



PETITORIO



03 001369 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación 03001369 00000000 Folios 107 lón
Fecha (AND) 2003-01 10 17 02 17
Trámite 011 PCT PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

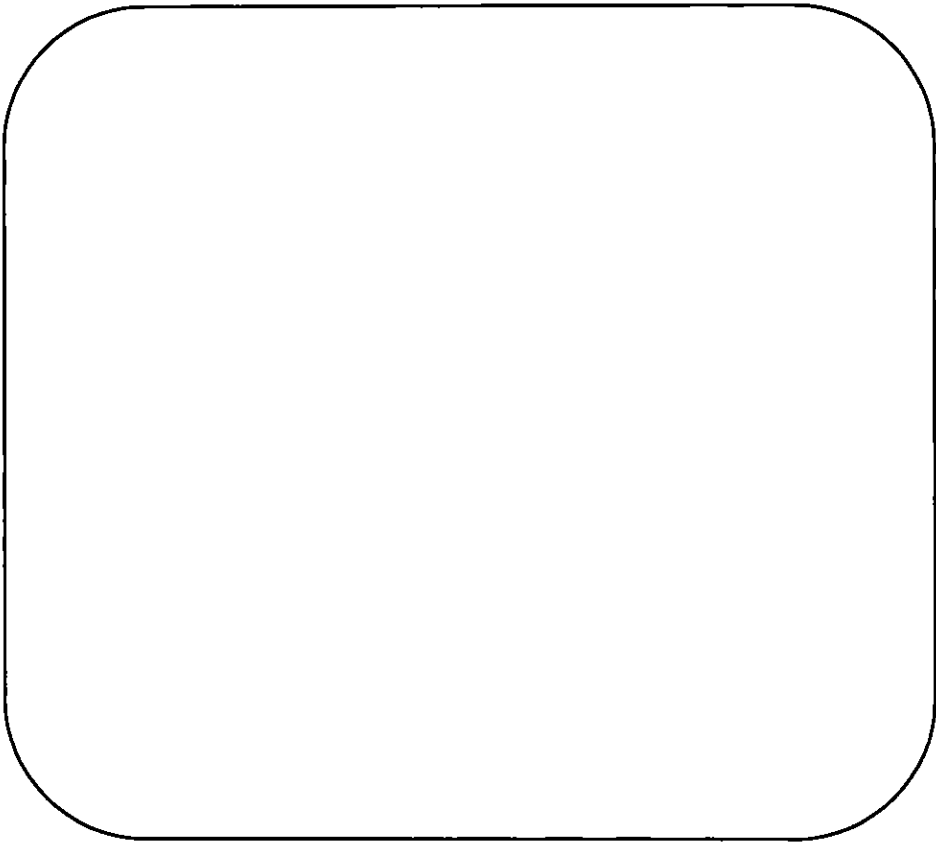
1 SOLICITUD DE			
☒ Patente de Invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☐ Capítulo I		☒ Capítulo II	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre BAYER AKTIENGESSELLSCHAFT sociedad constituida y existente bajo las leyes de Alemania Dirección 51368 Leverkusen Republica Federal de Alemania Domicilio Leverkusen Republica Federal de Alemania	IDENTIFICACION C C ☐ NIT ☐ C E ☐ Otro ☐ Cual _____ Numero _____	
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre EMILIO FERRERO Dirección Carrera 4ª No 72 35 Teléfono 347 36 11 Fax 217 92 11 E mail clientes@camyp.com Domicilio Bcgotá Colombia	IDENTIFICACION C C ☒ NIT ☐ C E ☐ Otro ☐ Cual _____ Numero 438 019 T P 31 929	
4 INVENTOR (ES) (72)	1 Olaf WEBER 539 Amity Road Woodbridge Connecticut 06525 Estados Unidos de América 3 Angela SIEGLING 7 rue Francois Bonvin F 75015 Paris Francia 5 Claudia HIRTH DIETRICH Stockmannsmühle 127 42115 Wuppertal Republica Federal de Alemania 2 Tobias SCHLAPP Gerstenkamp 10 51061 Köln Republica Federal de Alemania 4 Andreas KNORR Trillser Graben 10 40699 Erkrath Republica Federal de Alemania 6 Gudrun THIES Boeddinghausstr 13 42329 Wuppertal Republica Federal de Alemania		
5 PCT (86)	Solicitud Internacional No PCT/EP01/07991 Publicación Internacional No WO 02/004002 A2		Fecha 11 de julio de 2001 Fecha 17 de enero de 2002
6 Título (54)	USO DE CEPAS DEL PARAPOXVIRUS OVIS PARA LA FABRICACION DE MEDICAMENTOS ANTIVIRALES Y MEDICAMENTOS CONTRA EL CANCER		
7 Clasificación Internacional (51)	A61K 35/76		
8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Numero de Solicitud
SI ☒ NO ☐	DE DE	11 de julio de 2000 9 de mayo de 2001	100 33 582 9 101 22 451 6

9 Comprobante de pago No 03 107 Fecha 2 de enero de 2003

10 Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 400 000 oo
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes si fuere el caso
- ☐ 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 efectuado por la IPEA
- ☐ Traducción del examen preliminar 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 12x12
- ☐ 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
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE EMILIO FERRERO

FIRMA 
C C 438 019 de Usaquén T P 31 929

 MRE/mrm Id 1207

4
0698
6028

CONSULADO DE COLOMBIA

CERTIFICACION

No 145

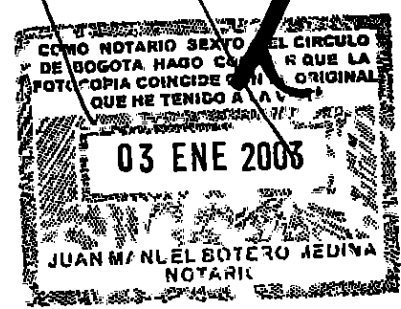
Bonn, 8 de agosto de 1996

El suscrito Segundo Secretario Encargado de las Funciones Consulares de Colombia en Bonn, vistos los documentos presentados por los interesados, CERTIFICA Que el señor Dirk Heiderhoff quien como Notario en Leverkusen autentico la firma de los signatarios DR ROLF BRAUN y DR JOACHIM GREMM del documento precedente, ejercian en la fecha las funciones indicadas y su firma corresponde a la registrada en este Consulado que la empresa BAYER AKTIENGESSELLSCHAFT está constituida de acuerdo con las leyes de la Republica Federal de Alemania y cumple su objeto conforme a las mismas según el Registro Comercial HRB 1122 del Tribunal de Primera Instancia de Leverkusen que los señores BRAUN y GREMM, quienes firmaron el documento precedente, son los representantes legales de la empresa arriba mencionada

El suscrito Segundo Secretario Encargado de las Funciones Consulares no asume responsabilidad alguna por el contenido del documento

Pagado el impuesto de timbre
y derechos consulares
Valor US\$106,00 = DM\$169,60

JUAN PABLO GONZALEZ
Segundo Secretario
Encargado de las Funciones Consulares



Handwritten signature/initials

Handwritten signatures and stamps at the bottom of the page, including 'LAS FUNCIONES CONSULARES' and 'NO SE ASUME RESPONSABILIDAD'.

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4ª N° 72-35

BOGOTÁ COLOMBIA

REPRESENTACION Y PODER

For patents utility models industrial designs
trademarks commercial names trade emblems
slogans

Para patentes modelos de utilidad diseños
industriales marcas de fábrica nombres
comerciales enseñanzas lemas comerciales

REPRESENTATION AND
POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned/Yo (nosotros) abajo firmado (s)

BAYER AKTIENGESellschaft

of/domiciliado (s) en D-51368 Leverkusen,
GERMANY,

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER tpa 832, GONZALO PERDOMO tpa 831, EMILIO FERRERO tpa 31929 y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ tpa 23555 domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35 Bogotá Colombia en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio el primero como principal y los demás como suplentes en su orden como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquel. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero o el tercero al segundo. En tales casos el representante principal o el primero o segundo suplente en su caso o ambos declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia o por Notario u otro Funcionario Público o Consul de Colombia en el extranjero y si se tratare de impedimento con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente el siguiente tomará su lugar. Cuando cesar la ausencia o impedimento del representante principal o de su primero o segundo suplentes en su caso podrán ejercer la representación en su orden uno u otros según el caso asumiéndola por el solo hecho de ejercerla cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero segundo o tercer suplente en su caso.

Además confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo contencioso-administrativo y judicial así como los tribunales de arbitramento en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales, el registro de marcas de fábrica colectivas defensivas de servicio lemas comerciales nombres comerciales enseñanzas variedades vegetales y denominaciones de origen su renovación traspaso cambio de nombre o domicilio cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos. b) Las acciones de competencia desleal protección del consumidor oposiciones u observaciones cancelación administrativa y judicial nulidad medidas cautelares concesión de licencias la tutela la protección de secretos industriales y en general los juicios civiles penales administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados puedan su u se transigir transigir conciliar admitir los hechos del proceso desistir cancelar recibir renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st of article 543 of the Commercial Code do hereby appoint GERMAN CAVELIER tpa 832 GONZALO PERDOMO tpa 831 EMILIO FERRERO tpa 31929 and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ tpa 23555 domiciled at Carrera 4ª N° 72-35 Bogotá Colombia the first as principal and the others as alternates in the order of their appointment as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one or when the third is to replace the first or second alternates in their turn or both of them second. In such cases the principal representative or the first or second alternates in their turn or both of them shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad and in case of impediment the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative or of the first or second alternate in their turn ceases the representation can be taken again in their sequence by the principal the first or second alternate depending on case and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys-at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons with or without jurisdiction specially those administrative administrative contentious and judicial as well as before Arbitration Court in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents utility models and industrial designs the registration of trademarks collective defensive and service marks slogans commercial names trade emblems vegetal varieties and denominations of origin its renewal assignment change of name or domicile voluntary cancellation and the registration of licenses of use of the above rights. b) Actions of unfair competition protection to the consumer oppositions or observations administrative or Court cancellation nullity infringement of trade secrets the action to writ mandamus the protection of trade secrets and in general the civil penal and administrative suits relating to those rights actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney by their own act of the act of the said attorneys-at law desist cancel receive resign and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy

31st July 1996

in/en Leverkusen

BAYER AKTIENGESellschaft

Signature

Firma

© CAVELIER ABOGADOS

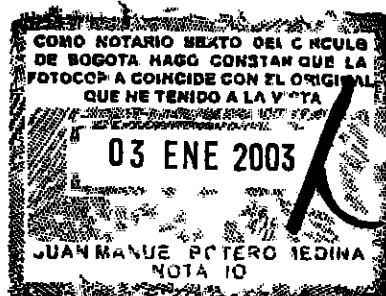
WPODERE 1 (MINUTA) 121125

LEGALIZACION

El Señor Consul de Colombia debe expedir un *certificado consular* sobre (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder (2) que ésta ejerce su objeto social y (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo. A este efecto les solicitamos que muestren al Señor Consul las pruebas que acreditan esos hechos (1) (2) y (3).

LEGALIZATION

The Colombia Consul must issue a *consular certificate* the legal existence of the company which is the Power of Attorney (2) that it is in actual exercise of company purposes and (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so. To this effect, show the Consul the evidence to prove the above facts and (3).



NOTA PARA EL SEÑOR CONSUL DE COLOMBIA Según los artículos 65 del C de P C y 480 del C de Co
l poderdante es una sociedad el Señor Consul debe certificar que tuvo a la vista las pruebas de su
encargado que ejerce su objeto social y que quien confiere el poder es su representante

o. zila. ce si
dany which 6 a
n actual exe cise
persons who a ec
u To this effec
the above facts

CRNr 799/1996

Ich beglaubige die vor mir vollzogenen Unterschriften der Herren

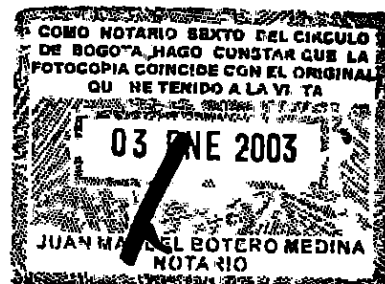
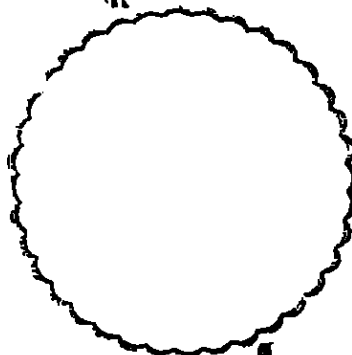
- 1 Dr Rolf Braun geschäftsansässig in D 51368
Leverkuseu, Bayerwerk,
- 2 Dr Joachim Gremm , geschäftsansässig in D 51368
Leverkuseu, Bayerwerk,

- persönlich bekannt -

Ich bescheinige aufgrund Einsicht vom heutigen Tage in das Handelsregister des Amtsgerichts Leverkusen - HRB 1122 -, daß die genannten Herren berechtigt sind, die Bayer Aktiengesellschaft in Leverkusen als Prokuristen gemeinschaftlich zu vertreten

Leverkuseu den 31 Juli 1996

H. L. ...
Notar

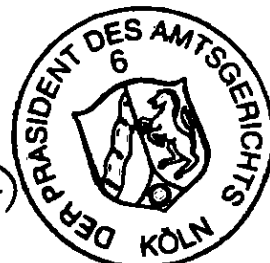


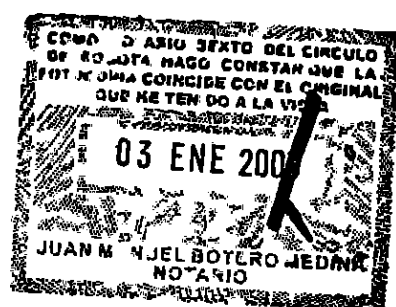
Die Echtheit der vorstehenden Unterschrift des Notars *J. L. ...* in Leverkusen sowie die Echtheit des beigebrachten Dienstzeichens siehe als we den Vermit bestätigt. Zugleich wird bescheinigt daß der Notar zur Vornahme der Amtshandlung befugt war.

Köln, des 02 Aug 1996

Der Präsident des Landgerichts

R. Wohrlich
(Dr. Wohrlich)





7

1

TRADUCCION OFICIAL No 5424

de un documento escrito en Alemán, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente -

(A continuación de la representación y poder conferido a GERMAN CAVELIER, tpa 832, GONZALO PERDOMO, tpa 831, EMILIO FERRERO tpa, 31929, y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555, domiciliados en la Carrera 4 No 72-35, Bogotá Colombia, el 31 de julio de 1996 por los señores Dr Rolf Braun y Dr Joachim Gremm, apoderados de la Bayer Aktiengesellschaft Leverkusen, PFA)

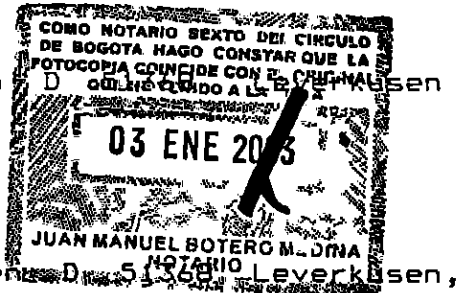
Protocolo notarial 1799/1996

Certifico la autenticidad de las firmas puestas ante mí por los señores

1 Dr Rolf Braun, domiciliado en
Bayerwerk

2 Dr Joachim Gremm, domiciliado en
Bayerwerk

- a quienes conozco en persona-



Certifico por haber tenido a la vista el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Leverkusen - HRB 1122 - que los señores mencionados están facultados en su calidad de apoderados, para representar conjuntamente a la Bayer Aktiengesellschaft domiciliada en Leverkusen

Leverkusen, 31 de julio de 1996

Fdo firma ilegible

Notario

(Hilo y oblea notarial en relieve)

Dirke Heiderhoff - Notario de Leverkusen

(corso)

Se certifica la autenticidad de la firma antecedente del notario de Leverkusen, Dirke Heiderhoff, y la del sello oficial que la acompaña. Igualmente se certifica que el mencionado notario estaba facultado para realizar ese acto oficial

Colonia, 02 de agosto de 1996

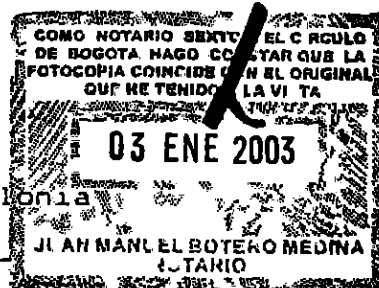
El Presidente del Juzgado Municipal

Fdo firma ilegible

(Dr Wohlmich)

(sello redondo en tinata)

El Presidente del Juzgado Municipal de Colonia



EN ESPAÑOL La legalización de las firmas antecedentes por el
Consulado de Colombia en Bonn bajo el No 145 del 08 de agosto de
1996 y por el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia
bajo el No 198692 del 23 de agosto de 1996

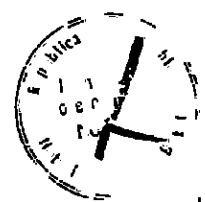
Pagados Impuesto de timbre y derechos consulares US\$ 106,--

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los
archivos de estas oficinas para su confrontación

Santafé de Bogotá, 2 de septiembre de 1996

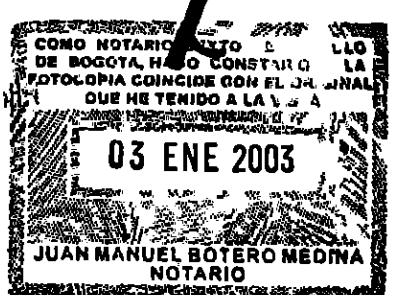
CUMPLIENDO CON LO EXIGIDO POR LA LEY DE NOTARÍA DE SANTAFÉ DE BOGOTÁ
HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE _____
COINCIDE CON LA REGISTRADA POR EL ()
EN ESTA NOTARÍA
09 SET 1996
SANTAFÉ DE BOGOTÁ D.C.

Fernando Arce



[Handwritten signature]
F. E. S. L. A. C. A.

[Handwritten notes and numbers]
363337
52512121



CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4 N 72 35
BOGOTA 8 COLOMBIA

CORR O E EC RON CO MUNDA CAVE
TE ONO 57 2 20100

T A 571 2358850
C B S CAVELEYES
TE EX 45479

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E S D

Poderdante BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

Poder conferido el 31-07-96

Yo GERMAN CAVELIER obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO Abogado con Tarjeta Profesional No 31 929 con todas las facultades que me fueron conferidas

Hago la anterior su titucion conforme al articulo 66 del Codigo de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento

Señor Jefe

GERMAN CAVELIER

T P A No 832

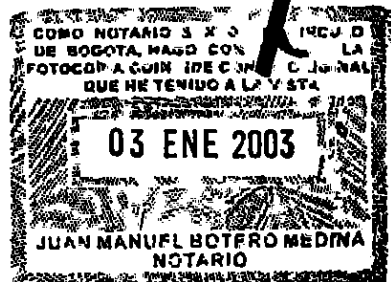
C C No 2 877 924 de Bogota

Acepto

EMILIO FERRERO

T P A No 31 929

C C No 438 019 de Usaquen



2e-780-2

NOTARIA DE ROGOTA
PECO
S L C R
An
NOT
Co

08 SET 1908

[Signature]

[Signature]

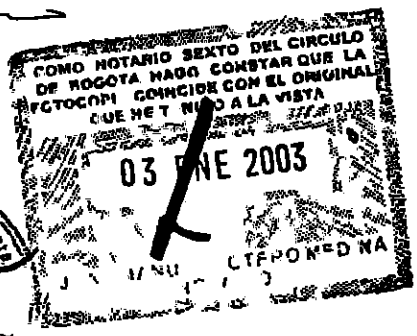
que e' *[Signature]*

y la(s) *[Signature]*

[Signature] *[Signature]*

[Signature]

[Signature]



(1.) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17 Januar 2002 (17 01 2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/04002 A2 nct JS

- (51) Internationale Patentklassifikation A61K 35/76 (74) Gemeinsamer Vertreter BAYER AKTIENGESELLSCHAFT 51368 Leverkusen (DE)
- (21) Internationales Aktenzeichen PCT/EP01/07991
- (81) Bestimmungsstaaten (national) AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
- (22) Internationales Anmeldedatum
11 Juli 2001 (11 07 2001)
- (75) Einreichungssprache Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität
100 53 587 9 11 Juli 2000 (11 07 2000) DE
101 2 451 6 9 Mai 2001 (09 05 2001) DL
- (84) Bestimmungsstaaten (regional) ARIPO Patent (GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW) eurasisches Patent (AM A7 BY KG KZ MD RU TJ TM) europäisches Patent (AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR) OAPI Patent (BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG)
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US) BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE] 51368 Leverkusen (DE)
- (72) Erfinder und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) WEBER Olaf [DE/US] 539 Amity Road Woodbridge CT 06525 (US) SCHLAPP Tobias [DL/DE] Gerstenkamp 10 51061 Köln (DE) SIEGLING Angela [DE/FR] 7 rue Francois Bonvin F 75015 Paris (FR) KNORR Andrea [DE/DE] Trilser Graben 10 40699 Erkrath (DE) HIRTH DIETRICH Claudia [DE/DE] Stockmannstrühe 1-7 42115 Wuppertal (DL) THEISS Gudrun [DE/DE] Boeddinghauser 13 42549 Wuppertal (DL)
- Veröffentlicht
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen (Guidance Notes on Codes and Abbreviations) am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT Gazette verwiesen

6A 34376

(54) Title USE OF STRAINS OF THE PARAPOX OVIS VIRUS FOR PRODUCING ANTIVIRAL PHARMACEUTICALS AND ANTICANCER PHARMACEUTICALS

(54) Bezeichnung VERWENDUNG VON STÄMMEN DES PARAPOXVIRUS OVIS ZUR HERSTELLUNG VON ANTIVIRALEN ARZNEIMITTELEN UND ARZNEIMITTELEN GEGEN KREBS

(57) Abstract The invention relates to the use of strains of the parapox ovis virus as immune therapeutics for infectious or non infectious immune weaknesses as well as the use of strains of said virus for treating tumour diseases and viral infections. The invention also relates to the use of strains of the parapox ovis virus for producing pharmaceuticals for both humans and animals

(57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Stämmen des Parapoxvirus ovis als Immuntherapeutikum bei Immunschwächen infektiöser oder nicht infektiöser Natur sowie die Verwendung von Stämmen des Parapoxvirus ovis zur Behandlung von Tumorerkrankungen viralen Infektionen und damit einhergehenden Erkrankungen sowie die Verwendung von Stämmen des Parapoxvirus ovis für die Herstellung von Arzneimitteln zur Anwendung bei Mensch und Tier

WO 02/04002 A2

Verwendung von Stämmen des Parapoxvirus ovis zur Herstellung von anti-
viralen Arzneimitteln und Arzneimitteln gegen Krebs

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Stämmen des Parapoxvirus
5 ovis als Immuntherapeutikum bei Immunschwächen infektiöser oder nicht infektiöser
Natur, sowie die Verwendung von Stämmen des Parapoxvirus ovis zur Behandlung
von Tumorerkrankungen, viralen Infektionen und damit einhergehenden Erkrankun-
gen sowie die Verwendung von Stämmen des Parapoxvirus ovis für die Herstellung
von Arzneimitteln zur Anwendung bei Mensch und Tier

10

Die vorliegende Erfindung betrifft weiter die Verwendung von Stämmen des Para-
poxvirus ovis und daraus hergestellter Arzneiformen als Immuntherapeutika oder
Immunprophylaktika, bei der Stressmetaphylaxe zur Verhinderung oder Vorbeugung
von Infektionskrankheiten nach Stress (z.B. Operationen) die Verwendung bei der
15 Infektionsprophylaxe zur Verhinderung oder Vorbeugung von Infektionskrankheiten
durch die Gabe vor Operationen oder Eingriffen (z.B. vor Implantation von Prothe-
sen oder vor zahnärztlichen Eingriffen) die Verwendung bei der Infektionsmeta-
phylaxe oder Therapie akuter oder chronischer viraler Infektionen beispielsweise des
Respirationstraktes der Papillomvirusinfektionen der Infektion mit Herpesviren der
20 HIV Infektion der Virusinfektion innerer Organe wie beispielsweise der Infektion
mit Hepatitisviren die Verwendung bei der Wundheilung zur Beschleunigung von
Wundheilungsprozessen und die Verwendung zur Unterstützung der Heilung
schlecht oder nicht heilender Wunden (z.B. Ulcus cruris) die Verwendung bei Er-
krankungen wie Multipler Sklerose Asthma Warzen und anderer Neubildungen der
25 Haut die Verwendung bei Erkrankungen des allergischen Formenkreises die Ver-
wendung zur Verhinderung des Ausbruchs systemischer Allergien sowie die Ver-
wendung bei topischen Allergien und die Verwendung zur Verbesserung des Wohl-
befindens z.B. im Alter wobei im Rahmen der Erfindung als Stämme von Parapox-
virus ovis die Stämme NZ2 NZ 7 NZ 10 und orf 11 verwendet werden

30

Verwendet werden können weiter durch Passagierung und/oder Adaptation an bestimmte Zellen beispielsweise WI 38, MRC-5 oder Vero Zellen erhaltene Abkömmlinge dieser Stämme bzw Teile oder Bruchstücke von Viren dieser Stämme oder diesen Abkömmlingen. Unter Teilen sind mittels geeigneter Vektoren beispielsweise Vaccinia, in geeigneten Systemen beispielsweise Fibroblastenzellkulturen exprimierte genomische oder subgenomische Fragmente zu verstehen. Unter Bruchstücken versteht man die durch biochemische Aufreinigung beispielsweise durch Chromatografie erhaltenen Fraktionen physikalisch beispielsweise durch Einwirkung von Ultraschall aufgeschlossener Partikel.

