes proteínas: la proteína de la nucleocápside (NP), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), proteína de fusión (F), proteína de hemaglutinina (HN) y la proteína polimerasa (L). Por medio de la maduración del APNm de la proteína P, se traducen una o dos proteínas adicionales, (V y W).

Los NDV se caracterizan en detalle en Alexander (1988) y Lamb (2001).

Virus de la enfermedad de Newcastle como un patógeno de aves

Las cepas de NDV se clasifican según su patogenicidad en las gallinas como cepas velogénicas (alta virulencia) que conducen a una infección letal aguda de las gallinas de todas las edades, formas aisladas mesogénicas (virulencia intermedia) que solamente son letales en gallinas jóvenes, cepas lentogénicas (no virulentas) que se manifiestan en una forma moderada o imperceptible de la enfermedad. La

clasificación de las formas aisladas de NDV en velogénicas, mesogénicas o lentogénicas está determinada por el tiempo promedio de muerte (MDT) del embrión de gallina en huevos embrionados de 9 días de edad luego de la inoculación con la dosis letal mínima que mata al embrión. Uno de los determinantes de la virulencia del NDV parece ser el sitio de clivaje del precursor de la proteína F.

El primer brote de NDV se observó en el año 1926 en Newcastle-upon-Tyne, Inglaterra y en Java, Indonesia. Se han descrito tres pancoóticos NDV desde la primera aparición de la enfermedad.

El NDV es transmitido primariamente por aerosoles o grandes gotas que son inhaladas por aves susceptibles. Durante el transcurso de la infección, nuevas partículas virales infecciosas se derramarán del tracto respiratorio infectado o serán excretadas en las heces. Con la ingestión de este material que contiene virus por las aves sanas, se pueden establecer infecciones nuevas y se mantiene una dispersión del virus de un ave a otro.

El NDV como patógeno de aves se describe con detalle en Alexander (1997), *Diseases of Poultry*.

Vacunación contra la enfermedad de Newcastle

El NDV constituye una amenaza para la cría de aves de corral y la necesidad de una vacunación ya se había esta-



blecido a comienzos del siglo pasado. Iyer y Dobson realizaron estudios en la década de 1930 sobre la atenuación de cepas virulentas de NDV, que condujeron al desarrollo de algunas cepas para vacuna de NDV mesogénicas. El desarrollo de vacunas vivas avanzó gracias al establecimiento de las cepas lentogénicas para vacunas Hitchner B1 y LaSota, que ahora son las vacunas NDV más utilizadas. Otras estrategias de vacunación incluyen el uso de vacunas contra NDV inactivadas (por ejemplo por formalina, β -propiolactona), administradas junto con un adyuvante vehículo (hidróxido de aluminio, emulsión oleosa).

La historia y el estado real del desarrollo de vacunas contra NDV se explican con detalle en Alexander (1997) *Diseases of Poultry*.

La siguiente generación de vacunas para uso veterinario basados en NDV recombinantes generados mediante tecnología genética inversa se revisa en Huang et al. (2003) y las vacunas contra NDV recombinantes se describen en las siguientes patentes.

En US 6.699.479 B1 se describe un virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) mutante que expresa su proteína V a un nivel reducido y se usa para la vacunación de embriones antes de la eclosión.

US 2004/0043035 se relaciona con un NDV recombinante



mutante que no puede expresar un epítopo inmunodominante de la nucleoproteína (NP) y es adecuado como una cepa de vacuna marcadora.

En US 2003/0224017 se describe un sistema genético inverso del NDV para la producción de una vacuna contra NDV recombinante. Este sistema permite la expresión de transgenes, por ejemplo de citoquinas de aves (IL-2 de pollo, IL-4 de pollo) del genoma de NDV para generar cepas para vacunas contra NDV.

EP 1 300 157 se relaciona con una cepa mutante atenuada del virus de la enfermedad de Newcastle adecuada para la vacunación *in ovo* de especies de aves que comprenden una mutación en las secuencias genéticas que codifican las glicoproteínas HN y/o F.

US 6.719.979 se relaciona con un proceso para generar un virus infeccioso de la enfermedad de Newcastle (NDV) enteramente a partir de ADN clonado de longitud completa y con el uso de vacunas y ensayos de diagnóstico generados y derivados del proceso.

En WO 2007/025431 se describe un método para producir una cepa La Sota recombinante atenuada de la enfermedad de Newcastle y su uso en la preparación de una vacuna para la prevención de las enfermedades causadas por el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).



WO 2000/067736 trata de ADNc para elaborar virus atenuados, infecciosos de la enfermedad de Newcastle (NDV). Dentro del alcance de la invención hay vacunas que comprenden NDV atenuados, infecciosos.

Paramixovirus recombinantes

EP-A-0702035 se relaciona con mutantes del virus a APN de cadena negativa, no segmentados infecciosos y manipulados genéticamente, que comprenden una inserción y/o supresión en un marco de lectura abierto, una región pseudogénica o una región intergénica del genoma del virus.

WO 99/66045 se relaciona con virus NDV genéticamente modificados que se obtienen de moléculas de ADNc de longitud completa del genoma del virus.

WO 00/62735 se relaciona con un método para tratar tumores que comprende administrar un virus clonal de replicación competente, sensible a interferón, por ejemplo NDV.

En WO 01/20989 (PCT/US00/26116) se describe un método para tratar pacientes que tienen tumores con paramixovirus oncolíticos recombinantes. El tumor se reduce ante la administración de un virus Paramyxoviridae de replicación competente. Se describen diferentes métodos que se pueden usar para tratar el genoma del virus mediante ingeniería genética con el objeto de mejorar las propiedades oncolíticas.

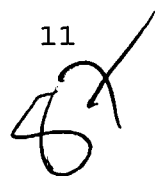


WO 03/005964 se relaciona con un VSV recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica una citoquina.

EE.UU. 2004/0170607 se relaciona con el tratamiento de melanomas mediante la administración de un virus que no es un patógeno humano común.

Manipulación genética de NDV

El NDV se puede manipular genéticamente usando la tecnología de genética inversa como se describe por ejemplo en EP-A-0702 035. Por ejemplo, se sabe que en la misma se hacen construcciones de NDV recombinantes que comprenden ácidos nucleicos adicionales que codifican una fosfatasa alcalina secretada (Shao y Peeters, 2003), proteína fluorescente verde (Engel-Herbert et al., 2003), proteína VP2 del virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (Huang et al., 2004), hemaglutinina de virus de influenza (Nakaya et al., 2001) y cloranfenicol acetil transferasa (Huang et al., 2001) (Krishnamurthy et al., 2000). Ninguno de estos NDV recombinantes se ha construido para usar en el tratamiento de enfermedades humanas. Los NDV recombinantes se hicieron para estudiar la virología básica del NDV o bien para desarrollar cepas de vacunas para aves de corral. Como cepas de virus parenterales, se utilizaron las cepas lentogénicas de NDV. Estas cepas no presentan propiedades oncolíticas significativas.



Manipulación genética de los virus

Los métodos para manipular genéticamente a los virus a APN son bien conocidos como se mencionó anteriormente. Además, la manipulación genética de virus oncolíticos se revisa por ejemplo en Bell et al. (2002). Los virus a APN como agentes viroterapéuticos se resumen en Russell (2002). El contenido de cualquiera de estos documentos se incorpora a la presente a modo de referencia.

Citoquinas de aves

Las citoquinas de aves se revisan en Staeheli et al. (2001). Se describió un análisis genómico de citoquinas y quimioquinas de pollo en Kaiser et al. (2005).

SÍNTESIS DE LA INVENCION

Las cepas oncolíticas del NDV se han estudiado desde principios de la década de 1960 como compuestos terapéuticos de tumores. La mayoría de las cepas de los virus usados en las terapias de tumores oncolíticos pertenece a la clase de virus mesogénicos, que se describen como patógenos para las aves de corral. Para desarrollar un NDV oncolítico como una droga biológica antitumoral, se debería reducir el potencial de toxicidad ambiental existente, en especial la patogenicidad para aves de corral. Sin embargo los NDV atenuados para aves de corral deben tener la capacidad continua de lisar células tumorales y de conservar su

potencial oncolítico. Las estrategias existentes para el desarrollo de vacunas no se pueden aplicar, porque están centradas en el estímulo del sistema inmune de las aves ya sea por aplicación de partículas virales completamente inactivadas o cepas de virus apatogénicas lentogénicas. Ambos tipos de vacuna ya no se pueden replicar en las células cancerosas y posteriormente han perdido el potencial para lisar células tumorales.

En la presente invención, la atenuación del NDV para las aves de corral sin disminuir la actividad oncolítica del virus se puede lograr con la ayuda de la tecnología genética inversa. Los NDV recombinantes atenuados se crean por inserción de transgenes que codifican citoquinas, en particular citoquinas antivirales o inmunoestimulantes.

Aún más la vacuna contra el NDV no es adecuada para dicho enfoque porque el objetivo de una vacuna es inducir una fuerte respuesta inmune con una inmunidad duradera para proteger al animal contra una infección secundaria. En la presente invención, la atenuación descrita del NDV tiene por objeto permitir que un animal controle la infección primaria (indeseada) y por ende disminuir la toxicidad ambiental e incrementar la seguridad del virus cuando se aplica en una terapia de una enfermedad proliferativa.

El objeto de la presente invención es la lisis de

células tumorales por un virus oncolítico. Una indicación para un enfoque con virus oncolítico tal es la terapia de cáncer en humanos. Por el contrario, una vacuna del NDV para aves de corral divulgada en US 2002/0224017 se aplica a animales y por ello pertenece al campo del cuidado de la salud en animales.

Por consiguiente, un objeto de la presente invención es un virus a ADN oncolítico recombinante de la enfermedad de Newcastle que comprende al menos un transgen que codifica una citocina de aves, en donde dicho virus a ADN oncolítico recombinante de la enfermedad de Newcastle se puede obtener a partir de un virus a ADN de la enfermedad de Newcastle oncolítico velogénico o mesogénico.

El virus de la presente invención puede comprender al menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresado en una célula tumoral infectada con virus.

Dicho al menos un transgen adicional es parcialmente alogénico o singénico para el huésped.

En otro aspecto de la presente invención, el virus de la presente invención puede ser un virus atenuado.

El término "atenuación" o "atenuado" incluye la reducción de la patogenicidad del virus de una especie de ave y reducción de patogenicidad en un sistema de ensayo biológico.

90

gico que es predictivo para dicha especie de ave (véase el Ejemplo 5).

Un aspecto adicional de la presente invención es un virus a ARI atenuado oncolítico recombinante para aves de corral que comprende un ácido nucleico que comprende al menos un transgen que codifica una citoquina. En particular, el virus es atenuado para pollos. El "transgen que codifica una citoquina" es en particular "un transgen que codifica una citoquina de aves" que se describe en la presente.

Además, la invención se relaciona con la nucleocápside del virus recombinante de la presente invención que comprende un ARI viral que forma un complejo con las proteínas de la cápside. Además, la invención se relaciona con un ARI que es el ARI del virus de la presente invención. La invención también se relaciona con un ARI complementario del ARI del virus de la presente invención.

Aún más, la invención se relaciona con un ADN, por ejemplo un ADNo, que codifica al ARI de la presente invención y/o un ADN complementario del ARI de la presente invención. Aún más, la invención se relaciona con la prevención o el tratamiento de enfermedades tumorales, cáncer o/y enfermedades proliferativas.

El ARI o/y el ADN de la presente invención se puede

al

proveer en una forma aislada.

En la presente invención, la citoquina codificada por el transgen que se describe en la presente puede ser secretada de una célula de ave infectada por el virus de la presente invención y, después de unirse a su receptor de interferón apropiado sobre la célula vecina, puede inducir un estado antiviral en la célula portadora del receptor. Por ello se puede inhibir, al menos parcialmente, la replicación del virus de la presente invención en la célula de ave estimulada con interferón. La similitud entre los interferones de tipo I de pollo y los interferones de tipo I de mamífero es muy baja (<25% de identidad a nivel de aminoácidos) (Staeheli et al. 2001). Por esta razón una citoquina que exhiba dicho efecto antiviral en una célula de ave no muestra una actividad esencialmente biológica en una célula humana y prácticamente no tendrá influencia sobre la replicación del virus en células tumorales humanas. Aún más, no se espera esencialmente que existan efectos adversos debidos a estas citoquinas en el organismo humano.

La expresión del transgen que codifica una citoquina descrita en la presente conduce a una patogenicidad reducida del virus para una especie de ave, en especial en aves de corral, en especial en pollos, y de esta manera a una

menor toxicidad ambiental. La actividad del transgen que codifica una citoquina descrita en la presente prácticamente no tiene efectos perjudiciales sobre el efecto terapéutico del virus.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas:

Virus

La invención se relaciona en general con virus a ARN, preferentemente virus a ARN de cadena negativa, más preferentemente virus de un tipo tal que tienen propiedades oncolíticas y que se pueden tratar mediante ingeniería genética. Dichos virus son:

- paramixovirus, preferentemente Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV), virus de la rubéola, virus de paperas, virus Sendai;
- ortomixovirus, preferentemente el virus de la influenza;
- rhabdovirus, preferentemente el virus de estomatitis vesicular.

Se prefiere que el virus de la presente invención sea un patógeno de aves, en particular un patógeno de aves de corral, más particularmente un patógeno de pollos.

También se prefiere que el virus de la presente invención sea un virus a ARN de cadena negativa. El virus a ARN recombinante de la presente invención puede ser un

q3

paramixovirus, preferentemente un virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). El NDV puede ser una cepa mesogénica o velogénica. Se prefiere que el NDV sea un NDV mesogénico.

El virus de la presente invención se puede obtener a partir de un virus a APII de la enfermedad de Newcastle oncolítico velogénico o mesogénico, en particular de la cepa MTH68.

El virus de la presente invención es preferentemente de replicación competente.

El virus de la presente invención pueden presentar una patogenicidad reducida para una especie de ave, en particular con respecto al virus del cual se puede obtener el virus recombinante.

Se prefiere que en el virus de la presente invención, la reducción de la patogenicidad sea la capacidad del virus para reducir la lisis de células de ave 48 hs aproximadamente después de la infección con un valor de MOI de 0,01 medido incrementando la viabilidad celular, con lo cual la viabilidad celular es incrementada en al menos un 25% aproximadamente (tal como al menos entre aproximadamente 25% hasta aproximadamente 50%) de células sobrevivientes, más preferentemente hasta al menos aproximadamente 50% (tal como al menos entre aproximadamente 50 % hasta aproximadamente 75%) de células sobrevivientes y con

qd

mayor preferencia hasta al menos un 75% aproximadamente (tal como al menos entre 75% hasta 100% aproximadamente) de células sobrevivientes con respecto al virus a partir del cual se puede obtener el virus recombinante.

