

27



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT
DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

07-58654
SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: VIRUS RECOMBINANTE DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

SOLICITANTE: BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT

DIRECCION: Mullerstrasse 173, 13353, Berlin, Alemania.

APODERADO: J. IAN RAISBECK

BOGOTÁ 08 de Junio de 2007

P2007/000031

07181.1



OLARTERA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-058654-00000-0000

Fecha: 2007-06-08 17:01:20 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 211

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT.
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:			
☒ Patente de Invención. ☐ Patente de Modelo de Utilidad.			
☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.			
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: <u>BAYER SCHERING PHARMA</u> <u>AKTIENGESELLSCHAFT</u> Dirección: <u>Müllerstrasse 178, 13353, Berlin</u> <u>Alemania</u> Nacionalidad o Domicilio: <u>ALEMANA</u> Lugar de Constitución: <u>ALEMANIA</u> Teléfono: <u> </u> Fax: <u> </u> E-mail: <u> </u>		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual <u> </u> Número <u> </u>
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: <u>J. IAN RAISBECK</u> Dirección: <u>World Trade Center Torre A,</u> <u>Calle 100 No. 3A-37 Piso 10</u> Teléfono: <u>601-7700</u> Fax: <u>601-7799</u> E-mail: <u>office@olarteraisbeck.com</u>		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual <u> </u> Número <u>79.376.996 Btá</u> TP <u>135.799</u>
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: <u>VER PAGINA ADJUNTA</u> Dirección: <u>VER PAGINA ADJUNTA</u> Nacionalidad o Domicilio: <u>VER PAGINA ADJUNTA</u>		
5 PCT (86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/EP2005/012186</u> Fecha <u>Noviembre 10, 2005</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2006/050984</u> Fecha <u>Mayo 18, 2006</u>			
6 Título (54): <u>VIRUS RECOMBINANTE DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE</u>			
7 Clasificación Internacional (51) <u> </u>			
8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>EP</u>	(32) Fecha <u>Noviembre 12, 2004</u>	(31) Número de Solicitud <u>04090432.8</u>
9 Comprobante de pago No. <u>07-45.382</u> Fecha <u>5 de Junio de 2007</u>			

10

ANEXOS

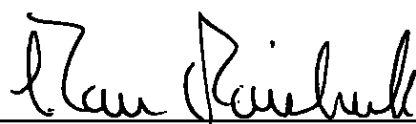
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☒ Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12 x 12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros. Búsqueda Internacional

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: J. IAN RAISBECK

FIRMA:


C.C. 79.376.996 Btá T.P. 135.799

LISTA DE INVENTORES PCT/EP2005/012186

BEIER, Rudolf
Kiautschoustrasse 1
13353 Berlin, Alemania
de nacionalidad alemana

PÜHLER, Florian
Naumannstrasse 2
10829 Berlin, Alemania
de nacionalidad alemana

BOSSLET, Klaus
Im Amseltal 57
13465 Berlin, Alemania
de nacionalidad alemana

WILLUDA, Hans Jörg
Platanenstrasse 3
13156 Berlin, Alemania
de nacionalidad alemana

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 07-058654- -00000-0000

Fecha: 2007-06-08 17:01:20 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 211

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 45,382
FECHA : JUNIO 5 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBECK	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	67535363	05/06/2007	6,757,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____ 

CECBA - LEY 404 GCBA

LEGALIZACION

070312117346

\$20.00

12/03/2007

13:51:46

CECBA - LEY 404 GCBA

LEGALIZACION

070312054713

\$39.00

12/03/2007

13:51:54

N 007422051

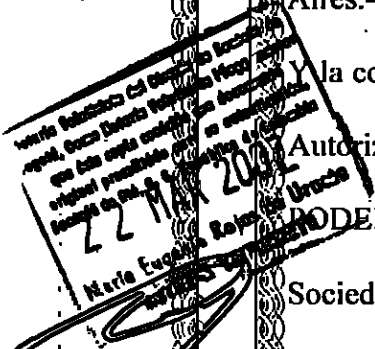
22 MAR 2007
Maria Eugenia Rojas
Escribana

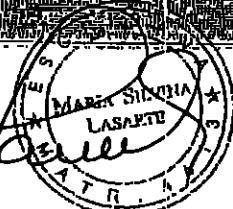
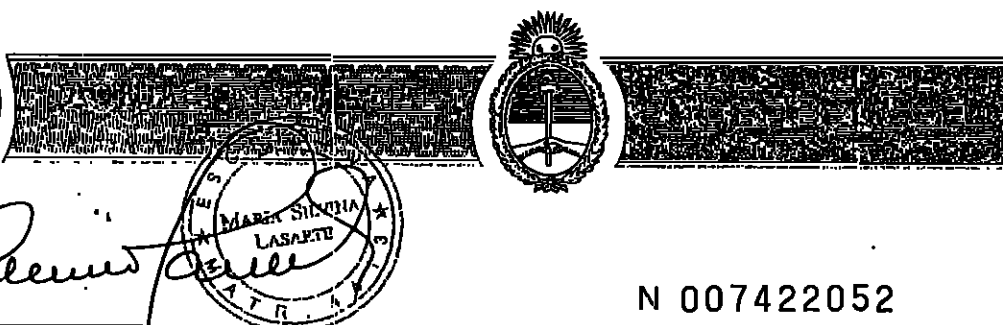
1 FOLIO 85.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: VEINTICUATRO.-
2 SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Dagmar a favor de
3 OLARTE, Carlos Reinaldo y otro del Poder otorgado por BAYER SCHERING
4 PHARMA AG.- En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Capital de la República
5 Argentina, el día NUEVE de MARZO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