10

Die vorliegende Erfindung betrifft weiter die Verwendung besagter Stämme von Parapoxvirus ovis zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen. Darüber hinaus betrifft die Erfindung die Verwendung besagter Stämme von Parapoxvirus ovis in Kombination mit anderen Mitteln zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen zur antiviralen oder Krebstherapie.

15

Es ist bekannt, dass latente und chronisch persistente virale Infektionen durch eine Immunsuppression aktiviert bzw reaktiviert werden können oder umgekehrt dass das Immunsystem die akute Erkrankung die durch ein Virus das latent ist hervorgerufen werden kann unterdrückt (z.B. rekurriert eine latente Herpesvirus Infektion bei Immunsuppression Lippenblaschen bei Stress oder Kortisongabe). Es ist weiter bekannt, dass chronisch persistente und latente virale Infektionen schwer oder gar nicht mit herkömmlichen antiviralen Substanzen auf niedermolekularer Basis therapierbar sind.

20

25

Ein Grund dafür kann die fehlende virale enzymatische Aktivität bei solchen Infektionen sein (beispielsweise das Fehlen einer viralen Polymerase Aktivität die einen nukleosidischen Inhibitor erst in die virale Nukleinsäure einbauen muss damit dieser z.B. zum Kettenabbruch in der viralen DNA führen kann beispielsweise das Fehlen einer viralen Thymidinkinase Aktivität die z.B. eine antivirale Verbindung erst phosphorylieren muss damit diese aktiv werden kann) oder aber die fehlende Erken-

30

13
nung infizierter oder entarteter Zellen z.B. Krebszellen oder viraler Antigene durch das Immunsystem des Wirtes

5 Bekannt ist ebenfalls, dass bei chronisch persistierenden viralen Infektionen eine Superinfektion mit einem anderen Virus zu antiviralen gegen das chronisch persistierende Virus gerichteten Effekten führen kann.¹⁾ Die Abhängigkeit dieses Effektes von Interferonen wie IFN- γ und TNF α , die von T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Makrophagen sezerniert werden, konnte von den Autoren¹⁾ gezeigt werden.

10 Die Ergebnisse dieser Autoren bestätigte eine andere frühere Studie, in der gezeigt wurde, dass Class I restringierte cytotoxische T-Zellen die hepatozelluläre HBV Genexpression in HBV-transgenen Mäusen hemmen konnten, dass dieser Prozess ohne Zerstörung der Leberzellen ablief und dass der Prozess durch TNF- α und IFN γ hervorgerufen wurde.²⁾

15 In der tiermedizinischen Praxis wird seit längerer Zeit ein Produkt zur Induktion paraspezifischer Immunität, ein sogenannter Paramunitätsinducer, therapeutisch, prophylaktisch und präventiv eingesetzt. Paramunitätsinducer bestehen z.B. aus chemisch inaktiviertem Parapoxvirus ovis Strain D 1701 (DE 3 504 940). Ein auf der Basis dieses Virus (Parapoxvirus ovis Strain D 1701) hergestelltes Produkt ist BAYPAMUN®.

20 Das inaktivierte Parapoxvirus induziert im Tier einen unspezifischen Schutz gegen über Infektionen mit den verschiedensten Erregern. Man nimmt an, dass dieser Schutz über verschiedene Mechanismen des organismus-eigenen Abwehrsystems vermittelt wird.

30 Zu diesen Mechanismen zählen die Induktion von Interferon, die Aktivierung der natürlichen Killerzellen, die Induktion der Kolonien-Stimulierenden Aktivität (CSA) sowie die Stimulierung der Lymphozytenproliferation. Frühere Untersuchun

gen zum Wirkmechanismus zeigten die Stimulation von Interleukin 2 und Interferon α ³⁾

5 Vor diesem Hintergrund stellt sich daher die Aufgabe die therapeutische Nutzbarkeit der ausgezeichneten Wirkung von Parapoxvirus ovis dahingehend weiter zu verbessern dass die oben beschriebene generalisierte sogenannte Induktion einer paraspezifischen Immunantwort des Parapoxvirus ovis, Stamm D 1701 qualitativ erhöht und dahingehend verbessert wird, dass durch Einsatz geringerer Dosen bessere antivirale oder anti Tumorstörungen erzielt werden können Dies ließe zusätzlich einen nebenwirkungsärmeren therapeutischen Effekt erwarten

15 Aufgabe der Erfindung war es deshalb, die immunologische Wirkung des Parapoxvirus zu verbessern. Die Aufgabe wird gelöst durch Verwendung der oben genannten Stämme von Parapoxvirus ovis anstelle des herkömmlich verwendeten Strain D 1701

20 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Viren die taxonomisch zu einem der Stämme NZ2 NZ 7 NZ-10 oder orf-11 von Parapoxvirus ovis gehören, zur Herstellung von Arzneimitteln gegen virale Infektionen und Krebs bei Mensch und Tier

25 Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von durch Passagierung oder Adaptation an geeigneten Zellsystemen wie beispielsweise humanen Zellen wie WI-38, MRC 5 Affenzellen zB Vero Zellen bovine Zellen wie zB BK-K13A47/Reg oder MDBK und ovinen Zellen wie MDOK erhaltenen Abkömmlingen der erfindungsgemäßen Stämme zur Herstellung von Arzneimitteln gegen virale Infektionen und Krebs bei Mensch und Tier zum Gegenstand hat, und weiter die Verwendung von Teilen oder Bruchstücken der genannten Stämme und ihrer Passagierungs und Adaptationsvarianten wobei unter Teilen mittels geeigneter

30 Vektoren wie Vacciniaviren in geeigneten Systemen wie Fibroblastenzellkulturen exprimierte genomische oder subgenomische Fragmente und unter Bruchstücken die

durch biochemische Aufreinigung wie Chromatografie erhaltenen Fraktionen der exprimierten oder physikalisch aufgeschlossenen viralen Partikel zu verstehen sind, zur Herstellung von Arzneimitteln gegen virale Infektionen und Krebs bei Mensch und Tier zum Gegenstand hat und weiter die Verwendung von einem der Stämme von Parapoxvirus ovis und wie vorstehend beschrieben abgeleiteten Derivate zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen als Immuntherapeutika oder Immunprophylaktika bei Autoimmunerkrankungen und bei akuten und chronischen viralen Infektionen des Respirationstraktes und der inneren Organe zum Gegenstand hat und weiter die Verwendung von einem der Stämme und abgeleiteten Derivate zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen für die Stressmetaphylaxe und zur Verhinderung oder Vorbeugung von Infektionskrankheiten nach Stress sowie bei der Infektionsprophylaxe im Rahmen von Operationen und zahnärztlichen Eingriffen zum Gegenstand hat und weiter die Verwendung von einem der Stämme und abgeleiteten Derivate zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen für die Verwendung bei der Infektionsmetaphylaxe oder Therapie akuter und chronischer viraler Infektionen beispielsweise des Respirationstraktes der Papillomvirusinfektionen der Infektion mit Viren der Herpesgruppe, der HIV-Infektion, der Virusinfektion innerer Organe wie beispielsweise der Infektion mit Hepatitisviren sowie die Verwendung bei Erkrankungen wie Multipler Sklerose Asthma Warzen und anderer Neubildungen der Haut zum Gegenstand hat und weiter die Verwendung von einem der Stämme und abgeleiteter Derivate zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen für die Verwendung an Wunden zur Beschleunigung von Wundheilungsprozessen und die Verwendung zur Unterstützung der Heilung schlecht oder nicht heilender Wunden und Ulcus cruris zum Gegenstand hat und weiter die Verwendung von einem der Stämme und abgeleiteter Derivate zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen für die Verwendung bei Erkrankungen des allergischen Formenkreises Psoriasis Neuroderemitis anderen Autoimmunerkrankungen wie z B Lupus erythematodes sowie zur Verbesserung des Wohlbefindens z B im Alter zum Gegenstand hat und weiter die Verwendung von einem der Stämme und abgeleiteter Derivate zur Herstellung von

- Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen für die Verwendung gegen entzündliche degenerative und proliferative Erkrankungen der inneren Organe, z B Morbus Crohn der Haut des Blutes des Zentralnervensystems und seiner Anhangs gebilde einschließlich des Auges einschließlich Krebs zum Gegenstand hat, und
- 5 weiter die Verwendung von einem der Stämme und davon abgeleiteter Derivate in Kombination mit anderen Mitteln zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen zur antiviralen- oder Krebstherapie bei Mensch und Tier zum Gegenstand hat
- 10 Ein bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von einem der Stämme von Parapoxvirus ovis in Kombination mit anderen Mitteln zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen für die orale Applikation, und/oder in einer magensaftresistenten Formulierung für die orale Applikation
- 15 Der hier beispielhaft genannte Parapoxvirus ovis NZ 2 wurde am 10 Juli 2001 bei der European Collection of Cell Cultures Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom hinterlegt Die Hinterlegungsnummer lautet
- 20 Beispielhaft wurde gefunden

1 Nachweis der therapeutischen Wirksamkeit in Hepatitis B Virus – transgenen Mäusen

- 25 Für den proof of concept Versuch wurden Hepatitis B Virus transgene Mäuse (Stamm HBV 1 3 Xtg) verwendet Es wurden 7 männliche Tiere im Alter von 8 bis 10 Wochen je Gruppe verwendet Die Applikation der verschiedenen Dosen erfolgte intraperitoneal in einem Volumen von 0 15 ml am Tag 1 (Beginn des Experimentes) und Tag 4

Für die Applikation wurden folgende Verdünnungen eines jeden Virus Strains für die einzelnen Dosisgruppen hergestellt

- 1 Dosis 1.5×10^6 TCID₅₀
- 2 Dosis 5×10^5 TCID₅₀
- 5 3 Dosis 1.5×10^5 TCID₅₀
- 4 Dosis 5×10^4 TCID₅₀

Als Placebo Kontrolle diente steriles pyrogenfreies PBS

- 10 Die Aufkonzentration der Viren wurde folgendermaßen vorgenommen 500 ml Überstand aus Parapoxvirus ovis strain NZ 2 (Titer ca. 2×10^5 TCID₅₀/ml) und Parapoxvirus ovis strain D 1701 (Titer 1×10^7 TCID₅₀/ml) wurden auf denselben Virustiter eingestellt. Dafür wurde eine Beckmann Ultrazentrifuge (Rotor SW28 bei 28000 RPM 3 Std. 4°C) benutzt. Nach der Zentrifugation wurden die Pellets mit entsprechenden Volumina Verdünnungsmedium auf einen Titer von 1×10^7 TCID₅₀/ml
- 15 eingestellt

- Aliquots der entsprechenden Dosierungen wurden für eine kontrollierende Rücktitration verwendet, die die Titer dieser Dosierungen bestätigte. Die entsprechenden Dosen wurden nach Entnahme der Kontrollaliquots für 1 Stunde bei 56°C inaktiviert

20

Verdünnungsmedium 10 ml EMEM 10x
 2.7 ml Bicarbonat 2 g/l
 1 ml Glutamin 1 %
 86.3 ml Aqua bidest

25

- Am Tag 5 wurden die Tiere schmerzlos getötet und Leber und Blut entnommen. Etwa 20 mg Leber je Tier wurden mit QIAamp Tissue Kit (Qiagen Hilden) aufgearbeitet, die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt und die Integrität in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch kontrolliert. Die DNA wurde in
- 30 einem Dot Blot Hybridisierungsverfahren mit einer HBV-spezifischen Sonde hybridisiert. Zuvor wurde die DNA mit RNase A (Qiagen Hilden) behandelt, um durch

RNA hervorgerufene Signale auszuschließen 200 µl DNA (10 µg) wurde auf eine Nylon-Membran (Boehringer Mannheim) gebracht 4 mal für jeweils 3 Minuten mit Soak I (0.5N NaOH 1M NaCl) und zwei mal mit Soak II (3M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH 7.4) behandelt bei 120°C für eine halbe Stunde gebacken und im Anschluss mit einem Standard Hybridisierungspuffer (5xSSC, N lauroylsarcosine, 0.1 % w/v SDS, 0.02 % Blocking reagent, 1x and 100 µg/ml fish sperm DNA) ohne Sonde für 30 Minuten bei 60°C prähybridisiert. Im Anschluss an diesen Schritt erfolgte die Hybridisierung mit einer random-Oligonukleotid geprimten Sonde, die das gesamte HBV Genom enthält (20-40 ng/ml Hybridisierungspuffer). Der Filter wurde danach für 10 Minuten bei 64°C in 4xSSC/0.1 %SDS 2xSSC/0.1 %SDS und 1xSSC/0.1 %SDS gewaschen.

Die immunologische Detektion erfolgte mit dem CDP Star® - System (Boehringer Mannheim) entsprechend den Vorschriften des Herstellers. Für die Auswertung wurde ein LumiImager® (Boehringer Mannheim) verwendet. Die Quantifizierung HBV spezifischer DNA im Blut erfolgte mittels quantitativer PCR. Zunächst wurde mittels Zentrifugation des EDTA Blutes das Plasma gewonnen. Die DNA wurde mittels des HighPure 16 System Viral Nucleic Acid Kits (Boehringer Mannheim) aufgereinigt und durch quantitative PCR mit dem ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) auf HBV spezifische Signale untersucht. Folgende Primer und Sonde wurden eingesetzt:

ayw 570f (sense)	5 - CTGTACCAAACCTTCGGACGG 3
ayw 670r (antisense)	5 AGGAGAAACGGGCTGAGGC 3
25 Sonde	
ayw 613t	5 - CCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATT - 3

Die DNA wurde in 50 µl Reaktionsvolumen amplifiziert (die Reaktion enthielt 1.4 mM von jedem dNTP 4.75 mM MgCl₂ 15 pmol eines jeden Primers und der Sonde 5 µl 10 fach PCR Puffer [alle PCR Reagenzien stammten aus dem TaqMan

core reagent kit [Perkin Elmer/Roche Molecular Systems Inc.] und 1,25 U Taq DNA polymerase und 0,25 U Amp Erase. Nach einem initialen Denaturierungsschritt (10 min bei 95°C) wurden die Proben 40 Zyklen Denaturierung (95°C 30 sec) und Annealing/Extension (56°C, 1 min) ausgesetzt. Die Analyse der Produkte erfolgte mit der ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System standard software.

Eine histochemische Analyse erfolgte mittels Antikörpern gegen das Hepatitis B Virus core Antigen (Dako). Dafür wurden Teile eines Leberlappens über Nacht in 4 % Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und geschnitten (5µm). Nach Entparaffinisierung und Rehydratation wurde die endogene Peroxydaseaktivität mit 3 % H₂O₂ für einen Zeitraum von 20 Minuten gequenchet. Unspezifische Bindung wurde mit Normal Schafserum geblockt. Im Anschluss wurden die Schnitte 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem 1:500 verdünnten Antikörper inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden mit dem Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories) wie vom Hersteller beschrieben durchgeführt.

Die Immunreaktion wurde mit 3,3'-Diamino benzidintetrachlorid und Wasserstoffperoxid visualisiert. Die Schnitte wurden Hematoxylin/Eosin gegengefärbt.

Die statistischen Analysen der Ergebnisse erfolgten durch Varianzanalyse und post hoc Vergleich.

Im Ergebnis wurde überraschend festgestellt, dass man durch Verwendung des Strains NZ 2 eine Verstärkung der antiviralen Wirkung im Vergleich zu bekanntem Parapox ovis Strain D 1701 erreicht. Damit wird es erstmals möglich, mit Hilfe von Parapoxvirus ovis die komplexe Kapazität des Immunsystems in einer Stärke zu induzieren, die sich signifikant von der Wirkstärke der bisher bekannten Paramunitätsinducer unterscheidet.

Folgende Ergebnisse wurden überraschenderweise erhalten:

Leber Bei mit NZ 2 behandelten Tieren wurde im Vergleich zu mit D 1701 behandelten Tieren eine signifikant stärkere Reduktion von HBV-spezifischer DNA festgestellt. Im Vergleich mit D 1701 ist NZ2 in seiner antiviralen Wirksamkeit potenter. In der höchsten Dosisgruppe reduziert die Gabe von NZ 2 die HBV spezifische DNA um mehr als den Faktor 45 besser als die Gabe von gleicher Menge D 1701 in der niedrigsten Dosisgruppe um den Faktor 57. Im Plasma reduziert die Gabe von NZ 2 die HBV-spezifische DNA in der niedrigsten Dosisgruppe um mehr als den Faktor 10 besser als die Gabe von gleicher Menge D 1701. Damit wurde gezeigt dass die therapeutische Wirksamkeit von Parapoxvirus ovis Strain NZ 2 signifikant besser als diejenige von Strain D 1701 ist.

In den Abbildungen wird die Reduktion HBV spezifischer Signale im Vergleich zur Placebogruppe (diese wurde mit 100 % gleichgesetzt) aufgezeigt.

Abbildung 1 zeigt Ergebnisse der Behandlung HBV transgener Mäuse mit Strain D 1701 oder NZ 2. HBV-spezifische DNA wird in der Leber in allen Dosisgruppen bei beiden Strains signifikant im Vergleich zur Placebogruppe reduziert, durch Strain NZ 2 aber stärker. Bei den beiden niedrigsten NZ 2 Dosierungen liegt eine signifikant stärkere Reduktion der HBV-spezifischen DNA als bei den äquivalenten D 1701 Dosisgruppen vor. In Abbildung 2 wird das Ergebnis der Behandlung HBV transgener Mäuse mit Strain D 1701 oder NZ 2 im Plasma gezeigt. HBV spezifische DNA wird im Plasma in allen Dosisgruppen bei beiden Strains signifikant im Vergleich zur Placebogruppe reduziert, durch Strain NZ 2 aber stärker. Im Gegensatz zur niedrigsten NZ 2 – Dosierung wirkt die geringste Dosis von Strain D 1701 nicht mehr signifikant antiviral.

2 Induktion von Zytokinen

7 bis 8 Wochen alte weibliche Balb/c Mäuse wurden unter sterilen Bedingungen gehalten und für den Versuch verwendet. Die Tiere wurden randomisiert und in Grup

pen mit jeweils 6 Tieren aufgeteilt. Folgendes Behandlungsschema wurde angewendet

	Gruppe 1	Placebo
5	Gruppe 2	Parapoxvirus ovis strain D 1701 5×10^4 TCID ₅₀ /Dosis
	Gruppe 3	Parapoxvirus ovis strain NZ 2 5×10^4 TCID ₅₀ /Dosis
	Gruppe 4	Placebo
	Gruppe 5	Parapoxvirus ovis strain D 1701 5×10^4 TCID ₅₀ /Dosis
	Gruppe 6	Parapoxvirus ovis strain NZ 2 5×10^4 TCID ₅₀ /Dosis

10

Das Applikationsvolumen betrug 10 ml/kg. Die Applikation erfolgte intraperitoneal

6 Stunden nach der Applikation wurden die Tiere der Gruppen 1 bis 3 12 Stunden nach der Applikation die Tiere der Gruppen 4 bis 6 getötet, Peritonealzellen über eine Lavage mit eiskaltem PBS gewonnen sowie die portalen und mesenterialen Lymphknoten isoliert

15

Die Peritonealzellen wurden über einen Zentrifugationsschritt (5 min bei 3000 rpm bei Raumtemperatur in einer Eppendorf-Tischzentrifuge) aufkonzentriert, anschließend in 0,2 ml Lysis Puffer (Lysis Lösung: 25 mM Natriumcitrat, 4 M Guanidiniumisothiocyanat, 0,5 % N-Lauroyl Sarkosin) aufgenommen, schockgefroren und bis zur RNA-Präparation bei -75°C gelagert

20

Die Präparation der totalen RNA erfolgte mittels saurer Phenol/Chloroform-Extraktion. Dazu wurden die in Lysispuffer eingefrorenen Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und zur Extraktion mit folgenden Lösungen versetzt: 1/10 Lysispuffer Volumen 2 M Natriumacetat (pH 4,0), 1 Lysispuffer-Volumen wassergesättigtes Phenol, 1/5 Lysispuffer Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24/1). Dieser Ansatz wurde für 10 Sekunden auf dem Vortexer vermischt und anschließend 10 Minuten auf Eis temperiert. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation bei 15365 g und 4°C für 30 Minuten. Danach wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und zur

25

30

Isolation der in dieser Phase befindlichen RNA 8 ml RNA MATRIX aus dem Rnaid™ plus Kit (DIANOVA) zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der entstandene RNA/RNA-MATRIX-Komplex wurde durch Zentrifugation bei 7000 g pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nachfolgend 2x mit je 250 ml RNA-WASH (DIANOVA) gewaschen und nach dem letzten Waschen durch Vakuumzentrifugation getrocknet. Die RNA wurde durch Zugabe von 20-30 ml RNase freiem destillierten Wasser durch Temperieren bei 55°C für 15 Minuten eluiert. Nach Zentrifugation bei 7000 g und Raumtemperatur für 1 Minute wurde die Matrix durch Überführen der RNA-Lösung in ein neues Gefäß abgetrennt.

Die Qualität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Die RNA wurde bei 70°C gelagert.

Die Synthese der cDNA erfolgte durch reverse Transkription der mRNA unter Verwendung von Oligo(dT) Primern als Startermoleküle für die Polymerisation. Im Synthese-Ansatz waren folgende Komponenten vorhanden: 200 ng 2 µg totale RNA, 2 µl reverse Transkriptase M-MLV (200 U/µl) (GIBCO/BRL), 8 µl des zugehörigen 5xRT-Puffer (GIBCO/BRL), 1 µl DTT (0.1 M) (GIBCO/BRL), 4 µl dNTP (2.5 mM) (SIGMA), 2 µl Oligo(dT)12-18-Primer (100 µg/ml) (PROMEGA), 1 µl human plazental RNase Inhibitor (10000 U/ml) (GIBCO/BRL) und Wasser ad 40 µl Gesamtvolumen. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur temperiert und anschließend 45 Minuten bei 37°C inkubiert, nachfolgend für 3 Minuten auf 95°C erhitzt und sofort auf Eis abgeköhlt. Die auf diese Weise synthetisierte cDNA wurde bei 20°C gelagert.

Die Mengen der cDNAs wurden mittels eines „housekeeping“ Gens (β-Aktin) standardisiert. Die quantitative PCR wurde mit dem ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) durchgeführt. Folgende Primer wurden eingesetzt:

β Actin sense 5' TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'

	antisense	5 TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G 3
IFN γ	sense	5 AGCGGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG 3
	antisense	5 GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG 3
TNF α	sense	5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C 3
5	antisense	5 -ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G 3
IL 15	sense	5-GCC AAC TGG ATA GAT GTA AGA TAT GAC CT 3
	antisense	5 -CGT GTT GAT GAA CAT TTG GAC AAT GCG TAT 3'

Die DNA wurde in 25 μ l Reaktionsvolumen amplifiziert (die Reaktion enthielt
 10 1,4 mM von jedem dNTP, 4 mM $MgCl_2$, 0,3 μ mol eines jeden Primers und der
 Sonde 2,5 μ l 10-fach PCR Puffer mit SYBR Green [alle PCR Reagenzien stammten
 aus dem SYBR Green PCR core reagent kit, Perkin Elmer/Roche Molecular Systems
 Inc.] und 1,25 U Taq DNA polymerase und 0,25 U Amp Erase. Nach einem initialen
 Denaturierungsschritt (95°C für 10 min) wurden die Proben 40 Zyklen
 15 Denaturierung (95°C 30 s) und Annealing/Extension (60°C 1,30 min) ausgesetzt.
 Die Analyse der Produkte erfolgte mit der ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection
 System Standard Software. Die statistischen Analysen der Ergebnisse erfolgte mit
 der Varianzanalyse und post hoc Vergleich.

20 Folgende Ergebnisse wurden überraschenderweise erhalten:

1 Die Expression von Interferon γ wird nach Behandlung mit Strain D 1701
 oder Strain NZ 2, 6 und 12 Stunden nach der Applikation induziert (Abbil-
dung 3). Diese Induktion ist bei Strain NZ 2 sowohl signifikant höher gegen
 25 über Placebo, als auch gegenüber Strain D 1701. Die nach Gabe von D 1701
 beobachtete Höhe der Interferon γ Expression ist nicht signifikant gegenüber
 der Placebokontrolle. Dargestellt sind die Werte, die in durch peritoneale
 Lavage erhaltenen Zellen gemessen wurden.