También se prefiere que en el virus de la presente invención, la reducción de la patogenicidad sea una prolongación del tiempo de sobrevida de los embriones de pollo infectados con virus en huevos embrionados de 11 días de vida medido por determinación del tiempo promedio de muerte (MDT), con lo cual el MDT es prolongado en al menos 15 hs aproximadamente (tal como, al menos entre 15 hs hasta 20 hs aproximadamente), más preferentemente de al menos 20 hs aproximadamente (tal como al menos entre 20 hs hasta 30 hs aproximadamente y más preferentemente en más de 30 hs en comparación con el virus a partir del cual se puede obtener el virus recombinante.

En aún otra realización, la actividad oncolítica del virus de la presente invención para las células tumorales humanas prácticamente no se reduce.

Se prefiere que en el virus de la presente invención, la actividad oncolítica del virus para las células tumorales humanas medida con la viabilidad celular después de 48 hs de la infección no se reduzca en más de un 50% en comparación con el virus a partir del cual se puede obtener

as

el virus recombinante y más preferentemente no se reduce esencialmente con respecto al virus a partir del cual se puede obtener el virus recombinante.

Citoquinas

La citoquina codificada por dicho al menos un transgen indicado en la presente puede ser cualquier citoquina. En particular, la citoquina puede ser una citoquina capaz de inhibir al menos parcialmente la replicación del virus en una célula de ave, en particular en células de aves de corral, más particularmente en células de pollo. Se prefiere que la replicación del virus sea inhibida de manera esencialmente completa.

La citoquina puede ser una citoquina que no tiene prácticamente actividad biológica en un mamífero, en particular en un ser humano. En este contexto, la "actividad biológica" se refiere en particular a la capacidad de una citoquina para inhibir al menos parcialmente la replicación del virus, en particular la replicación de un virus de la presente invención. La "actividad biológica" también se refiere a cualquier otra actividad que pueda exhibir una citoquina en una célula que no es de mamífero o/y en un animal que no es un mamífero.

La citoquina puede ser una citoquina capaz de inhibir al menos parcialmente la replicación del virus en un ave,

gb

en particular en aves de corral, más particularmente en pollo, y prácticamente no tiene actividad biológica en un mamífero, en particular en un ser humano.

La citoquina se puede seleccionar entre citoquinas de aves, en particular de citoquinas de aves de corral, más particularmente de citoquinas de pollo.

La citoquina se puede seleccionar entre interferones, en particular entre interferones de ave, más particularmente entre interferones de pollo, más particularmente entre interferones de tipo I de pollo.

El interferón puede ser beta-interferón o un miembro de la familia de alfa-interferones.

En una realización preferida, el virus a APN oncolítico recombinante es un NDV que comprende un ácido nucleico que comprende un transgen que codifica un alfa-interferón de pollo o/y un beta-interferón de pollo.

Transgenes

El transgen se define en el contexto del genoma NDV como ácidos nucleicos adicionales que se introducen en el genoma viral. Los ácidos nucleicos se pueden seleccionar entre diferentes fuentes genómicas (por ejemplo el genoma de NDV, de una clase de virus diferente, de fuentes procariontas o eucariotas, de especies de mamífero o que no son de mamífero). También se pueden fusionar transgenes de dos

o más fuentes genómicas diferentes. Se pueden construir asimismo transgenes sintéticos basados en la síntesis de novo de secuencias de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos se pueden ubicar dentro de al menos un casete de transcripción. Preferentemente el transgen es traducido en una proteína en la célula infectada. Por esta razón, la secuencia transgénica debería incluir un codón de inicio y de terminación de la traducción.

El virus oncolítico recombinante de la presente invención puede comprender un ácido nucleico que codifica al menos un transgen adicional seleccionado de manera independiente entre transgenes que codifica proteínas de unión, enzimas convertidoras de prodrogas y proteasas.

Dicho al menos un transgen adicional codifica preferentemente una proteína de unión que tiene actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus.

En otra realización preferida, dicho al menos un transgen adicional codifica una enzima convertidora de prodrogas que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus.

En aún otra realización preferida, dicho al menos un transgen adicional codifica una proteasa que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral

ab

infectada con virus.

Si no se indica de otra manera, un "transgen" o "al menos un transgen" según se utiliza en la presente se refiere a un transgen que codifica una citoquina de aves, o dicho al menos un transgen adicional presenta actividad terapéutica cuando es expresada por una célula tumoral infectada con virus, o una combinación de los mismos. Esta definición de "transgen" se aplica en particular en la posición y el número de transgenes dentro del genoma del virus, según se describe en la presente, si no se indica de otra manera.

El virus a AFII, el genoma, antígenoma, nucleocápside y/o molécula de ADN de la presente invención pueden comprender al transgen que se describe en la presente que se puede ubicar dentro de un casete de transcripción como se describe en la presente.

El virus oncolítico recombinante de la presente invención puede comprender al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco ácidos nucleicos, cada uno de los cuales comprende un transgen que se describe en la presente. El virus oncolítico recombinante de la presente invención puede comprender como máximo cinco ácidos nucleicos, cada uno de los cuales comprende un transgen descrito en la presente. En particular, el virus oncolítico recom-

49

binante de la presente invención comprende uno, dos, tres, cuatro o cinco ácidos nucleicos, cada uno de los cuales comprende un transgen descrito en la presente. Si el virus recombinante de la presente invención comprende al menos dos transgenes, los mismos pueden ser idénticos o diferentes.

El ácido nucleico que comprende dicho al menos un transgen se puede ubicar en cualquier posición entre los marcos de lectura de los genes virales. En particular, el ácido nucleico que comprende dicho al menos un transgen se puede ubicar 5' con respecto al gen H, entre el gen N y el gen F, entre el gen F y el gen M, entre el gen M y el gen F, entre el gen F y el gen HN, entre el gen HN y el gen L o/y 3' con respecto al gen L. Se prefiere que el ácido nucleico se ubique en una posición más 5', tal como 5' con respecto al gen H, entre el gen N y el gen F o/y entre el gen F y el gen M, ya que dicha ubicación conduce a una expresión mejorada en comparación con una ubicación más 3'.

Preferentemente, el virus de la presente invención exhibe una infección selectiva del tumor que conduce a una expresión selectiva del tumor por el transgen que se describe en la presente.

El virus a AFI recombinante de la presente invención puede comprender en total hasta cinco transgenes, hasta

100

cuatro transgenes o hasta tres transgenes.

En la presente invención, el transgen que codifica una citoquina de aves o dicho al menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresado por una célula tumoral infectada con virus, o una combinación de los mismos, es preferentemente heterólogo con respecto al virus a APII oncolítico sobre el cual se basa el virus a APII recombinante de la presente invención. El término "heterólogo", tal como se utiliza en la presente, se refiere al gen completo o a una parte del mismo, que puede ser la región codificante del gen o una parte de la misma.

El ácido nucleico heterólogo puede ser un ácido nucleico artificial o se puede obtener de fuentes naturales o por recombinación de al menos dos ácidos nucleicos seleccionados entre ácidos nucleicos obtenidos de fuentes naturales y/o de ácidos nucleicos artificiales. Las "fuentes naturales" incluyen a animales tales como mamíferos, plantas, hongos y microorganismos tales como bacterias, protozoarios y virus, que pueden ser diferentes de los virus oncolíticos a APII de la presente invención.

El transgen también puede codificar una proteína de fusión.

En otra realización de la presente invención, el transgen que codifica una citoquina de aves y dicho al

101

menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por una célula tumoral infectada con virus puede estar ubicado sobre al menos dos unidades de transcripción separadas.

También se puede transcribir al menos una unidad de transcripción que comprende al ácido nucleico que comprende dicho al menos un transgen que codifica una citoquina de aves en una célula tumoral como se describe en la presente.

Asimismo, se puede transcribir al menos una unidad de transcripción que comprende al ácido nucleico que comprende dicho al menos un segundo transgen que presenta actividad terapéutica cuando es expresado por un tumor infectado por virus en una célula de ave según se describe en la presente.

Se pueden transcribir al menos dos unidades de transcripción separadas, cada una de las cuales se puede transcribir en una célula tumoral como se describe en la presente y en una célula de ave según se describe en la presente.

En una realización preferida alternativa, dicho al menos un transgen que codifica una citoquina de aves y dicho al menos un transgen adicional que tiene actividad terapéutica cuando es expresada por una célula tumoral infectada con virus se traducen en una célula tumoral como

102

se describe en la presente y en una célula de ave según se describe en la presente.

Proteínas de unión

En el virus a ADN oncolítico recombinante de la presente invención, dicho al menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por una célula tumoral infectada con virus puede codificar una proteína de unión.

Por ello, un objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma del virus de la presente invención, un antígenoma del virus de la presente invención y/o una molécula de ADN de la presente invención como un ingrediente activo opcionalmente junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para uso farmacéutico, donde dicho virus, genoma, antígenoma y/o molécula de ADN del virus comprende al menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por una célula tumoral infectada con virus que codifica una proteína de unión.

Las proteínas de unión son proteínas que, cuando se expresan en una célula blanco, son capaces de unirse a un componente de dicha célula y/o de una célula vecina. Preferentemente, las proteínas de unión son proteínas que

103

se unen a componentes intracelulares.

En una realización preferida, la proteína de unión se selecciona del siguiente grupo que consiste de un ligando natural, un ligando modificado genéticamente, un dominio recombinante soluble de un receptor natural y una versión modificada del mismo, un ligando peptídico, un ligando polipeptídico, una molécula de anticuerpo y fragmentos y derivados de la misma, y una molécula tipo anticuerpo como una proteína de repetición de anquirina y fragmentos y derivados de la misma.

Una revisión incompleta de marcos de trabajo de unión de gran afinidad se puede consultar en Ladner y Ley (2001).

Las proteínas de unión que se describieron en la presente pueden ser de origen humano, murino o estrechamente relacionados, o sea una proteína que puede ser una proteína de fusión que comprende secuencias de especies diferentes, por ejemplo humano y ratón.

Las moléculas de unión recombinantes que se basan en la descripción anterior pueden ser monoméricas, diméricas, triméricas, tetraméricas o multiméricas. Las moléculas de unión recombinantes basadas en la descripción anterior pueden ser monoespecíficas, biespecíficas o multiespecíficas.

Las proteínas de unión preferidas se seleccionan entre

109

proteínas de unión que tienen una actividad terapéutica.

Un ligando natural, como se describe en la presente, puede ser un factor de crecimiento o un péptido. Un ligando modificado genéticamente puede ser un análogo de un factor de crecimiento o un péptido de origen natural.

Los dominios solubles recombinantes de un receptor natural o versiones modificadas del mismo que se describen en la presente, son dominios solubles extracelulares de un receptor de la superficie celular y/o fragmentos del mismo que se expresan en forma recombinante, un dominio soluble extracelular de una molécula de adhesión celular y/o fragmentos del mismo que se expresan en forma recombinante.

Las moléculas de anticuerpo mencionadas anteriormente pueden ser anticuerpos monoclonales de inmunoglobulina de cualquier especificidad e isotipo conocido, fragmentos de los mismos y/o fragmentos de los mismos fusionados con proteínas efectoras. Las moléculas de anticuerpo pueden ser quiméricas, humanizadas o anticuerpos humanos. Los fragmentos de anticuerpo contienen al menos un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos se han descrito ampliamente en la literatura (revisados, por ejemplo, en Allen (2002), incorporada en la presente a modo de referencia). Los ejemplos preferidos son los fragmentos de Fv de cadena simple, los fragmentos de Fab,

105

F(ab2'), las versiones con dominios suprimidos denominados minicuerpos, y otras porciones immunoactivas, fragmentos, segmentos y otras estructuras de anticuerpo más pequeñas o más grandes en donde las mismas poseen propiedades de direccionamiento o actividad inmunológica estimulante o inhibidora suficiente como para que sean de utilidad terapéutica en los métodos de la presente invención.

Dichos anticuerpos pueden derivar de experimentos de clonación de hibridomas mediante el uso de ratones transgénicos o de selecciones de expresión en fagos, selecciones de expresión en ribosomas o examen de filtros con colonias de bibliotecas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos humanos o metodologías relacionadas.

Las proteínas de unión con propiedades similares a anticuerpos, que se describen en la presente, pueden ser proteínas o dominios de las mismas modificados genéticamente, en donde uno o más bucles peptídicos se randomizan al nivel de sus aminoácidos de manera tal que se pueden enriquecer en moléculas de unión de gran afinidad con especificidad alta contra cualquier antígeno a partir de bibliotecas de dichas moléculas mediante expresión en fagos, expresión en ribosomas, examen con filtros de colonias o metodologías relacionadas. Las proteínas seleccionadas habitualmente tienen una gran estabilidad térmica y

termodinámica y se expresan bien en sistemas de expresión recombinantes tales como sistemas de expresión en *E. coli*, levadura, insectos y mamíferos. Los ejemplos de dichas proteínas de unión con propiedades similares a anticuerpo comprenden las proteínas de repeticiones de anquirina como las que se describen en Binn et al. (2004), las lipocalinas como las que se describen en Skerra (2000), las gamacristalinas como las que se describen en DE199 32 688.6, el andamiaje de la proteína A modificada (*affibodies*) como el que se describe en Hogben et al. (2003), o Nord et al. (2000), o el andamiaje proteico de fibronectina y otros. Las moléculas similares a anticuerpos pueden ser moléculas monoméricas o repetitivas ya sean construidas como moléculas de cadena simple o como moléculas de cadena múltiple, en donde la molécula similar al anticuerpo posee propiedades de direccionamiento o de actividad inmunológica estimulante o inhibidora suficiente, de modo que sean de utilidad terapéutica en los métodos de la presente invención.

Otro objeto de la presente invención es un método de tratamiento de una enfermedad proliferativa, en particular una enfermedad hiperproliferativa, tal como un tumor o cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz para uso farmacéutico a un sujeto que lo necesita de un virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma

del virus de la presente invención, un antígenoma del virus de la presente invención y/o una molécula de ADN de la presente invención que comprende al menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresado por una célula tumoral infectada con virus que codifica una proteína de unión descrita en la presente.

Moléculas de unión con funciones adicionales

La proteína de unión puede ser una proteína de fusión que comprende al menos un dominio de unión, por ejemplo de un anticuerpo, y al menos un dominio heterólogo. El término "heterólogo" tiene el significado que se expuso precedentemente en el contexto de genes heterólogos.