N 007422051

damente, se presente exclusivamente ante las autoridades de COLOMBIA que co- 26
rrespondan y realicen los actos enumerados en el citado poder y con las facultades que 27
surgen del mismo, el que transcripto en lo pertinente dice: "FOLIO 44.- PRIMERA 28
COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: CATORCE.-- En la Ciudad Autónoma de 29
Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día DIECISIÉIS de FEBRERO del 30
año DOS MIL SIETE, ante mí ..., Escribana Autorizante, ..., COMPARECE: Dagmar 31
MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter Messerer y 32
Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Nacional de Identidad Número 33
20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria 27-20383892-7, domiciliada 34
legalmente en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad de Buenos 35
Aires.- La compareciente es mayor de edad.- INTERVIENE: por su propio derecho.- 36
Y la compareciente EXPRESA: Que a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la 37
Autorizante, LA INCORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo del 38
PODER que le fuera conferido en Berlín, Alemania, el 22 de enero de 2007, por la 39
Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con domicilio en Müllerstrasse 178, 40
13353, Berlín, Alemania, sobre cuya plena vigencia responde la requirente bajo jura- 41
mento.- Yo, la Autorizante, hago constar: a) Que el instrumento de poder, cuya incor- 42
poración y transcripción a este protocolo solicita la compareciente, se encuentra ex- 43
tendido en idioma castellano, certificadas las firmas por notario en idioma alemán, 44
debidamente legalizado en idioma alemán (Sello de Apostilla de la Convención de La 45
Haya del 5 de octubre de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional por la 46
Traductora Pública Laura Thieberger.- b) Que la compareciente en virtud de lo mani- 47
festado tiene interés legítimo en su requerimiento.- En consecuencia, me hace entrega 48
en este acto del original del instrumento de poder relacionado con su respectiva tra- 49
ducción al idioma nacional, el que agrego a la presente y transcripto dice: "MOE- 50





N 007422052

6

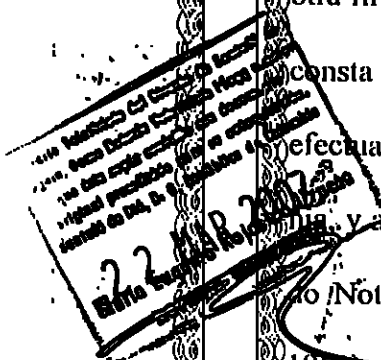
1 LLER & CO. (Sigue aclaración en idioma inglés) - PODER Los abajo firmante/s
2 BAYER SCHERING PHARMA AG domiciliados en Müllerstrasse 178 13353 Berlín
3 - Alemania declaran por el presente otorgar a Dagmar MESSERER poder general am-
4 plio y suficiente para recabar de las autoridades ..., sud y centroamericanas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

Excmo. Sr. Jefe de la Oficina de Registro de la Propiedad Intelectual y de los Derechos de Autor
C/ de la capital, 100, 1.º piso, en Montevideo.
Excmo. Sr. Jefe de la Oficina de Registro de la Propiedad Intelectual y de los Derechos de Autor
C/ de la capital, 100, 1.º piso, en Montevideo.
2 MAR 2007
Dagmar Messerer
Dagmar Messerer



N 007422052

a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, recusar, apelar, transar, 26
someter a arbitraje o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar cauciones, pedir embar- 27
gos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, pedir la venta de los 28
bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de sentencias, prestar ju- 29
ramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en general practicar 30
todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este mandato. Podrán 31
asimismo substituir el presente poder en todo o en parte.- Dado y firmado en Berlín 32
(Sigue fecha en idioma inglés). Bayer Schering Pharma AG (Sigue texto en idioma 33
inglés). ppa. Sigue una firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Noeske-Jungblut. ppa. Sigue 34
otra firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Klose". ES COPIA FIEL, doy fe.- En hoja adjunta 35
consta la certificación notarial de las firmas obrantes en el poder en idioma alemán, 36
efectuado el 22 de enero de 2007 por el Escribano Dimitri Rempen, de Berlín, Alema- 37
nia, y a continuación consta la respectiva legalización de la firma y sello del nombra- 38
do Notario (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 39
1961), en idioma alemán, efectuada por el Presidente del Tribunal Regional de Berlín, 40
Alemania.- En hojas adjuntas sigue la rescrita traducción al idioma nacional la que 41
transcripta textualmente, dice: "TRADUCCIÓN PUBLICA - (Sobre papel con mem- 42
brete de "MOELLER y CO" - América Latina - Agentes de la Propiedad Intelectual - 43
figura un Poder otorgado por la Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con 44
sede en Berlín, Alemania, redactado en idioma nacional, luego del que aparecen los 45
siguientes textos, que traducidos dicen:) "BAYER SCHERING PHARMA AG" - 46
Patentes y licencias - (Firmado y Aclarado:) pp Dr. Noeske-Jungblut - pp (Firmado y 47
Aclarado:) Dr. Klose.- La versión en inglés es para su información únicamente.- Re- 48
gistro de Actas N° R 17/2007.- Me he referido a la prohibición de intervención según 49
el artículo 3, párrafo 1, N° 7, de la Ley de Certificaciones. Mi pregunta de si ha existi- 50