30 2 Die Expression von TNF α wird nach Behandlung mit Strain D 1701 12
 Stunden oder nach Behandlung mit Strain NZ 2, 6 und 12 Stunden nach der

Applikation induziert (wobei nach 12 Stunden bereits ein Absinken im Vergleich zum 6 Stunden Wert festgestellt werden kann, Abbildung 4) Diese Induktion ist 6 Stunden nach der Applikation bei Strain NZ 2 signifikant höher als vergleichsweise gegenüber Strain D 1701 Dargestellt sind die Werte die in durch peritoneale Lavage erhaltenen Zellen gemessen wurden

3 Die Expression von IL-15 wird nach Behandlung mit Strain D 1701 oder mit Strain NZ 2 6 und 12 Stunden nach der Applikation induziert (Abbildung 5) Diese Induktion ist 6 Stunden nach der Applikation bei Strain NZ 2 signifikant höher als vergleichsweise gegenüber Strain D 1701 oder Placebo Die nach Gabe von D 1701 beobachtete Höhe der IL-15 - Expression ist nicht signifikant gegenüber der Placebokontrolle Dargestellt sind die Werte die in durch peritoneale Lavage erhaltenen Zellen gemessen wurden

15 3 Nachweis der therapeutischen Wirksamkeit in tumortragenden Nacktmäusen

MDA-MB231 Zellen (ATCC#HTB26) wurden in Komplettmedium (DMEM 88 5 FBS 10 %, Penicillin/Streptomycin 1 % L Glutamin 1 % (jeweils Gibco Life Technologies)) bei 37°C und 5 % CO₂ in einem Inkubator kultiviert Am Tage der Transplantation waren die Zellen zu ca 70 % konfluent Die Zellen wurden trypsinisiert, mit HBSS gewaschen gezählt und auf $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml mit vorgekühltem PBS eingestellt Es wurden weibliche NCr nude Mäuse (taconic) verwendet Die Mäuse waren zwischen 8 und 10 Wochen alt und wogen ca 22 g Alle Manipulationen an den Tieren wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt 5×10^6 Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 0.2 ml subcutan in die Flankenregion injiziert Danach wurden die Mäuse weitere sieben Tage gehalten bis die Tumoren eine durchschnittliche Masse von ca 80 mg erreicht hatten Die Tumoren wurden vermessen und die Mäuse nach dem Zufallsprinzip in drei Gruppen zu jeweils zehn Tieren eingeteilt Die einzelnen Gruppen erhielten wie folgt verabreicht

- Gruppe 1 Placebo (PBS)
Gruppe 2 Parapoxvirus ovis Stamm D1701
Gruppe 3 Parapoxvirus ovis Stamm NZ2

- 5 D1701 wurde in einer Dosis von 2.5×10^5 TCID₅₀ NZ2 in einer Dosis von 1×10^5 TCID₅₀ insgesamt jeweils vier mal im Abstand von jeweils drei Tagen verabreicht. Die Tumoren wurden zwei mal pro Woche vermessen. Signifikanzen wurden mittels Student's Test ermittelt.
- 10 Figur 6 zeigt die mittlere Größe der Tumoren (in Milligramm) in Tieren der Gruppen 1 bis 3 über die Versuchszeit (in Tagen)
(Symbole Gruppe 1 Kreise Gruppe 2 Dreiecke Gruppe 3 Quadrate)
- 15 Überraschender Weise wurde im experimentellen System eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante gegen Tumoren gerichtete Wirksamkeit gefunden ($p < 0.05$). Dabei zeigte sich der Stamm NZ2 deutlich potenter als der Stamm D1701. Zum Erreichen des gleichen Effektes war nur ungefähr die halbe Menge NZ2 verglichen mit D1701 nötig.
- 20 Dieser Befund belegt deutlich die therapeutische Wirksamkeit von erfindungsge-
mäßigen Viruspräparationen in tumortragenden Nacktmäusen.
- 25 Nacktmäuse sind immundefizient und verfügen nicht über funktionelle T-Zellen. Die gegen die Tumoren gerichtete Aktivität wird vermutlich im experimentellen System durch die natürlichen Killerzellen (NK) andere Zellen und direkte Wirkung von Zytokinen/Chemokinen bedingt. Bei einem vollständigen und intakten Immunsystem wäre zu vermuten, dass die bessere Wirksamkeit von NZ2 noch deutlicher ersichtlich wird.
- 30 4 Weitere biologische Unterschiede zwischen NZ2 und D1701

Es wurde gefunden dass Parapox Virus NZ2 im Gegensatz zum Stamm D1701 auf humanen Zelllinien fortgesetzt passagierbar ist. Dies zeigt grundsätzliche Unterschiede im Replikationsverhalten und/oder in den viralen Rezeptoren bei NZ2 und D1701.

5

Die Adaptation an humane Zelllinien ist eine wichtige Voraussetzung für die Produktion von viralen Stämmen auf humanen Zelllinien.

4 a) Fortgesetzte Passagierbarkeit auf humanen MRC 5 Zellen

10

Ein Adaptionsversuch der Stämme NZ2 und D1701 an die humane diploide Zelllinie MRC-5 ist in Figur 7 dargestellt. MRC 5 ist für die Produktion von biologischen Wirkstoffen und Impfstoffen geeignet. Die Stämme wurden mit dem gleichen Ausgangstitel eingesetzt und die entsprechenden Zellkulturüberstände über 5 Passagen in MRC 5 Zellen weitergeführt. Dargestellt ist die Austitration von Proben aus den Überständen der jeweils infizierten MRC5-Zellen in TCID₅₀ über die Passagennummer. Lediglich der Stamm NZ2, nicht aber D1701, war auf bovinen Nierenzellkulturen (BK Klon 3a) reaktivierbar. Dies weist auf prinzipielle biologische Unterschiede der beiden Stämme im Infektions- und Replikationsverhalten hin. Gleichzeitig zeigt dieses Ergebnis, dass NZ2 in einem breiteren Spektrum von Zellen als D1701 reproduziert werden kann, woraus sich die Möglichkeit eines auf humanen Zellen beruhenden Produktionsverfahrens ergibt.

15

20

25 4 b) Passagierbarkeit von NZ2 und D1701 auf WI 38 Zellen und BK Klon 3a Zellen

Wesentliche biologische Unterschiede zwischen NZ2 und D1701 Stämmen werden auch durch die in Figur 8 und Figur 9 dargestellten Experimente deutlich. Figur 8 zeigt den Virustiter in Passagierungsversuchen von D1701 auf bovinen BK Klon 3a Zellen und auf humanen WI 38 Zellen über die

30

20

Anzahl der Passagen Es ist erkennbar dass D1701 auf BK Klon 3a Zellen fortgesetzt passagierbar ist auf humanen WI 38 Zellen jedoch nicht

5 Anders verhält es sich mit dem NZ2 Stamm Dieser Stamm ist über mehrere Tage sowohl auf BK Klon 3a Zellen als auch auf WI-38 Zellen fortgesetzt passagierbar (Figur 9)

10 Auch diese Ergebnisse weisen auf deutliche Unterschiede im Infektions und Replikationsverhalten von NZ2 und D1701 hin

4 c) Dosisabhängige Wirkung von NZ2 im Herpesvirus Challenge Test nach Passagierung auf WI 38

15 Zur Untersuchung der immunstimulatorischen Eigenschaften von NZ2 Stämmen welche auf WI 38 Zellen passagiert worden sind sind Herpesvirus Challenge Tests an Mäusen durchgeführt worden Es wurden drei Gruppen von jeweils 10 Versuchstieren mit jeweils 1×10^4 TCID₅₀ 5×10^4 TCID₅₀ und 1×10^5 TCID₅₀ behandelt eine Kontrollgruppe erhielt ein Placebo Die Überlebensrate der vier Versuchsgruppen ist in Figur 10 über die Zeit nach
20 der Herpesvirusinfektion dargestellt Überraschenderweise wurde festgestellt dass NZ2 durch die Passage auf WI 38 Zellen seine immunstimulatorischen Eigenschaften nicht verloren hat

25 Alle experimentellen Ergebnisse dieses Beispiels weisen auf grundlegende biologische Unterschiede im Infektions und Replikationsverhalten von NZ2 und D1701 hin Es wurde überraschenderweise gefunden dass die Herstellung von NZ2 zur Verwendung als Immunmodulator im Gegensatz zu D1701 nicht an Rindernierenzellen als Produktionszelllinie gebunden ist

30 Unter Zugrundelegung der bekannten Zusammenhänge vom Einfluss einer Th1 Immunantwort auf latente und chronisch persistente Virusinfektionen^{4,5)} sowie pro

- liferative Erkrankungen z.B. Krebs⁸⁹⁾ und der im Vergleich zu Parapoxvirus ovis Strain D 1701 besseren immunmodulatorischen Eigenschaften des Parapoxvirus ovis Strain NZ 2 ist der Einsatz von Immunmodulatoren auf der Basis von Parapoxvirus ovis Strain NZ 2 oder einer der o.g. Stämme als Monotherapie oder in Kombination mit biologisch aktiven, z.B. antiviralen niedermolekularen Verbindungen an Mensch und Tier möglich und von therapeutischem Nutzen zur antiviralen Therapie von Infektionen mit dem Hepatitis B Virus dem Hepatitis C Virus oder allen anderen Erregern aus der Gruppe der Hepatitis verursachenden Viren sowie anderen viralen Infektionen der inneren Organe, sowie Infektionen, auch in Begleitung anderer Erkrankungen mit den verschiedenen Typen des Herpes simplex Virus (HSV) den verschiedenen Typen von humanem Papillomvirus (HPV) dem humanem Immundefizienzvirus (HIV), dem Varizella Zoster Virus dem humanem Cytomegalievirus (HCMV) sowie den entsprechenden Viruserkrankungen beim Tier
- 15 Des weiteren können mit den oben genannten Stämmen von Parapoxvirus ovis aufgrund des gezeigten Wirkmechanismus insbesondere die folgenden prophylaktischen oder therapeutischen Behandlungen erfolgversprechend durchgeführt werden
- 20 Verhinderung von Rekurrenzen bei Herpesvirus Infektionen Metaphylaxe d.h. Verhinderung der Etablierung von viralen Infektionen (z.B. HIV) wenn unmittelbar nach der Exposition mit dem Mittel behandelt wird ⁷⁾ Die Behandlung von Krebs ist aufgrund des Wirkmechanismus ebenfalls möglich ⁸⁹⁾
- 25 Je nach klinischer Fragestellung wird das Therapeutikum auf der Basis von Parapoxvirus systemisch also beispielsweise intramuskulär, subcutan, intraperitoneal intravenös per os oder lokal appliziert. Das Parapoxvirus liegt dabei entweder aufgereinigt und lyophilisiert vor und/oder wird unmittelbar vor der Applikation in einem geeigneten Lösungsmittel suspendiert oder es liegt in einer anderen geeigneten Formulierung vor oder es liegt in einer magensaftresistenten oder einer anderen
- 30 oralen Applikationsform vor

Geeignete Zubereitungen können ebenfalls aus durch Passagierung und/oder Adaptation an bestimmte Zellen beispielsweise WI 38 MRC 5 oder Vero Zellen, erhaltenen Abkömmlingen von NZ2 und den anderen genannten Stämmen bzw Teilen oder Bruchstücken von NZ2 und den anderen genannten Stämmen oder diesen Abkömmlingen hergestellt werden Unter Teilen sind mittels geeigneter Vektoren, beispielsweise Vaccinia, in geeigneten Systemen beispielsweise Fibroblastenzellkulturen exprimierte genomische oder subgenomische Fragmente zu verstehen Unter Bruchstücken versteht man die durch biochemische Aufreinigung beispielsweise Chromatografie erhaltenen Fraktionen physikalisch beispielsweise durch Einwirkung von Ultraschall aufgeschlossener Partikel

Mehrere Applikationen oder Langzeitbehandlung nach Zeitschemen die den Erfordernissen der klinischen Fragestellung entsprechen können dabei notwendig sein

So erweist sich bei der Krebstherapie beispielsweise (jedoch ohne Einschränkung) die Anwendung nach folgendem Schema als besonders erfolgversprechend

Intramuskuläre Applikation von jeweils 10^6 bis 10^7 TCID₅₀ (Tissue Culture Infective Dosage) für 4 Wochen an jedem 3 Tag gefolgt von 2 Wochen Pause erneute intramuskuläre Applikation von jeweils 10^6 bis 10^7 TCID₅₀ für 4 Wochen an jedem 3 Tag gefolgt von 2 Wochen Pause erneute intramuskuläre Applikation von jeweils 10^6 bis 10^7 TCID₅₀ für 4 Wochen an jedem 3 Tag gefolgt von 2 Wochen Pause je nach Schweregrad und Heilungserfolg können diese Cyclen durch weitere Cyclen ergänzt werden alternativ kann auch ein Schema unter dem die Formulierung jeden 4 bis 5 Tag über mindestens 3 Monate appliziert wird indiziert sein

Bei chronischer Virusinfektion werden beispielsweise 10^6 bis 10^7 TCID₅₀ der Formulierung subcutan im Bauchbereich oder intramuskulär im Bereich des Deltoid oder Quadrizeps jeden 3 Tag insgesamt 5 mal appliziert Abweichungen von diesem Schema können entsprechend den Bedürfnissen die sich aus der Erkrankung ergeben vorgenommen werden Zur Prophylaxe von Erkältungen ist mit der Formulie

zung zu gurgeln und diese Anwendung täglich zu wiederholen solange wie das Ansteckungsrisiko besteht.

5 Für die Vorbeugung von Infektionen nach oralchirurgischen Eingriffen (z.B. Zahnoperation) ist am Vorabend vor dem Eingriff 1-2 min zu gurgeln.

Literatur

- 1 Guidotti L G Borrow P , Hobbs M V Matzke B , Gresser I Oldstone,
M B A and Chisari, F V (1996) Viral cross talk Intracellular inactivation
5 of the hepatitis B virus during an unrelated viral infection of the liver Proc
Natl Acad Sci USA 93 4589-4594

- 2 Guidotti L G Ando K , Hobbs M V Ishikawa, T Runkel L , Schreiber
R D and Chisari F V (1994) Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B
10 virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice Proc
Natl Acad Sci USA 91 3764 3768

- 3 Steinmassl G Wolf G (1990) Bildung von Interleukin 2 und Interferon-
durch mononukleäre Leukozyten des Schweines nach in vitro Stimulation mit
15 verschiedenen Viruspräparaten J Vet Med B37 5 321-331

- 4 P Lucin, S Jonjic, M Messerle, B Polic H Hengel U H Koszinowski
(1994) Late Phase inhibition of murine cytomegalovirus replication by
synergistic action of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha J
20 Gen Virol 75 101 110 P M

- 5 Smith R M Wolcott R Chervenak S R Jennings (1994) Control of acute
cutaneous herpes-simplex virus Infection T-cell mediated viral clearance is
dependent upon interferon gamma Virology 202 (1) 76 88]
25
- 6 Y Kawanashi N Hayashi K Katayama, K ueda T Takehara E Miyoshi
E Mita, A Kasahara H Fusamoto T Kamada (1995) Tumor necrosis factor
alpha and interferon gamma inhibit synergistically viral replication in
hepatitis B virus replicating cells J Medical Virology 47 (3) 272 277
30

- 7 Dhawan S, L M Wahl A Heredia, Y H Zhang J S Epstein M S Meltzer
I K Hewlett (1995) Interferon gamma inhibits HIV-induced invasiveness of
Monocytes J Leukocyte Biology 58 (6) 713-716
- 5 8 J F Bromberg, C M Horvath, Z L Wen, R D Schreiber, J E Darnell (1996)
Transcriptionally active stat1 is required for the antiproliferative effects of
both interferon alpha and interferon gamma PNAS 93(15) 7673 7678
- 9 M Klouche, H Kirchner, F Holzel (1994) Antiproliferative effects of inter
10 feron gamma in combination with alpha difluoromethylornithine on human
carcinoma cell cultures J Cancer Research and Clinical Oncology
120(12) 706]

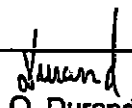
PCT

LEA34376-WO

Original (für EINREICHUNG) gedruckt am 10 07 2001 01 12 00 PM

0 1	Formular PCT/RO/134 (EASY) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material erstellt durch Benutzung von	
0 1 1		PCT-EASY Version 2 91 (aktualisiert 01 01 2001)
0 2	Internationales Aktenzeichen	
0-3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	LEA34376-WO
1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material der/das in der Beschreibung genannt ist	
1 1	Seite	6
1 2	Zeile	15
1 3	Angaben betr. Hinterlegung	
1 3-1	Name der Hinterlegungsstelle	European Collection of Cell Cultures Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom 10 Juli 2001 (10 07 2001) ECACC
1 3-2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	
1 3-3	Datum der Hinterlegung	
1 3-4	Eingangsnummer	
1-4	Weitere Angaben	KEINE
1-5	Bestimmungsstaaten für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten
1 6	Gesondert eingereichte Angaben Diese Angaben werden dem Internationalen Büro später übermittelt	KEINE

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der internationalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein)	ja
0-4 1	Bevollmächtigter Bediensteter	 O Durand

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0 5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen	
0 5 1	Bevollmächtigter Bediensteter	

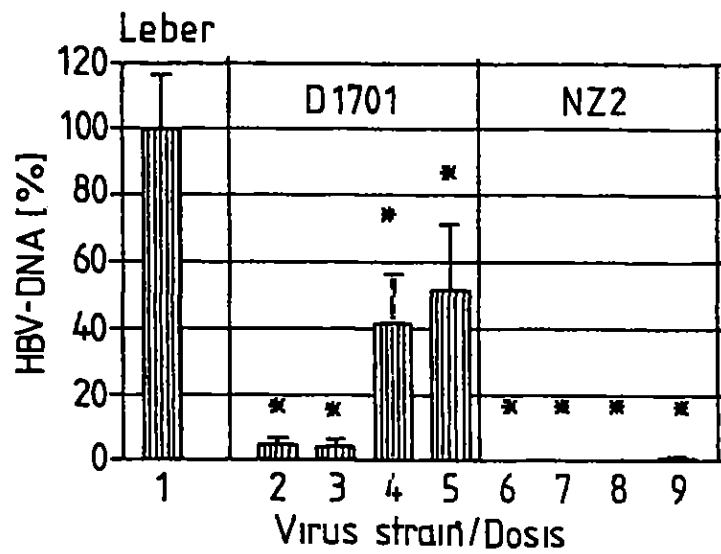
Patentansprüche

- 1 Verwendung von Viren, die taxonomisch zu einem der Stämme NZ2 NZ 7
NZ 10 oder orf-11 von Parapoxvirus ovis gehören zur Herstellung von Arz
5 neimitteln gegen virale Infektionen und Krebs bei Mensch und Tier
- 2 Verwendung von durch Passagierung oder Adaptation an geeigneten Zell-
systemen wie beispielsweise humanen Zellen wie WI-38 MRC 5 Vero
Zellen bovinen Zellen wie BK K13A47/Reg oder MDBK und ovinen Zellen
10 wie MDOK erhaltenen Abkömmlingen der Viren gemäss Anspruch 1 zur
Herstellung von Arzneimitteln gegen virale Infektionen und Krebs bei
Mensch und Tier
- 3 Verwendung von Teilen oder Bruchstücken der Viren gemäss Anspruch 1
15 und 2 wobei unter Teilen mittels geeigneter Vektoren wie Vaccinaviren in
geeigneten Systemen wie z.B. Fibroblastenzellkulturen exprimierte
genomische oder subgenomische Fragmente und unter Bruchstücken die
durch biochemische Aufreinigung wie Chromatografie erhaltenen Fraktionen
der exprimierten oder physikalisch aufgeschlossenen viralen Partikel zu ver-
20 stehen sind, zur Herstellung von Arzneimitteln gegen virale Infektionen und
Krebs bei Mensch und Tier
- 4 Verwendung von einem der Stämme von Parapoxvirus ovis entsprechend
Anspruch 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zu-
25 bereitungen als Immuntherapeutika oder Immunprophylaktika bei Auto-
immunerkrankungen und bei akuten und chronischen viralen Infektionen des
Respirationstraktes und der inneren Organe
- 5 Verwendung von einem der Stämme entsprechend Anspruch 1-3 zur Her-
30 stellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen für die
Stressmetaphylaxe und zur Verhinderung oder Vorbeugung von Infektions-

krankheiten nach Stress sowie bei der Infektionsprophylaxe im Rahmen von Operationen und zahnärztlichen Eingriffen.

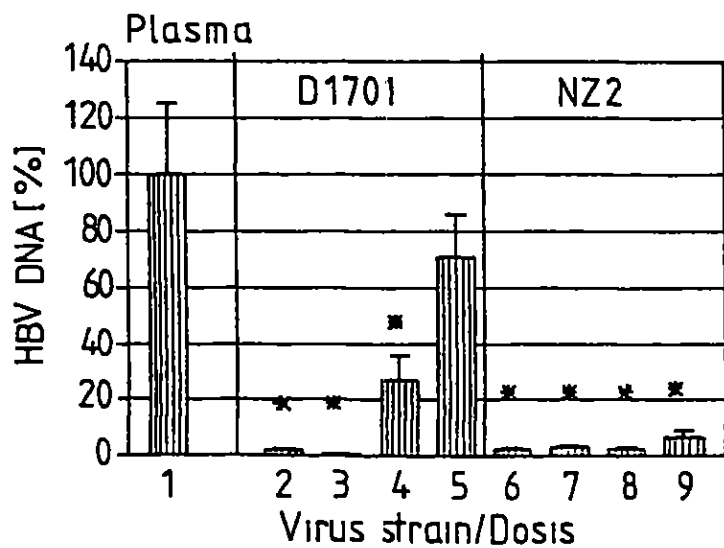
- 5 6 Verwendung von einem der Stämme entsprechend Anspruch 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen für die Verwendung bei der Infektionsmetaphylaxe oder Therapie akuter viraler Infektionen beispielsweise des Respirationstraktes, der Papillomvirusinfektionen der Infektion mit Herpesviren der HIV-Infektion, der Virusinfektion innerer Organe wie beispielsweise der Infektion mit Hepatitisviren sowie die Verwendung bei Erkrankungen wie Multipler Sklerose Asthma, Warzen und anderer Neubildungen der Haut
- 10
- 7 Verwendung von einem der Stämme entsprechend Anspruch 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen für die Verwendung an Wunden zur Beschleunigung von Wundheilungsprozessen und die Verwendung zur Unterstützung der Heilung schlecht oder nicht heilender Wunden und Ulcus cruris
- 15
- 8 Verwendung von einem der Stämme entsprechend Anspruch 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen für die Verwendung bei Erkrankungen des allergischen Formenkreises Psoriasis Neurodermitis anderen Autoimmunerkrankungen wie z.B. Lupus erythematodes sowie zur Verbesserung des Wohlbefindens z.B. im Alter
- 20
- 9 Verwendung von einem der Stämme entsprechend Anspruch 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen für die Verwendung gegen entzündliche degenerative und proliferative Erkrankungen der inneren Organe (z.B. Morbus Crohn) der Haut des Blutes des Zentralnervensystems und seiner Anhangsgebilde einschließlich des Auges einschließlich Krebs
- 25
- 30

- 10 Verwendung von einem der Stämme von Parapoxvirus ovis entsprechend Anspruch 1 3 in Kombination mit anderen Mitteln zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen zur antiviralen- oder Krebstherapie bei Mensch und Tier
- 5
- 11 Verwendung von einem der Stämme von Parapoxvirus ovis entsprechend Anspruch 1 3 in Kombination mit anderen Mitteln zur Herstellung von Arzneimitteln und pharmazeutischen Zubereitungen für die orale Applikation und/oder in einer magensaftresistenten Formulierung für die orale
- 10 Applikation.