Las proteínas de unión que se describieron previamente permiten administrar una carga útil en un sitio específico de la enfermedad (por ejemplo un tumor) como si fuera un intracuerpo o como una proteína de unión disponible extracelularmente. La carga útil administrada puede ser un dominio heterólogo, por ejemplo una toxina tal como la ARNasa humana (De Lorenzo et al., 2004) (Sewe et al., 1997) endotoxina de *Pseudomonas* (Chaudhary et al., 1989) (Freitman y Pastan, 1995) (Eatra et al., 1992), toxina de la difteria (Freitman et al., 1993) (Chaudhary et al., 1990) (Eatra et al., 1991), o una enzima tal como beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa (Poffler et al., 1991)

(Wang et al., 1992) (Bosslet et al., 1992), beta-glucosidasa (Rowlinson-Eusza, 1992), carboxipeptidasa, (Antoniw et al., 1990), (Bagshawe et al., 1988), beta-lactamasa con eficacia terapéutica, o una proteína estimulante del sistema inmune con actividad de citoquinas tal como IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN-beta o GM-CSF (véase, por ejemplo, el resumen de Allen (2002)).

En otro ejemplo las proteínas de unión que se describieron previamente tienen ellas mismas una eficacia antagonista o agonista que es de utilidad terapéutica. Los ejemplos de moléculas de unión antagonistas/bloqueantes incluyen al anticuerpo inhibidor de VEGF Avastina (Ferrara et al., 2004), el anticuerpo bloqueante del receptor HER2/neu Herceptina (Moonberg y Benz, 2000) o el anticuerpo bloqueante de receptor de EGF Erbitux (Herbst y Langer, 2002). Las proteínas de unión agonistas pueden ser proteínas de unión que inducen, por ejemplo, apoptosis (Georgakis et al., 2005) o que tienen actividad reguladora sobre el ADN, ARN o proteínas (por ejemplo inducen la transcripción, estabilizan proteínas). En una revisión (Adams y Weiner, 2005) se describen diferentes anticuerpos terapéuticos que también se pueden incorporar en un virus oncolítico

Enzimas convertidoras de prodrogas

109

En el virus a ADN oncolítico recombinante de la presente invención, dicho al menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por una célula tumoral infectada con virus puede codificar una enzima convertidora de prodrogas.

Una prodroga es un derivado o un precursor de un compuesto terapéuticamente activo, que se puede convertir enzimáticamente en el compuesto activo. Las enzimas convertidoras de prodrogas son enzimas capaces de convertir una prodroga en la droga terapéuticamente activa.

Por ello, un objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma del virus de la presente invención, un antígenoma del virus de la presente invención y/o una molécula de ADN de la presente invención como un ingrediente activo opcionalmente junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para uso farmacéutico, donde dicho virus, genoma, antígenoma y/o molécula de ADN del virus comprende al menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por una célula tumoral infectada con virus que codifica una enzima convertidora de prodrogas.

La composición farmacéutica puede comprender además una prodroga que se puede convertir en un compuesto

110

terapéuticamente activo por medio de la enzima convertidora de prodrogas codificada por el virus, el genoma, el antígeno y/o una molécula de ADN del virus. La composición farmacéutica puede ser apropiada para tratar y/o mejorar un trastorno proliferativo.

La prodroga puede formularse en una composición única con el virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma viral de la presente invención, un antígeno viral de la presente invención y/o una molécula de ADN de la presente invención como ingrediente activo, o se puede formular en una composición distinta a la formulación del virus oncolítico.

Si el virus a ADN oncolítico recombinante de la presente invención codifica una enzima convertidora de prodrogas, el virus oncolítico de la presente invención causa una expresión selectiva de la enzima convertidora de prodrogas en una célula blanco infectada con virus (en particular una célula tumoral) que habitualmente no expresa, o no lo hace en forma suficiente, la enzima convertidora de prodrogas. Por consiguiente, durante el tratamiento de un sujeto que lo necesita, la prodroga se convierte específicamente en el compuesto farmacéutico activo en una célula blanco, en particular en una célula tumoral, pero puede esencialmente no convertirse en el compuesto terapéuticamente activo en

///

una célula no blanco, en particular en una célula sana del sujeto a tratar. De esta forma, los efectos colaterales no deseados del compuesto terapéuticamente activo se reducen en comparación con el tratamiento con el compuesto terapéuticamente activo solo.

En el contexto de la presente invención, la prodroga puede ser un derivado o un precursor de un compuesto terapéuticamente activo adecuado para tratar y/o aliviar un trastorno proliferativo, tumor o/y cáncer, donde dicha prodroga puede ser convertida por una enzima convertidora de prodrogas. La prodroga puede ser un compuesto conocido por un especialista en la técnica. Los derivados y/o precursores son conocidos por los especialistas en la técnica.

Se prefiere que la prodroga esencialmente sea farmacéuticamente activa y/o no tóxica.

Los ejemplos de enzimas convertidoras de prodrogas de la presente invención comprenden beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, carboxipeptidasa, beta-lactamasa, D-aminoácido oxidasa. Además, los ejemplos son conocidos por un especialista en la técnica.

Se prefiere que la enzima convertidora de prodrogas esencialmente no se exprese en células no tumorales.

La enzima convertidora de prodrogas se puede obtener a

112

partir de un organismo que se selecciona entre mamíferos, plantas, hongos y microorganismos, tales como bacterias, protozoarios y virus.

Una combinación más preferida de la enzima convertidora de prodrogas y una prodroga comprende beta-glucuronidasa de *E. coli* y una prodroga que puede ser convertida por la beta-glucuronidasa en un compuesto citotóxico activo. Un ejemplo es la HMP1826 (glucurónido-doxorubicina) que se puede convertir en doxorubicina que es un compuesto conocido para el tratamiento del cáncer.

Otro objeto de la presente invención es un método de tratamiento de una enfermedad proliferativa, en particular una enfermedad hiperproliferativa, tal como un tumor o cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz para uso farmacéutico a un sujeto que lo necesita de un virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma del virus de la presente invención, un antígenoma del virus de la presente invención y/o una molécula de ADN de la presente invención que comprende al menos un transgen adicional que codifica una enzima convertidora de prodrogas como se describe en la presente.

En particular, un objeto de la presente invención es un método de tratamiento de una enfermedad proliferativa, en particular una enfermedad hiperproliferativa, tal como

cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz para uso farmacéutico a un sujeto que lo necesita

(i) un virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma viral de la presente invención, un antígenoma viral de la presente invención y/o una molécula de ADN de la presente invención que comprende al menos un transgen que codifica una enzima convertidora de prodrogas, y

(ii) una prodroga adecuada para el tratamiento de la enfermedad proliferativa, donde dicha prodroga se puede convertir en un compuesto farmacéuticamente activo por la enzima convertidora de prodrogas de (i).

El método puede comprender la administración de una composición farmacéutica individual que comprende ambos componentes (i) y (ii), o puede comprender la administración de dos composiciones farmacéuticas solas, en donde una de las cuales comprende el componente (i) y la otra comprende (ii).

Proteasas

En el virus a ADN oncolítico recombinante de la presente invención, al menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por una célula tumoral infectada con virus puede codificar una proteasa.

114

Por ello, un objeto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma del virus de la presente invención, un antígenoma del virus de la presente invención y/o una molécula de ADN de la presente invención como un ingrediente activo opcionalmente junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para uso farmacéutico, donde dicho virus, genoma, antígenoma y/o molécula de ADN del virus comprende al menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por una célula tumoral infectada con virus que codifica una proteasa. La composición farmacéutica puede ser apropiada para tratar y/o mejorar un trastorno proliferativo.

Si el virus o ADN oncolítico recombinante de la presente invención codifica una proteasa, el virus oncolítico de la presente invención puede causar la expresión selectiva de la proteasa en una célula blanco infectada con virus (en particular una célula tumoral) que habitualmente no expresa la proteasa o no lo hace de una forma suficiente. Por consiguiente, durante el tratamiento de un sujeto que lo necesita, la proteasa puede clivar en forma irreversible un polipéptido blanco en una célula blanco, inhibiendo de esa forma la proliferación y/o el crecimiento

US

de la célula blanco o matando la célula blanco, pero puede esencialmente no clivar la molécula blanco en una célula no blanco, en particular en una célula sana del sujeto a tratar. Esta estrategia permite se reducir los efectos colaterales no deseados del tratamiento con la proteasa.

Se prefiere que la proteasa sea una proteasa específica de la secuencia. Más preferida es una proteasa que cliva específicamente un polipéptido blanco. La proteasa puede ser de origen natural y puede derivar de cualquier especie o bien puede ser producida mediante ingeniería genética. Un especialista en la técnica podrá determinar las secuencias de aminoácidos adecuadas para un clivaje específico de un polipéptido blanco predeterminado, por ejemplo sobre la base de bases de datos de secuencias disponibles al público. En US 2005-0175591 y US 2004-0072276 se describe la generación de proteasas de proteínas manipuladas con una especificidad de sustrato determinada. Estos dos documentos se incluyen en la presente a modo de referencia.

La molécula blanco de la proteasa puede ser cualquier molécula blanco como se describe a continuación para los blancos de las proteínas de unión.

Otro objeto de la presente invención es un método de tratamiento de una enfermedad proliferativa, en particular

116

una enfermedad hiperproliferativa, tal como un tumor o cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz para uso farmacéutico a un sujeto que lo necesita de un virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma del virus de la presente invención, un antígenoma del virus de la presente invención y/o una molécula de ADN de la presente invención que comprende al menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresado por una célula tumoral infectada con virus que codifica una proteasa.

El transgen de la presente invención puede codificar una proteína de fusión de una enzima convertidora de prodrogas definida anteriormente, una molécula de unión definida anteriormente y/o una proteasa definida anteriormente. Se prefiere especialmente una proteína de fusión de una enzima convertidora de prodrogas y una molécula de unión o una proteína de fusión de una proteasa y una molécula de unión.

Aplicaciones terapéuticas

La presente invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo un virus descrito en la presente, una nucleocápside del virus, un genoma del virus o una molécula de ADN que codifica al genoma o/y un antígenoma del virus, opcionalmente junto con

117

vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para uso farmacéutico.

La composición farmacéutica se puede proveer como una solución, suspensión, un liofilizado o en cualquier otra forma apropiada. Además del ingrediente activo, la composición puede comprender vehículos, amortiguadores, agentes tensioactivos y/o adyuvantes conocidos en la técnica. La composición se puede administrar por ejemplo en forma oral, tópica, nasal, pulmonar o por medio de inyección local o intravenosa. La composición farmacéutica se administra en una cantidad farmacéuticamente activa dependiendo del tipo de trastorno, de la condición y peso del paciente, la ruta de administración etc. Preferentemente se administran entre 10^9 y 10^{12} partículas virales, entre 10^8 y 10^{11} , entre 10^7 y 10^{10} , o entre 10^6 y 10^9 partículas virales por aplicación. La terapia oncolítica se puede combinar en forma opcional con otras terapias para tumores tales como cirugía, radiación y/o quimioterapia tales como tratamiento con ciclofosfamida y/o tratamiento por hipertermia.

Aún otro aspecto es un método de tratamiento de una enfermedad proliferativa o/y cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz para uso farmacéutico a un sujeto que lo necesita un virus oncolítico recombinante descrito en la presente, una nucleocápside del virus, un genoma del

virus o una molécula de ADN que codifica al genoma o/y un antígenoma del virus, opcionalmente junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para uso farmacéutico.

De acuerdo con la presente invención, un paramixovirus oncolítico recombinante puede expresar una proteína de unión soluble, una enzima convertidora de prodrogas y/o una proteasa que puede permanecer o en la célula infectada o puede ser secretada, tal como un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una proteína de repetición de anquirina u otra molécula de unión como se especifica a continuación.

Como ejemplo de NDV, en la presente solicitud se eligió la cepa MTH68 debido a que la misma tiene una propiedad oncolítica inherente con datos promisorios a partir de los tratamientos clínicos experimentales en pacientes (Sinkovics y Horvath, 2000). En principio, sin embargo, la mayoría de las cepas de NDV con sitios de clivaje de proteínas de fusión multibásicas se puede usar como agente oncolítico para el tratamiento de tumores. La tecnología de genética inversa es aplicable a todas las cepas.

Se ha demostrado que las proteínas de unión, como las que se describieron en la presente, tienen un alto potencial terapéutico.

La combinación de NDV oncolítico con proteínas de

119

unión, enzimas convertidoras de prodrogas y/o proteasas terapéuticas con las propiedades descritas previamente, tendrá una eficacia aditiva, o incluso sinérgica, de los dos principios terapéuticos. El virus autorreplicante oncolítico envía a la droga de proteína de unión, enzima convertidora de prodroga y/o la proteasa al sitio de acción preferido en donde se expresa *in situ* en concentraciones locales altas. Se espera que dicha expresión de proteínas sea muy selectiva y que la proteína de unión, la enzima convertidora de prodrogas y/o la proteasa con sus respectivos modos de acción, se sumen a la actividad terapéutica oncolítica intrínseca del HDV. En base a la naturaleza de competencia de replicación del virus que se usa y de la replicación selectiva en células tumorales, se espera que la cantidad de transgen que se expresa [proteína de unión, enzima convertidora de prodroga y/o proteasa] sea casi proporcional a la masa del tumor.

Las moléculas de anticuerpo o las moléculas similares a anticuerpo o los derivados de ellas son proteínas de unión ideales para usarse con el sistema HDV. Las moléculas de anticuerpo han sido objeto de una investigación intensiva y ahora hay tecnologías disponibles para generar moléculas de anticuerpo que son no inmunogénicas, muy selectivas y de gran afinidad. La expresión local de

120

moléculas de anticuerpo a concentraciones altas conduce a eficacias agonistas o antagonistas muy significativas o a un direccionamiento eficiente de moléculas efectoras con un perfil de toxicidad reducido en comparación con la terapia estándar.

Se espera que el uso de una molécula similar a anticuerpos en el sistema HDV sea aún superior. Estas moléculas se diseñan para una unión de gran afinidad selectiva con una estabilidad térmica y rendimiento altos en comparación con los anticuerpos normales. En el caso de las moléculas tipo anticuerpos basadas en anquirina, la naturaleza repetitiva de la molécula se puede efectuar un ajuste fino de acuerdo al blanco respectivo para un direccionamiento, unión, inhibición o activación optimizados. También se pueden combinar diferentes especificidades de unión dentro de una molécula de anquirina, lo que aprovecha la posibilidad de asociar en una molécula de anquirina varias unidades con diferentes especificidades de unión. Esta estructura modular permite la unión multivalente de mayores superficies de proteína de lo que es posible con los anticuerpos, lo que puede ser extremadamente importante en las interacciones de bloqueo proteína-proteína. La estructura modular también se puede aprovechar para bloquear diferentes efectores solamente con una proteína de repeti-

121

ciones de anquirina de bloqueo única.

Debido a que las moléculas de repeticiones de anquirina son extremadamente estables aún bajo condiciones reductoras, estas moléculas se pueden diseñar para su direccionamiento a proteínas dentro de la célula ("Intra-cuerpo").