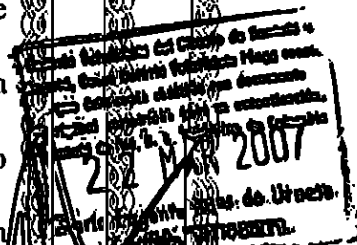




N 007422053

7

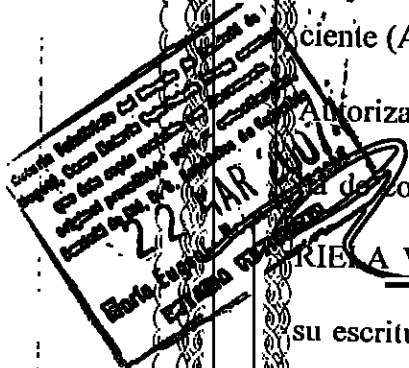
do una intervención previa en el sentido de la norma me fue contestaba por la negati-
va.- Las firmas trazadas ante mi por el Dr. Walter Klose, que nació el 26 de diciembre
de 1952, y de la Dra. Chistianc Noeske-Jungblut de soltera Noeske, que nació el 26 de
junio de 1957 – Ambos de mi personal conocimiento – Ambos con domicilio comer-
cial en 13353 Berlín, Müllerstrasse 178 son auténticas, de lo que doy fe.- Al mismo
tiempo certifico en base a que tuve a la vista en el día de hoy las actas del Registro de
Comercio del Tribunal de Primera Instancia de Charlottenburg, N° de Registro HR B
283, que la Sociedad “Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft”, con sede en Ber-
lín, está inscripta con el número mencionado arriba en el Registro de Comercio y que
la arriba mencionada Dra. Noeske-Jungblut y el arriba mencionado Dr. Walter Klose
están facultados en su carácter de mandatarios a representar en forma conjunta a la
Sociedad “Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft” de Berlín. Berlín, 22 de enero
de 2007.- El escribano (firma ilegible) y liquidación de derechos. (Hay un sello en
oblea sobre precinto:) Dimitri Rempen, Escribano de Berlín.- 9101ª E-F.- APOSTI-
LLA – (Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961) - País: República Federal
de Alemania - Este instrumento público fue firmado por Dimitri Rempen, actuando en
su carácter de escribano de Berlín, estando provisto del sello del escribano.- Certifica-
do en Berlín, el 24 de enero de 2007, por el Presidente del Tribunal Regional de Ber-
lín, con el N° 9101 a E-F 536/07 - Sello (hay un sello:) el Presidente del Tribunal Re-
gional de Berlín – Firma el Funcionario autorizado (firmado y aclarado:) Holldorf –
Juez Principal del Tribunal Regional.- ES TRADUCCIÓN FIEL de las partes perti-
nentes en los idiomas alemán e inglés del documento que se acompaña, que he vertido
al idioma nacional, en Buenos Aires, a 6 de febrero de 2007.- Hay una firma ilegible.
Hay un sello que dice: “LAURA THIEBERGER – MATRÍCULA DE TRADUCTO-
RES ALEMÁN – FRANCÉS – Tomo II Folio 254 (Cap.) Tomo III – 98 – (La Plata) –





N 007422053

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





8

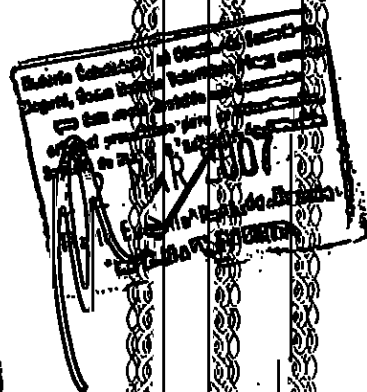
N 007422054

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

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

[Handwritten signature]

[Circular notary seal: MARIA SILVINA LASARTE]

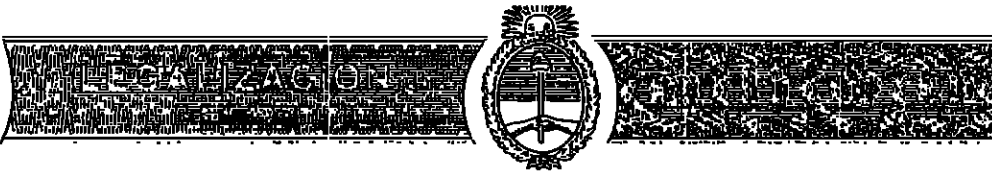




N 007422054

Historia Valoriada del Divento de Secretari de
Jegado, Gaceta Notaria Valoriada Ringo como
que fero copia conlida con documento
original presentada para su autenticacion.
Escritura de 014, D. U. Republica de Colombia
22 MAR 2007
Maria Eugenia Rojas de Urquiza
ESTADO GUATEMALA

26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50



9

L 007495419

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

Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, **LEGALIZA** la firma
y sello del escribano **MARIA SILVINA LASARTE**

obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo
el N° **070312117346/0**

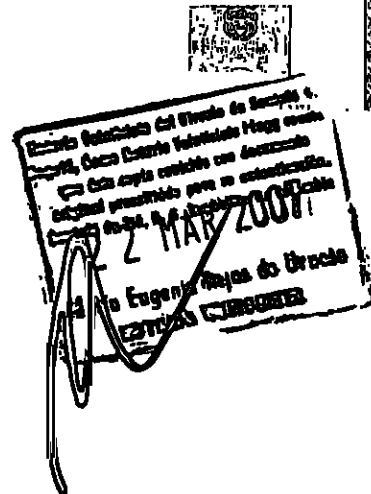
La presente legalización no juzga sobre
el contenido y forma del documento.

Buenos Aires, Lunes 12 de Marzo de 2007



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

CONSEJERO



APOSTILLE

A 00115229

10

REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por EDDA ENRIQUETA SINELLI

3. Quien actúa en calidad de CONSEJERA

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

AIRES

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

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

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

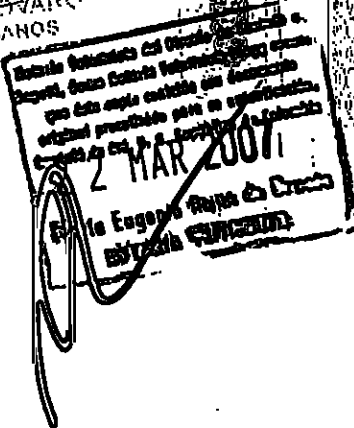
(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 070312054713

10. Firma



MINISTROS DE RELACIONES EXTERIORES
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO



(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 May 2006 (18.05.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/050984 A2

(51) International Patent Classification: Not classified

(21) International Application Number:
PCT/EP2005/012186

(22) International Filing Date:
10 November 2005 (10.11.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
04090432.8 12 November 2004 (12.11.2004) EP

(71) Applicant (for all designated States except US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178, 13342 Berlin (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): BEIER, Rudolf [DE/DE]; Kiautschoustrasse 1, 13353 Berlin (DE). PÜHLER, Florian [DE/DE]; Naumannstrasse 2, 10829 Berlin (DE).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: RECOMBINANT NEWCASTLE DISEASE VIRUS

(57) Abstract: The goal of the invention is to increase the therapeutical activity of oncolytic NDV. This issue is solved by a Newcastle Disease Virus comprising a recombinant nucleic acid, wherein the nucleic acid codes for a binding protein that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell. Binding proteins belong to the following group: A natural ligand or a genetically modified ligand, a recombinant soluble domain of a natural receptor or a modified version of it, a peptide-ligand, an antibody molecule and derivatives thereof or antibody-like molecules like ankyrin repeat molecules or derivatives thereof.