Fig 1

* p < 0.0002 Varianzanalyse

- 1 Placebo
- 2 D1701 1.5x10+e6
- 3 D1701 5x10+e5
- 4 D1701 1.5x10+e5
- 5 D1701 5x10+e4
- 6 NZ2 1.5x10+e6
- 7 NZ2 5x10+e5
- 8 NZ2 1.5x10+e5
- 9 NZ2 5x10+e4

Fig 2

* p < 0.00005 Varianzanalyse

- 1 Placebo
- 2 D1701 1.5x10+e6
- 3 D1701 5x10+e5
- 4 D1701 1.5x10+e5
- 5 D1701 5x10+e4
- 6 NZ2 1.5x10+e6
- 7 NZ2 5x10+e5
- 8 NZ2 1.5x10+e5
- 9 NZ2 5x10+e4

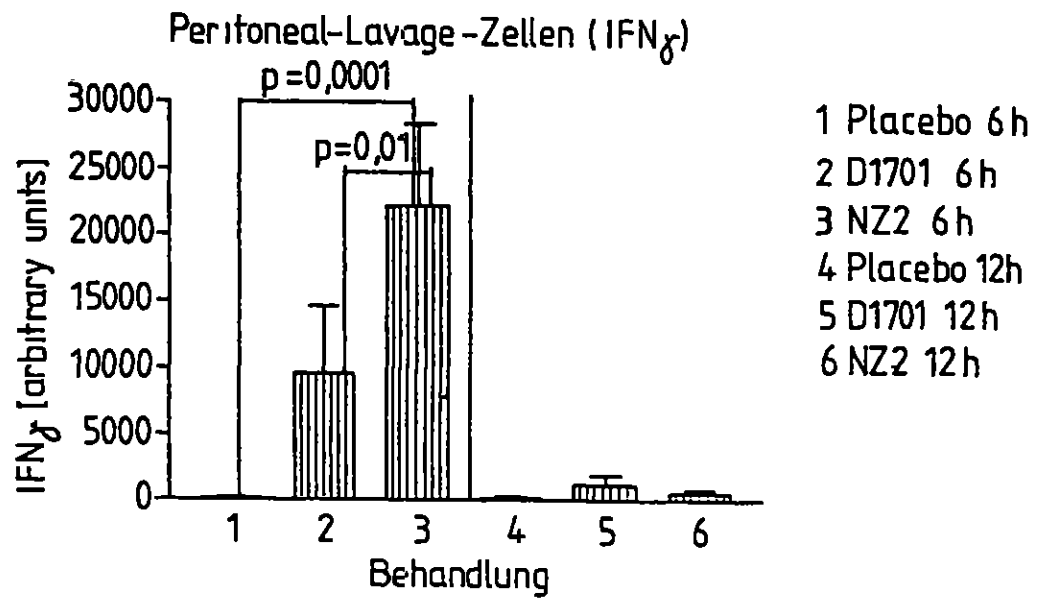
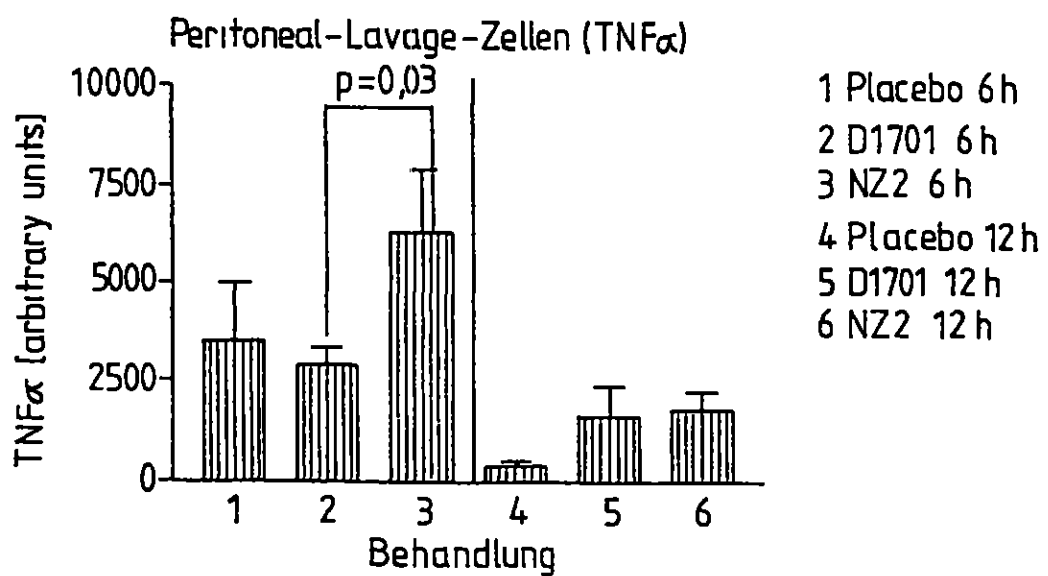
Fig 3**Fig 4**

Fig 5

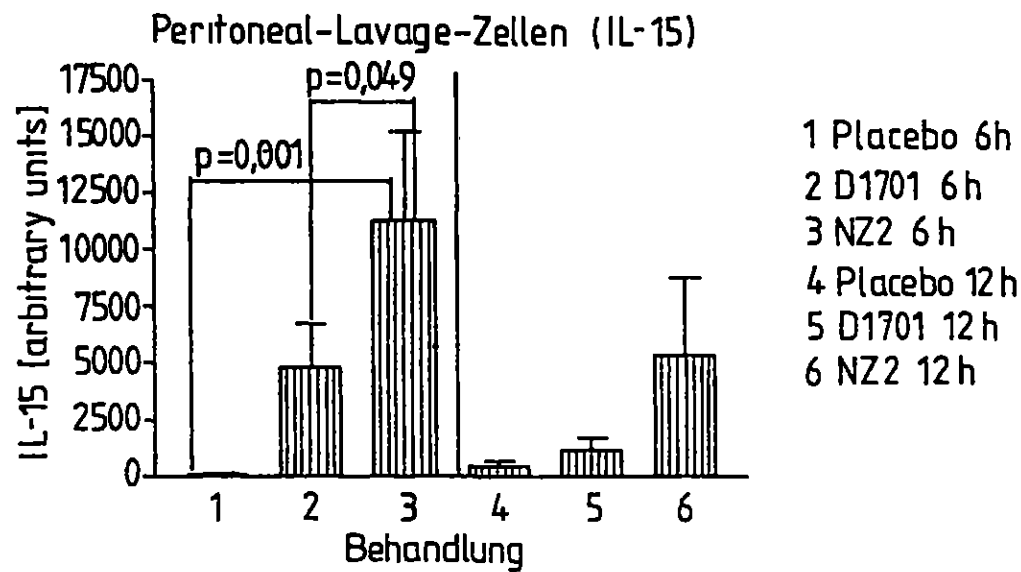


Fig 6

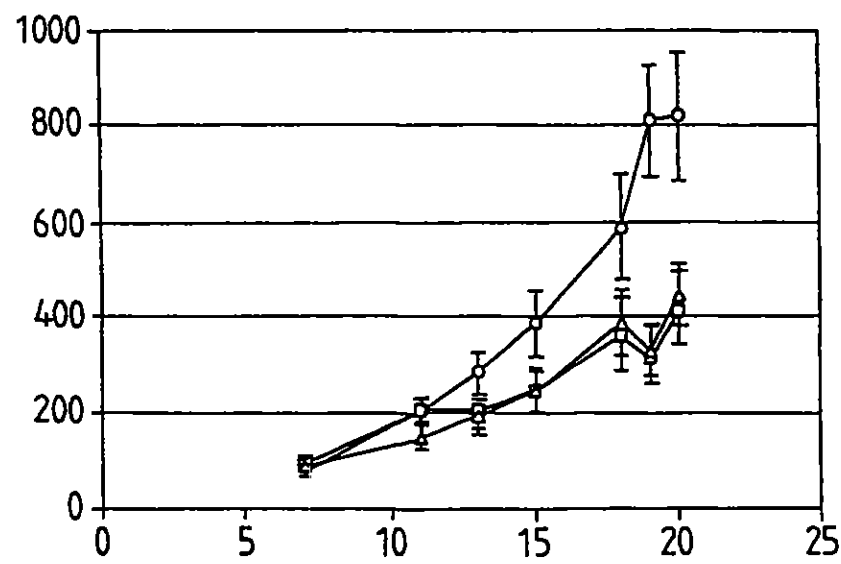


Fig 7

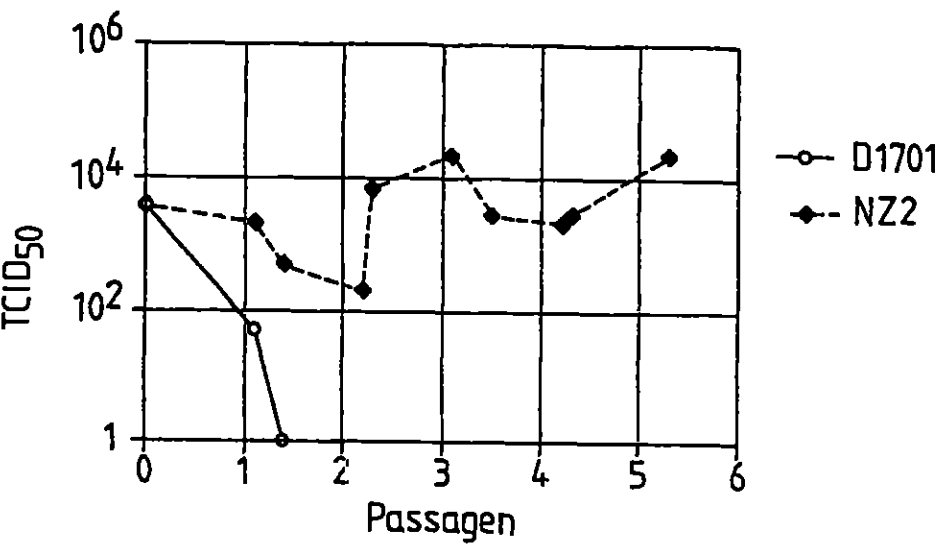


Fig 8

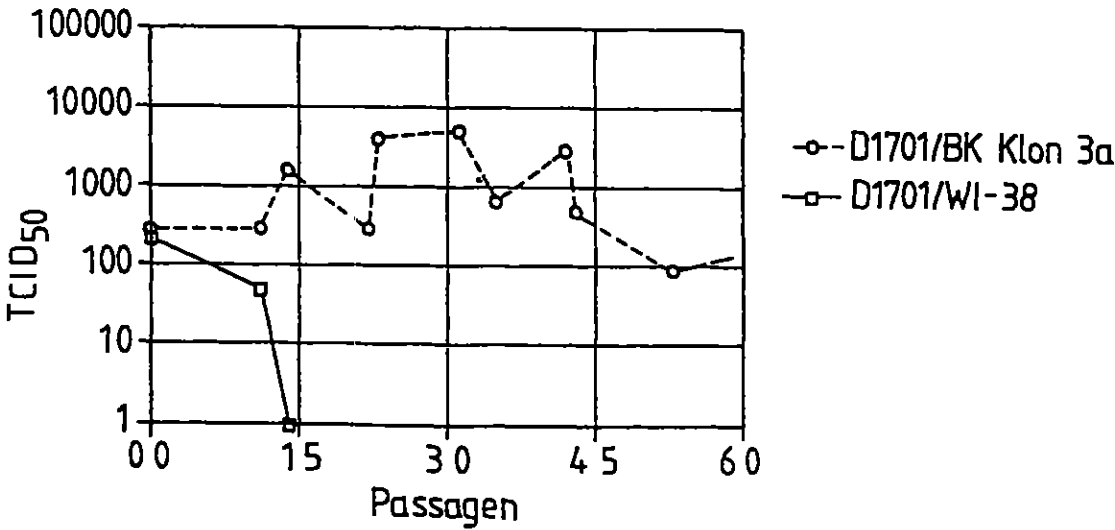


Fig 9

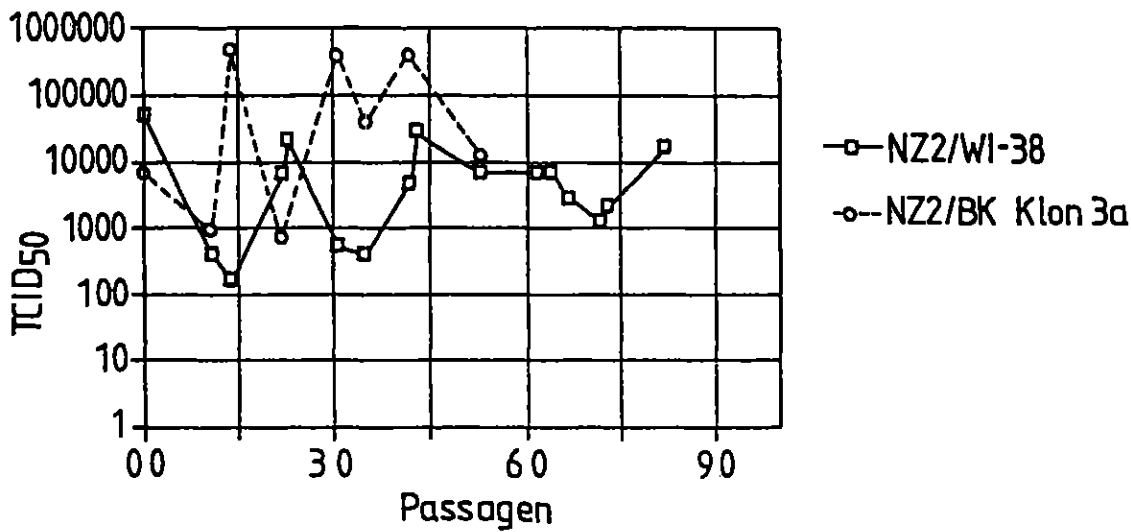
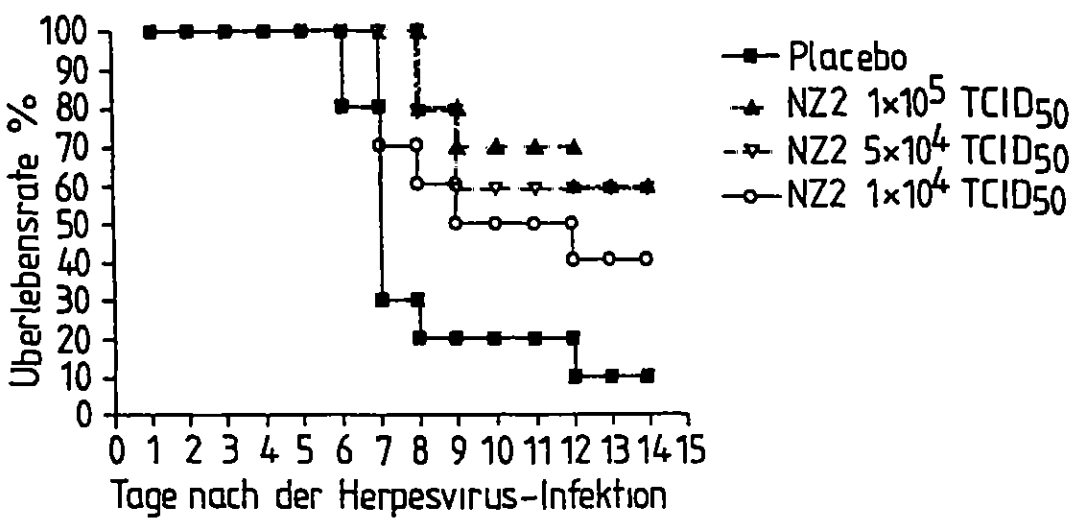


Fig 10



SEQUENZPROTOKOLL

<110> Bayer AG

<120> Verwendung von Stämmen des Parapoxvirus ovis zur Herstellung
von antiviralen Arzneimitteln

<130> Parapoxvirus ovis Strain NZ2

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver 2 1

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Mus sp

<220>

<223> beta-Actin primer, an 1sense

<400> 1

taaaacgcag ctcagtaaca gtccg

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Mus sp

<220>

<223> beta-Actin primer, sense

<400> 2

tggaatcctg tggcatccat gaaac

25

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<220>

<223> HBV sonde ayw-613t

<400> 3

ccatcatcct gggctttcgg aaaatt

26

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<220>

<223> HBV primer, ayw-670r (antisense)

<400> 4

aggagaaacg ggctgaggc 19

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<220>

<223> HBV primer ayw-570f (sense)

<400> 5

ctgtaccaaa ccttcggacg g 21

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Mus sp

<220>

<223> Primer IFN-gamma (antisense)

<400> 6

gtcacagttt tcagctgtat aggg

24

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Mus sp

<220>

<223> Primer IFN-gamma (sense)

<400> 7

agcggctgac tgaactcaga ttgtag

26

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> MUs sp

<220>

<223> Primer IL-15 (antisense)

<400> 8

cgtgttgatg aacatttgga caatgcgtat

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Mus sp

<220>

<223> Primer IL-15 (sense)

<400> 9

gcccaactgga tagatgtaag atatgacct

29

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Mus sp

<220>

<223> Primer TNF-alpha (antisense)

<400> 10

acattcgagg ctccagtgaa ttcgg

25

<210> 11

<21> 25

<212> DNA

<213> Mus sp

<220>

<223> Primer TNF-alpha (sense)

<400> 11

ggcaggtcta ctttggagtc attgc

25

Fig 1

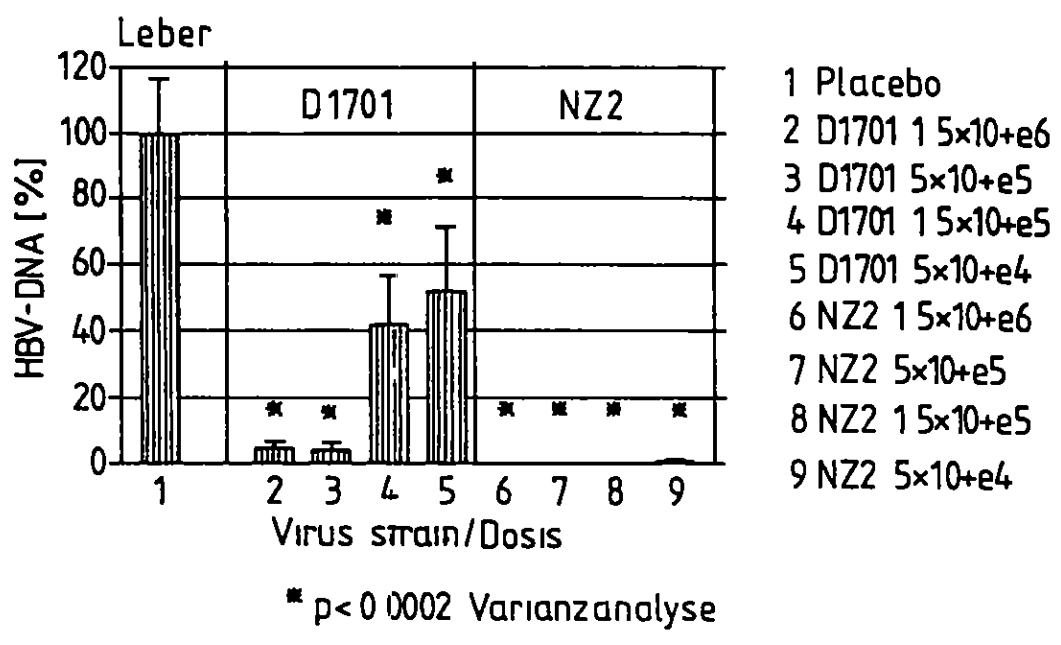


Fig 2

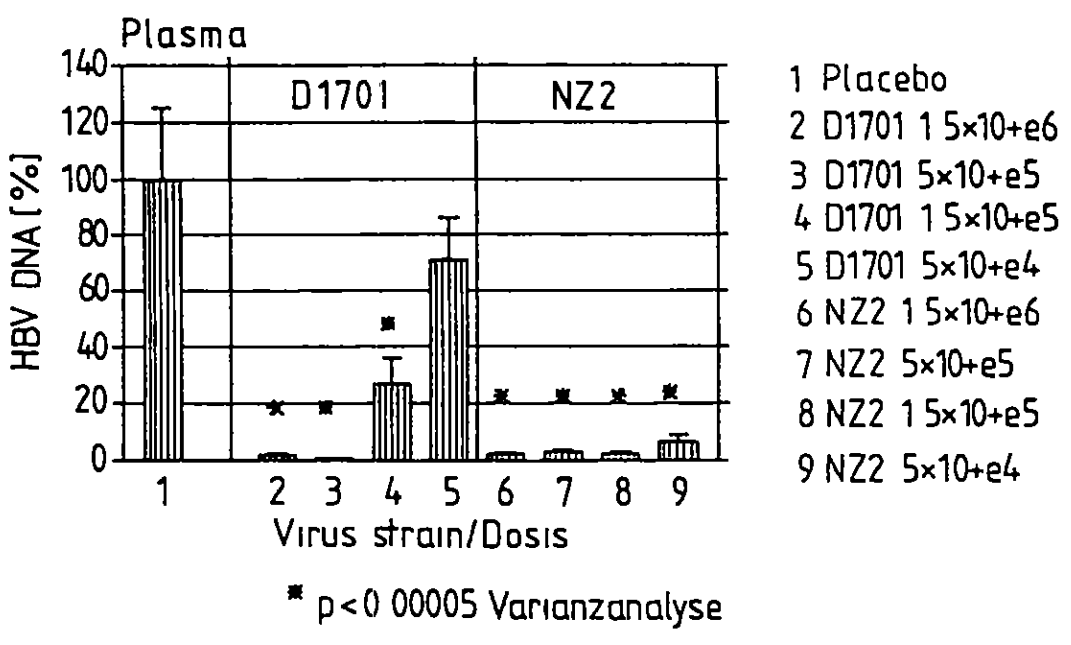


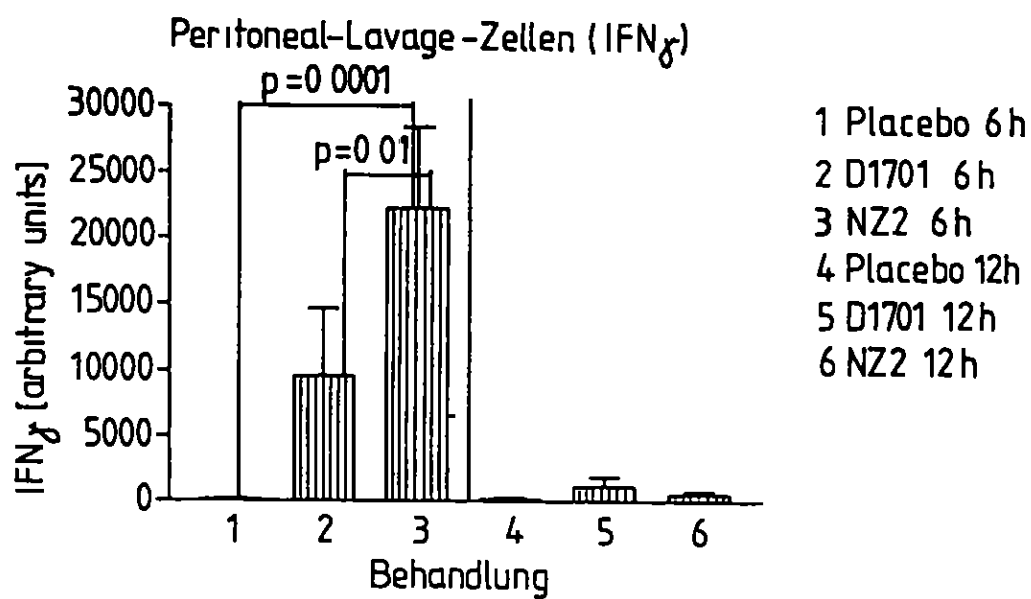
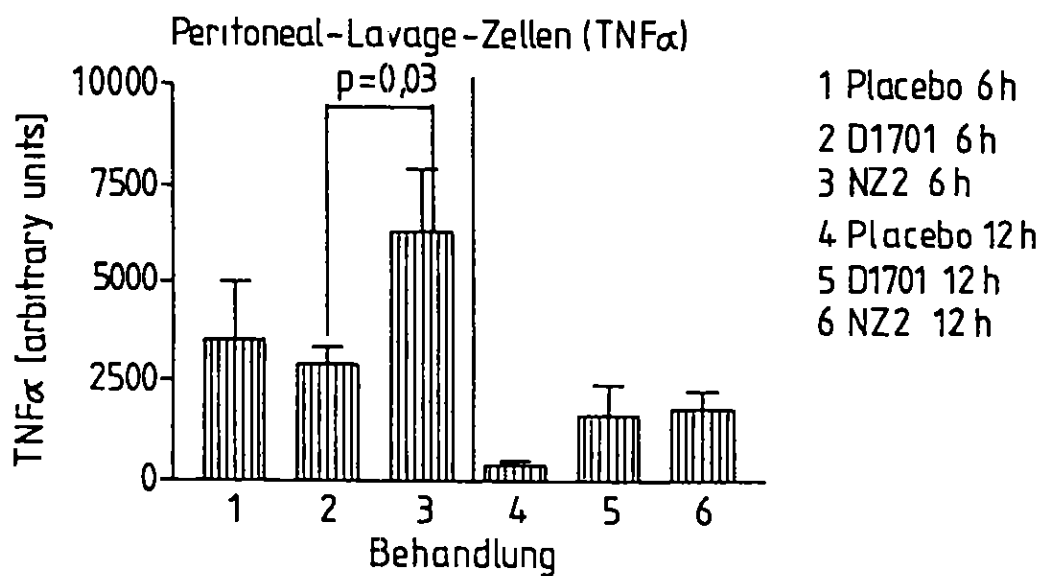
Fig 3**Fig 4**