También es posible el uso de bibliotecas de secuencias codificantes de proteínas de unión con NDV para la identificación de blancos *in vivo*.

Los blancos posibles para moléculas de unión y/o proteasas pueden ser todas las estructuras de una célula blanco o de la matriz extracelular que rodea a la célula blanco que pueden ser reconocidas por las proteínas de unión y/o proteasas descritas y que son relevantes para un determinado tipo de fenotipo patológico. Estas pueden ser proteínas estructurales, enzimas, factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento, integrinas, factores de transcripción, etc.

Aún los blancos que no son alcanzables por pequeñas moléculas (interacciones proteína-proteína, unión a ADN etc.) puede ser alcanzados por esta invención.

Se prevé el uso de la combinación del NDV oncolítico con las proteínas de unión, enzimas convertidoras de prodrogas y/o proteasas terapéuticas, que se describen en

122

la presente, para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, por ejemplo artritis reumatoide y de cáncer.

Para el tratamiento de cáncer, todas las vías que contribuyen en el desarrollo del cáncer pueden constituir el blanco. Estas vías son: autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitoras del crecimiento (anticrecimiento), evasión de apoptosis, potencial de replicación ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión tisular y metástasis. Se puede consultar un resumen de estas vías en (Hanahan y Weinberg, 2000). Las vías de señalización que están comprometidas en el proceso de tumorigénesis y que pueden ser alcanzadas por el método descrito son la vía del receptor de tirosina quinasa (PTK), la vía de RB y p53, la vía de apoptosis, la vía de APC, la vía de HIF1, la vía de GLI, la vía de PI3K y la vía de SMAD. Por una descripción detallada de estas vías de señalización véase Vogelstein y Kinzler (2004).

Otras vías de señalización en las que pueden interferir las proteínas de unión descritas comprenden las vías de ras, Wnt y Hedgehog, en donde se pueden bloquear, por ejemplo, las interacciones proteína-proteína.

Los ejemplos de proteínas de unión que intervienen en forma beneficiosa en las vías que se describieron anteriormente en células cancerosas son:

123

- proteínas de bloqueo de receptores de factores de crecimiento autónomos activos (por ejemplo EGFR, Met)
- ligandos competitivos para factores de crecimiento (antagonistas)
- proteínas de bloqueo para una fosforilación E2F
- proteínas de bloqueo para la transcripción dependiente de E2F
- estabilizantes de p53
- ligandos antagonistas para proteínas antiapoptóticas (por ejemplo Bcl-2)
- ligandos antagonistas para ciclinas
- ligandos antagonistas de efectores de Ras (por ejemplo GEFs)
- ligandos antagonistas para proteínas inducidas por hipoxia (por ejemplo HIF1 α)
- inhibidores de factores de transcripción que interfieren con la dimerización, unión a ADN o/y unión a cofactores (por ejemplo Myc/Max)
- inductores de la diferenciación
- inhibidores de señalización/translocación de smad
- inhibidores de interacciones de adhesión celular (cadherinas, integrinas, por ejemplo $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$)
- inhibidores de enzimas que degradan la matriz extracelular (por ejemplo MMPs)

124

- ligandos antagonistas para ligandos pro-angiogénicos (por ejemplo VEGF-R soluble)
- inhibidores de quinasas mitóticas (por ejemplo Plk-1)
- ligandos antagonistas de receptores pro-angiogénicos
- inhibidores de la formación de complejos de andamiajes proteicos (por ejemplo KSR/Ras)
- inhibidores del inicio de la traducción (eIF4E, EIF2a)

La proteasa de la presente invención, la enzima convertidora de prodrogas y/o el compuesto terapéuticamente activos que deriva de las prodrogas de la presente invención por medio de la enzima convertidora de prodrogas también puede intervenir en forma beneficiosa en las vías descritas previamente de las células cancerosas.

Virus recombinante

Un virus recombinante significa un virus que tiene una alteración definida mediante ingeniería genética en su secuencia de ADN genómico. Esta alteración puede comprender una o más inserciones, supresiones, mutaciones puntuales o combinaciones de los mismos.

Un virus a ADN recombinante de la presente invención puede comprender la secuencia genómica completa de un virus a ADN natural (sin modificar) o una secuencia derivada de

125

la misma, y puede comprender además al menos un casete de transcripción recombinante. Dicho al menos un casete de transcripción puede localizarse entre dos genes (unidades de transcripción) del genoma viral. En este caso, dicho al menos un casete de transcripción está flanqueado por secuencias de inicio y terminación de la transcripción. Dicho al menos un casete de transcripción puede localizarse también entre una unidad de transcripción del genoma viral. En este caso, no se requieren secuencias adicionales de inicio y terminación de la transcripción.

Dicho al menos un casete de transcripción puede comprender sitios de restricción, tales como *PacI* y/o *AscI*, los que pueden ser únicos. Si hay dos casetes de transcripción, los mismos pueden comprender sitios de restricción diferentes.

Se prefiere que el virus a APN de la presente invención comprenda uno o dos casetes de transcripción recombinantes.

En dicho al menos un casete de transcripción de la presente invención, hay un transgen localizado, que puede codificar una proteína de unión, una enzima convertidora de prodrogas y/o una proteasa como se describió en la presente.

Cualquier región intergénica entre cada uno de los dos

26

genes (unidades de transcripción) del genoma viral es apropiada para introducir dicho al menos un casete de transcripción recombinante. Si hay más de un casete de transcripción recombinante, los mismos se pueden localizar en las mismas regiones intergénicas o en regiones diferentes. Se prefiere que al menos un casete de transcripción recombinante se localice entre los genes virales F y HN, en particular si el virus a APN de la presente invención es un virus de la enfermedad de Newcastle recombinante.

No hay un límite superior conocido para el tamaño del genoma de Paramyxoviridae. Por lo tanto, no hay un límite superior para el número y tamaño de transgenes que se introducen en el virus a APN recombinante de la presente invención. Se prefiere que el transgen (un transgen que codifica una citoquina de aves, o dicho al menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por una célula tumoral infectada con virus o una combinación de los mismos, como se describe en la presente) tenga de manera independiente un tamaño de hasta 10 kb aproximadamente, más preferentemente hasta 5 kb aproximadamente, con mayor preferencia hasta 2 kb aproximadamente.

En la expresión (que incluye transcripción del APN viral en APNm y traducción del APNm) del transgen, que se

122

describe en la presente, se usan las secuencias de control de la expresión tales como las secuencias de inicio y terminación de la transcripción y las secuencias que controlan la traducción. Las secuencias de control de la expresión de un virus a APN que se pueden usar pueden ser las del virus a APN en el que se basa el virus a APN recombinante de la presente invención. En particular, las secuencias de inicio y terminación de la transcripción se pueden obtener a partir de un virus a APN. Las secuencias del control de la expresión también se pueden obtener a partir de una célula blanco, en particular las secuencias que controlan la traducción y/o el transporte de proteínas.

Debido al mecanismo de replicación de Paramyxoviridae, los APN genómico y antígenómico habitualmente no aparecen como APN desnudos. Los APN genómicos y antígenómicos se ensamblan con la nucleoproteína. Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es una nucleocápside de un virus a APN oncolítico recombinante de la presente invención. La nucleocápside comprende la molécula de APN que codifica el genoma y/o el antígenoma del virus a APN y la proteína de la nucleocápside. La nucleocápside también puede comprender la proteína polimerasa L y/o la fosfoproteína P.

También constituye un objeto de la presente invención el antígenoma del genoma de la presente invención que se

describe en la presente.

Otro aspecto de la presente invención es una molécula de ADN que codifica el genoma y/o el antígenoma de un virus a ARN oncolítico recombinante de la presente invención. La molécula de ADN puede ser un plásmido. La molécula de ADN de la presente invención se puede usar para tratar mediante ingeniería genética el virus a ARN de la presente invención. Además, la molécula de ADN se puede usar para producir el virus a ARN de la presente invención. Por lo tanto, la molécula de ADN se puede ligar operativamente a una secuencia de control de la transcripción, por ejemplo una secuencia de control de la transcripción procariota o eucariota.

Otro aspecto de la presente invención es un método para producir un virus a ARN oncolítico recombinante expresado a partir de una molécula de ADN que codifica al genoma y/o al antígenoma de un virus oncolítico recombinante de la presente invención, en particular los NDV oncolíticos recombinantes de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención es una célula que comprende el virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma viral de la presente invención, un antígenoma viral de la presente invención y/o una molécula de ADN de la presente invención. La célula puede

ser una célula procariota o una célula eucariota. La célula puede ser de una línea celular, en particular una línea celular de mamífero, más particularmente una línea celular humana o murina. La célula se puede usar en el método de la presente invención para producir el virus a ARN de la presente invención. Los sistemas apropiados para transcribir una molécula de ADN son conocidos por un especialista en la técnica, por ejemplo sistemas en procariotas, tal como *E. coli*, o sistemas eucariotas, tales como HeLa o CHO.

Aún otro aspecto es un virus a ARN oncolítico, un genoma o antígenoma del mismo o una molécula de ADN que comprende el juego completo de genes de Paramyxoviridae o un juego de genes de Paramyxoviridae en donde al menos un gen o región intergénica es modificado genéticamente, y comprende además al menos un casete de transcripción recombinante como se describe en la presente. Dicho virus, genoma o antígenoma o molécula de ADN se puede usar para elaborar un medicamento y/o en el tratamiento de cáncer. Dicho virus a ARN, genoma, antígenoma o molécula de ADN es apropiada para construir un virus Paramyxoviridae recombinante, en particular un virus de la enfermedad de Newcastle recombinante por medio de técnicas de ingeniería genética con el objeto de introducir una secuencia recom-

130

binante en el casete de transcripción. Para este propósito, dicho al menos un casete de transcripción puede comprender un sitio de restricción. Si hay más de un casete de transcripción, los sitios de restricción únicos de los casetes de transcripción pueden ser diferentes. Un ejemplo es el plásmido pflMTH63_Asc_Pac de la Fig. 1 de WO 2006/050984, cuya divulgación se incluye en la presente a modo de referencia. Otro ejemplo es la IgG EDB del pflMTH68 murino divulgado en la Fig. 2 de WO 2006/050984, cuya divulgación se incluye en la presente a modo de referencia.

Relevancia terapéutica:

El tratamiento de cáncer o/y de un tumor incluye la inhibición del crecimiento tumoral, preferentemente la muerte de las células tumorales o el bloqueo de la proliferación en un lapso por una infección. El NDV se replica en forma selectiva en células tumorales.

El virus de la presente invención se puede usar para tratar trastornos proliferativos, en particular trastornos hiperproliferativos. Preferentemente se pueden tratar neoplasias con el virus descrito, preferentemente distintos tipos de cáncer del grupo que consiste en cáncer de pulmón, colon, próstata, mama y de cerebro.

Más preferentemente se puede tratar un tumor sólido.

Más preferentemente se puede tratar un tumor sólido de

baja proliferación. Los ejemplos de tumores con bajo índice de proliferación comprenden cáncer de próstata o cáncer de mama.

Más preferentemente se puede tratar un tumor de cerebro.

Más preferentemente se puede tratar un glioblastoma.

Los mamíferos incluyen seres humanos, ratones y ratas.

Elaboración del virus a ARN recombinante

El virus a ARN recombinante de la presente invención, en particular el NDV recombinante, se puede construir como se describe en Fomer-Oberdorfer et al. (1999). La construcción de las nuevas secuencias de ácido nucleico es a nivel del ADNc que luego se traduce en ARN dentro de una célula eucariótica mediante el uso de los siguientes plásmidos de partida: pCITE P, pCITE N, pCITE L, pX85T flNDV

El NDV puede ser de cualquier cepa del virus de la enfermedad de Newcastle, más preferentemente una cepa que sea oncolítica en su forma salvaje.

El plásmido pX85T se describe en EP0702085 (Conzelmann KK).

El virus a ARN recombinante de la presente invención, en particular el NDV recombinante, se puede recuperar inicialmente a partir de células que expresan la polimerasa T7, por ejemplo células BHK T7 o CHO transfectadas

transitoriamente con la T7 polimerasa. El mismo se puede amplificar en células de tipo 293, CEC32, HT29 o A431. También se puede amplificar en el fluido alantoico de huevos de gallina embrionados.

El virus a ARN recombinante, en particular el NDV recombinante, se almacena bajo las siguientes condiciones. El virus a ARN recombinante, en particular el NDV, es estable en D-manitol al 5% / L-lisina al 1% (p/v) / pH 8,0 o medio de cultivo celular estándar.

A -20°C durante hasta un mes.

A -80°C durante hasta 10 años.

El virus a ARN recombinante de la presente invención se puede elaborar usando un virus de tipo salvaje o un virus recombinante como material de partida. También se puede usar un ácido nucleico, tal como un ADN, incluyendo una secuencia de tipo salvaje o recombinante. Por ejemplo, se puede emplear el virus a ARN recombinante o/y la molécula de ADN que se describe en WO 2006/050984 como material de partida. Un ejemplo es el plásmido pflMTH68_Asc_Fac de la Fig. 1 de WO 2006/050984. Otro ejemplo es la IgG EDE pflMTH68 murina de la Fig. 2 de WO 2006/050984. La divulgación de WO 2006/050984 se incluye en la presente a modo de referencia. En particular, se incluye la divulgación de WO 2006/050984 referida a virus a

(33)

ARN oncolíticos recombinantes y la construcción de los mismos en la presente a modo de referencia.

Uso del NDV recombinante como medicamento

El virus a ARN recombinante de la presente invención, en particular el NDV purificado recombinante de acuerdo con la invención, se puede usar como medicamento, debido a que el mismo muestra efectos farmacológicos.

El virus a ARN recombinante, en particular el NDV de la invención, el genoma del virus, antígenoma, nucleocápside y/o la molécula de ADN de la presente invención se puede usar en la elaboración de un medicamento para prevenir, aliviar o/y tratar el cáncer, un tumor o/y una enfermedad proliferativa, en especial para prevenir, aliviar o/y tratar el cáncer, tal como cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer de colon, cáncer de mama.

La composición farmacéutica de la presente invención comprende opcionalmente vehículos y diluyentes aceptables para uso farmacéutico. Dichos vehículos y diluyentes se describen en *Remington's Pharmaceutical Science*, 15ª ed. Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (1930). Los títulos virales usados en la composición farmacéutica o/y aplicados en el método de tratamiento de la presente invención se pueden encontrar en el rango entre 10^9 y 10^{12} pfu

por dosis, en un rango entre 10^8 y 10^{11} pfu, en un rango entre 10^7 y 10^{10} pfu o en un rango entre 10^6 y 10^9 pfu según la indicación de tratamiento.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para prevenir y/o tratar un trastorno proliferativo, tal como cáncer.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender una emulsión del virus a ARN oncolítico recombinante de la presente invención, en particular el NDV de la invención, y se puede administrar por medio de inhalación, infusión intravenosa, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal o inyección intratumoral.