WO 2006/050984 A2

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

To:

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT
Müllerstrasse 178
13342 Berlin
ALLEMAGNE

Patente

24. Mai 2006

Date of mailing (day/month/year)
18 May 2006 (18.05.2006)

From:

Applicant's or agent's file reference
53277AWO

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/EP2005/012186International filing date (day/month/year)
10 November 2005 (10.11.2005)Priority date (day/month/year)
12 November 2004 (12.11.2004)

Applicant

SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

copy of the international application as published by the International Bureau on 18 May 2006 (18.05.2006) under
No. WO 2006/050984copy of international application as republished by the International Bureau on under
No. WOFor an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48)
or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Yolaine Cussac

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 70 80

Recombinant Newcastle Disease Virus

Introduction

5The invention refers to a recombinant RNA-virus, preferably a paramyxovirus, preferably Newcastle Disease Virus (NDV) for treatment of diseases, especially for oncolytic tumor treatment. Recombinant viruses are produced that encode binding proteins (antibodies, ankyrin repeat molecules, peptides etc.), prodrug-converting enzymes and/or proteases and lead to th
10selective expression of these molecules in virus-infected tumor cells. The activity of these binding proteins, prodrug-converting enzymes and/or proteases increases the anti-tumor effect of the virus. Further the invention describes manufacture and the use of such modified viruses for treatment of cancer.

15

Description of the State of the Art

Newcastle Disease Virus

Oncolytic viruses in general for the treatment of tumors are reviewed in
20Chiocca (2002). Newcastle Disease Virus has been used as an experimental therapeutic agent for more than 40 years and is reviewed by Sinkovics and Horvath (2000). The Newcastle Disease Virus in general is described in the book by Alexander (1988). NDV strain PV701 is being developed as an anticancer treatment for glioblastoma (Lorence et al., 2003). The NDV strain
25MTH68 has been used as an experimental cancer treatment and has been administered to humans for more than 30 years (Csatary et al., 2004).

In the paper by Stojdl et al. (2003) it is described that in the range of 80% of all tested tumor cell lines, there is a defect in the interferon response
30following infection with Vesicular Stomatitis Virus (VSV). It may be assumed

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

Recombinant paramyxoviruses

EP-A-0702085 relates to genetically manipulated infectious replicating non-segmented negative-stranded RNA virus mutants, comprising an insertion and/or deletion in an open reading frame, a pseudogen region or an intergenic region of the virus genome.

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

15

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

20 In WO 01/20989 (PCT/US00/26116) a method for treating patients having tumor with recombinant oncolytic paramyxoviruses is described. The tumor is reduced by administering a replication-competent *Paramyxoviridae* virus. Various methods are described that can be used to engineer the virus genome in order to improve the oncolytic properties.

25

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

US 6,699,479 describes NDV mutants expressing the V-protein at a reduced level and comprising nucleotide substitutions in an editing locus.

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

Genetic manipulation of NDV

NDV can be genetically manipulated using the reverse genetics technology as described e.g. in EP-A-0702 085. For example, it is known to make recombinant NDV constructs comprising additional nucleic acids coding for secreted alkaline phosphatase (Zhao and Peeters, 2003), green fluorescent protein (Engel-Herbert et al., 2003), VP2 protein of infectious bursal disease virus (Huang et al., 2004), influenza virus hemagglutinin (Nakaya et al., 2001) and chloramphenicol acetyl transferase (Huang et al., 2001) (Krishnamurthy et al., 2000). None of these recombinant NDV has been constructed for use in the treatment of human disease. The recombinant NDVs were made to study either basic virology of NDV or to develop vaccine strains for poultry. As parental virus strains served lentogenic strains of NDV. These strains do not have significant oncolytic properties.

20

Summary of the Invention

This present invention relates to an RNA virus, e.g. an NDV having increased oncolytic activity. More particularly, the invention relates to an RNA virus, particularly a Newcastle disease virus comprising a recombinant nucleic acid having the therapeutical relevance in treatment of cancer, wherein the nucleic acid codes for a binding protein, a prodrug-converting enzyme and/or a protease that have a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.

4

More preferred are recombinant-oncolytic viruses, e.g. NDVs comprising one or more transgenes, wherein the transgene(s) is / are coding for a binding protein, a prodrug-converting enzyme and/or a protease. Combinations of different specificities are possible.

5

Further, the invention relates to the nucleocapsid of the recombinant virus as indicated above, comprising viral RNA complexed with capsid proteins or to the viral RNA and/or an RNA complementary to the viral RNA in its isolated form.

10

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

15 Detailed description of Preferred Embodiments:

Viruses

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

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

25

Therefore, the subject of the present invention is a recombinant oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a binding protein that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.

Another subject of the present invention is a recombinant oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a prodrug-converting enzyme that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell, preferably in combination with the corresponding prodrug.

Yet another subject of the present invention is a recombinant oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a protease that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.

Preferably the virus of the present invention exhibits a tumor-selective infection that leads to a tumor-selective expression of the encoded transgene.

15

The recombinant oncolytic virus of the present invention may carry at least one transgene gene independently selected from transgenes coding for binding proteins, prodrug-converting enzymes, and/or proteases.

20 It is preferred that the virus of the present invention is a negative strand RNA virus, more preferably a paramyxovirus.

In the context of the present invention, a nucleic acid with at least one transgene is a nucleic acid comprising a gene which is heterologous to the oncolytic RNA virus on which the recombinant RNA virus of the present invention is based. The term "heterologous" refers to the complete gene or a part thereof, which may be the coding region of the gene or a part thereof.

The heterologous gene may be an artificial sequence or may be obtained from natural sources or by recombination of at least two sequences selected

from sequences obtained from natural sources and/or artificial sequences. "Natural sources" include animals such as mammals, plants, fungi, and microorganisms such as bacteria, protozoa and viruses, which may be different from other oncolytic RNA viruses of the present invention. The 5transgene may also encode for a fusion protein. Mammals include humans and mice.