Fig 5

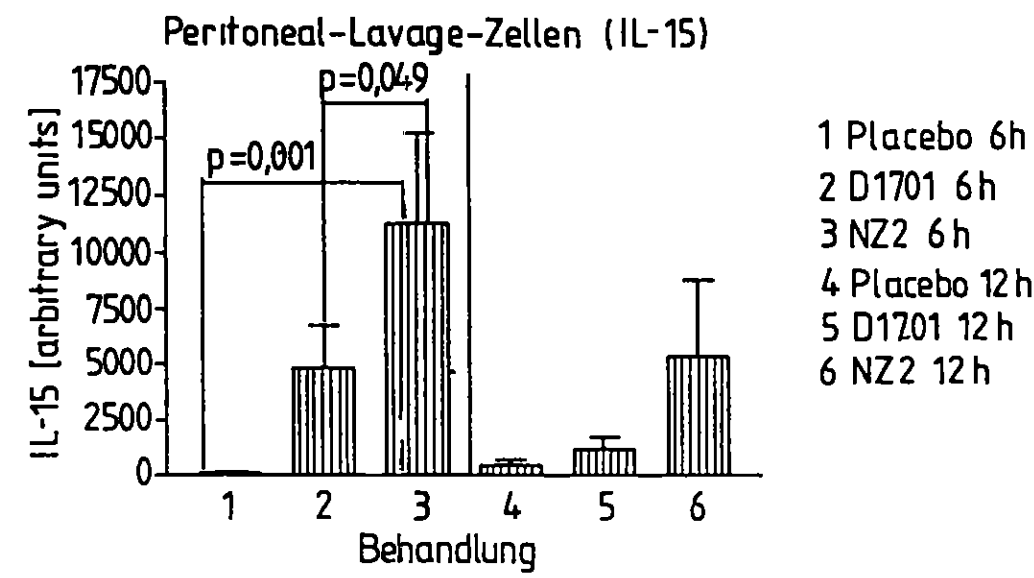


Fig 6

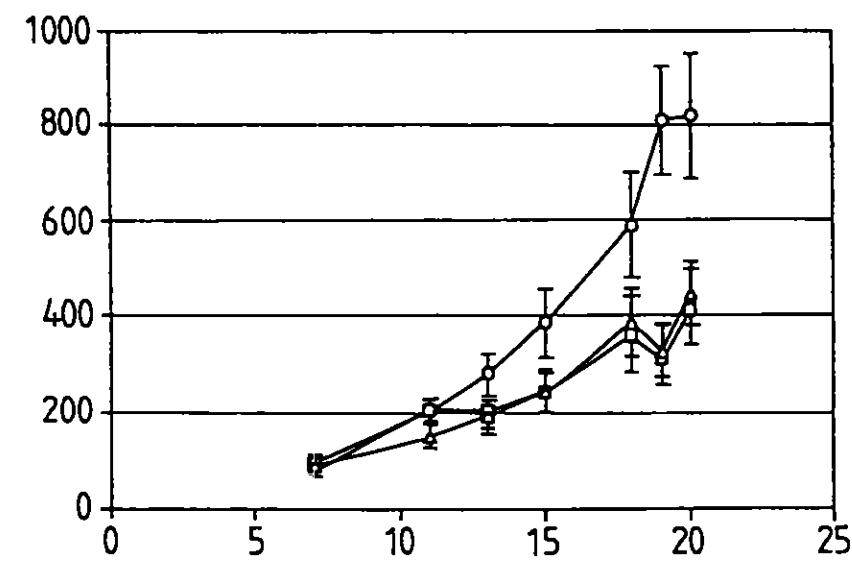


Fig 7

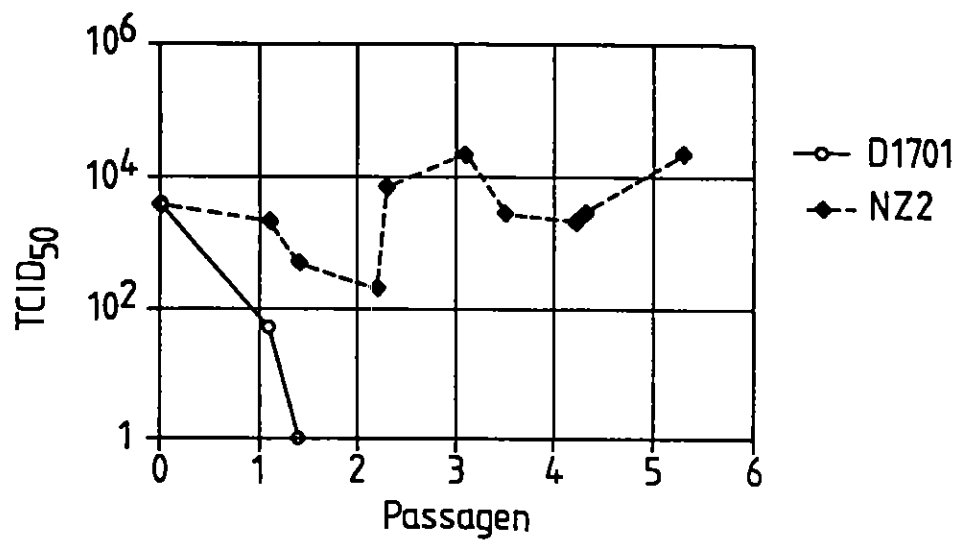


Fig 8

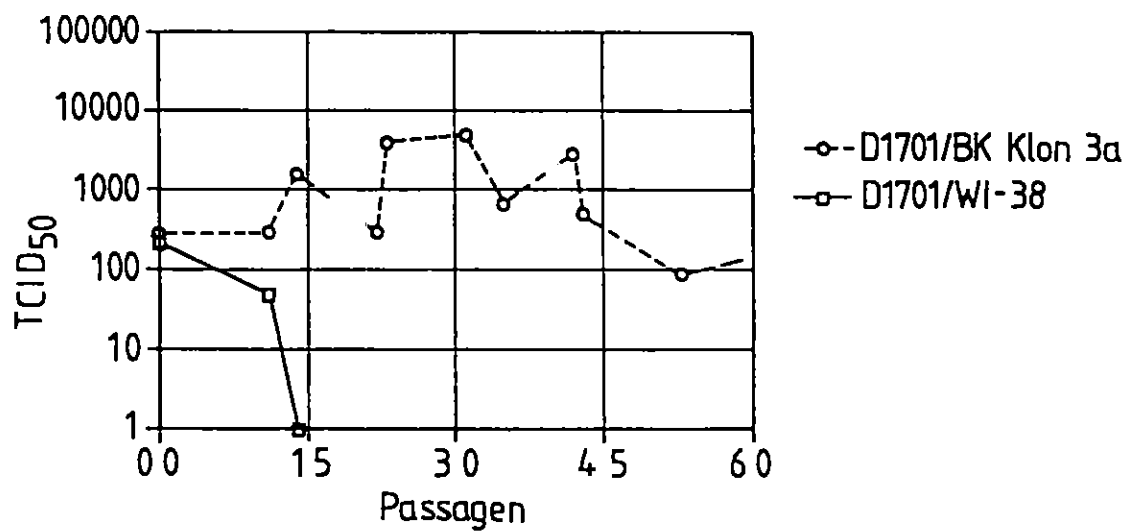


Fig 9

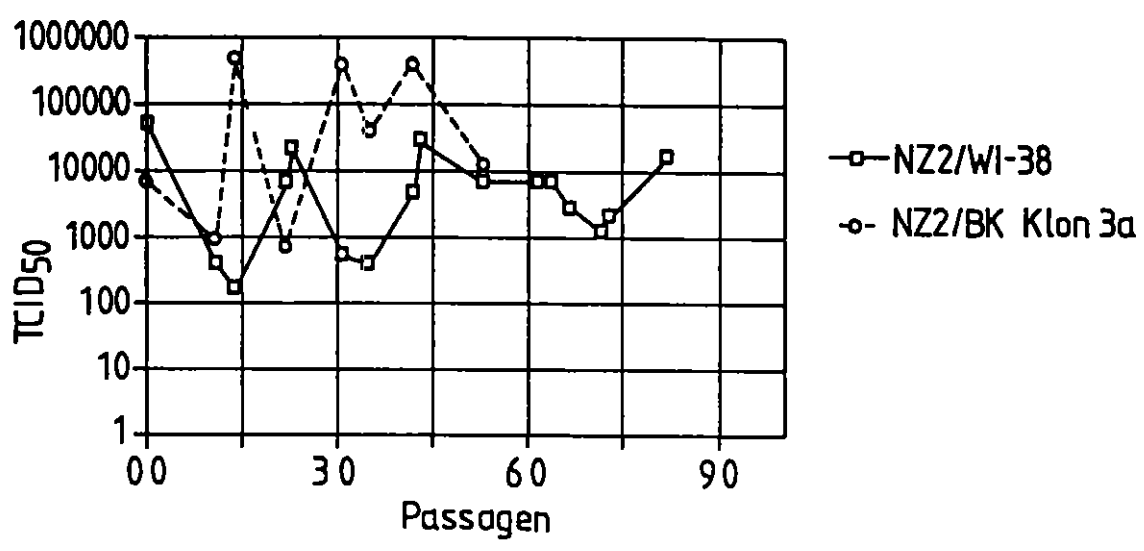
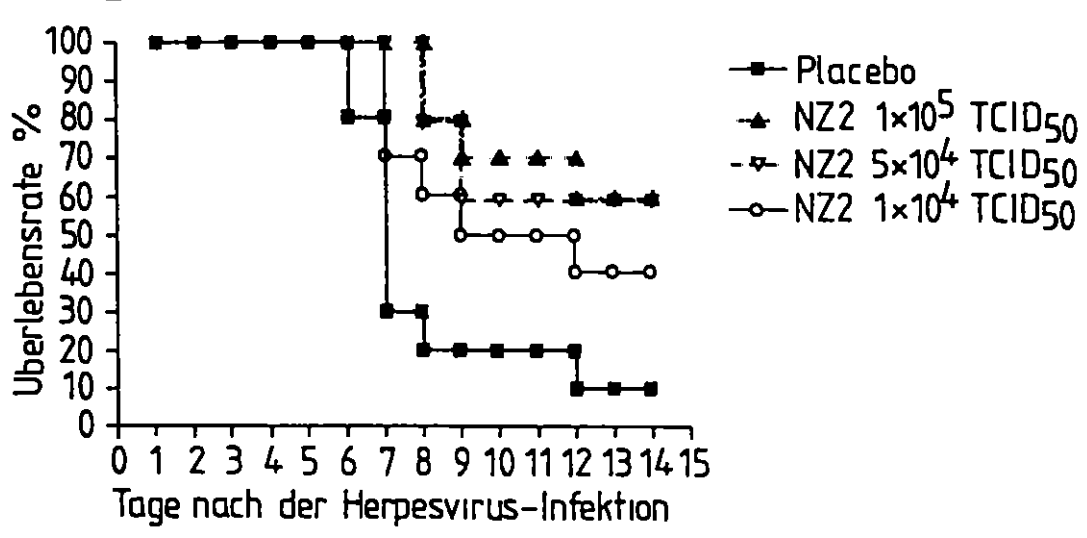


Fig 10



WO 02/04002

PCT/EP01/07991

Uso de cepas del parapoxvirus ovis para la fabricacion de medicamentos antivirales y medicamentos contra el cancer

5 La presente invención se refiere al uso de cepas del parapoxvirus ovis como agente inmunoterapeutico en debilidades inmunes de naturaleza infecciosa o no infecciosa, así como al uso de cepas del parapoxvirus ovis para el tratamiento de enfermedades tumorales, infecciones
10 virales y enfermedades que van acompañadas de estas, así como al uso de cepas del parapoxvirus ovis para la fabricacion de medicamentos para uso en hombres y animales

 La presente invencion se refiere ademas al uso de
15 cepas del parapoxvirus ovis y a formas medicamentosas fabricadas con ellas como agentes inmunoterapéuticos o inmunoprolifácticos, en la metafilaxia antiestrés para impedir o prevenir enfermedades infecciosas tras estrés (p ej operaciones) al uso en la profilaxis de
20 infecciones para impedir o prevenir enfermedades infecciosas mediante la toma antes de operaciones o intervenciones (p ej antes del implante de prótesis o de intervenciones odontologicas), al uso en la metafilaxia de infecciones o en la terapia de infecciones virales agudas
25 o crónicas por ejemplo del tracto respiratorio, de las

infecciones por papilomavirus, de la infeccion por
herpesvirus, de la infeccion por VIH, de la infeccion por
virus de organos internos como por ejemplo la infeccion
por virus de hepatitis, al uso en la cicatrizacion de
5 heridas para acelerar procesos de cicatrización y al uso
para favorecer la cura de heridas que curan mal o no curan
(p ej ulcera crural), al uso en enfermedades como la
esclerosis multiple, el asma, verrugas y otras
neoformaciones de la piel, al uso en enfermedades del
10 ambito alergico, al uso para impedir la eclosion de
alergias sistemicas asi como al uso en alergias topicas y
al uso para la mejora del buen estado de salud, p ej en
la vejez, utilizandose como cepas de parapoxvirus ovis en
el marco de la invencion las cepas NZ2, NZ-7, NZ-10 y orf-
15 11

Pueden utilizarse además derivados de estas cepas
obtenidos por pases (subcultivo) y/o adaptacion en
determinadas celulas, por ejemplo WI-38, MRC-5 o celulas
Vero, o partes o trozos de virus de estas cepas o de estos
20 derivados Por partes debe entenderse fragmentos
expresados genómica o subgenómicamente mediante vectores
adecuados por ejemplo vaccinia en sistemas adecuados
por ejemplo cultivos celulares de fibroblastos Por trozos
se entiende las fracciones obtenidas por purificacion
25 bioquímica, por ejemplo por cromatografía de particulas

fisicamente disgregadas, por ejemplo por accion de ultrasonidos

La presente invención se refiere además al uso de dichas cepas de parapoxvirus ovis para la fabricacion de
5 medicamentos y preparados farmacéuticos. Además de esto, la invencion se refiere al uso de dichas cepas de parapoxvirus ovis en combinación con otros agentes para la fabricacion de medicamentos y preparados farmacéuticos para la terapia antiviral o del cancer

10 Es sabido que infecciones virales latentes y crónicas persistentes pueden activarse o reactivarse por una inmunosupresion, o a la inversa que el sistema inmune reprime la enfermedad aguda que puede producirse por un virus que esta latente (p ej una infeccion latente por
15 herpes virus recurre por inmunosupresion vesiculas en los labios por estrés o toma de cortisona). Es sabido además que las infecciones virales crónicas persistentes y latentes pueden tratarse con dificultad o en absoluto con sustancias antivirales habituales de base de bajo peso
20 molecular

Un motivo de ello puede ser la ausencia de actividad enzimática viral en tales infecciones (por ejemplo la ausencia de una actividad de polimerasa viral que primero debe incorporar un inhibidor nucleosidico en el acido
25 nucleico viral para que este pueda llevar p ej a la

rotura de cadena en el ADN viral por ejemplo la ausencia de una actividad de timidinquinasa viral, que p e j primero debe fosforilar un compuesto antiviral para que este pueda hacerse activo) o bien la ausencia de
5 reconocimiento de células infectadas o degeneradas, p e j células cancerosas o antígenos virales por el sistema inmune del huésped

Es sabido igualmente que en infecciones virales crónicas persistentes una superinfección con otro virus
10 puede conducir a efecto antivirales dirigidos contra el virus crónico persistente ¹⁾ La dependencia de este efecto de interferones como IFN- γ y TNF- α que se segregan por células T células asesinas naturales y macrófagos pudo indicarse por los autores ¹⁾

15 Los resultados de estos autores confirmaron otro estudio anterior en el que se había indicado que las células T citotóxicas restringidas de clase I podían inhibir la expresión genica de VHB hepatocelular en ratones transgénicos con VHB que este proceso se
20 desarrollaba sin destrucción de las células hepáticas y que este proceso fue causado por TNF- α e IFN- γ ²⁾

En la practica veterinaria se utiliza desde hace largo tiempo un producto para la inducción de inmunidad paraespecifica , un llamado inductor de parainmunidad
25 terapeutico, meta- y profilactico Los inductores de

parainmunidad estan constituidos p ej por parapoxvirus ovis, cepa D 1701 quimicamente inactivados (DE 3 504 940) Un producto fabricado sobre la base de este virus (parapoxvirus ovis, cepa D 1701) es el BAYPAMUN®

5 El parapoxvirus inactivado induce en un animal una proteccion inespecifica frente a infecciones por los mas distintos germenés Se acepta que esta proteccion esta mediada por distintos mecanismos del sistema de defensa del propio organismo

10 Entre estos mecanismos se cuentan la induccion de interferón, la activación de las celulas asesinas naturales la induccion de la actividad estimulante de colonias (CSA) asi como la estimulacion de la proliferacion de linfocitos Investigaciones anteriores
15 respecto al mecanismo de accion indicaron la estimulacion de interleucina 2 e interferon- α ³⁾

Ante estos antecedentes se plantea por consiguiente el cometido de perfeccionar la utilidad terapéutica de la sobresaliente actividad del parapoxvirus ovis de modo que
20 aumente cualitativamente la llamada induccion de una respuesta inmune paraespecifica del parapoxvirus ovis, cepa D 1701 generalizada anteriormente descrita y mejorarla de modo que utilizando menores dosis puedan conseguirse mejores efectos antivirales o antitumorales
25 Esto hacia esperar adicionalmente un efecto terapeutico

VJ

con menos efectos secundarios

Ha sido por consiguiente cometido de la invencion mejorar la actividad inmunologica del parapoxvirus Este cometido se ha resuelto utilizando las cepas de
5 parapoxvirus ovis anteriormente indicadas en lugar de la cepa D 1701 habitualmente utilizada

La presente invencion se refiere al uso de virus que taxonomicamente pertenecen a una de las cepas NZ2, NZ-7, NZ-10 u orf-11 de parapoxvirus ovis para la fabricacion de
10 medicamentos contra infecciones virales y cancer en hombres y animales

Ademas la invencion se refiere al uso de derivados de las cepas conforme a la invención obtenidos por pases o adaptacion en sistemas celulares adecuados como por
15 ejemplo celulas humanas como WI-38 MRC-5, celulas de mono, p ej celulas Vero, celulas bovinas como p ej BK/K13A47/Reg o MDBK, y celulas ovinas como MDOK para la fabricacion de medicamentos contra infecciones virales y cancer en hombres y animales y lo tiene por objeto, y
20 ademas al uso de partes o trozos de las cepas indicadas y sus variantes por pases y adaptacion, debiéndose entender por partes fragmentos expresados genomica o subgenomicamente mediante vectores adecuados como virus vaccinia en sistemas adecuados como cultivos celulares de
25 fibroblastos y por trozos las fracciones obtenidas por

purificación bioquímica como cromatografía de las partículas virales expresadas o físicamente disgregadas, para la fabricación de medicamentos contra infecciones virales y cáncer en hombres y animales y lo tiene por
5 objeto, y además al uso de una de las cepas de parapoxvirus ovis y derivados obtenidos como se ha descrito anteriormente para la fabricación de medicamentos y preparados farmacéuticos como agentes inmunoterapéuticos o inmunoprolácticos en enfermedades autoinmunes y en
10 infecciones virales agudas y crónicas del tracto respiratorio y de los órganos internos, y lo tiene por objeto, y además al uso de una de las cepas y derivados obtenidos para la fabricación de medicamentos y preparados farmacéuticos para la metafilaxia antiestrés y para
15 impedir o prevenir enfermedades infecciosas tras estrés así como en la profilaxis de infecciones en el marco de operaciones e intervenciones odontológicas, y lo tiene por objeto, y además al uso de una de las cepas y derivados obtenidos para la fabricación de medicamentos y preparados
20 farmacéuticos para su uso en la metafilaxia de infecciones o terapia de infecciones virales agudas y crónicas por ejemplo del tracto respiratorio en las infecciones por papilomavirus, en la infección por virus del grupo herpes en la infección por VIH, en la infección por virus de
25 órganos internos como por ejemplo la infección por virus

de hepatitis así como para su uso en enfermedades como la
esclerosis múltiple, el asma, verrugas y otras
neoformaciones de la piel, y lo tiene por objeto, y además
al uso de una de las cepas y derivados obtenidos para la
5 fabricación de medicamentos y preparados farmacéuticos
para su uso en heridas para acelerar procesos de
cicatrización y a su uso para favorecer la cura de heridas
que curan mal o no curan y de la úlcera crural y lo tiene
por objeto, y además al uso de una de las cepas y
10 derivados obtenidos para la fabricación de medicamentos y
preparados farmacéuticos para su uso en enfermedades del
ámbito alérgico, psoriasis, neurodermitis, otras
enfermedades autoinmunes como p ej lupus eritematoso así
como para la mejora del buen estado de salud, p ej en la
15 vejez, y lo tiene por objeto, y además al uso de una de
las cepas y derivados obtenidos para la fabricación de
medicamentos y preparados farmacéuticos para su uso contra
enfermedades inflamatorias, degenerativas y proliferativas
de los órganos internos, p ej enfermedad de Crohn, de la
20 piel, de la sangre, del sistema nervioso central y sus
anejos, incluidos los ojos, incluido el cáncer, y lo tiene
por objeto, y además al uso de una de las cepas y
derivados obtenidos de estas en combinación con otros
agentes para la fabricación de medicamentos y preparados
25 farmacéuticos para la terapia antiviral o del cáncer en

hombres y animales, y lo tiene por objeto

Un objeto mas preferido de la invencion es el uso de una de las cepas de parapoxvirus ovis en combinacion con otros agentes para la fabricacion de medicamentos y preparados farmacéuticos para administración oral, y/o en una formulación resistente al jugo gastrico para administracion oral

El parapoxvirus ovis NZ-2 aqui indicado a modo de ejemplo se deposito el 10 de Julio de 2001 en la European Collection of Cell Cultures, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire, SP4 OJG Reino Unido El numero de deposito es

A modo de ejemplo se ha encontrado

15 1 **Estudio de la actividad terapeutica en ratones transgenicos con virus de la hepatitis B**

Para el ensayo proof of concept se utilizaron ratones transgenicos con virus de la hepatitis B (cepa VHB 1 3 Xtg,) Se utilizaron 7 animales machos de una edad de 8 a 10 semanas por grupo La administracion de las distintas dosis se realizo intraperitonealmente en un volumen de 0,15 ml el dia 1 (comienzo del experimento) y el dia 4

Para la administracion se prepararon las siguientes diluciones de cada una de las cepas del virus para los

distintos grupos de dosis

	1ª Dosis	$1,5 \times 10^6$ TCID ₅₀
	2ª Dosis	5×10^5 TCID ₅₀
	3ª Dosis	$1,5 \times 10^5$ TCID ₅₀
5	4ª Dosis	5×10^4 TCID ₅₀

Como control de placebo se utilizo PBS esteril exento de pirogenos

La concentracion del virus se efectuo del modo siguiente 500 ml de sobrenadante de parapoxvirus ovis, cepa NZ 2 (titulo aprox 2×10^5 TCID₅₀/ml) y parapoxvirus ovis, cepa D 1701 (titulo 1×10^7 TCID₅₀/ml) se ajustaron al mismo titulo de viru Para ello se utilizo una ultracentrifuga Beckman (rotor SW28 a 28000 rpm 3 h 4°C) Tras la centrifugacion los sedimentos se ajustaron con volumenes correspondientes de medio diluyente a un titulo de 1×10^7 TCID₅₀/ml

Se utilizaron alicuotas de las dosificaciones correspondientes para una retrotitulacion de control que confirmo los titulos de estas dosificaciones Las dosis correspondientes tras la toma correspondiente de la alicuota de control se inactivaron durante 1 hora a 56°C

	Medio diluyente	10 ml de EMEM 10x
		2,7 ml de bicarbonato 2 g(l
		1 ml de glutamina al 1%
25		86,3 ml de agua bidestilada

El día 5 se sacrificaron los animales sin dolor y se les extrajo el hígado y sangre. Aproximadamente 20 mg de hígado por animal se procesaron con QIAamp Tissue Kit (Qiagen, Hilden), se determinó fotométricamente la concentración del ADN y se controló la integridad electroforéticamente en un gel de agarosa del 1%. El ADN se hibridó en un procedimiento de hibridación de transferencia por puntos con una sonda específica de VHB. Previamente se trató el ADN con RNase A (Qiagen, Hilden) para excluir señales causadas por ARN. Se aplicaron 200 µl (10 µg) de ADN en una membrana de nailon (Boehringer Mannheim), se trataron 4 veces durante respectivos 3 minutos con soak I (NaOH 0,5 N NaCl 1 M) y dos veces con soak II (NaCl 3 M Tris-HCl 0,5 M, pH 7,4) se mantuvieron en estufa a 120°C durante media hora y a continuación se prehibridaron sin sonda durante 30 minutos a 60°C con un tampón de hibridación estándar (SSC 5x 0,1% de N-lauroilsarcosina p/v 0,02% de SDS reactivo de bloqueo 1x y 100 µg/ml de ADN de esperma de pescado). A continuación de este paso se realizó la hibridación con una sonda cebada con un oligonucleótido aleatorio que contenía el genoma del VHB completo (20-40 ng/ml de tampón de hibridación). El filtro se lavó después durante 10 minutos a 64°C en SSC 4x/0,1% de SDS SSC 2x/0,1% de SDS y SSC 1x/0,1% de SDS.