En el método de la presente invención para prevenir o/y tratar un trastorno proliferativo, en particular cáncer, una cantidad eficaz para uso farmacéutico es un título de los virus a ARN oncolíticos de la presente invención, en particular el NDV de la presente invención, el genoma del virus de la presente invención o la molécula de ADN de la presente invención, que previene, alivia o/y suprime la enfermedad.

Para lograr el efecto terapéutico, la dosis aceptable puede depender por ejemplo de la construcción, del paciente, los modos de administración y el tipo de cáncer.

Se prefiere que el sujeto (el paciente) sea un mamí-

BS

fero, más preferentemente un paciente humano.

La presente invención se ilustra además por medio de las siguientes Figuras y Ejemplos.

Leyendas de las figuras

La **Figura 1** describe al plásmido pflMTH68 ChIFN-alfa que comprende al genoma completo de NDV y un casete de transcripción que comprende al transgen del interferón-alfa (ChIFN-alfa) de pollo.

La **Figura 2** describe al plásmido pflMTH68 ChIFN-beta que comprende al genoma completo de NDV y un casete de transcripción que comprende al transgen del interferón-beta (ChIFN-beta) de pollo.

La **Figura 3a** demuestra que la línea celular CEC-32 de aves está parcialmente protegida contra lisis 48 hs después de la infección con NDV-ChIFN-alfa y fuertemente protegida después de la infección con NDV-ChIFN-beta. La infección con un NDV que expresa GFP destruye por completo la monocapa de CEC-32. Por el contrario, no se observan diferencias en el efecto lítico entre los tres virus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa y NDV-ChIFN-beta después de la infección de la línea celular tumorigénica Hela. Independientemente del virus usado, la monocapa de células Hela es completamente destruido 48 hs después de la infección.

La **Figura 3b** muestra una cuantificación de la

(26)

sobrevida celular de células CEC-32 y Hela 48 hs después de la infección con los virus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa y NDV-ChIFN-beta. Después de la infección con NDV-GFP, se observa una muerte casi completa de las células CEC-32, solamente el 3% de las células son viables. La infección de las células de codorniz con el NDV-ChIFN-alfa mantiene un 26% de las células infectadas con vida. La mejor protección se observa después de una infección con el virus NDV-ChIFN-beta, el 96% de las células CEC-32 son viables. Por el contrario, 48 hs después de la infección la viabilidad de las células tumorigénicas Hela se reduce por debajo de un 10% independientemente del NDV recombinante usado.

La **Figura 4** muestra que existe una amplia ventana terapéutica después de una infección de células de tumores y fibroblastos con NDV-ChIFN-alfa y NDV-ChIFN-beta. La inhibición de la proliferación de los virus oncolíticos NDV-ChIFN-alfa y NDV-ChIFN-beta es muy fuerte sobre las células tumorales y por el contrario casi no se observa inhibición del crecimiento después de la infección de fibroblastos primarios, en especial a valores bajos de MOI como MOI de entre 0,1 y 0,01.

La **Figura 5a** representa las curvas de sobrevida de huevos embrionados de pollo infectados con NDV, usando los cuatro virus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa, NDV-ChIFN-beta y la

cepa apatogénica LaSota. Los embriones de pollo infectados con NDV-ChIFN-alfa o NDV-ChIFN-beta están sobreviviendo más que los embriones infectados con NDV-GFP. Las curvas están claramente desplazadas en la dirección de la curva de sobrevida de la cepa lentogénica NDV LaSota.

Figura 5b: A partir de los resultados de las curvas de sobrevida se calcula el valor de MDT (tiempo promedio de muerte) para cada grupo de infección. El MDT está incrementado para los virus NDV-ChIFN-alfa y ChIFN-beta en comparación con NDV-GFP. El mayor valor con MDT se observó con la cepa apatogénica LaSota.

Ejemplo 1:

Generación de un NDV recombinante con un transgen derivado de aves que lleva a la expresión de una citoquina de pollo

Se usó la cepa oncolítica MTH68 de NDV para obtener el ADN viral. El uso de RT-PCR permitió obtener numerosos fragmentos de ADNc y en un procedimiento de clonación de varios pasos los mismos se ensamblaron en un ADNc de genoma completo que se clonó en el vector pX88T (Schnell et al., 1994) con lo cual se obtuvo el plásmido pflMTH68. Este vector se puede usar para la transfección con el objeto de rescatar el virus recombinante de una línea de células que expresan la T7 polimerasa.

[38]

Se clonó un casete de transcripción adicional en el plásmido genómico de longitud completa de NDV, MTH68 (pflMTH68), entre los genes que codifican la proteína F y la proteína NH en el sitio de restricción único SfiI. Los dos oligonucleótidos de ADN

Sfi directo

(5'-aggccttaattaacgcgacaacttaagaaaaatacgggtagaacggcctgag-3',

SEQ. ID. NO: 1) y

Sfi inverso

(5'-aggcggttctacccgtatctttttctttaagttgtcggttaattaaggcctctc-3',

SEQ. ID. NO: 2)

se alinearon y se ligaron luego en el sitio SfiI del pflMTH68.

Se amplificaron por PCR dos transgenes de ADN que codifican para ChIFN-alfa (NM_205427) y ChIFN-beta (NM_001024836). Como molde para la reacción en cadena de polimerasa se usaron las construcciones de expresión ChIFN-alfa y ChIFN-beta descritas en Schultz et al, 1995 y Sick et al, 1996. Para la amplificación del transgen ChIFN-alfa, se usó el siguiente par de cebadores: ChIFN-alfa fw (5'-ccttaattaagccaccatgggtgtgacctgcaagccc-3' SEQ. ID NO:3) y ChIFN-alfa-rev (5'-ccttaattaactaagtgcgcgtgttgacctgtg-3' SEQ. ID NO:4) y para la amplificación de la secuencia codificante ChIFN-beta se usaron los dos cebadores PacI ChIFN-

139

beta fw (5'-cottaattaacgcaccatgactgcaaaccatcagttctcagg-3'
 SEQ. ID NO:5) y ChIFN-beta-rev (5'-
 cottaattaatcactgggtgttgagacgtttggatg-3' SEQ. ID NO:6).

Cada uno de los dos transgenes ChIFN se clonaron en el sitio PacI del plásmido pflMTH68Pac, respectivamente. La longitud total del genoma se ajustó para que fuera un múltiplo de 6 para seguir la "regla de seis" para la longitud del genoma viral. La identidad de secuencia del inserto ChIFN-beta se confirmó por secuenciación de nucleótidos. En el inserto ChIFN-alfa se detectó un cambio de nucleótido G a A en la posición 89 en comparación con la secuencia NM_205427. Se rescató el virus recombinante de células que expresan T7 transfectadas con el plásmido genómico viral de longitud total que contiene los genes para ChIFN-alfa (figura 1) o ChIFN-beta (figura 2) por medio de una técnica estándar de rescate de virus. El virus resultante que expresa ChIFN-alfa se designó NDV-ChIFN-alfa y el NDV que expresa ChIFN-beta NDV se llamó NDV-ChIFN-beta. Los virus se cultivaron en cultivo de tejido o en fluido alantóico de huevos de gallina para producir títulos altos.

Ejemplo 2:

ChIFN-alfa y ChIFN-beta expresados a partir de un NDV recombinante es activo biológicamente.

140

Materiales y métodos:

Se sembraron células CEC-32 (línea celular de codorniz) o células Hela (línea celular de cáncer cervical) en una placa de 6 cavidades a 1×10^5 células/cavidad. Luego de que las células se volvieron adherentes, se infectaron usando una MOI de 0,01 con el virus control que expresa GFP NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa, NDV-ChIFN-beta o MOCK. Luego de 64 horas se colectaron los sobrenadantes y se inactivaron las partículas virales infecciosas con radiación UV.

Para demostrar la actividad biológica de ChIFN-alfa o ChIFN-beta en el sobrenadante de las células infectadas con virus, se usó un bioensayo específico para interferón de pollo (Schwarz et al, JICR, 2005).

El ensayo se basa en la línea celular de codorniz transfectada estable CEC-511 que lleva un gen de la luciferasa controlado por el promotor Mx de gallina que responde a IFN. La actividad luciferasa se induce cuando las células indicadoras CEC-511 se incubaron con ChIFN-alfa o ChIFN-beta. Para realizar este ensayo se sembraron 15.000 células CEC-511 en una placa de 96 cavidades. 24 horas después de la siembra, se trataron las células con el sobrenadante tratado con UV de las células Hela o CEC-32 infectadas con virus. Las células se incubaron con 75 μ l de una dilución 1:100 de los respectivos sobrenadantes. Como

controles positivos, se incubaron células con una dilución 1:1000 del sobrenadante de células 293T transfectadas con un plásmido de expresión para ChIFN-alfa o ChIFN-beta (Sick et al, 1996) o solamente medio. Luego de 6 horas de tiempo de incubación, se realizó el ensayo de luciferasa Steady-Glo® (Promega), siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. Para determinar los valores medios, cada punto se midió por triplicado.

Resultados:

64 horas luego de la infección, los sobrenadantes de las células CEC-32 y Hela infectadas con NDV-ChIFN-alfa y NDV-ChIFN-beta tienen una fuerte actividad inductora de luciferasa sobre las células CEC-511 indicando la expresión mediada por virus de ChIFN-alfa y ChIFN-beta en las células infectadas. Por otro lado, el sobrenadante de células infectadas con MOCK o infectadas con un virus control expresando GFP no mostró actividad inductora de luciferasa sobre la línea celular indicadora CEC-511. Una dilución 1:1000 del sobrenadante conteniendo ChIFN-alfa o ChIFN-beta recombinante también demostró una actividad inductora del promotor Mx dependiente de ChIFN.

Tabla 1: actividad de interferón en el sobrenadante de células CEC-32 y Hela infectadas con NDVs recombinantes que expresan ChIFN-alfa o ChIFN-beta. La respuesta de IFN se

142

medida en células indicadoras que llevan un gen reportero con luciferasa controlado por el promotor Mx. Los valores medidos se dan en cuentas relativas de luciferasa.

	CEC-32			
	NDV-GFP	NDV-ChIFN- alfa	NDV-ChIFN- beta	MOCK
Valor medio	308	11991	8033	246
Desviación est.	86	283	423	27

	Hela			
	NDV-GFP	NDV-ChIFN- alfa	NDV-ChIFN- beta	MOCK
Valor medio	237	11739	5095	290
Desviación est.	19	1835	78	39

	ChIFN-alfa	ChIFN-beta	Medio
Valor medio	4849	2128	237
Desviación est.	107	15	21

Ejemplo 3:

Las células de ave pero no las células de tumor infectadas con NDVs recombinantes que expresan ChIFN-alfa o ChIFN-beta están protegidas de la lisis viral

Materiales y métodos:

3 a.) Se sembraron células CEC-32 (línea celular de codorniz) o células Hela (línea celular de cáncer cervical) en una placa de 6 cavidades a 1×10^5 células/cavidad. Luego de que las células se volvieron adherentes, se infectaron usando una MOI de 0,01 con el virus control NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa, NDV-ChIFN-beta o MOCK. Luego de 48 horas las

células se fijaron con solución 4% de formaldehído y se tiñeron con solución Giemsa. Se realizó la posterior fotodocumentación con un sistema de adquisición de imágenes Zeiss Axiophot.

3 b.) Se sembraron células CEC-32 (línea celular de codorniz) o células Hela (línea celular de cáncer cervical) en una placa de 96 cavidades a 15.000 células/cavidad. Luego de que las células se volvieron adherentes se infectaron con una MOI de 0,01 con el virus control NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa, NDV-ChIFN-beta o MOCK (= no infectadas). Luego de 48 horas de tiempo de incubación se realizó el ensayo de luciferasa CellTiter-Glo® (Promega) para medir la viabilidad celular, siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. Para determinar los valores medios, cada punto se generó a partir de seis valores independientes.

Resultados:

Figura 3. a.) Luego de 48 horas las células CEC-32 de ave se lisaron por el NDV que expresa GFP (NDV-GFP). Por otra parte, las células infectadas con el virus que expresa ChIFN-alfa están parcialmente protegidas contra la lisis. La monocapa de CEC-32 infectada con NDV-ChIFN-alfa está entre 25 y 50% intacta. Con NDV que expresa ChIFN-beta se ve una protección aún fuerte. Luego de 48 horas cerca de

144

entre 90 y 100% de la monocapa de CEC-32 está intacta y protegida de la lisis viral. La densidad de esta monocapa es comparable con la monocapa de las células infectadas con MOCK.

La infección con los tres virus sobre la línea celular tumorigénica Hela muestra una actividad oncolítica comparable entre los virus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa y NDV-ChIFN-beta. Luego de 48 horas la monocapa de células Hela infectadas con NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa o NDV-ChIFN-beta se encuentra casi destruida por completo. La monocapa celular de células Hela infectadas con MOCK se encuentra intacta, indicado por el color azul de las células teñidas con Giemsa.

Figura 3. b) En un segundo experimento se cuantificó la viabilidad celular 48 horas después de la infección con los NDVs que expresan ChIFN. Las células de ave CEC-32 infectadas con NDV-GFP mostraron sólo 3% de la viabilidad celular remanente. En las células CEC-32 infectadas con NDV-ChIFN-alfa el 26% de las células remanentes están intactas. 48 horas luego de la infección con NDV-ChIFN-beta de la línea celular de codorniz CEC-32, el 94% de las células se encuentran viables y protegidas contra la lisis viral.

145

Por el contrario, no se puede observar casi ninguna diferencia en la destrucción celular luego de la infección con los tres virus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa o NDV-ChIFN-beta sobre la línea celular tumorigénica Hela. Luego de 48 horas el valor de las células viables es para los tres virus entre 3% y 9% indicando casi una destrucción completa de las células del tumor.

Ejemplo 4:

Oncolisis selectiva de células tumorales pero no de células primarias por NDV recombinante que expresan ChIFN-alfa o ChIFN-beta.

Materiales y métodos:

Se sembraron 5000 células de fibroblastos primarios/embrionarios o 3000 células Hela en cada cavidad de una placa de 96 cavidades. 16 horas luego de la sembrada, se prepararon diluciones de virus de NDV-GFP (NDV-GFP), NDV-ChIFN-alfa (NDV-ChIFN-alfa) y NDV-ChIFN-beta (NDV-ChIFN-beta). Las células fibroblastos se infectaron con las concentraciones indicadas de virus. Como control negativo, las células fibroblastos se infectaron con MOCK. Luego de 1 hora se quitó el inóculo, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 200 µl de medio de cultivo celular durante 4 días en el incubador para cultivo celular. Luego se fijaron las células remanentes con

146

solución 4% de formaldehído y se tiñeron con cristal violeta. El colorante se solubilizó con 10% de ácido acético glacial y se midió la absorbancia de cada cavidad a 595 nm en un lector de ELISA.