In an especially preferred embodiment, the virus of the present invention is a Newcastle Disease Virus, (NDV), most preferred is NDV strain MTH68. The 10NDV may be a lentogenic, mesogenic or velogenic strain. Especially preferred are mesogenic or velogenic NDV strains. The virus is preferably replication competent.

Genetic manipulation of viruses

15

Methods for genetically manipulating RNA viruses are well known as stated above. Further, genetic manipulation of oncolytic viruses is reviewed e.g. in Bell et al. (2002). RNA viruses as virotherapy agents are reviewed in Russ II (2002). The content of any of these documents is herein incorporated by 20reference.

Binding proteins

In the oncolytic recombinant RNA virus of the present invention, at least one 25transgene may code for a binding protein.

Binding proteins are proteins, which, when expressed in a target cell, are capable of binding to a component of said cell and/or a neighbouring cell. Preferably, binding proteins are proteins which bind to intracellular 30components.

In a preferred embodiment, binding proteins belong to the following group: a natural ligand or a genetically modified ligand, a recombinant soluble domain of a natural receptor or a modified version of it, e.g. a peptide- or polypeptide-ligand, an antibody molecule and fragments and derivatives thereof or an antibody-like molecule and derivatives thereof.

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

10

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

15

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

20The preferred binding proteins are selected from binding proteins having a therapeutic activity.

A natural ligand as described above can be a growth factor or a peptide. A genetically modified ligand may be an analogue of a naturally occurring
25growth factor or peptide.

Recombinant soluble domains of a natural receptor or modified versions of it as described above are recombinantly expressed soluble extracellular domains of a cell-surface receptor and/or fragments of it, a recombinantly

expressed soluble extracellular domain of a cell adhesion molecule and/or fragments thereof.

Antibody molecules as mentioned above may be monoclonal immunoglobulin antibodies of any known specificity and isotype, fragments thereof and/or fragments thereof fused to effector proteins. The antibody molecules may be chimeric, humanized or human antibodies. Antibody fragments contain at least one antigen-binding domain of an antibody. Antibody fragments have been described extensively in the literature (reviewed eg. in Allen (2002), 10herein incorporated by reference). Preferred examples are single-chain Fv fragments, Fab fragments, F(ab2'), domain-deleted versions called minibodies, and other immunoactive portions, fragments, segments and other smaller or larger partial antibody structures wherein the latter possess sufficient targeting properties or immunological stimulatory or inhibitory 15activity so as to be therapeutically useful within the methods of the present invention.

Such antibodies may be derived from hybridoma cloning experiments by use of transgenic mice or from phage display selections, ribosome display 20selections, or colony filter screening of antibody libraries containing human antibody sequences or related methodologies.

Binding proteins with antibody like properties as described above may be genetically modified proteins or domains of it in which one or more peptide 25loops are randomized on the level of amino acids in such a way that high affinity binding molecules with high specificity can be enriched against any antigen from libraries of such molecules by phage display, ribosome display, colony filter screen or related methodologies. The selected proteins usually have high thermal and thermodynamic stability and are well expressed in 30recombinant expression systems such as E.coli, yeast, insect and mammalian expression system. Examples for such binding proteins with

antibody like properties are ankyrin repeat proteins as described in Binz et al. (2004), the lipocalins as described in Skerra (2000), the gamma-crystallins as described in DE199 32 688.6, the modified protein A scaffold (affibodies) as described in Hogbom et al. (2003), or Nord et al. (2000) or the fibronectin 5framework and others. Antibody-like molecules can be monomeric or repetitive molecules either constructed as single-chain molecules or as multichain molecules wherein the antibody-like molecule possesses sufficient targeting properties or immunological stimulatory or inhibitory activity so as to be therapeutically useful within the methods of the present invention.

10

Binding molecules with additional function

The binding protein may be a fusion protein comprising at least one binding domain, e.g. from an antibody, and a heterologous domain. "Heterologous" 15has the meaning as discussed above in the context of heterologous genes.

The binding proteins described above are able to deliver a payload to a disease specific site (e.g. a tumor) as a so called intrabody or as extracellular available binding protein. The delivered payload can be a heterologous 20domain, e.g. a toxin such as human RNase (De Lorenzo et al., 2004) (Zewe et al., 1997) *Pseudomonas* exotoxin (Chaudhary et al., 1989) (Kreitman and Pastan, 1995) (Batra et al., 1992) , Diphtheria toxin (Kreitman et al., 1993) (Chaudhary et al., 1990) (Batra et al., 1991), or an enzyme such as beta-galactosidase, beta-glucuronidase (Roffler et al., 1991) (Wang et al., 1992) 25(Bosslet et al., 1992), beta-glucosidase (Rowlinson-Busza, 1992), carboxypeptidase, (Antoniw et al., 1990), (Bagshawe et al., 1988), beta-lactamase with therapeutic efficacy, or an immune-stimulatory protein with cytokine activity such as IL-2, IL-12, TNF-alpha, IFN-beta or GM-CSF (see eg. review by Allen (2002).

30

In another example the binding proteins described above have themselves **antagonistic or agonistic efficacy** which is therapeutically useful. Examples for antagonistic/blocking binding molecules are the VEGF inhibitory antibody Avastin (Ferrara et al., 2004), the HER2/neu receptor blocking antibody Herceptin (Noonberg and Benz, 2000) or the EGF-receptor blocking antibody Erbitux (Herbst and Langer, 2002). Agonistic binding proteins can be binding proteins which induce for example apoptosis (Georgakis et al., 2005) or have regulatory activity on DNA, RNA or proteins (e.g. induce transcription, stabilize proteins). The review by (Adams and 10Weiner, 2005) describes various therapeutic antibodies that could also be incorporated into an oncolytic virus

Prodrug-converting enzymes

15In the oncolytic recombinant RNA virus of the present invention, at least one transgene may code for a prodrug-converting enzyme.

A prodrug is a derivative or a precursor of a therapeutically active compound, which can be enzymatically converted into the active compound. Prodrug- 20converting enzymes are enzymes capable of converting a prodrug into the therapeutically active drug.