La deteccion inmunologica se realizo con el sistema CDP-Star® (Boehringer Mannheim) conforme a las instrucciones del fabricante Para la valoración se utilizo un LumiImage® (Boehringer Mannheim) La cuantificacion del ADN especifico de VHB en la sangre se realizo mediante PCR cuantitativa Primeramente se obtuvo el plasma mediante centrifugacion de la sangre con EDTA El ADN se purificó mediante el HighPure 16 System Viral Nucleic Acid Kits (Boehringer Mannheim) y se analizaron las señales especificas de VHB por PCR cuantitativa con el ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) Se utilizaron los siguientes cebadores y sondas

- ayw-570f(sentido) 5'-CTGTACCAAACCTTCGGACGG-3'
- ayw-6704(antisentido) 5'-AGGAGAAACGGGCTGAGGC-3'
- Sonda
- ayw-613t 5'-CCATCATCCTGGGCTTTCGGAAAATT-3'

El ADN se amplifico en 50 µl de volumen de reacción (la reacción contenia 1 4 mM de cada dNTP, MgCl₂ 4,75 mM, 15 pmol de uno de cada cebador y de la sonda, 5 µl de tampon PCR 10x [todos los reactivos de la PCR procedian del TaqMan core reagent kit Perkin Elmer/Roche Molecular Systems Inc] y 1 25 U de Taq ADN polimerasa y 0,25 U de Amp erasa Tras un paso de desnaturalizacion inicial (10 min a 95°C) las muestras se sometieron a 40 ciclos de

desnaturalización (95°C 30 seg) y a reasociación/extensión (56°C, 1 min) El análisis de los productos se realizó con el software estándar ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System

5 Se realizó un análisis histoquímico mediante anticuerpos contra el antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B (Dako) Para ello se fijaron partes de un lobulillo hepático durante una noche con formaldehído al 4%, se incluyeron en parafina y se cortaron (5 µm) Tras la
10 desparafinación y rehidratación se extinguió la actividad de peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante un periodo de 20 minutos La unión inespecífica se bloqueó con suero ovino normal A continuación los cortes se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con los
15 anticuerpos diluidos 1 500 Todos los pasos subsiguientes se llevaron a cabo con el Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories) como describe el fabricante

La reacción inmune se visualizó con tetracloruro de 3,3-diamino-bencidina y peróxido de hidrógeno Los cortes
20 se contratiñeron con hematoxilina/eosina

Los análisis estadísticos de los resultados se realizaron por análisis de varianza y comparación post-hoc

En el resultado se comprobó sorprendentemente que
25 utilizando la cepa NZ 2 se alcanzaba un refuerzo de la

actividad antiviral en comparacion con la capa D 101 de
parapox ovis conocida Por consiguiente, es posible por
vez primera utilizando parapoxvirus ovis inducir un
refuerzo en la compleja capacidad del sistema inmune que
5 se diferencia significativamente del refuerzo de actividad
de los inductores de parainmunidad conocidos hasta ahora

Se obtuvieron sorprendentemente los siguientes
resultados

Higado En los animales tratados con NZ-2 se
10 determino en comparacion con los animales tratados con D
1701 una reduccion significativamente mas intensa del ADN
especifico de VHB En comparacion con D 1701 NZ2 es mas
potente en su actividad antiviral en el grupo de dosis
mas elevada la toma de NZ 2 reduce el ADN especifico de
15 HBV en mas de un factor 45 mejor que la toma de la misma
cantidad de D 1701, y en el grupo de dosis mas baja en un
factor 57 En el plasma la toma de NZ 2 reduce el ADN
especifico de HBV en el grupo de dosis mas baja en mas de
un factor 10 mejor que la toma de la misma cantidad de D
20 1701 Por consiguiente se ha demostrado que la actividad
terapeutica de parapoxvirus ovis NZ 2 es
significativamente mejor que la de la cepa D 1701

En las figuras se representa la reduccion de las
señales especificas de VHB en comparacion con el grupo de
25 placebo (este se equiparó a 100%)

La Figura 1 muestra resultados del tratamiento de ratones transgenicos con VHB con cepa D 1701 y NZ 2 respectivamente. El ADN especifico de VHB se redujo en el hígado en todos los grupos de dosis con ambas cepas significativamente en comparacion con el grupo de placebo, pero con la cepa NZ 2 mas intensamente. Con las dos dosis mas bajas de NZ 2 se presento una reduccion significativamente más intensa del ADN especifico de VHB que en los grupos de dosis equivalentes de D 1701. En la Figura 2 se muestra el resultado del tratamiento de ratones transgenicos con VHB con cepa D 1701 y NZ 2 respectivamente en el plasma. El ADN especifico de VHB se redujo en el plasma en todos los grupos de dosis con ambas cepas significativamente en comparacion con el grupo de placebo pero con la cepa NZ 2 más intensamente. En contraposición con la dosis mas baja de NZ 2 la dosis mas baja de la cepa D 1701 no actuó ya de modo antiviral significativamente.

2 Induccion de citocinas.

Ratones hembras Balb/c de 7 a 8 semanas de edad se mantuvieron en condiciones esteriles y se utilizaron para el ensayo. Los animales se distribuyeron al azar y se dividieron en grupos de 6 animales cada uno. Se utilizó el siguiente esquema de tratamiento.

Grupo 1 Placebo

	Grupo 2	Parapoxvirus	ovis	cepa	D 1701	5x10 ⁴
		TCID ₅₀ /dosis				
	Grupo 3	Parapoxvirus	ovis	cepa	NZ 2	5x10 ⁴
		TCID ₅₀ /dosis				
5	Grupo 4	Placebo				
	Grupo 5	Parapoxvirus	ovis	cepa	D 1701	5x10 ⁴
		TCID ₅₀ /dosis				
	Grupo 6	Parapoxvirus	ovis	cepa	NZ 2	5x10 ⁴
		TCID ₅₀ /dosis				

10 El volumen de administración ascendió a 10 ml/kg, la administración se realizó intraperitonealmente

Los animales de los grupos 1 a 3 se sacrificaron 6 horas después de la administración y los animales de los grupos 4 a 6 12 horas después de la administración, se
15 obtuvieron células peritoneales mediante un lavado con PBS frío y se aislaron los ganglios linfáticos portales y mesentéricos

Las células peritoneales se concentraron mediante un paso de centrifugación (5 min a 3000 rpm a temperatura
20 ambiente en una centrifuga de mesa de tubos Eppendorf), a continuación se suspendieron en 0.2 ml de tampón de lisis (solución de lisis citrato sódico 25 mM, isotiocianato de guanidinio 4 M 0,5% de N-lauroil-sarcosina), se congelaron subitamente y se almacenaron a -75°C hasta la
25 preparación del ARN

La preparacion del ARN total se realizó mediante extraccion acida con fenol/cloroformo. Para ello se descongelaron a temperatura ambiente las muestras congeladas en tampon de lisis y se mezclaron para la
5 extraccion con las siguientes soluciones: 1/10 en volumen de tampon de lisis acetato sódico 2 M (pH 4,0), 1 en volumen de tampon de lisis fenol saturado de agua, 1/5 en volumen de tampon de lisis cloroformo/alcohol isoamilico (24:1). Esta mezcla se mezcló durante 10 segundos en un
10 Vortex y a continuacion se mantuvo en hielo durante 10 minutos. La separacion de fases se realizó por centrifugacion a 15365 g y 4°C durante 30 minutos. Después la fase acuosa se transfirió a un nuevo recipiente y para el aislamiento del ARN que se encontraba en esta fase se
15 añadieron 8 ml de RNA-MATRIX del Rnaid™ plus Kit (DIANOVA) y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. El complejo ARN/RNA-MATRIX se precipitó por centrifugación a 7000 g y el sobrenadante se desechó. El sedimento se lavó seguidamente 2x con sendos 250 µl de RNA-WASH (DIANOVA) y
20 tras el ultimo lavado se secó por centrifugacion a vacío. El ARN se eluyó por adición de 20-30 µl de agua destilada exenta de ARNasa por calentamiento a 55°C durante 15 minutos. Tras centrifugacion a 7000 g y temperatura ambiente durante 1 minuto se separó la matriz
25 transfiriendo la solución de ARN a un nuevo recipiente.

La calidad del ARN se examino mediante electroforesis en gel El ARN se almaceno a -70°C

La sintesis del ADNc se realizo por transcripcion inversa del ARNm utilizando cebadores oligo(dT) como
 5 moléculas iniciadoras para la polimerización En la mezcla de síntesis estaban presentes los siguientes componentes
 200 ng-2 µg de ARN total 2 µl de transcriptasa inversa M-MLV (200 U/µl) (GIBCO/BRL), 8 µl del correspondiente
 tampon 5xRT (GIBCO/BRL), 1 µl de DTT (0,1 M) (GIBCO/BRL)
 10 4 µl de dNTP (2,5 mM) (SIGMA), 2 µl de cebador oligo(dT)12-18 (100 µg/µl) (PROMEGA) 1 µl de inhibidor de ARNasa humana de placenta (10000 U/ml) (GIBCO/BRL) y agua hasta 40 µl de volumen total La mezcla se mantuvo durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se
 15 incubo durante 45 minutos a 37°C despues se calentó durante 3 minutos a 95°C e inmediatamente se enfrió sobre hielo El ADNc sintetizado de este modo se almacenó a -20°C

Las cantidades del ADNc se estandarizaron mediante
 20 un gen housekeeping (β-actina) La PCR cuantitativa se realizo con el ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) Se utilizaron los siguientes cebadores

25	β-Actina sentido	5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3'
----	------------------	--

19

	antisentido	5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3'
IFN- γ	sentido	5'-AGCGGC TGA CTG AAC TCA GAT TGT AG-3'
5	antisentido	5'-GTC ACA GTT TTC AGC TGT ATA GGG-3'
TNF- α	sentido	5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C-3'
10	antisentido	5'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG G-3'
IL-5	sentido	5'-GCC AAC TGG ATA GAT GTA AGA TAT GAC CT-3'
	antisentido	5'-CGT GTT GAT GAA CAT TTG GAC AAT GCG TAT-3'

15 El ADN se amplificó en 25 μ l de volumen de reacción
(la reacción contenía 1,4 mM de cada dNTP, $MgCl_2$ 4 mM, 0,3
 μ mol de uno de cada cebador y de la sonda, 2,5 μ l de
tampon PCR 10x con verde SYBR [todos los reactivos para la
pCR procedían del SYBR Green PCR core reagent kit Perkin
20 Elmer/Roche Molecular Systems Inc] y 1,25 U de Taq ADN
polimerasa y 0,25 U de Amp erasa Tras un paso inicial de
desnaturalización (95°C durante 10 min) las muestras e
sometieron a 40 ciclos de desnaturalización (95°C 30 seg)
y a reasociación/extensión (60°C, 1,30 min) El análisis
25 de los productos se realizó con el software estándar ABI

PRISM™ 7700 Sequence Detection System Los análisis estadísticos de los resultados se realizaron por análisis de varianza y comparación post-hoc

Se obtuvieron sorprendentemente los siguientes
5 resultados

1 La expresión de interferón γ tras el tratamiento con la cepa D 1701 o la cepa NZ 2 se indujo 6 y 12 horas después de la administración (Figura 3) Esta inducción es con la cepa NZ 2 significativamente mayor tanto respecto
10 al placebo como también respecto a la cepa D 1701 El nivel de la expresión de interferón γ observado tras la toma de la cepa D 1701 no es significativo respecto al del control de placebo Están representados los valores que se midieron en células obtenidas por lavado peritoneal

15 2 La expresión de TNF α tras el tratamiento con la cepa D 1701 se indujo 6 horas después y con la cepa NZ 2 12 horas después de la administración (pudiéndose constatar tras 12 horas ya un descenso en comparación con el valor de 6 horas Figura 4) Esta inducción es con la
20 cepa NZ 2 6 horas después de la administración significativamente mayor que comparativamente respecto a la cepa D 1701 Están representados los valores que se midieron en células obtenidas por lavado peritoneal

3 La expresión de IL-15 tras el tratamiento con la
25 cepa D 1701 o la cepa NZ 2 se indujo 6 y 12 horas después

de la administración (Figura 5) Esta inducción es con la cepa NZ 2 6 horas después de la administración significativamente mayor que comparativamente respecto a la cepa D 1701 o placebo El nivel de la expresión de IL-15 observado tras la toma de la cepa D 1701 no es significativa respecto a la del control de placebo Están representados los valores que se midieron en células obtenidas por lavado peritoneal

3 Estudio de la actividad terapéutica en ratones desnudos portadores de tumores

Se cultivaron células MDA-MB231 (ATCC#HTB26) en medio completo (DMEM 88 5, FBS 10%, penicilina/estreptomina 1% (respectivamente de Gibco Life Technologies)) a 37°C y con 5% de CO₂ en un incubador El día del trasplante las células presentaban una confluencia de aprox el 70% Las células se tripsinizaron, se lavaron con HBSS, se contaron y se ajustaron con PBS enfriado previamente a 2.5×10^7 células/ml Se utilizaron ratones hembras NCr desnudos (taconicos) Los ratones tenían entre 8 y 10 semanas de edad y pesaban aprox 22 g Todas las manipulaciones a los animales se efectuaron en condiciones estériles Se inyectaron subcutáneamente en la región de los costados 5×10^6 en un volumen total de 0,2 ml Después de esto los ratones se mantuvieron otros siete días hasta que los tumores habían alcanzado una masa media de aprox 80 mg

Se midieron los tumores y los ratones se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos de diez animales cada uno. A los distintos grupos obtenidos se les administró del modo siguiente

5 Grupo 1 Placebo (PBS)

 Grupo 2 Parapoxvirus ovis, cepa D1701

 Grupo 3 Parapoxvirus ovis, cepa NZ2

 La D1701 se administro en una dosis de $2,5 \times 10^5$ TCID₅₀,
la NZ2 en una dosis de 1×10^5 TCID₅₀ en total
10 respectivamente cuatro veces espaciadas respectivamente
tres dias. Los tumores se midieron dos veces por semana.
Las significancias se determinaron mediante el test de Student

 La Figura 6 muestra el tamaño medio de los tumores
15 (en miligramos) en animales de los grupos 1 a 3 en el
transcurso del tiempo de ensayo (en dias)

 (Símbolos grupo 1, círculos grupo 2 triángulos
grupo 3, cuadrados)

 De modo sorprendente se encontro en sistemas
20 experimentales una significativa actividad dirigida hacia
tumores en comparación con el grupo de control ($p < 0,05$)
Ademas la cepa NZ2 se mostró claramente mas potente que
la cepa D1701. Para conseguir el mismo efecto fue
necesario solamente aproximadamente la mitad de la cantidad
25 de NZ2, en comparación con la de D1701

Este hallazgo justifica claramente la actividad terapéutica de preparaciones de virus conforme a la invención en ratones desnudos portadores de tumores

Los ratones desnudos son inmunodeficientes y no
5 disponen de células T funcionales. La actividad dirigida contra los tumores es causada presumiblemente en sistemas experimentales por las clientelas naturales (CN), otras células y acción directa de citocinas/quimiocinas. En un sistema inmune completo e intacto sería de presumir que la
10 mejor actividad de NZ2 resultaría todavía más clara

4 Otras diferencias biológicas entre NZ2 y D1701

Se ha encontrado que el parapoxvirus NZ2 en contraposición a la cepa D1701 puede ser subcultivado de modo continuado sobre líneas celulares humanas. Esto
15 indica diferencias básicas en el comportamiento de replicación y/o en los receptores virales en NZ2 y en D1701

La adaptación a líneas celulares humanas es un requisito importante para la producción de cepas virales
20 sobre líneas celulares humanas

4 a) Subcultivabilidad continuada sobre células humanas MRC-5

En la Figura 7 se representa un ensayo de adaptación de las cepas NZ2 y D1701 a la línea celular humana
25 diploide MRC-5. La MRC-5 es adecuada para la producción de

principios activos biológicos y vacunas Las cepas se utilizaron con el mismo título inicial y los correspondientes sobrenadantes del cultivo celular se continuaron a través de 5 pases en células MRC-5 Esta representada la titulación de muestras de los sobrenadantes de las células MRC5 respectivamente infectadas en TCID₅₀ a través del número de pases Solamente la cepa NZ2 pero no la D1701, pudo retrotitularse sobre cultivos celulares renales bovinos (BK clon 3a) Esto indica diferencias biológicas básicas entre las dos cepas en el comportamiento de infección y replicación Al mismo tiempo este resultado indica que la NZ2 puede reproducirse en un espectro de células más amplio que la D1701, con lo que resulta la posibilidad de un procedimiento de producción basado en células humanas

4 b) Subcultivabilidad de NZ2 y D1701 sobre células WI-38 y células BK clon 3a

También mediante los experimentos representados en la Figura 8 y la Figura 9 se aclaran diferencias biológicas esenciales entre las cepas NZ2 y D1701 La Figura 8 muestra el título de virus en ensayos de subcultivo de D1701 en células BK clon 3a bovinas y en células WI-38 humanas a través del número de pases Puede observarse que la D1701 es subcultivable de modo continuado sobre células BK clon 3a pero no sobre células

WI-38 humanas

Otra cosa sucede con la cepa NZ2 Esta cepa puede subcultivarse de modo continuado durante varios días tanto sobre células BK clon 3a como también sobre células WI-38

5 (Figura 9)

También estos resultados indican claras diferencias en el comportamiento de infección y replicación de NZ2 y D1701

4 c) Actividad dependiente de la dosis de NZ2 en el
10 ensayo de desafío con herpesvirus tras subcultivo en WI-38

Para la investigación de las propiedades inmunoestimuladoras de cepas de NZ2 que han sido subcultivadas sobre células WI-38 se realizaron ensayos de
15 desafío con herpesvirus en ratones Se trataron tres grupos de respectivamente 10 animales de ensayo con respectivamente 1×10^4 TCID₅₀ 5×10^4 TCID₅₀ y 1×10^5 TCID₅₀ Un grupo de control recibió un placebo La tasa de supervivencia de los cuatro grupos de ensayo esta
20 representado en la Figura 10 a través del tiempo después de la infección con herpesvirus Sorprendentemente se comprobó que la NZ2 tras el subcultivo sobre células WI-38 no había perdido sus propiedades inmunoestimuladoras

Todos los resultados experimentales de este ejemplo
25 indican diferencias biológicas básicas en el

comportamiento de infeccion y replicacion de NZ2 y D1701
Se ha encontrado sorprendentemente que la produccion de
NZ2 para su uso como inmunomodulador no esta asociado, en
contraposicion a la D1701, a celulas renales bovinas como
5 linea celular de produccion

Sobre la base de las conocidas relaciones de la
influencia de una respuesta inmune Th1 sobre infecciones
virales latentes y cronicas persistentes ^{4 5)} asi como
sobre enfermedades proliferativas p ej cancer ⁹⁾ y de
10 las mejores propiedades inmunomoduladoras de la cepa NZ 2
de parapoxvirus ovis en comparacion con la cepa D 1701 de
parapoxvirus ovis, es posible la utilizacion de
inmunomoduladores basados en la cepa NZ 2 de parapoxvirus
ovis o en una de las cepas anteriormente indicadas como
15 monoterapia o en combinacion con compuestos de bajo peso
molecular biologicamente activos, p ej antivirales, en
hombres y animales y el aprovechamiento terapeutico para
la terapia antiviral de infecciones por virus de la
hepatitis B por virus de la hepatitis C u otros germen
20 del grupo de los virus causantes de la hepatitis asi como
de otras infecciones virales de los organos internos, asi
como de infecciones, tambien acompañadas de otras
enfermedades por los distintos tipos del virus del herpes
simplex (VHS), los distintos tipos del virus del papiloma
25 humano (VPH), el virus de la inmunodeficiencia humana

(VIH) el virus de la varicela zoster, el citomegalovirus humano (CMVH), así como de las correspondientes enfermedades virales en animales

Además, con las cepas de parapoxvirus ovis
5 anteriormente indicada, debido al mecanismo de acción indicado, pueden llevarse a cabo en especial los siguientes tratamientos profilácticos o terapéuticos prometedores

Reducción de las recurrencias en infecciones por
10 herpesvirus, metafilaxia, es decir reducción del establecimiento de infecciones virales (p.ej. VIH) si se trata inmediatamente después de la exposición al agente ⁷⁾
El tratamiento de cáncer es igualmente posible debido al mecanismo de acción ^{8 9)}

15 Según sea el problema clínico el agente terapéutico basado en el parapoxvirus se administra sistemáticamente, así por ejemplo intramuscularmente, subcutáneamente, intraperitonealmente, intravenosamente, per os, o localmente. El parapoxvirus se presenta a este respecto o
20 purificado y liofilizado y/o inmediatamente antes de la administración se suspende en un disolvente adecuado o se presenta en otra formulación adecuada o se presenta en una forma de administración resistente al jugo gástrico o en otra forma de administración oral

25 Igualmente pueden prepararse preparados a partir de

derivados de NZ2 obtenidos por pases y/o adaptacion en determinadas células, por ejemplo células WI-38, MRC-5 o Vero, y de las otras cepas o partes o trozos de NZ2 anteriormente indicados y de las otras cepas indicadas o de estos derivados Por partes debe entenderse fragmentos expresados genómica o subgenómicamente mediante vectores adecuados, por ejemplo vaccinia, en sistemas adecuados, por ejemplo cultivos celulares de fibroblastos Por trozos se entiende las fracciones obtenidas por purificación bioquímica, por ejemplo por cromatografía, de partículas físicamente disgregadas por ejemplo por acción de ultrasonidos

Ademas, pueden ser necesarias varias administraciones o tratamiento prolongado con esquemas temporales que correspondan a los requisitos del problema clínico

Así, en la terapia anticancerosa por ejemplo (sin embargo sin limitación) el uso conforme al siguiente esquema se muestra especialmente prometedor

Administración intramuscular de respectivas 10^6 a 10^7 TCID₅₀ (Tissue Culture Infective Dosage) durante 4 semanas cada día 3 seguida de 2 semanas de pausa nueva administración intramuscular de respectivas 10^6 a 10^7 TCID₅₀ durante 4 semanas cada día 3 seguida de 2 semanas de pausa nueva administración intramuscular de respectivas 10^6 a 10^7 TCID₅₀ durante 4 semanas cada día 3

seguida de 2 semanas de pausa según el grado de gravedad y el éxito en la curación estos ciclos pueden completarse con otros ciclos, como alternativa puede estar indicado también un esquema según el cual la formulación se
5 administra cada día 4 a 5 durante al menos 3 meses

En infecciones víricas crónicas se administran por ejemplo 10^6 a 10^7 TCID₅₀ de la formulación subcutáneamente en la zona abdominal o intramuscularmente en la zona del deltoides o del cuádriceps cada día 3 un total de 5 veces
10 Pueden efectuarse desviaciones sobre este esquema según las necesidades que resulten de la enfermedad Para la profilaxis de resfriados debe hacerse gárgaras con la formulación y repetir esta aplicación en tanto exista el riesgo de contagio

15 Para la prevención de infecciones tras intervenciones quirúrgicas orales (p ej una operación dental) debe gargarizarse la víspera de la intervención durante 1-2 min

Bibliografia

- 1 Guidotti, L G , Borrow, P , Hobbs, M V , Matzke, B ,
 Gresser, I , Oldstone, M B A , and Chisari, F V
 (1996) Viral cross talk Intracellular inactivation
 5 of the hepatitis B virus during an unrelated viral
 infection of the liver Proc Natl Acad Sci USA
 93 4589-4594

- 2 Guidotti, L G , Ando, K Hobbs, M V , Ishikawa T ,
 Runkel, L , Schreiber, R D , and Chisari, F V
 10 (1994) Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B
 virus gene express on by a noncytolytic mechanism in
 transgenic mice Proc Natl Acad Sci USA 91 3764-
 3768

- 3 Steinmassl, G , G Wolf (1990) Bildung von
 15 Interleukin 2 und Interferon durch mononukleäre
 Leukozyten des Schweines nach in vitro-Stimulation
 mit verschidenen Viruspräparaten J Vet Med
 B37,5,321-331

- 4 P Lucin, S Jorjic, M Messerle, B Polic, H
 20 Hengel, U H Foszinowski (1994) Late-Phase
 inhibition of murine cytomegalovirus replication by
 synergistic action of interferon gamma and tumor
 necrosis factor alpha J Gen Virol 75 101-110 P M

- 5 Smith R M Wolcott, R Chervenak, S R Jennings
 25 (1994) Control of acute cutaneous herpes-simplex

virus-infection - T-cell mediated viral clearance is dependent upon interferon gamma, Virology 202(1) 76-88]

- 6 Y Kawanashi, N Hayashi, K Ktayaama, K ueda, T
5 Takehara, E Miyoshi, E Mita, A Kasahara, H
Fusamoto, T Kamada (1995) Tumor necrosis factor
alpha and interferon gamma inhibit synergistically
viral replication in hepatitis B virus replicating
cells J Medical Virology 47 (3) 272-277
- 10 7 Dhawan, S , L M Wahl, A Heredia, Y H Zhang, J S
Epstein M S Meltzer, I K Hewlett (1995)
Interferon gamma inhibits HIV-induced invasiveness of
Monocytes J Leukocyte Biology, 58 (6) 713-716
- 8 J F Bromberg, C M Horvath, Z L Wen, R D
15 Schreiber, J E Darnell (1996) Transcriptionally
active stat1 is required for the antiproliferative
effects of both interferon alpha and interferon
gamma PNAS 93(15) 7673-7678
- 9 M Klouche, H Kirchner F Holzel (1994)
20 Antiproliferative effects of interferon gamma in
combination with alpha-difluoromethylornithine on
human carcinoma cell cultures J Cancer Research and
Clinical Oncology 120(12) 706]

PCT

LEA34376 WO

Original (para PRESENTACIÓN) impreso el 10 07 2001 01 12 00 PM

0-1	Formulario PCT/RO/134 (EASY) Datos correspondientes a un microorganismo depositado y/o a otro material biológico depositado suministrado utilizando	
0-1 1		PCT-EASY Versión 2 91 (actualizada el 01 01 2001)
0-2	Numero internacional de referencia	
0-3	Numero de referencia del solicitante o representante	LEA34376-WO

1	Los datos siguientes se refieren al microorganismo y/o otro material biológico que está indicado en la Memoria descriptiva	
1 1	Página	6
1 2	Línea	15
1 3	Datos ref al depósito	
1 3 1	Nombre del lugar de depósito	European Collection of Cell Cultures Vaccine Research and Production Laboratory Service Centre for Applied Microbiology and Research Porton Down Salisbury Wiltshire SP4 0JG Reino Unido 10 Julio 2001 (10 07 2001)
1 3 2	Dirección del lugar de depósito	
1 3 3	Fecha del depósito	
1 3 4	Numero de entrada	ACC
1-4	Otros datos	NINGUNO
1 5	Estados designados para los que se han hecho indicaciones especiales	odos los Estados designados
1-6	Datos presentados por separado	NINGUNO
	Estos datos se transmiten a la Oficina Internacional despues	