Resultados:

Cuatro días después de la infección, los fibroblastos primarios infectados con los tres virus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa y NDV-ChIFN-beta usando MOIs entre MOI 0,001 hasta MOI 0,1 casi no mostraron inhibición de proliferación (figura 4). Los primeros signos de inhibición de la proliferación sólo se observan en donde se usaron MOIs entre 1 ó 10 partículas virales por célula para la infección. Por el contrario, las células tumorigénicas Hela infectadas con MOIs entre MOI 0,001 y MOI 10 mostraron una inhibición de proliferación muy fuerte. Estos resultados indican que los NDVs recombinantes tienen una ventana terapéutica muy buena especialmente a bajas MOIs como MOI 0,1 y MOI 0,001 donde casi no se mide un efecto lítico en las células primarias y se mide un efecto inhibitorio del crecimiento muy fuerte en las células tumorigénicas Hela. No se observa diferencia en la forma de la curva de muerte en las células tumorales y primordiales entre el virus control NDV-GFP y los virus NDV-ChIFN-alfa y NDV-ChIFN-beta que expresan ChIFN.

Ejemplo 5:

Tiempo de sobrevida prolongada de embriones de pollo infectados con el NDV recombinante que expresa ChIFN-alfa o ChIFN-beta

Materiales y métodos:

Se infectaron grupos de quince huevos de gallina embrionados de 11 días de edad con NDV-ChIFN-alfa, NDV-ChIFN-beta, NDV-GFP o la cepa de NDV no patogénica LaSota, respectivamente. Como material infeccioso, se usó virus crecido en huevo en fluido alantóico diluido con PBS estéril. Se aplicó una dosis infecciosa de 4000 PFU en un volumen total de 200 µl. El inóculo se inyectó en la cavidad alantóica. Luego de la infección, los huevos se incubaron a 37°C y entre 50% y 60% de humedad en un incubador de huevos. Los huevos se miraron a trasluz dos veces al día en los tiempos indicados (figura 5) y se verificaron los signos de vitalidad de los embriones.

Este ensayo permite comparar la patogenicidad de diferentes cepas de NDV por comparación del tiempo de sobrevida de los embriones infectados. El método se basa en la determinación del "tiempo medio de muerte de la dosis letal mínima (MDT/MLD)" descrito en R.P. Hanson (1980). El protocolo se modificó de modo que se inocularon en los huevos diluciones no seriadas de la solución madre de virus, en lugar de una inyección de dosis de virus definida

con una concentración más alta que la dosis letal mínima. Por razones éticas, esta modificación del ensayo reduce el número de embriones usados para el estudio. El MDT se determina por la siguiente fórmula:

MDT = ((no. muertes a la hora X) x (X horas) + (no. muertes a la hora Y) x (Y horas) etc.)/número total de muertes

Resultados:

La sobrevivencia de los embriones de pollo infectados con NDV-ChIFN-alfa y NDV-ChIFN-beta mejora en comparación con los embriones infectados con NDV-GFP. Los huevos embrionados infectados con NDV-GFP van perdiendo los signos de vitalidad entre las 24 horas y 62 horas, llevando a un MDT (tiempo medio de muerte) de 50 horas. Los embriones infectados con NDV-ChIFN-beta sobreviven hasta 96 horas con un MDT calculado de 69 horas. Se mide un tiempo de sobrevivencia comparable con un MDT de 74 horas en los embriones infectados con NDV-ChIFN-beta. La mayoría de los embriones infectados con NDV-ChIFN-beta mueren entre las 48 horas y las 96 horas. La sensibilidad del ensayo se indica por el uso de una cepa no patogénica o lentogénica de LaSota. Incluso los huevos embrionados inoculados con la cepa LaSota de NDV se mueren entre las 62 horas y las 115 horas con un MDT calculado de 85 horas. Este experimento

119

muestra que el MDT del NDV mesogénico MTH68 se desplaza hacia la cepa NDV lentogénica.

Referencias

Adams, G.P. and Weiner, L.M. (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 23, 1147-1157.

Alexander, D.J. (1983) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.

Allen, T.M. (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2, 750-763.

Amstutz, P., Binc, H.K., Parizek, P., Stumpp, M.T., Kohl, A., Grutter, M.G., Ferrer, P. and Fluckthun, A. (2005) Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed ankyrin repeat proteins. *J Biol Chem*, 280, 24715-24722.

Antoniw, P., Springer, C.J., Bagshawe, K.D., Searle, F., Melton, R.G., Rogers, G.T., Burke, P.J. and Sherwood, R.F. (1990) Disposition of the prodrug 4-(bis (2-chloroethyl) amino) benzoyl-L-glutamic acid and its active parent drug in mice. *Br J Cancer*, 62, 909-914.

Bagshawe, K.D., Springer, C.J., Searle, F., Antoniow, P., Sharma, S.K., Melton, R.G. and Sherwood, R.F. (1988) A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites. *Br J Cancer*, 58, 700-703.

Batra, J.K., Fitzgerald, D.J., Chaudhary, V.K. and

Pastan, I. (1991) Single-chain immunotoxins directed at the human transferrin receptor containing *Pseudomonas* exotoxin A or diphtheria toxin: anti-TFR(Fv)-PE40 and DT388-anti-TFR(Fv). *Mol Cell Biol*, 11, 2200-2205.

Eatra, J.K., Kasprzyk, F.G., Bird, R.E., Pastan, I. and King, C.R. (1992) Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5867-5871.

Bell, J.C., Garson, K.A., Lichty, B.D. and Stojdl, D.F. (2002) Oncolytic viruses: programmable tumor hunters. *Curr Gene Ther*, 2, 243-254.

Binn, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M.G. and Pluckthun, A. (2004) High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol*, 22, 575-582.

Bosslet, K., Czech, J., Lorenz, P., Sedlacek, H.H., Schuermann, M. and Seemann, G. (1992) Molecular and functional characterisation of a fusion protein suited for tumor specific prodrug activation. *Br J Cancer*, 65, 234-238.

Carnemolla, B., Borsi, L., Balza, E., Castellani, P., Meazza, R., Berndt, A., Ferrini, S., Kosmehl, H., Neri, D. and Sardi, L. (2002) Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the

tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood*, 99, 1659-1665.

Chaudhary, V.K., Gallo, M.G., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1990) A recombinant single-chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9491-9494.

Chaudhary, V.K., Queen, C., Junghans, R.P., Waldmann, T.A., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1989) A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature*, 339, 394-397.

Chiocca, E.A. (2002) Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer*, 2, 938-950.

Csatary, L.K., Gosstonyi, G., Szeberenyi, J., Fabian, Z., Liska, V., Bodey, B. and Csatary, C.M. (2004) MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol*, 67, 83-93.

De Lorenzo, C., Arciello, A., Cazzolino, R., Palmer, D.B., Laccetti, P., Piccoli, R. and D'Alessio, G. (2004) A fully human antitumor immunotoxin selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Res*, 64, 4870-4874.

Engel-Herbert, I., Werner, O., Teifke, J.P., Mebatsion, T., Mettenleiter, T.C. and Pomeroy-Oberdorfer, A. (2002) Characterization of a recombinant Newcastle disease virus expressing the green fluorescent protein. *J Virol*

Methods, 108, 19-28.

Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P. and Novotny, W. (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 3, 391-400.

Ford, E.G., Souberbielle, B.E., Darling, D. and Farzaneh, F. (2001) Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene Ther*, 8, 1-4.

Georgakis, G.V., Li, Y., Humphreys, E., Andreeff, M., O'Brien, S., Younes, M., Carbone, A., Albert, V. and Younes, A. (2005) Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death. *Br J Haematol*, 130, 501-510.

Gerber, H.P. and Ferrara, N. (2005) Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*, 65, 671-680.

Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-70.

Hanson, R.P. (1980) Newcastle Disease. In Hitchner, S. B. (ed.). Isolation and identification of avian pathogens. College Station, Tex: American Association of Avian

Pathologists.

Herbst, R.S. and Langer, C.J. (2002) Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. *Semin Oncol*, 29, 27-36.

Hogbom, M., Eklund, M., Nygren, P.A. and Nordlund, P. (2003) Structural basis for recognition by an in vitro evolved affibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3191-3196.

Huang, Z., Elankumaran, S., Panda, A. and Samal, S.K. (2003) Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Poult Sci*. 82, 899-906.

Huang, Z., Elankumaran, S., Yunus, A.S. and Samal, S.K. (2004) A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *J Virol*, 78, 10054-10063.

Huang, Z., Krishnamurthy, S., Panda, A. and Samal, S.K. (2001) High-level expression of a foreign gene from the most 3'-proximal locus of a recombinant Newcastle disease virus. *J Gen Virol*, 82, 1729-1736.

Kreitman, R.J., Chaudhary, V.K., Waldmann, T.A., Hanchard, B., Cranston, B., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1993) Cytotoxic activities of recombinant immunotoxins composed of *Pseudomonas* toxin or diphtheria toxin toward

lymphocytes from patients with adult T-cell leukemia. *Leukemia*, 7, 553-562.

Kaiser, F., Poh, T.Y., Bothwell, L., Avery, S., Balu, S., Pathania, U.S., Hughes, S., Goodchild, M., Morrell, S., Watson, M., Bumstead, N., Kaufman, J. and Young, J.R. (2005) A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *J Interferon Cytokine Res.* 25: 467-484.

Kreitman, R.J. and Pastan, I. (1995) Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of *Pseudomonas* exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. *Biochem J*, 307 (Pt 1), 29-37.

Krishnamurthy, S., Huang, Z. and Samal, S.K. (2000) Recovery of a virulent strain of newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. *Virology*, 278, 168-182.

Kuan, S.F., Eyrd, J.C., Basbaum, C.B. and Kim, Y.S. (1987) Characterization of quantitative mucin variants from a human colon cancer cell line. *Cancer Res*, 47, 5715-5724.

Lalner, R.C. and Ley, A.C. (2001) Novel frameworks as a source of high-affinity ligands. *Curr Opin Biotechnol*, 12, 406-410.

Lamb, R.A., Kolakofsky, D. (2001) Paramyxoviridae: The Viruses And Their Replication. In Fields, B.N. (ed.), *Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1305-1485.

155

Lorence, E.M., Pecora, A.L., Major, P.P., Hotte, S.J., Laurie, S.A., Roberts, M.S., Greene, W.S. and Bamat, M.K. (2003) Overview of phase I studies of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus. *Curr Opin Mol Ther*, 5, 618-624.

Mizukami, Y., Jo, W.S., Duerr, E.M., Gala, M., Li, J., Shang, X., Zimmer, M.A., Iliopoulos, O., Zukerberg, L.R., Kohgo, Y., Lynch, M.P., Eueda, E.R. and Chung, D.C. (2005) Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nat Med*, 11, 992-997.

Nakaya, T., Cros, J., Park, M.S., Nakaya, Y., Zheng, H., Sagrera, A., Villar, E., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2001) Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J Virol*, 75, 11868-11873.

Noonberg, S.B. and Benz, C.C. (2000) Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs*, 59, 753-767.

Nord, K., Gunneriusson, E., Uhl inverted question mark, M. and Nygren, P.A. (2000) Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and taq DNA polymerase. *J Biotechnol*, 80, 45-54.

Roffler, S.P., Wang, S.M., Chern, J.W., Yeh, M.Y. and

Tung, E. (1991) Anti-neoplastic glucuronide prodrug treatment of human tumor cells targeted with a monoclonal antibody-enzyme conjugate. *Biochem Pharmacol*, 42, 2062-2065.

Boemer-Oberdorfer, A., Mundt, E., Mebatsion, T., Buchholz, U.J. and Mettenleiter, T.C. (1999) Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J Gen Virol*, 80 (Pt 11), 2987-2995.

Rowlinson-Busza, G., Bamias, A., Krausz, T. and Epenetos, A.A. (1992) Antibody guided enzyme nitrile therapy (Agent): in vitro cytotoxicity and in vivo tumor localisation. In Epenetos, a. (ed.), *Monoclonal Antibodies 2. Applications in Clinical Oncology*. Chapman and Hall, London, pp. 111-118.

Russell, S.J. (2002) FNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther*, 9, 961-966.

Salgaller, M.L. (2003) Technology evaluation: bevacizumab, Genentech/Roche. *Curr Opin Mol Ther*, 5, 657-667.

Schnell, M.J., Mebatsion, T. and Conzelmann, K.K. (1994) Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *Embo J*, 13, 4195-4203.

Schultz, U., Einderle, C., Sekellick, M.J., Marcus, F.I. and Staeheli, P. (1995) Recombinant chicken interferon

from *Escherichia coli* and transfected COS cells is biologically active. *Eur J Biochem.* 229:73-76.

Schwarz, H., Harlin, O., Ohnemus, A., Kaspers, B. and Staeheli, P. (2004) Synthesis of IFN-beta by virus-infected chicken embryo cells demonstrated with specific antisera and a new bioassay. *J Interferon Cytokine Res.* 24:179-184.

Sick, C., Schultz, U. and Staeheli, P. (1996) A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. *J Biol Chem.*, 271, 7635-7639.

Sinkovics, J.G. and Horvath, J.C. (2000) Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol*, 16, 1-15.

Skerra, A. (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 337-350.

Staeheli, P., Fuehler, F., Schneider, H., Gobel, T.W. and Kaspers, B. (2001)

Cytokines of birds: conserved functions--a largely different look. *J Interferon Cytokine Res.* 2001 21:993-1010.

Stojdl, D.F., Lichty, B.D., TenCever, B.P., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., Brown, E.G., Durbin, E.K., Durbin, J.E., Hiscott, J. and Bell, J.C. (2003) VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*, 4,

263-275.

Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10, 789-799.

Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. and Heldin, C.H. (1994) Different signal transduction properties of IDP and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 269, 26988-26995.

Wang, S.M., Chern, J.W., Yeh, M.Y., Ng, J.C., Tung, E. and Eoffler, S.P. (1992) Specific activation of glucuronide prodrugs by antibody-targeted enzyme conjugates for cancer therapy. *Cancer Res*, 52, 4484-4491.

Warren, E.S., Yuan, H., Matli, M.R., Gillett, H.A. and Ferrara, H. (1995) Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest*, 95, 1789-1797.

Zewe, M., Rybak, S.M., Dubel, S., Coy, J.F., Welschhof, M., Newton, D.L. and Little, M. (1997) Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic PNase immunofusion. *Immunotechnology*, 3, 127-136.