Therefore subject of the present invention is a pharmaceutical composition comprising a recombinant oncolytic virus of the present invention, a virus 25genome of the present invention, a virus antigenome of the present invention, and/or a DNA molecule of the present invention as an active ingredient optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants, which virus, virus genome, antigenome and/or DNA molecule comprises at least one transgene encoding for a prodrug-converting enzyme.

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

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

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

25

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

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

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

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

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

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

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

(a) a recombinant oncolytic virus of the present invention, a virus genome of the present invention, a virus antigenome of the present invention, and/or a DNA molecule of the present invention comprising at least one transgene
30 encoding for a prodrug-converting enzyme, and

(b) a prodrug suitable for treatment of the proliferative disease, which prodrug can be converted into a pharmaceutically active compound by the prodrug-converting enzyme of (a).

5The method may comprise the administration of a single pharmaceutical composition comprising both components (a) and (b), or may comprise the administration of two distinct pharmaceutical compositions, one of which comprises component (a) and the other comprises (b).

10

Proteases

In the oncolytic recombinant RNA virus of the present invention, at least one transgene may code for a protease.

15

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

25

If the oncolytic recombinant RNA virus of the present invention encodes for a protease, the oncolytic virus of the present invention causes selective expression of the protease in a virus-infected target cell (in particular a tumor cell) which is usually not or not sufficiently expressing the protease. Thus,
30during treatment of a subject in need thereof, the protease may irreversibly

cleave a target polypeptide in a target cell, thereby inhibiting proliferation and/or growth of the target cell or killing the target cell, but may essentially not cleave the target molecule in a non-target cell, in particular in a healthy cell of the subject to be treated. By this strategy, undesired side-effects of 5protease treatment are reduced.

It is preferred that the protease is a sequence-specific protease. More preferred is a protease specifically cleaving a target polypeptide. The protease may either be of natural origin and may be derived from any 10species or it may be engineered. Amino acid sequences suitable for a specific cleavage of a predetermined target polypeptide can be determined by a person skilled in the art, e.g. on the basis of publicly available sequence databases. US 2005-0175581 and US 2004-0072276 describe the generation of protein-engineered proteases with a predetermined substrate 15specificity. These two documents are herein included by reference.

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

20Another subject of the present invention is a method for treatment of a proliferative disease, in particular a hyperproliferative disease, such a cancer, comprising administering in a pharmaceutically effective amount to a subject in need thereof a recombinant oncolytic virus of the present invention, a virus genome of the present invention, a virus antigenome of the present invention, 25and/or a DNA molecule of the present invention comprising at least one transgene encoding for a protease.

The transgene of the present invention may encode a fusion protein of a prodrug-converting enzyme as defined above, a binding molecule as defined 30above and/or a protease as defined above. Especially preferred is a fusion

protein of a prodrug-converting enzyme and a binding molecule or a fusion protein of a protease and a binding molecule.

Therapeutic Applications

5

The present invention shows for the first time that a transgene coding for a binding protein, a prodrug-converting enzyme and/or a protease may be functionally expressed in oncolytic virus-infected tumor cells. Thus, the present invention relates to a pharmaceutical composition which comprises 10 as an active ingredient a virus as indicated above, a nucleocapsid of the virus, a genome of the virus or a DNA molecule encoding the genome and/or the antigenome of the virus, optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants.

15 The pharmaceutical composition may be provided as a solution, suspension, a lyophilisate or in any other suitable form. In addition to the active ingredient, the composition may comprise carriers, buffers, surfactants and/or adjuvants as known in the art. The composition may be administered e.g. orally, topically, nasally, pulmonally or by injection locally or intravenously. The 20 pharmaceutical composition is administered in a pharmaceutically effective amount depending on the type of disorder, the patient's condition and weight, the route of administration etc. Preferably 10^9 to 10^{12} virus particles, 10^8 to 10^{11} , 10^7 to 10^{10} , or 10^6 to 10^9 virus particles are administered per application. The oncolytic therapy may be optionally combined with other 25 tumor therapies such as surgery, radiation and/or chemotherapy such as cyclophosphamide treatment and/or hyperthermia treatment.

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

binding molecule as specified below. It has especially not been described that such a protein can be expressed by an oncolytic strain of an RNA virus, e.g. of a Newcastle disease virus.

5As an example NDV, the strain MTH68 was chosen in the present application because it has an inherent oncolytic property with promising data from experimental clinical treatments of patients (Sinkovics and Horvath, 2000). In principle, however, most NDV strains with multibasic fusion protein cleavage sites may be used as oncolytic agents for the treatment of tumors. The
10reverse genetics technology is applicable to all strains.

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

15The combination of oncolytic NDV with therapeutic binding proteins, prodrug-converting enzymes and/or proteases of the above described properties will have additional or even synergistic efficacy of two therapeutical principles. The oncolytic self-replicating virus targets the binding protein drug, the prodrug-converting enzyme and/or the protease to the preferred site of action
20where it is expressed in situ in high local concentrations. Such protein expression is expected to be very selective and the binding protein, the prodrug-converting enzyme and/or the protease with its respective mode of action will add to the intrinsic therapeutic oncolytic activity of the NDV. Based on the replication competent nature of the used virus and the selective
25replication in tumor cells the amount of expressed transgene [binding protein, the prodrug-converting enzyme and/or protease] is expected to be roughly proportional to the mass of the tumor.

Antibody molecules or antibody like molecules or derivatives thereof are
30ideal binding proteins to be used with the NDV-system. Antibody molecules have been the subject of intensive research and technologies are now

available to generate antibody molecules which are non-immunogenic, very selective and of high affinity. The local expression of antibody molecules at high concentrations lead to very significant agonistic or antagonistic efficacy or efficient targeting of effector molecules with reduced toxicity profile compared to standard therapy.

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

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

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

Possible targets for binding molecules or/and proteases can be all structures of a target cell or of the extracellular matrix surrounding the target cell which can be recognized by the described binding proteins or/and proteases and which are relevant to a certain type of pathological phenotype. These can be

structural proteins, enzymes, growth factors, growth factor receptors, integrins, transcription factors etc.