A RELLENAR POR LA OFICINA DE SOLICITUD

0-4	Este formulario se ha presentado con la Solicitud Internacional (si o no)	si
0-4 1	Empleado con plenos poderes	O Durand

A RELLENAR POR LA OFICINA INTERNACIONAL

0 5	Este formulario se presentó en la fecha siguiente en la Oficina Internacional	
0 5 1	Empleado con plenos poderes	

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

Reivindicaciones

5

1 Uso de virus que taxonómicamente pertenecen a una de las cepas NZ2, NZ-7, NZ-10 u orf-11 de parapoxvirus ovis para la fabricación de medicamentos contra infecciones virales y cáncer en hombres y animales

10

2 Uso de derivados de los virus conforme a la reivindicación 1 obtenidos por pases o adaptación en sistemas celulares adecuados como por ejemplo células humanas como WI-38, MK-5, células Vero, células bovinas como BK-K13A47/Reg o MDBK, y células ovinas como MDOK para la fabricación de medicamentos contra infecciones virales y cáncer en hombres y animales

3 Uso de partes o trozos de los virus conforme a la reivindicación 1 y 2, debiéndose entender por partes fragmentos expresados genómica o subgenómicamente mediante vectores adecuados como vacciniavirus en sistemas adecuados como p ej cultivos celulares de fibroblastos y por trozos las fracciones obtenidas por purificación bioquímica como cromatografía de las partículas virales

expresadas o físicamente disgregadas, para la fabricación de medicamentos contra infecciones virales y cáncer en hombres y animales

5 4 Uso de una de las cepas de parapoxvirus ovis conforme a la reivindicación 1-3 para la fabricación de medicamentos y preparados farmacéuticos como agentes inmunoterapéuticos o inmunoprolácticos en enfermedades autoinmunes y en infecciones virales agudas y crónicas del
10 tracto respiratorio y de los órganos internos

 5 Uso de una de las cepas conforme a la reivindicación 1-3 para la fabricación de medicamentos y preparados farmacéuticos para la metafilaxia antiestrés y
15 para impedir o prevenir enfermedades infecciosas tras estrés así como en la profilaxis de infecciones en el marco de operaciones e intervenciones odontológicas

 6 Uso de una de las cepas conforme a la
20 reivindicación 1-3 para la fabricación de medicamentos y preparados farmacéuticos para uso en la metafilaxia de infecciones o en la terapia de infecciones virales agudas por ejemplo del tracto respiratorio, de las infecciones por papilomavirus, de la infección por herpesvirus de la
25 infección por VIH, de la infección por virus de órganos

internos como por ejemplo la infección por virus de hepatitis así como para uso en enfermedades como la esclerosis múltiple, el asma, verrugas y otras neoformaciones de la piel

5

7 Uso de una de las cepas conforme a la reivindicación 1-3 para la fabricación de medicamentos y preparados farmacéuticos para uso en heridas para acelerar procesos de cicatrización y para uso para favorecer la cura de heridas que curan mal o no curan y de la úlcera crural

8 Uso de una de las cepas conforme a la reivindicación 1-3 para la fabricación de medicamentos y preparados farmacéuticos para uso en enfermedades del ámbito alérgico psoriasis, neurodermitis, otras enfermedades autoinmunes como p ej lupus eritematoso, así como para la mejora del buen estado de salud p ej en la vejez

20

9 Uso de una de las cepas conforme a la reivindicación 1-3 para la fabricación de medicamentos y preparados farmacéuticos para uso contra enfermedades inflamatorias degenerativas y proliferativas de los órganos internos (p ej enfermedad de Crohn) de la piel,

25

de la sangre del sistema nervioso central y sus anejos,
incluidos los ojos, incluido el cáncer

10 10 Uso de una de las cepas de parapoxvirus ovis
5 conforme a la reivindicación 1-3 en combinación con otros
agentes para la fabricación de medicamentos y preparados
farmaceuticos para la terapia antiviral o del cancer en
hombres o animales

10 11 Uso de una de las cepas de parapoxvirus ovis
conforme a la reivindicación 1-3 en combinación con otros
agentes para la fabricación de medicamentos y preparados
farmaceuticos para administracion oral y/o en una
formulacion resistente al jugo gastrico para
15 administracion oral

Uso de cepas del parapoxvirus ovis para la fabricacion
de medicamentos antivirales y medicamentos contra el
cancer

Resumen

La presente invencion se refiere al uso de cepas del parapoxvirus ovis como agente inmunoterapeutico en debilidades inmunes de naturaleza infecciosa o no infecciosa, asi como al uso de cepas del parapoxvirus ovis para el tratamiento de enfermedades tumorales, infecciones virales y enfermedades que van acompañadas de estas asi como al uso de cepas del parapoxvirus ovis para la fabricacion de medicamentos para uso en hombres y animales

PROTOCOLO DE SECUENCIAS

<110> Bayer AG

<120> Uso de cepas del parapoxvirus ovis para la
fabricación de medicamentos antivirales

<130> Parapoxvirus ovi cepa NZ2

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver 2 1

<210> 1

<211> 25

<212> ADN

<213> Mus sp

<220>

<223> Cebador beta-actina antisentido

<400> 1

taaaacgcag ctcagtaaca gtccg

25

<210> 2

<211> 25

<212> ADN

<213> Mus sp

<220>

<223> Cebador beta-actina, sentido

<400> 2

2

tggaatcctg tggcatccat gaaac

25

<210> 3

<211> 26

<212> ADN

<213> Virus hepatitis B

<220>

<223> Sonda VHB, ayw-613t

<400> 3

ccatcatcct gggctttcgg aaaatt

26

<210> 4

<211> 19

<212> ADN

<213> Virus hepatitis B

<220>

<223> Cebador VHB ayw-670r (antisentido)

<400> 4

aggagaaacg ggctgaggc

19

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> Virus hepatitis B

<220>

3

<223> Cebador VHB, ayw-570f (sentido)

<400> 5

ctgtaccaaa ccttcggacg g 21

<210> 6

<211> 24

<212> ADN

<213> Mus sp

<220>

<223> Cebador IFN-gamma (antisentido)

<400> 6

gtcacagttt tcagctgtat aggg 24

<210> 7

<211> 26

<212> ADN

<213> Mus sp

<220>

<223> Cebador IFN-gamma (sentido)

<400> 7

agcggctgac tgaactcaga ttgtag 26

<210> 8

<211> 30

<212> ADN

4

<213> Mus sp

<220>

<223> Cebador IL-15 (antisentido)

<400> 8

cgtgttgatg aacatttgga caatgcgtat

30

<210> 9

<211> 29

<212> ADN

<213> Mus sp

<220>

<223> Cebador IL-15 (sentido)

<400> 9

gccaaactgga tagatgtaag atatgacct

29

<210> 10

<211> 25

<212> ADN

<213> Mus sp

<220>

<223> Cebador TNF-alfa (antisentido)

<400> 10

acattcgagg ctccagtga ttcgg

25

<210> 11

<211> 25
<212> ADN
<213> Mus sp
<220>
<223> Cebador TNF-alfa (sentido)
<400> 11
ggcaggtcta ctttggagtc attgc

Fig 1

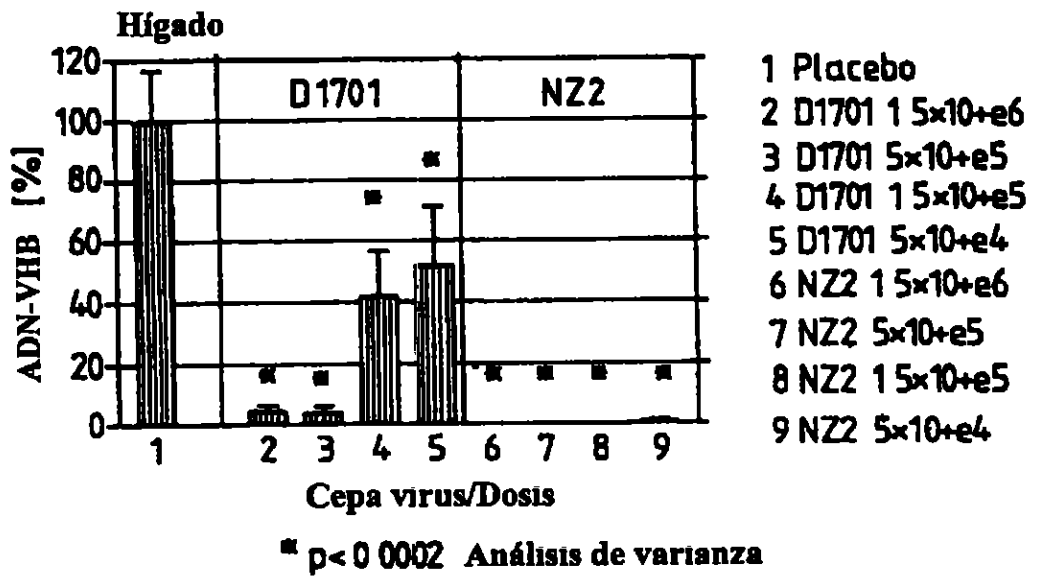


Fig 2

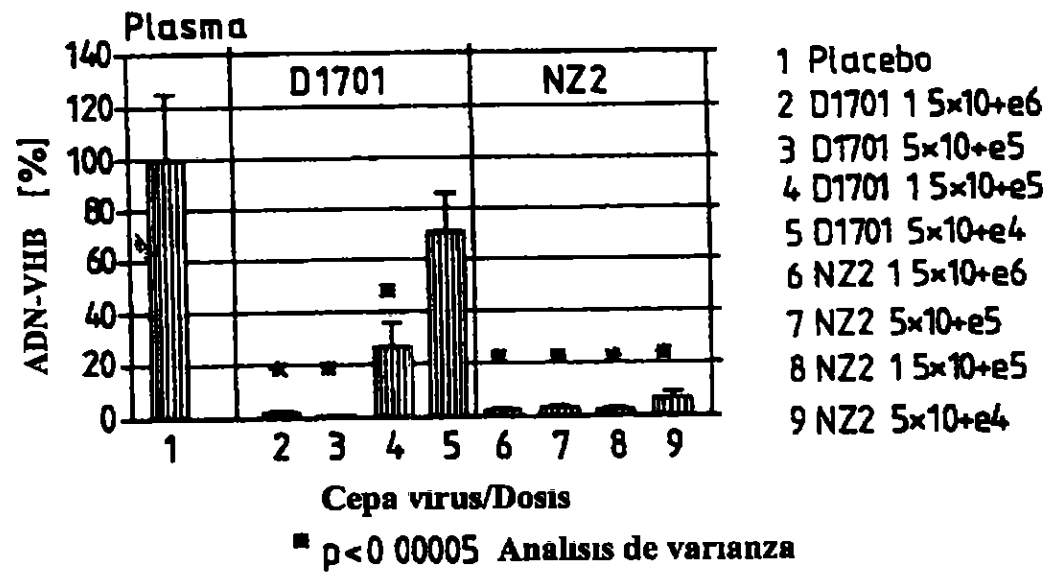


Fig 3

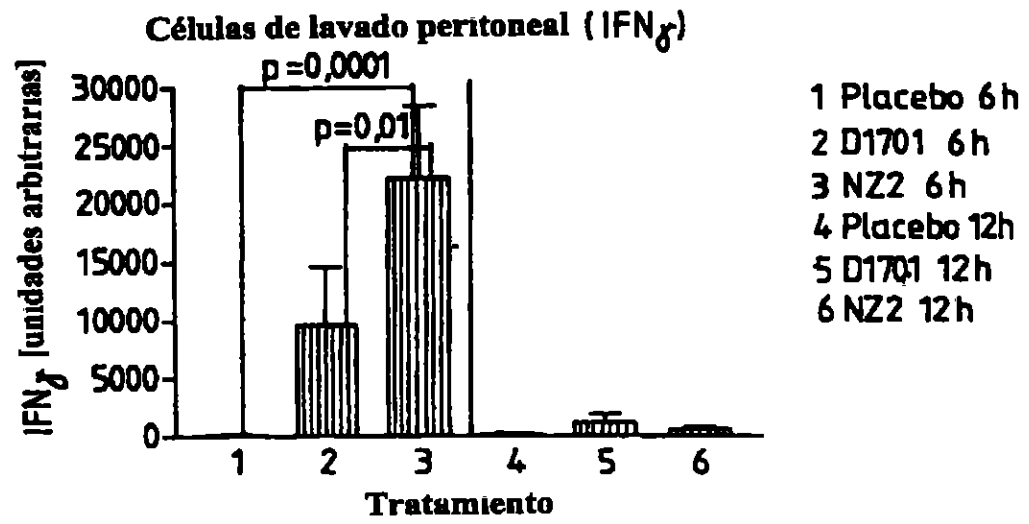


Fig 4

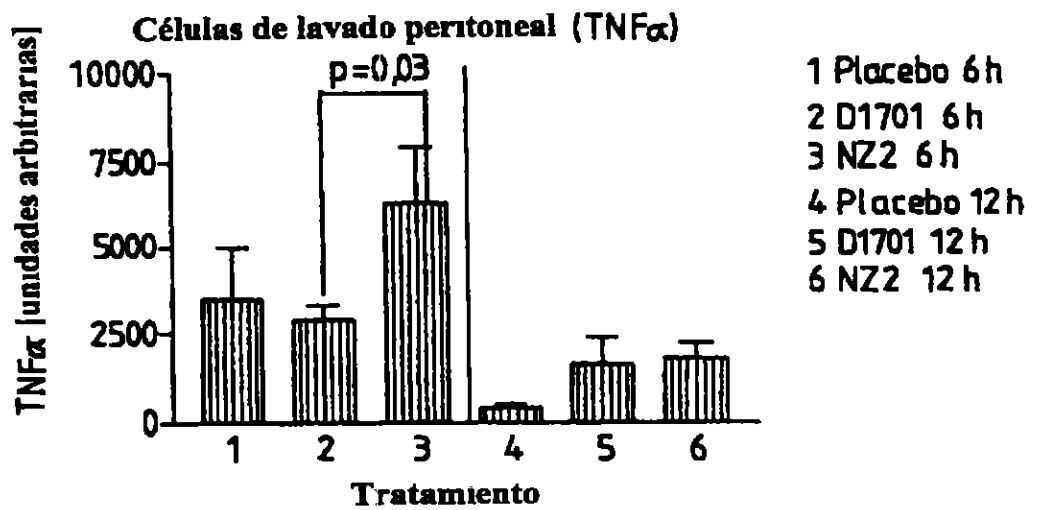


Fig 5

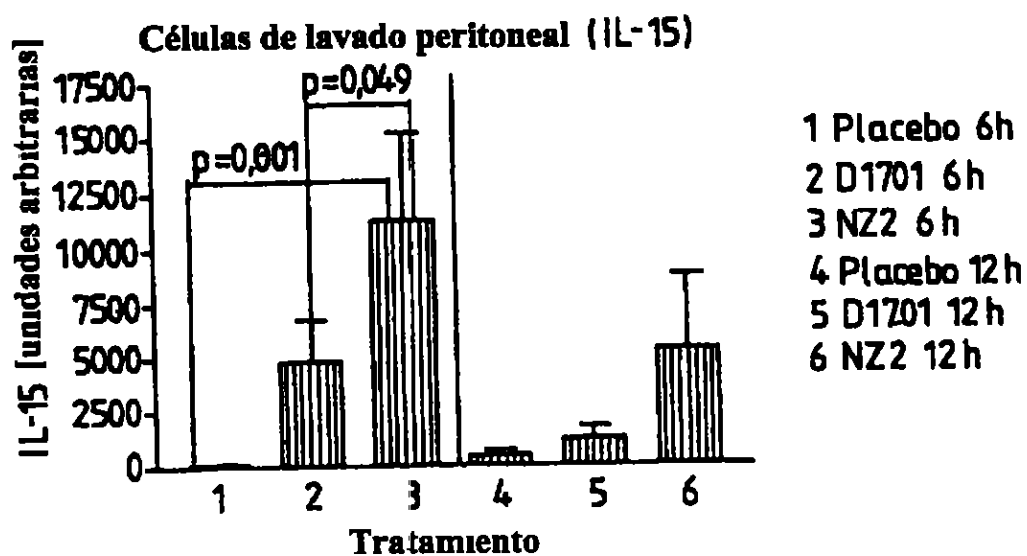
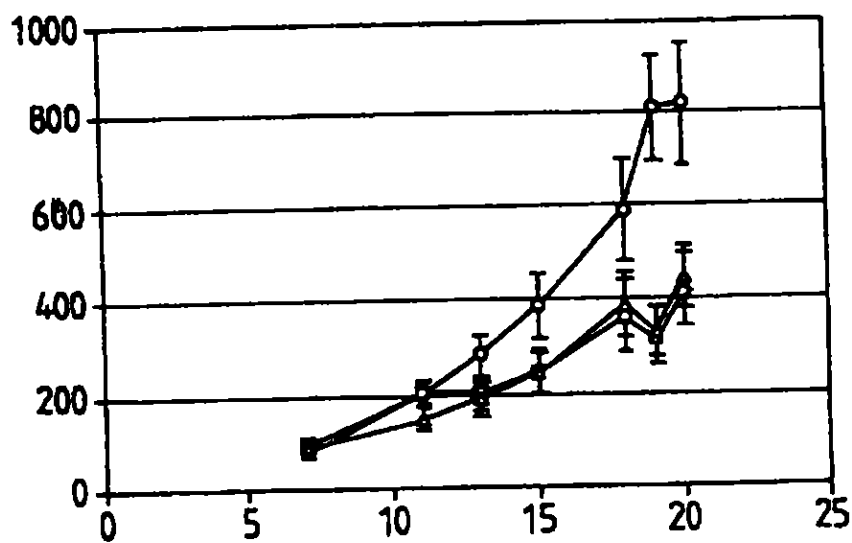
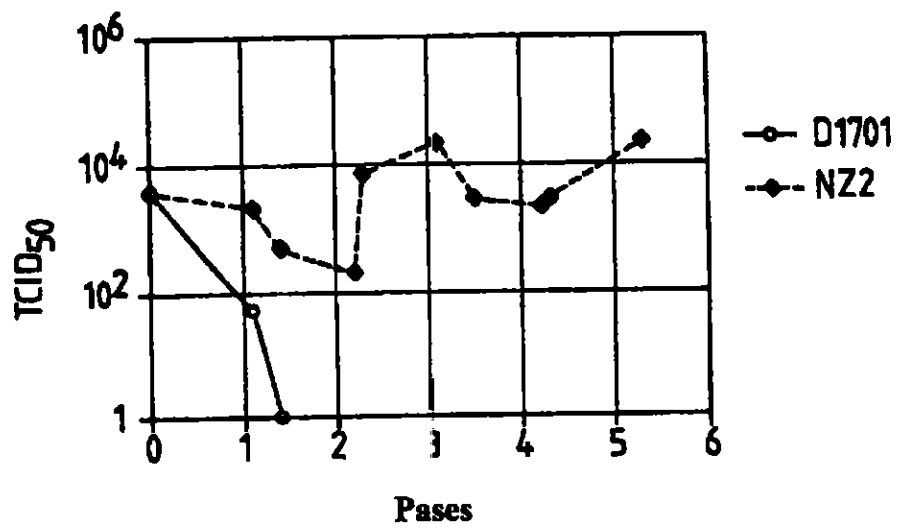
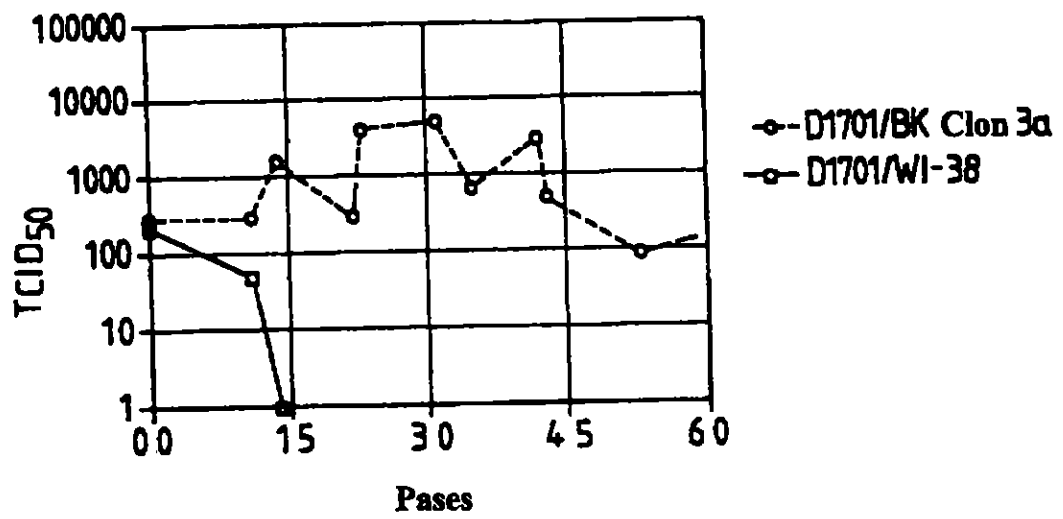


Fig 6



- 4 / 5 -

Fig 7**Fig 8**

- 5 / 5 -

Fig 9

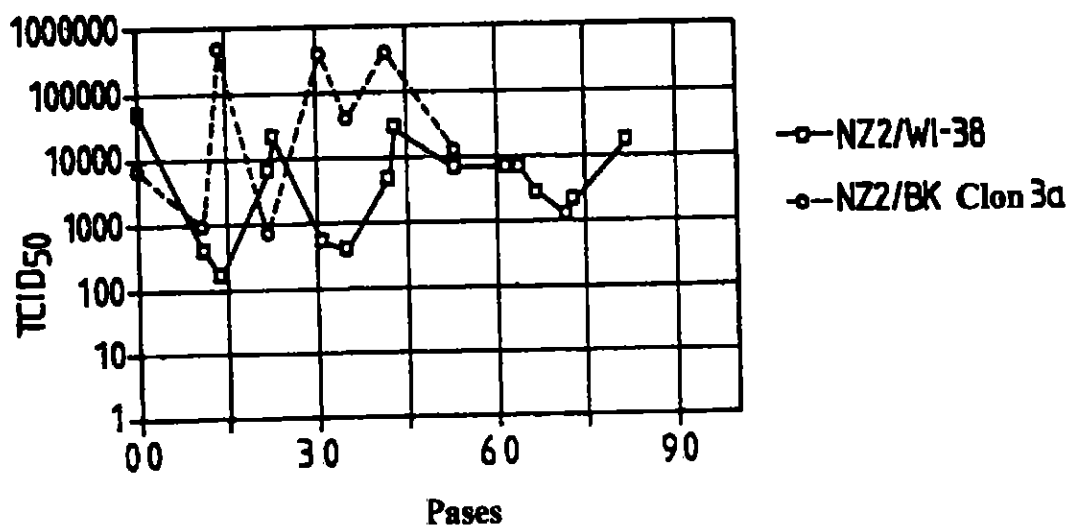
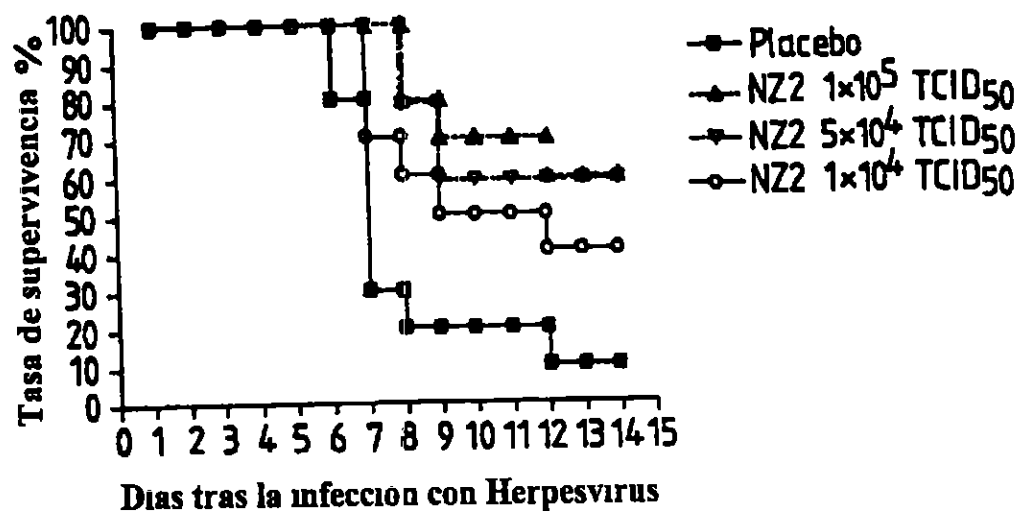


Fig 10





LeA 34714 381
LeA 34376
ecacc
European Collection
of Cell Cultures

Centre for Applied Microbiology and Research and European Collection of Cell Cultures

This document certifies that
Virus PPVO NZ-2
Deposit Reference 01071006

has been accepted as a patent deposit, in accordance with
The Budapest Treaty of 1977
with the European Collection of Cell Cultures on
10 July 2001

Dr D H Lewis
General Manager
ECACC

90

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13b s)

A The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page <u>6</u> line <u>15</u>	
B IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution European Collection of Cell Cultures	
Address of depositary institution (including postal code and country) Centre for Applied Microbiology and Research Porton Down Salisbury Wiltshire SP4 0JG United Kingdom	
Date of deposit July 10th 2001	Accession Number ECACC 01071006
C ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
D DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indication is not fulfilled, see 1.5)	
E SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be furnished to the International Bureau (per the general nature of the indications Number of Deposits)	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
☐ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau
Authorized office	Authorized office

Form PCT/RO 134 (July 1993)

91

Applicants' agent's reference LeA 34 714 WO	International application No PCT/EPC1/07978
---	--

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13bis)

A The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description on page 5 line 12	
B IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution European Collection of Cell Cultures	
Address of depositary institution (including postal code and country) Centre for Applied Microbiology and Research Porton Down Salisbury Wiltshire SP4 0JG United Kingdom	
Date of deposit July 10th 2001	Accession Number ECACC 01071006
C ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is contained on an additional sheet ☐	
D DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be transmitted to the International Bureau later (specify the general nature of the microorganism and its number of Deposits)	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
☐ This sheet was received with the International application	☐ This sheet was received by the International Bureau on
Authorized officer	Authorized officer

— 50720

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLAUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts LEA34376-WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 01/ 07991	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 11/07/2001	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 11/07/2000
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K35/76		
Anmelder BAYER AKTIENGESELLSCHAFT et al		

1 Der internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.

2 Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 2 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei, dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsvorschriften zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt _____ Blätter.