Zhao, H. and Peeters, B.P. (2003) Recombinant Newcastle disease virus as a viral vector: effect of genomic location of foreign gene on gene expression and

160

REIVINDICACIONES

1. Un virus a APN oncolítico recombinante de la enfermedad de Newcastle que comprende al menos un transgen que codifica una citoquina de aves, en donde el virus a APN oncolítico recombinante de la enfermedad de Newcastle se puede obtener a partir de un virus a APN de la enfermedad de Newcastle oncolítico velogénico o mesogénico.

2. El virus de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende al menos un transgen adicional que presenta actividad terapéutica cuando es expresado por una célula tumoral infectada con virus.

3. El virus de acuerdo con la reivindicación 2 donde dicho al menos un transgen adicional es parcialmente alogénico o singénico para el huésped.

4. El virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la patogenicidad del virus está reducida para una especie de ave.

5. El virus de la reivindicación 4, donde la patogenicidad del virus está reducida para una especie de ave con respecto al virus a partir del cual se puede obtener el virus recombinante.

6. El virus de la reivindicación 4 ó 5, donde la especie de ave se selecciona entre aves de corral.

7. El virus de cualquiera de las reivindicaciones 4

a 6, donde la especie de ave comprende pollos.

8. El virus de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que es un patógeno de aves, en particular un patógeno de aves de corral, más particularmente un patógeno de pollos.

9. El virus de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que se puede obtener a partir de la cepa mesogénica MTH68.

10. El virus de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho al menos un transgen adicional codifica una proteína de unión que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus.

11. El virus de acuerdo con la reivindicación 10, donde la proteína de unión se selecciona del siguiente grupo que consiste de un ligando natural, un ligando genéticamente modificado, un dominio recombinante soluble de un receptor natural y una versión modificada del mismo, un ligando peptídico, un ligando polipeptídico, una molécula de anticuerpo y fragmentos y derivados de la misma, y una molécula tipo anticuerpo como una proteína de repetición de anquirina y fragmentos y derivados de la misma.

12. El virus de acuerdo con las reivindicaciones 10 ó

11, donde la proteína de unión es de origen mamífero, por ejemplo humano, murino o estrechamente relacionado o una proteína quimérica.

13. El virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde la proteína de unión es una proteína monomérica, dimérica, trimérica, tetramérica o multimérica.

14. El virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, donde la proteína de unión es monoespecífica, biespecífica o multiespecífica.

15. El virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, donde la proteína de unión es una proteína de fusión que comprende al menos un dominio de unión y al menos un dominio heterólogo.

16. El virus de acuerdo con la reivindicación 15, donde la proteína de unión es una proteína de fusión que comprende una toxina tal como la EHAa humana (exotoxina de *Pseudomonas*, toxina de la difteria) o una proteína de fusión que comprende una enzima tal como beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, carboxipeptidasa, beta-lactamasa o una proteína de fusión que comprende una proteína estimulante del sistema inmune con actividad citoquina, tal como IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN-beta o GM-CSF.

163

17. El virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, donde la proteína de unión se selecciona del grupo que consiste de proteínas bloqueantes de los receptores de factores de crecimiento activos autónomos (por ejemplo, EGFR, Met), ligandos competitivos para factores de crecimiento (antagonistas), proteínas bloqueantes de la fosforilación Rb, proteínas bloqueantes de la transcripción dependiente de E2F; estabilizantes de p53; ligandos antagonistas de proteínas antiapoptóticas (por ejemplo, Bcl-2); ligandos antagonistas de ciclinas; ligandos antagonistas de efectores de Ras (por ejemplo, GEFs); ligandos antagonistas de proteínas producidas por hipoxia (por ejemplo, HIF1 α); inhibidores de factores de transcripción que interfieren con la dimerización, unión a ADN o/y unión a cofactores (por ejemplo, Myc/Max); inductores de diferenciación; inhibidores de la señalización/translocación de smad; inhibidores de las interacciones de adhesión celular (cadherinas, integrinas, por ejemplo, α 5 β 1, α v β 3); inhibidores de enzimas que degradan la matriz extracelular (por ejemplo, MMPs); ligandos antagonistas de ligandos proangiogénicos (por ejemplo, VEGF-R soluble); ligandos antagonistas de receptores proangiogénicos; inhibidores de la formación del complejo de andamiaje (por ejemplo, KSF/Ras); inhibidores del inicio

168

de la traducción (por ejemplo, eIF4E, EIF2a); e inhibidores de las quinasas mitóticas (por ejemplo, Plk-1).

18. El virus de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho al menos un transgen adicional codifica una enzima convertidora de prodrogas que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus.

19. El virus de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde dicho al menos un transgen adicional codifica una proteasa que presenta actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus.

20. El virus de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde dicho al menos un transgen que codifica una citoquina de aves se selecciona entre interferones de pollo.

21. El virus de la reivindicación 20, donde dicho al menos un transgen que codifica una citoquina de aves se selecciona entre interferones de tipo I de pollo.

22. El virus de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 21, donde la reducción de la patogenicidad es la capacidad del virus para reducir la lisis de las células de aves aproximadamente 48 hs después de la infección con un valor de MOI de 0,01 medido por incremento de la viabilidad celular, con lo cual la viabilidad celular aumenta entre al

16

menos un 25% aproximadamente, hasta aproximadamente un 50% de células sobrevivientes, más preferentemente entre al menos aproximadamente 50% hasta aproximadamente 75% de células sobrevivientes y más preferentemente entre al menos aproximadamente 75% hasta el 100% de células sobrevivientes con respecto al virus a partir del cual se puede obtener el virus recombinante.

23. El virus de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 21, donde la reducción de la patogenicidad es la prolongación del tiempo de sobrevida de embriones de pollo infectados con virus en huevos embrionados de 11 días de vida medida mediante determinación del tiempo promedio de muerte (MDT), con lo cual el MDT es prolongado en al menos aproximadamente 15 hs hasta aproximadamente 20 hs, más preferentemente en al menos aproximadamente 20 hs hasta aproximadamente 30 hs y más preferentemente en más de 30 hs en comparación con el virus a partir del cual se puede obtener el virus recombinante.

24. El virus de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, donde prácticamente no se reduce la actividad oncolítica del virus para las células tumorales humanas.

25. El virus de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, donde la actividad oncolítica del virus para las células tumorales humanas medida con la viabilidad celular

166

después de 48 hs de la infección no se reduzca en más de un 50% en comparación con el virus a partir del cual se puede obtener el virus recombinante y más preferentemente no se reduce esencialmente con respecto al virus a partir del cual se puede obtener el virus recombinante.

26. Una nucleocápside de un virus a APN oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-25.

27. Un genoma de un virus a APN oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-25.

28. Una molécula de ADN que codifica el genoma y/o antígenoma de un virus a APN oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-25.

29. La molécula de ADN de la reivindicación 27, ligada operativamente a una secuencia de control de la transcripción.

30. Una célula que comprende un virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, un genoma del virus de la reivindicación 27 y/o una molécula de ADN de la reivindicación 28 ó 29.

31. Una composición farmacéutica que comprende un virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, un genoma del virus de la reivindicación 27 y/o una molécula de ADN de la reivindicación 28 ó 29 como un ingrediente activo, opcio-

167

nalmente junto con vehículos, adyuvantes y/o diluyentes aceptables para uso farmacéutico.

32. La composición farmacéutica de la reivindicación 31 que además comprende una prodroga que se puede convertir en un compuesto terapéuticamente activo por la enzima convertidora de prodrogas codificada por dicho al menos un transgen adicional.

33. Un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, que comprende la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad eficaz para uso farmacéutico de un virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, el genoma del virus de la reivindicación 27 y/o una molécula de ADN de la reivindicación 28 ó 29.

34. El método de la reivindicación 33, que comprende administrarle una cantidad eficaz para uso farmacéutico a un sujeto que lo necesita

(i) un virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-25, un genoma del virus de la reivindicación 27 o/y una molécula de ADN de la reivindicación 28 ó 29 que comprende al menos un transgen que codifica una enzima convertidora de prodrogas y

(ii) una prodroga adecuada para el tratamiento de la enfermedad proliferativa en combinación con el virus, en

168

donde dicha prodroga se puede convertir en un compuesto farmacéuticamente activo por la enzima convertidora de prodrogas de (i).

35. El método de cualquiera de las reivindicaciones 33 a 34, donde el sujeto es un paciente humano.

36. Un virus a APN atenuado oncolítico recombinante para aves de corral, que comprende un ácido nucleico que comprende al menos un transgen que codifica una citoquina.

37. El virus de la reivindicación 36, atenuado para pollos.

LISTADO DE SECUENCIAS

169

<110> Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft

<120> Paramixovirus oncolíticos atenuados que codifican citoquinas de aves

<130> 53671AWO

<140> PCT/EP2009/000308

<141> 2009-01-20

<150> EP 08001643.9

<151> 2008-01-29

<150> US 61/024,333

<151> 2008-01-29

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 52

<212> ADN

<213> Virus de enfermedad de Newcastle

<400> 1
aggccttaat taaccgacaa ctttaagaaaa aatacgggta gaacgggctg ag
52

<210> 2

<211> 52

<212> ADN

<213> Virus de enfermedad de Newcastle

<400> 2
aggccgtttct acccgctatctt tttctttaagt tgtcggttaa ttaaggctc tc
52

<210> 3

<211> 36

<212> ADN

<213> Virus de enfermedad de Newcastle

<400> 3
ccttaattaa gccaccatgg ctgtgcctgc aagccc
36

<210> 4

<211> 32

<212> ADN

<213> Virus de enfermedad de Newcastle

<400> 4
ccttaattaa ctaagtgcgc gtgttgcttg tg
32

<210> 5

<211> 42

<212> ADN

<213> Virus de enfermedad de Newcastle

<400> 5
ccttaattaa cgcaccatga ctgcaaacca tcagtctcca gg
42

<210> 6

<211> 36

<212> ADN

<213> Virus de enfermedad de Newcastle

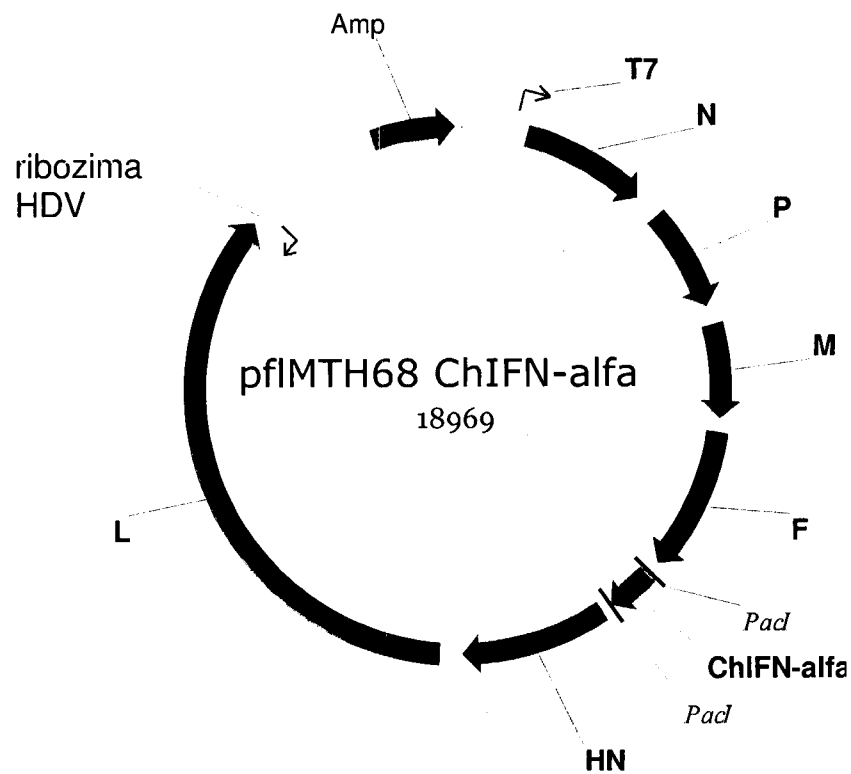
<400> 6
ccttaattaa tcactgggtg ttgagacgtt tggatg
36

170

171

Fig. 1:

plásmido pflMTH68 ChIFN-alfa



172

Fig. 2:

plásmido pflMTH68 ChIFN-beta

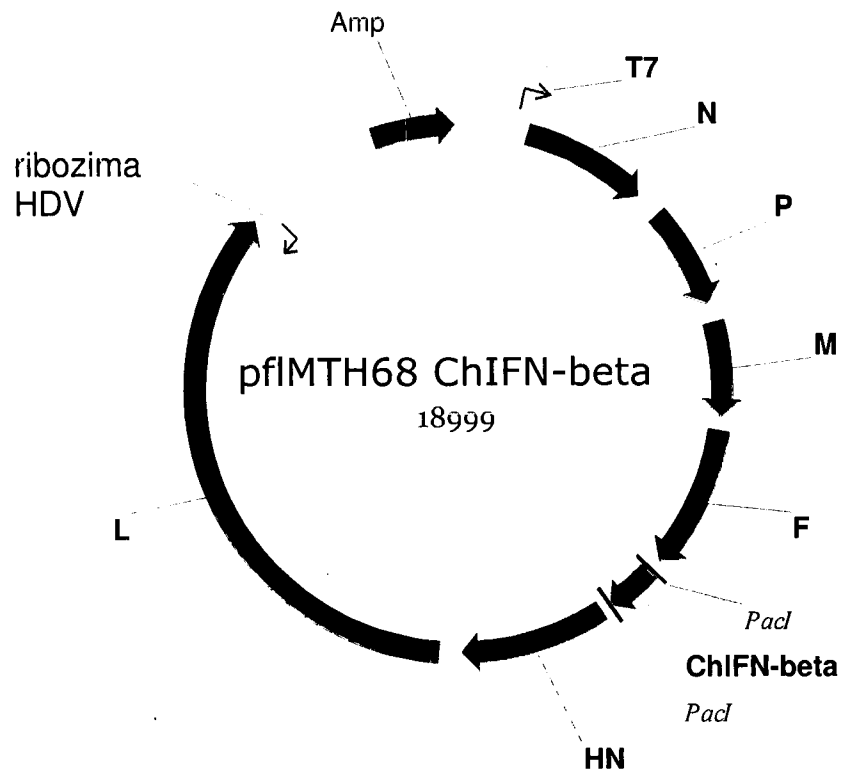


Fig. 3a

173

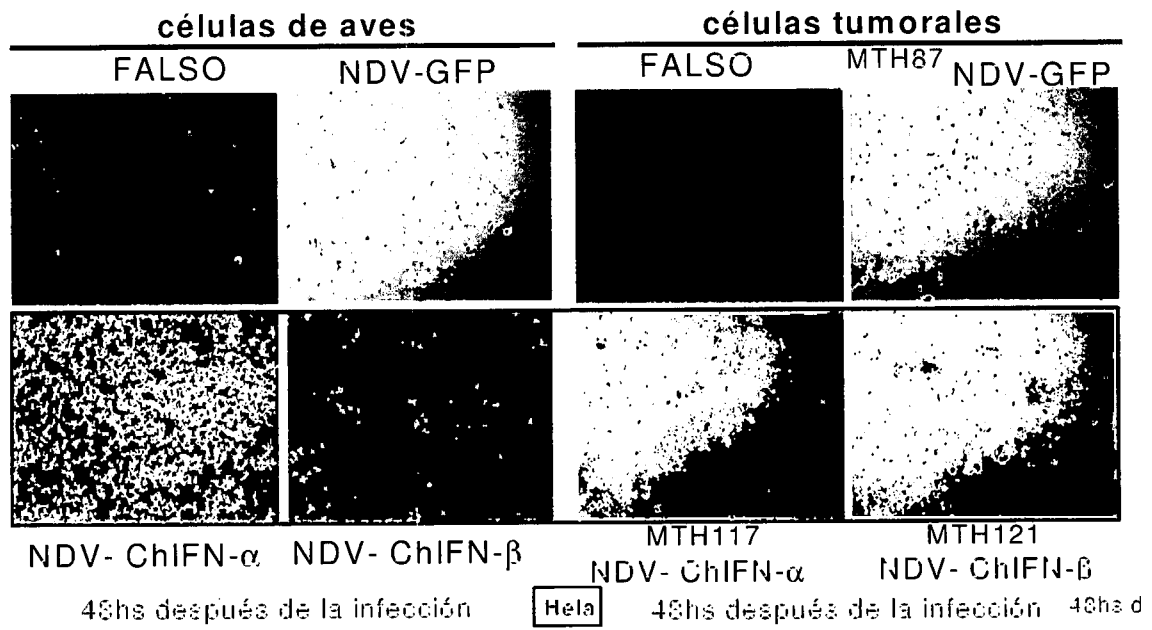
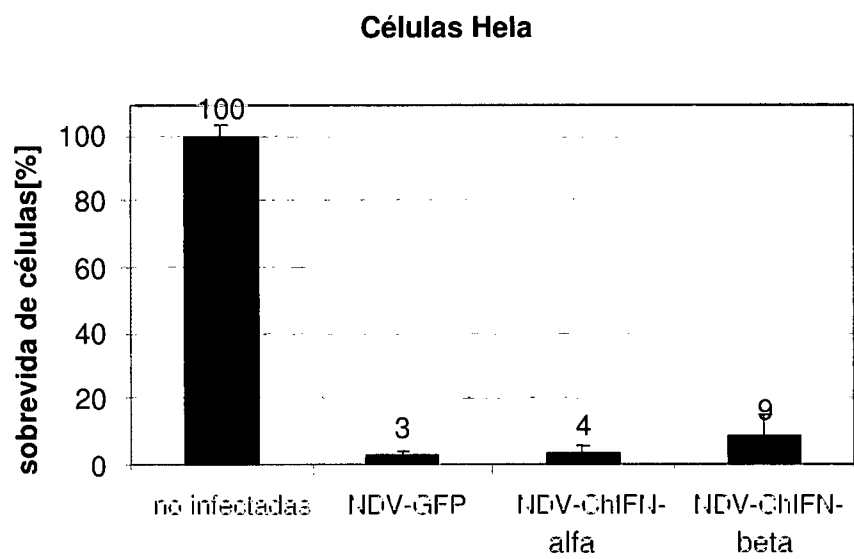
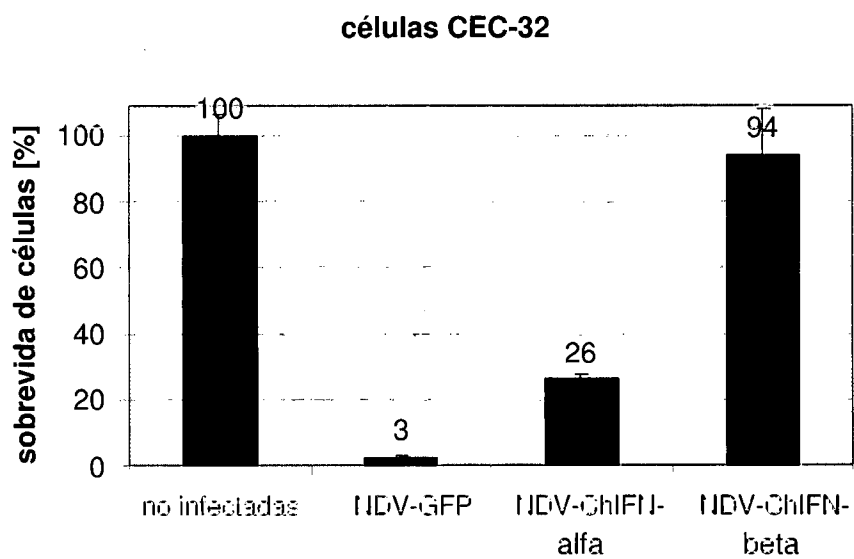


Fig. 3b

178



125

Fig. 4

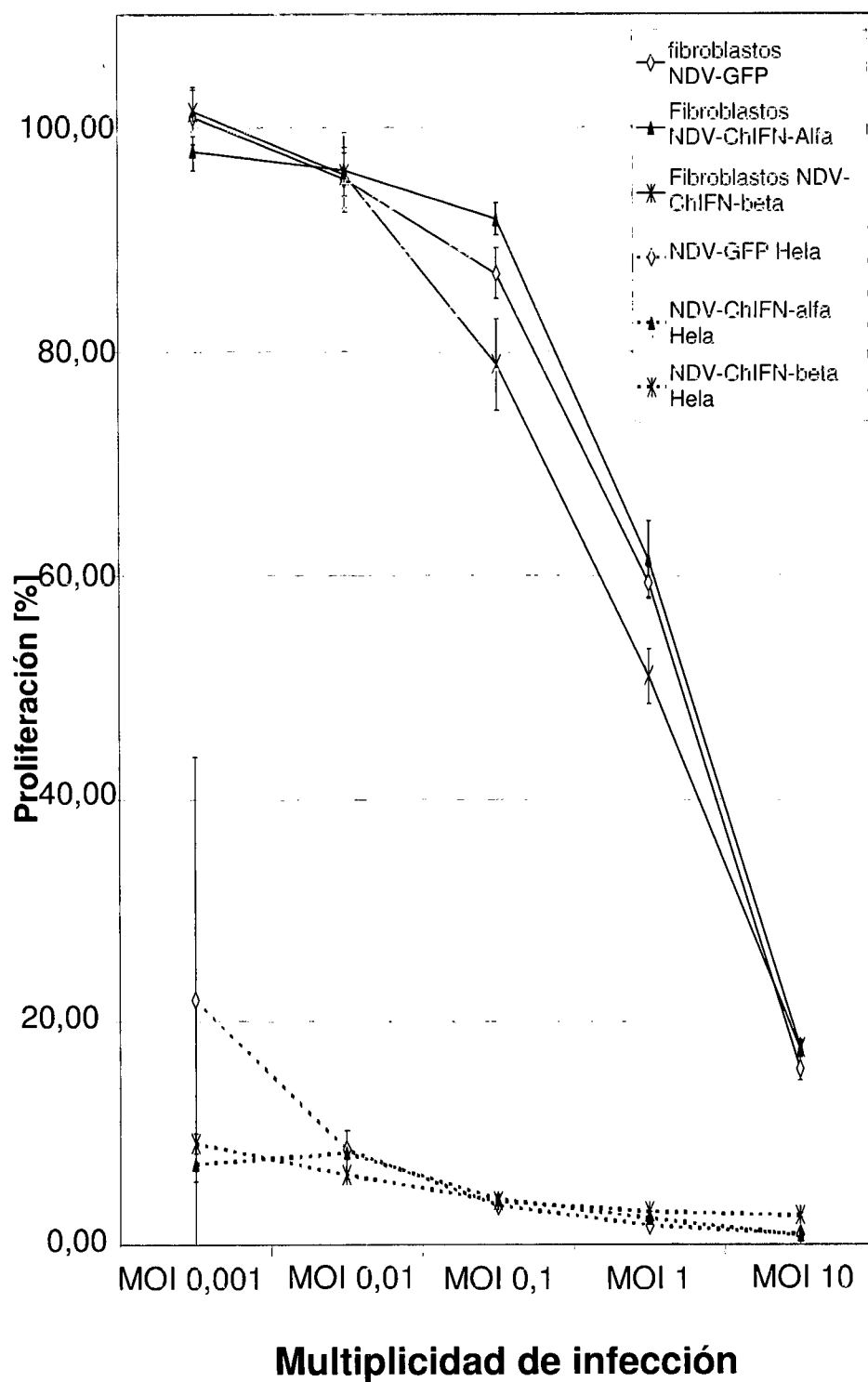


Fig. 5a

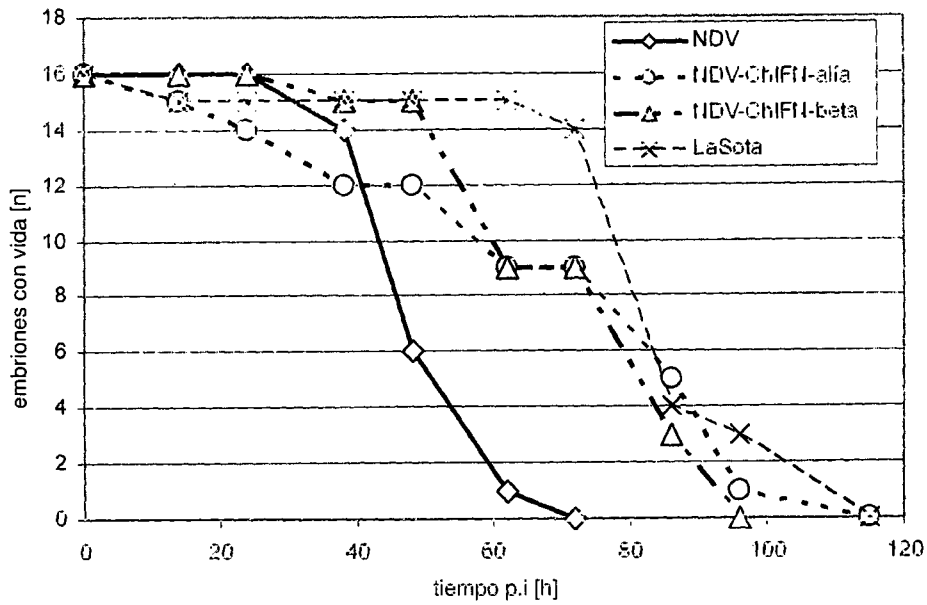
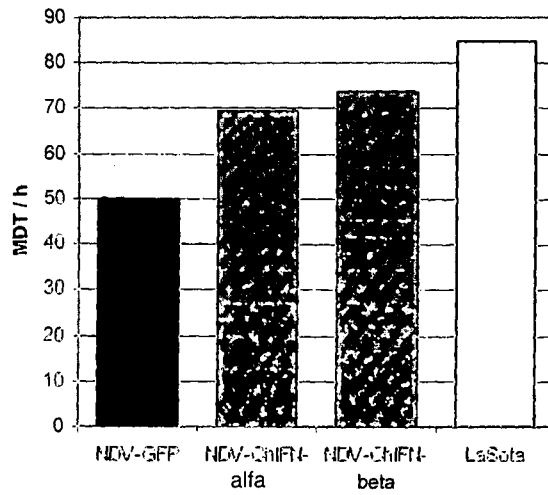


Fig. 5b



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference ESP53671-WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/EP2005/000303	International filing date (day/month/year) 20/01/2009	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 29/01/2008
Applicant BAYER SCHEERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT		

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the International application in the language in which it was filed
☐ a translation of the International application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.2(a) and 23.1(b))

b. ☐ This International search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(2)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 23.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this International search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 4
☐ as suggested by the applicant
☒ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2009/000308

12/20

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒

on paper

☒

in electronic form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☐

filed together with the international application in electronic form

☒

furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/000308

1701

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K35/76

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2003/224017 A1 (SAMAL SIBA K [US] ET AL) 4 December 2003 (2003-12-04) cited in the application the whole document	1-8, 22-31, 36, 37
X	WO 00/62735 A (PRO VIRUS INC [US]; ROBERTS MICHAEL S [US]; LORENCE ROBERT M [US]; GRO) 26 October 2000 (2000-10-26) sentence 7 - sentence 10	26, 36, 37
X	WO 2006/050984 A (SCHERING AG [DE]; BEIER RUDOLF [DE]; PUEHLER FLORIAN [DE]) 18 May 2006 (2006-05-18) the whole document	26, 36, 37
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

V document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

S document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 May 2009

Date of mailing of the international search report

18/05/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.O. 5016 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wimmer, Georg

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/000308

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LORENCE R M ET AL: "REPLICATION-COMPETENT, ONCOLYTIC NEWCASTLE DISEASE VIRUS FOR CANCER THERAPY" MONOGRAPHS IN VIROLOGY, KARGER, BASEL, CH, vol. 22, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 160-182, XP008051134 ISSN: 0077-0965 the whole document	26
A	MO C W ET AL: "THE IN VIVO AND IN VITRO EFFECTS OF CHICKEN INTERFERON ALPHA ON INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS AND NEWCASTLE DISEASE VIRUS INFECTION" AVIAN DISEASES, AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS, KENNET SQ., PA, US, vol. 45, no. 2, 1 April 2001 (2001-04-01), pages 389-399, XP008069611 ISSN: 0005-2086 the whole document	1-37

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/000308

86

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003224017	A1	04-12-2003	NONE
WO 0062735	A	26-10-2000	AU 4246900 A 02-11-2000
			CA 2370187 A1 26-10-2000
			CN 1477964 A 25-02-2004
			EP 1390046 A2 25-02-2004
			HU 0302278 A2 28-10-2003
			JP 2003530301 T 14-10-2003
			MX PA01010393 A 02-04-2004
			US 2009081161 A1 26-03-2009
WO 2006050984	A	18-05-2006	AU 2005303912 A1 18-05-2006
			BR PI0517834 A 21-10-2008
			CA 2585435 A1 18-05-2006
			CN 101056646 A 17-10-2007
			JP 2008519590 T 12-06-2008
			KR 20070085314 A 27-08-2007
			US 2008206201 A1 28-08-2008



No. 10-092654- -00000-0000

Fecha: 2010-07-29 17:05:21 Dep. 2020 DIR NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 181

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