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

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

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

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

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

- blocking proteins of autonomous active growth factor receptors (eg. EGFR, Met)

- competitive binders for growth factors (antagonists)
 - blocking proteins for Rb-phosphorylation
 - blocking proteins for E2F-dependent transcription
 - stabilizers for p53
- 5- antagonistic binders for antiapoptotic proteins (e.g. Bcl-2)
- antagonistic binders for cyclins
 - antagonistic binders for Ras effectors (eg. GEFs)
 - antagonistic binders for hypoxia induced proteins (e.g. HIF1 α)
 - inhibitors of transcription factors that interfere with dimerization or DNA-
- 10 binding or cofactor binding (eg. Myc/Max)
- inducers of differentiation
 - inhibitors of smad signalling/translocation
 - inhibitors of cellular adhesion interactions (cadherins, integrins, eg. $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$)
- 15- inhibitors of enzymes that degrade the extracellular matrix (eg. MMPs)
- antagonistic binders for proangiogenic ligands (eg. soluble VEGF-R)
 - inhibitors of mitotic kinases (eg. Plk-1)
 - antagonistic binders to proangiogenic receptors
 - inhibitors of scaffold complex formation (eg. KSR/Ras)
- 20- inhibitors of translation initiation (eIF4E, EIF2a)

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

Definitions

Newcastle Disease Virus:

Paramyxoviruses contain single-stranded RNA genomes of negative polarity having genomes of 15-19 kb in length (wild-type) and the genomes contain 6-510 genes. The viral envelope is formed by the surface glycoproteins and a membrane part derived from the host cell. The surface glycoproteins (F and HN or H or G) mediate entry and exit of the virus from the host cell. The nucleocapsid is inside the envelope and contains the RNA genome and the nucleocapsid protein (NP), phospho- (P) and large (L) proteins responsible for intercellular virus transcription and replication. The matrix (M) protein connects the viral envelope and the nucleocapsid. In addition to these genes encoding structural proteins, *Paramyxoviridae* may contain "accessory" genes which may be additional transcriptional units interspersed with the genes mentioned above. The accessory genes are mostly ORFs that overlap with the P gene transcriptional unit. A comprehensive description of paramyxoviridae can be found in (Lamb, 2001).

NDV is the prototypic member of the genus *Avulavirus* in the family *Paramyxoviridae* belonging to the order *Mononegavirales*. The viral genome is a single-stranded negative-sense RNA coding for six major proteins: the nucleocapsid protein (NP), phosphoprotein (P), matrix protein (M), fusion protein (F), hemagglutinin protein (HN), and the polymerase protein (L). By editing of the P protein mRNA, one or two additional proteins, V (and W), are translated.

NDV strains are classified on their pathogenicity for chicken as velogenic strains (highly virulent) leading to acute lethal infection of chicken of all ages, mesogenic isolates (intermediate virulence) that are only lethal in young chicks, and lentogenic strains (nonvirulent) manifested in a mild or unapparent form of the disease. Classification of NDV isolates in velo-, meso- or lentogen is determined by the mean death time (MDT) of the chicken embryo in 9 day-old embryonated eggs after inoculation with the

u

minimum lethal dose to kill the embryo. One of the determinants of NDV virulence seems to be the cleavage site of the precursor F protein.

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

5

Recombinant virus

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

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

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

25

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

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

Any intergenic region between each of two genes (transcriptional units) of the viral genome is suitable for introducing the at least one recombinant transcriptional cassette. If more than one recombinant transcriptional cassette is present, they may be located in the same or different intergenic regions. Figure 1 describes an example of two recombinant transcriptional cassettes within one intergenic region. It is preferred that at least one recombinant transcriptional cassette is located between the viral F and HN genes, in particular if the RNA virus of the present invention is a recombinant Newcastle Disease Virus.

There is no known upper limit for the size of the genome of *Paramyxoviridae*. Therefore, there is no upper limit for the number and size of transgenes introduced into the recombinant RNA virus of the present invention. It is preferred that the transgene has a size of up to about 10 kb, more preferred up to about 5 kb, most preferred up to about 2 kb.

20

The recombinant RNA virus of the present invention preferably carries up to five transgenes, more preferably up to four transgenes, even more preferably up to three transgenes, most preferably one or two transgenes. If the recombinant virus of the present invention carries at least two transgenes, they may be identical or different. The recombinant RNA virus of the present invention may carry more than one copy of a particular transgene, in particular two, three, four or five copies.

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

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

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

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

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

An example of DNA molecules of the present invention is pflMTH68 murine IgG EDB (Fig. 2).

The genome, antigenome, nucleocapsid and/or DNA molecule of the present invention may comprise at least one transgene which may be located within the transcriptional cassette as described above. As discussed above, the transgene may encode for a binding protein, a prodrug-converting enzyme and/or a protease.

Another aspect of the present invention is a method for producing a recombinant oncolytic RNA virus comprising expressing a DNA molecule encoding the genome and/or the anti-genome of a recombinant oncolytic virus of the present invention.

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

Yet another aspect is an oncolytic RNA virus, a genome or anti-genome thereof or a DNA molecule comprising the full set of genes of *Paramyxoviridae* or a set of genes of *Paramyxoviridae* in which at least one gene or intergenic region is genetically modified, and further comprising at least one recombinant transcriptional cassette as described above. Such a virus, genome or antigenome or DNA molecule may be used for the manufacture of a medicament and/or treatment of cancer. Such RNA virus, genome, anti-genome or DNA molecule is suitable for constructing a recombinant *Paramyxoviridae* virus, in particular a recombinant Newcastle

Disease Virus by genetic engineering techniques in order to introduce a recombinant sequence into the transcription cassette. For this purpose, the at least one transcription cassette may comprise a restriction site. If more than one transcription cassettes are present, the unique restriction sites of the 5transcriptional cassettes may be different. An example is plasmid pflMTH68_Asc_Pac of Fig. 1.