3 Dieser Bericht enthält Angaben und die entsprechenden Seiten zu folgenden Punkten:

I ☒ Grundlage des Berichts

II ☐ Priorität

III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit. Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

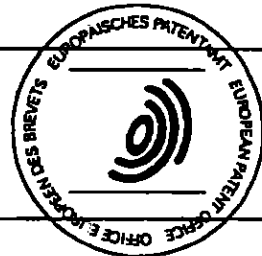
VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen

VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung

VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 23/01/2002	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 27/09/2002
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel (+49 89) 2399 0 Tx 523656 epm: d Fax (+49 89) 2399-4465	Bevollmächtigter Bediensteter MEYLAERTS H Tel (+49 89) 2399 2828

Formblatt PCT/IPEA/409 (Deckblatt)(Juli 1998)



I Grundlage des Berichts

Grundlage dieses Berichtes sind die Anmeldungsunterlagen in der ursprünglich eingereichten Fassung

V Begründete Feststellung nach Regel 66 2(a)(ii) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit

In Anbetracht der im internationalen Recherchenbericht angeführten Unterlagen wird festgestellt daß die Erfindung wie sie in den Ansprüchen gekennzeichnet ist die in Artikel 33(1) PCT aufgeführten Kriterien erfüllt d h als neu als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend und als gewerblich anwendbar anzusehen ist

94

0	Vom Anmeldeamt auszufüllen	
0 1	Internationales Aktenzeichen	
0 2	Internationales Anmeldedatum	
0 3	Name des Anmeldeamts und PCT International Application	
0-4	Formular PCT/RO/101 PCT-Antrag	
0-4 1	erstellt durch Benutzung von	PCT-EASY Version 2 91 (aktualisiert 01 01 2001)
0 5	Antragsersuchen Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird	
0-6	(Vom Anmelder gewähltes) Anmeldeamt	Europäisches Patentamt (EPA) (RO/EP)
0 7	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	LEA34376-WO
I	Bezeichnung der Erfindung	VERWENDUNG VON STAMMEN DES PARAPOXVIRUS OVIS ZUR HERSTELLUNG VON ANTIVIRALEN ARZNEIMITTELN UND ARZNEIMITTELN GEGEN KREBS
II	Anmelder	
II 1	Diese Person ist	nur Anmelder
II 2	Anmelder für	Alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US
II 3	Name	BAYER AKTIENGESSELLSCHAFT
II 5	Anschrift	D-51368 Leverkusen Deutschland
II 6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
II 7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE
II 8	Telefonnr	0214 30 71166
II 9	Telefaxnr	0214 30 53482
III 1	Anmelder und/oder Erfinder	
III 1 1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III 1 2	Anmelder für	Nur US
III 1-4	Name (FAMILIENNAME Vorname)	WEBER, Olaf
III 1 5	Anschrift	539 Amity Road Woodbridge, CT 06525 Ver St von Amerika
III 1 6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III 1 7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	US

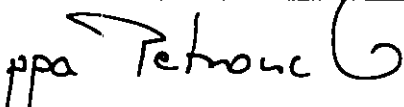
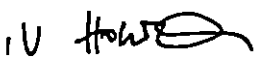
95

III 2	Anmelder und/oder Erfinder	
III 2 1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III 2 2	Anmelder für	Nur US
III 2 4	Name (FAMILIENNAME Vorname)	SCHLAPP, Tobias
III 2 5	Anschrift	Gerstenkamp 10 D-51061 Köln Deutschland
III 2 6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III 2 7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE
III 3	Anmelder und/oder Erfinder	
III-3 1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III 3 2	Anmelder für	Nur US
III 3 4	Name (FAMILIENNAME Vorname)	SIEGLING, Angela
III 3 5	Anschrift	7, rue Francois Bonvin F-75015 Paris Frankreich
III 3 6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III 3 7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	FR
III-4	Anmelder und/oder Erfinder	
III-4 1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III-4 2	Anmelder für	Nur US
III-4 4	Name (FAMILIENNAME Vorname)	KNORR, Andreas
III-4 5	Anschrift	Trillser Graben 10 D-40699 Erkrath Deutschland
III-4 6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III-4 7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE
III 5	Anmelder und/oder Erfinder	
III 5 1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III 5 2	Anmelder für	Nur US
III 5 4	Name (FAMILIENNAME Vorname)	HIRTH-DIETRICH, Claudia
III 5 5	Anschrift	Stockmannsmühle 127 D-42115 Wuppertal Deutschland
III 5 6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III 5 7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE
III 6	Anmelder und/oder Erfinder	
III 6 1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III 6 2	Anmelder für	Nur US
III 6 4	Name (FAMILIENNAME Vorname)	THEISS, Gudrun
III 6 5	Anschrift	Boeddinghausstr 13 D-42329 Wuppertal Deutschland
III 6 6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III 6 7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE

IV 1	Anwalt oder gemeinsamer Vertreter oder besondere Zustellanschrift Die unten bezeichnete Person ist/wird hiermit bestellt um den (die) Anmelder vor den internationalen Behörden zu vertreten und zwar als	gemeinsamer Vertreter
IV 1 1	Name	BAYER AKTIENGESELLSCHAFT
IV 1 2	Anschrift	D-51368 Leverkusen Deutschland
IV 1 3	Telefonnr	0214 30 71166
IV 1 4	Telefaxnr	0214 30 53482
V	Bestimmung von Staaten	
V 1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AP GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZW und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und Vertragsstaat des PCT ist EA AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist EP AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR und jeder weitere Staat, der Mitgliedsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und Vertragsstaat des PCT ist OA BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat des PCT ist
V 2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind gg in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CR CU CZ DE DK DM DZ EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZW
V 3	Nationales Patent (Staaten die dem PCT nach Veröffentlichung dieser PCT EASY Version beigetreten sind)	und alle weiteren Staaten, die am Anmeldetag dem PCT angehören

97

V 5	Erklärung bzgl vorsorglicher Bestimmungen Zusätzlich zu den unter Punkten V 1 V 2 and V 3 vorgenommenen Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4 9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der nachstehend unter Punkt V-6 angegebenen Staaten Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt.		
V 6	Staaten die von der Erklärung über vorsorgliche Bestimmungen ausgenommen werden	KEINE	
VI 1	Priorität einer früheren nationalen Anmeldung beansprucht		
VI 1 1	Anmeldedatum	11 Juli 2000 (11 07 2000)	
VI 1 2	Aktenzeichen	10033582 9	
VI 1 3	Staat	DE	
VI 2	Priorität einer früheren nationalen Anmeldung beansprucht		
VI 2 1	Anmeldedatum	09 Mai 2001 (09 05 2001)	
VI 2 2	Aktenzeichen	10122451 6	
VI 2 3	Staat	DE	
VII 1	Gewählte Internationale Recherchenbehörde	Europäisches Patentamt (EPA) (ISA/EP)	
VIII	Kontrolliste	Anzahl der Blätter	Elektronische Datei(en) beigefügt
VIII 1	Antrag	5	-
VIII 2	Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil)	22	-
VII 3	Ansprüche	3	-
VIII-4	Zusammenfassung	1	EZABST00 TXT
VIII 5	Zeichnung(en)	10	-
VIII 6	Sequenzprotokollteil der Beschreibung	7	-
VIII 7	INSGESAMT	48	
	Beigefügte Unterlagen	Unterlage(n) in Papierform beigefügt	Elektronische Datei(en) beigefügt
VIII 8	Blatt für die Gebührenberechnung	✓	-
VIII 9	Gesonderte unterzeichnete Vollmacht		-
VIII 12	Prioritätsbeleg(e)	Unterlage(n) VI-1	-
VIII 14	Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen und/oder anderem biologischen Material	✓	-
VIII 15	Protokoll der Nucleotid und oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form		Separate Diskette
VIII 16	PCT EASY Diskette	-	Diskette
VIII 18	Nr der Abb der Zeichn die mit der Zusammenf veröffentlicht werden soll	<Nr >	
VIII 19	Sprache der int Anmeldung	Deutsch	

IX 1	Unterschrift des Anmelders oder Anwalts		
IX 1 1	Name	BAYER AKTIENGESELLSCHAFT	

ppa Dr Petrovicki i V Dr Hollberg
VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

10 1	Datum des tatsächlichen Eingangs dieser Internationalen Anmeldung	
10 2	Zeichnung(en)	
10-2 1	Eingegangen	
10-2 2	Nicht eingegangen	
10 3	Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich jedoch fristgerecht eingeg Unterlage(n) oder Zeichnung(en) zur Vervollständigung dieser int Anmeldung	
10-4	Datum des fristgerechten Eingangs der Berichtigung nach PCT Artikel 11(2)	
10 5	Internationale Recherchenbehörde	ISA/EP
10 6	Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben	

VOM INTERNATIONALEN BURO AUSZUFÜLLEN

11 1	Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro	
------	---	--

A

PCT (ANHANG BLATT FÜR DIE
GEBÜHRENBERECHNUNG)

LEA34376-WO

Original (für EINREICHUNG) gedruckt am 10 07 2001 01 12 00 PM

12 21	Nummer des laufenden Kontos	28 000 001
12 22	Datum	10 Juli 2001 (10 07 2001)
12 23	Name und Unterschrift	BAYER AKTIENGESELLSCHAFT ppa Petrovicki, V. Hollberg

ppa Dr Petrovicki i V Dr Hollberg
PRÜFPROTOKOLL UND BEMERKUNGEN

13 2 1	Prüfergebnisse Antrag	Grun? Die Bezeichnung der Erfindung muß kurz und genau gefaßt sein Bitte überprüfen
13 2 2	Prüfergebnisse Staaten	Gelb! Weitere nationale Bestimmung benutzen Sie aktualisierte Wartungstabellen anstatt dieses Feldes
13 2 3	Prüfergebnisse Namen	Gelb Anmelder 1 Anschrift (Straße) nicht angegeben
		Gelb Gemeinsamer Vertreter Anschrift (Straße) nicht angegeben
13 2 5	Prüfergebnisse Biologie	Grun? Biologie in einigen PCT-Vertragsstaaten ist es erforderlich, daß diese Angaben in der Beschreibung enthalten sind Bitte überprüfen
		Gelb Biologie 1 Eingangsnr nicht angegeben
13 2-6	Prüfergebnisse Inhalt	Grun? Priorität 2 der Prioritätsbeleg ist nicht beigefügt (der Anmelder muß ihn beim Anmeldeamt oder beim Internationalen Büro vor Ablauf von 16 Monaten ab dem (frühesten) Prioritätsdatum einreichen)
		Gelb gesonderte unterzeichnete VollmachtBeigefugte Unterlage ' ' ' ist nicht als beigefügt angegeben

^

		Grun? Biologie in einigen PCT-Vertragsstaaten ist erforderlich, daß diese Angaben in der Beschreibung enthalten sind. Bitte überprüfen.
13.2.7	Prüfergebnisse Gebühren	Grun? Bitte bestätigen, daß das Gebührenverzeichnis in der zur Zeit geltenden Fassung benutzt wurde.
13.2.8	Prüfergebnisse Zahlung	Grun? Bitte überprüfen Sie, daß bei dem gewählten Anmeldeamt ein gültiges laufendes Konto auf Ihren Namen besteht.
13.2.9	Prüfergebnisse Anmerken	Grun? Der Name der unterzeichnenden Person oder/und ihre Eigenschaft nicht angegeben. Bitte berücksichtigen Sie, daß einige Anmeldeämter fordern, daß diese Information zusammen mit der Unterschrift vorgeführt wird.

101

0 1	Formular PCT/RO/134 (EASY) Angaben zu einem hinterlegten Mikroorganismus und/oder anderem hinterlegten biologischen Material	
0 1 1	erstellt durch Benutzung von	PCT-EASY Version 2 91 (aktualisiert 01 01 2001)
0 2	Internationales Aktenzeichen	
0 3	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	LEA34376-WO

1	Die nachstehenden Angaben betreffen den Mikroorganismus und/oder anderes biologisches Material der/das in der Beschreibung genannt ist	
1 1	Seite	6
1 2	Zelle	15
1 3	Angaben betr. Hinterlegung	
1 3 1	Name der Hinterlegungsstelle	European Collection of Cell Cultures Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom
1 3 2	Anschrift der Hinterlegungsstelle	
1 3 3	Datum der Hinterlegung	
1 3 4	Eingangsnummer	
1 4	Weitere Angaben	KEINE
1 5	Bestimmungsstaaten für die besondere Angaben gemacht werden	alle Bestimmungsstaaten
1 6	Gesondert eingereichte Angaben Diese Angaben werden dem Internationalen Büro später übermittelt	KEINE

VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

0-4	Dieses Formular ist mit der internationalen Anmeldung eingegangen (ja oder nein)	
0-4 1	Bevollmächtigter Bediensteter	

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

0 5	Dieses Formular ist an folgendem Datum beim internationalen Büro eingegangen	
0 5 1	Bevollmächtigter Bediensteter	

A Schmidt
SL 102

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

Bayer AG
Bayer CropScience AG
LP Patents and Licensing

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17 Januar 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/004002 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷
A61P 31/12 35/00 37/00

A61K 35/76

(74) Gemeinsamer Vertreter BAYER AKTIENGE-
SELLSCHAFT 51368 Leverkusen (DE)

(21) Internationales Aktenzeichen

PCT/EP01/07991

(81) Bestimmungsstaaten (national) AE AG AI AM AT
AU AZ, BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO CR
CU CZ, DE DK, DM DZ, EC EE ES FI GB GD GE
GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ
LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN
MW MX MZ NO NZ, PL, PT RO RU SD SE, SG SI
SK, SL TJ TM TR TT TZ UA UG US UZ, VN YU
ZA ZW

(22) Internationales Anmeldedatum

11 Juli 2001 (11.07.2001)

(25) Einreichungssprache

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache

Deutsch

(30) Angaben zur Priorität

100 53 582 9

11 Juli 2000 (11.07.2000)

DE

101 22 451 6

9 Mai 2001 (09.05.2001)

DE

(84) Bestimmungsstaaten (regional) ARIPO Patent (GH
GM KE, LS MW MZ SD SL SZ, TZ UG ZW)
eurasisches Patent (AM AZ BY KG KZ, MD RU TJ
TM) europäisches Patent (AT BE, CH CY DE DK
ES FI FR, GB GR, IE, IT LU MC NL PT SE TR)
OAPI Patent (BF BJ CF CG CI, CM GA GN GW ML
MR NE, SN TD TG)

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US) BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]
51368 Leverkusen (DE)

(72) Erfinder und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US) WEBER Olaf
[DE/US] 539 Amity Road Woodbridge CT 06525 (US)
SCHLAPP Tobias [DE/DE] Gerstenkamp 10 51061
Köln (DE) SIEGLING Angela [DE/FR] 7 rue Francois
Bonvin F 75015 Paris (FR) KNORR, Andreas [DE/DE]
Triller Graben 10 40699 Erkrath (DE) HIRCH DI
ETRICH Claudia [DE/DE] Stockmannsmühle 127
42115 Wuppertal (DE) THEISS Gudrun [DE/DE]
Boeddinghausstr 13 42329 Wuppertal (DE)

Veröffentlicht

mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts

31 Oktober 2002

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT Gazette verwiesen.

(54) Title USE OF STRAINS OF THE PARAPOX OVIS VIRUS FOR PRODUCING ANTIVIRAL PHARMACEUTICALS AND
ANTICANCER PHARMACEUTICALS

(54) Bezeichnung VERWENDUNG VON STÄMMEN DES PARAPOXVIRUS OVIS ZUR HERSTELLUNG VON ANTIVIRA-
LEN ARZNEIMITTELEN UND ARZNEIMITTELEN GEGEN KREBS

(57) Abstract The invention relates to the use of strains of the parapox ovis virus as immune therapeutics for infectious or non
infectious immune weaknesses as well as the use of strains of said virus for treating tumour diseases and viral infections. The
invention also relates to the use of strains of the parapox ovis virus for producing pharmaceuticals for both humans and animals.

(57) Zusammenfassung Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Stämmen des Parapoxvirus ovis als Immunthera-
peutikum bei Immunschwächen infektiöser oder nicht infektiöser Natur sowie die Verwendung von Stämmen des Parapoxvirus ovis
zur Behandlung von Tumorerkrankungen viralen Infektionen und damit einhergehenden Erkrankungen sowie die Verwendung von
Stämmen des Parapoxvirus ovis für die Herstellung von Arzneimitteln zur Anwendung bei Mensch und Tier

4 34 376

*

WO 02/004002 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/07991

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K35/76 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00

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)
IPC 7 A61K C07K 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 PAJ MEDLINE BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 38724 A (MAYR ANTON) 23 October 1997 (1997-10-23) the whole document	1-11
A	WO 95 22978 A (MAYR ANTON) 31 August 1995 (1995-08-31) page 5 line 31 -page 7 line 12 claims example 4	1-11
A	DE 35 04 940 A (MAYR ANTON PROF DR MED VET DR) 31 October 1985 (1985-10-31) cited in the application page 5 line 1 - line 13 claims 1-3 10-12 page 13 line 33 -page 14 line 16 example 1	1-11
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in 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
- X 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
- Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 July 2002

Date of mailing of the international search report

11/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Interny

Application No

PCT/EP 01/07991

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9738724	A	23-10-1997	AT 203678 T	15-08-2001
			AU 706729 B2	24-06-1999
			AU 2885897 A	07-11-1997
			BR 9708679 A	04-01-2000
			CA 2251690 A1	23-10-1997
			CN 1215996 A	05-05-1999
			WO 9738724 A1	23-10-1997
			DE 19780300 D2	17-06-1999
			DE 59704194 D1	06-09-2001
			DK 885013 T3	05-11-2001
			EP 0885013 A1	23-12-1998
			ES 2125846 T1	16-03-1999
			HU 9901299 A2	28-07-1999
			JP 2000501114 T	02-02-2000
			NO 984782 A	15-12-1998
			NZ 332243 A	27-10-2000
			PL 329353 A1	29-03-1999
			PT 885013 T	30-01-2002
			SI 885013 T1	31-12-2001
			US 6162600 A	19-12-2000
WO 9522978	A	31-08-1995	DE 4405841 C1	05-01-1995
			AT 153242 T	15-06-1997
			AU 690625 B2	30-04-1998
			AU 1416795 A	11-09-1995
			BR 9506882 A	19-08-1997
			CA 2182207 A1	31-08-1995
			CN 1142187 A	05-02-1997
			DE 59402826 D1	26-06-1997
			DK 669133 T3	14-07-1997
			WO 9522978 A1	31-08-1995
			EP 0669133 A1	30-08-1995
			ES 2102081 T3	16-07-1997
			FI 963277 A	22-08-1996
			GR 3023508 T3	29-08-1997
			HU 75545 A2	28-05-1997
			JP 2873880 B2	24-03-1999
			JP 9504803 T	13-05-1997
			KR 196204 B1	15-06-1999
			NO 963462 A	20-08-1996
			NZ 278079 A	26-01-1998
			PL 316024 A1	23-12-1996
			SI 669133 T1	31-10-1997
DE 3504940	A	31-10-1985	DE 3504940 A1	31-10-1985

A KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K35/76 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RESEARCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal WPI Data PAJ MEDLINE BIOSIS

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 38724 A (MAYR ANTON) 23 Oktober 1997 (1997-10-23) das ganze Dokument	1-11
A	WO 95 22978 A (MAYR ANTON) 31 August 1995 (1995-08-31) Seite 5 Zeile 31 -Seite 7 Zeile 12 Ansprüche Beispiel 4	1-11
A	DE 35 04 940 A (MAYR ANTON PROF DR MED VET DR) 31 Oktober 1985 (1985-10-31) in der Anmeldung erwähnt Seite 5 Zeile 1 - Zeile 13 Ansprüche 1-3 10-12 Seite 13 Zeile 33 -Seite 14 Zeile 16, Beispiel 1	1-11
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen
A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
I Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
3 Juli 2002	11/07/2002
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Beauftragter Ryckebosch A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. des Aktenzeichen
PCT/EP 01/07991

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9738724 A	23-10-1997	AT 203678 T	15-08-2001
		AU 706729 B2	24-06-1999
		AU 2885897 A	07-11-1997
		BR 9708679 A	04-01-2000
		CA 2251690 A1	23-10-1997
		CN 1215996 A	05-05-1999
		WO 9738724 A1	23-10-1997
		DE 19780300 D2	17-06-1999
		DE 59704194 D1	06-09-2001
		DK 885013 T3	05-11-2001
		EP 0885013 A1	23-12-1998
		ES 2125846 T1	16-03-1999
		HU 9901299 A2	28-07-1999
		JP 2000501114 T	02-02-2000
		NO 984782 A	15-12-1998
		NZ 332243 A	27-10-2000
		PL 329353 A1	29-03-1999
		PT 885013 T	30-01-2002
		SI 885013 T1	31-12-2001
		US 6162600 A	19-12-2000
WO 9522978 A	31-08-1995	DE 4405841 C1	05-01-1995
		AT 153242 T	15-06-1997
		AU 690625 B2	30-04-1998
		AU 1416795 A	11-09-1995
		BR 9506882 A	19-08-1997
		CA 2182207 A1	31-08-1995
		CN 1142187 A	05-02-1997
		DE 59402826 D1	26-06-1997
		DK 669133 T3	14-07-1997
		WO 9522978 A1	31-08-1995
		EP 0669133 A1	30-08-1995
		ES 2102081 T3	16-07-1997
		FI 963277 A	22-08-1996
		GR 3023508 T3	29-08-1997
		HU 75545 A2	28-05-1997
		JP 2873880 B2	24-03-1999
		JP 9504803 T	13-05-1997
		KR 196204 B1	15-06-1999
		NO 963462 A	20-08-1996
		NZ 278079 A	26-01-1998
DE 3504940 A	31-10-1985	PL 316024 A1	23-12-1996
		SI 669133 T1	31-10-1997
DE 3504940 A	31-10-1985	DE 3504940 A1	31-10-1985



107

T 8001 99 2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion 83881369 88888888
 Fecha (AMD) 2003-01-10 17:02:17
 Trámite 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC A
 Dependencia 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios 107 0

RECIBO OFICIAL DE CAJA 03 107
 FE HA NERO DE 2003

*** CO N S I G N A C I O N ***

EPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
ABELIER ABOGADOS	CO N S I G N A C I O N	BANCO POPULAR	050 00110 6	3 369 4	02/01/2003	34,706,000 00

*** C O N C E P T O ***

CAT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	000 01 01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL DE PA ENTE DE IN	400,000 00
		TOT L	400,000 00

SOL CUA POCE NTOS MIL PESOS

RESPONSABLE 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No _____

Carrera 13 No 27-00 Pisos 5, 7 y 10
 Conmutador 382 0840
 Fax 350 5220
 E mail info@sic.gov.co
 www.sic.gov.co
 Bogotá D.C. Colombia

000 0698-841-010-3

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION		
MODELO DE UTILIDAD	()	()
Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
Descripción de la invención	()	()
Dibujos de ser estos pertinentes	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()		
INCOMPLETA ()	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
Representación grafica 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 ()		
Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()
Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()		
INCOMPLETA	()	()

Firma Responsable

Fecha



2020
Bogotá D C

Doctor
EMILIO FERRERO
Apoderado
BAYER AKTIENGESELLSCHAFT

Oficio N° 05830

ASUNTO	Radicación N°	03-01369
	Solicitud internacional	PCT/EP2001/007991
	Fecha inicio fase nacional	
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	330
	Folios	001

Como resultado del examen de forma realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Unica de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que

- ☐ La solicitud no contiene la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36 2 b) del tratado PCT)
- ☐ El solicitante debe aclarar si la solicitud corresponde al capítulo I o II del PCT por que la indicación en el petitorio no es concordante con los documentos del expediente en caso necesario adjuntar los documentos respectivos

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica N° 10 de 2001


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

25 JUL 2003

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, _____