Therapeutical relevance:

10**Treatment of Cancer** means inhibition of tumor growth, preferably the killing of the tumor cells or the blocking of proliferation in a time gap by infection. NDV replicates selectively in tumor cells.

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

20**More preferably a solid tumor can be treated.**

More preferably a tumor with low proliferation rate can be treated.

Examples of tumors with low proliferation rate are prostate cancer or breast cancer.

25

More preferably a brain tumor can be treated.

More preferably a glioblastoma can be treated.

Manufacture of the recombinant RNA virus

5

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

pCITE P, pCITE N, pCITE L, pX85T flNDV

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

15

The plasmid pX85T is described in EP0702085 (Conzelmann KK).

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

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

At -20°C for up to one month.

At -80°C for up to 10 years.

Use of the recombinant NDV as a Medicament

5

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

10 The recombinant RNA virus of the present invention, in particular the NDV of the invention is a medicament especially for prevention and/or treatment of cancer, especially for prevention and/or treatment of lung cancer, prostate cancer, brain cancer, colon cancer, breast cancer.

15 The invention comprises the recombinant RNA virus of the present invention, in particular the NDV of the invention as a medicament combined with pharmaceutically acceptable carrier and diluents. Such carrier and diluents are described in Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed. Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (1980). The used virus titers may
20 be in the range of 10^9 to 10^{12} pfu per dose, in a range of 10^8 to 10^{11} pfu, in a range of 10^7 to 10^{10} pfu or in a range of 10^6 to 10^9 pfu dependent on the indication of treatment.

Therefore, another subject of the present invention is a pharmaceutical
25 composition comprising a recombinant oncolytic virus of the present invention, a virus genome of the present invention, or a DNA molecule of the present invention together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants. The pharmaceutical composition of the present invention may be used for the prevention or/and treatment of a proliferative disorder,
30 such as cancer.

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

Yet another subject of the present invention is a method for the prevention or/and treatment of a proliferative disorder, in particular cancer, comprising administration to a subject in need thereof a pharmaceutically effective amount of the pharmaceutical composition of the present invention. A pharmaceutically effective amount is a titre of the oncolytic RNA virus of the present invention, in particular the NDV of the present invention, the virus genome of the present invention, or the DNA molecule of the present invention which cures or suppresses the disease.

For the therapeutic effect the acceptable dosis is different and depends for example from the construct, the patient, the ways of administration and the type of cancer.

20

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

Yet another aspect of the present invention is the use of the recombinant RNA virus of the present invention, in particular the NDV of the invention, the virus genome of the present invention, or the DNA molecule of the present invention for manufacture of a medicament for treatment of cancer.

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

26

Figure legends

Figure 1 describes plasmid pflMTH68_Asc_Pac comprising the full genome of NDV and two transcriptional cassettes comprising the unique restriction site Ascl or PacI, respectively. The nucleotide sequence describes the intergenic region between F and HN comprising two recombinant transcriptional cassettes (SEQ. ID. NO: 5).

Figure 2 describes plasmid pflMTH68 murine IgG ED-B, which is based on pflMTH68_Asc_Pac and comprises sequences encoding the light chain and the heavy chain of anti-ED-B IgG antibody MOR03257 (see claim 42 of German Patent Application DE10 2004 05 0101.7-43; Seq ID No. 77). The light chain and the heavy chain are each inserted in one of the transcriptional cassettes.

15

Figure 3 describes that infection of CHO or HT29 cells with NDV MTH146 containing the genes for the anti-ED-B IgG antibody MOR03257 leads to expression of the antibody into the cell supernatant. 24 hours post infection, a level of about 20% of the maximal expression level is reached. After about 2072 hours post infection, maximal expression of the antibody is reached. As a control, cells were infected with MTH115 (containing the gene for beta-glucuronidase). In these cells, no IgG was detected.

Figure 4 demonstrates by immunofluorescence that cells infected with MTH146 exhibit a staining pattern indistinguishable from the staining with the recombinant antibody MOR03257.

Figure 5 demonstrates by immunohistochemistry that the supernatant from MTH146 infected cells yields an undistinguishable staining pattern compared

with purified α ED-B antibody MOR03257 expressed from stably transfected 239 cell in tumor vasculature where ED-B is present.

Figure 6 demonstrates that intravenous injection of MTH87 leads to expression of GFP in the tumor in a mouse xenograft model.

Figure 7 describes expression of β -glucuronidase in MTH115 infected Hela cells.

10 Figure 8 describes expression levels of β -glucuronidase in MTH115-infected cell lines.

Figure 9 and Figure 10 describe synergistic effect of HMR1826 and MTH115 in selectively killing tumor cells.

15

Examples

Example 1:

20 Generation of a recombinant NDV with transgenes that lead to the expression of an antibody

The oncolytic strain MTH68 of NDV was used to obtain viral RNA. Using RT-PCR several fragments of cDNA were obtained and in a multi-step cloning
25 procedure they were assembled into a full-genome cDNA that was cloned into the vector pX85T (Schnell et al., 1994) yielding the plasmid pflMTH68. This vector can be used for transfection in order to rescue recombinant virus from a T7-polymerase expressing cell line.

27

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

5Sfi fw (5'-aggccttaattaaccgacaacttaagaaaaatacgggtagaacggcctgag-3', SEQ. ID. NO: 1) and

Sfi back (5'-aggccgttctacccgtatttttcttaagttgtcgggtaattaaggcctctc-3', SEQ. ID. NO: 2)

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

10The resulting plasmid pflMTH68Pac was cut with PacI and another dsDNA-oligonucleotide consisting of

Asc fw (5'-

cgggcgcgccccgacaacttaagaaaaatacgggtagaacagcagtccttcagtcctaat-3', SEQ. ID. NO: 3) and Asc back (5'-

15taagactgaagactgctgttctacccgtatttttcttaagttgtcggggcgcgccccgat-3', SEQ. ID. NO: 4)

was inserted into the PacI-restriction site thereby destroying one of the flanking PacI-recognition sites and inserting a unique AscI-site. The resulting plasmid was designated pflMTH68 Asc Pac. This plasmid has two additional
20transcriptional cassettes inserted between the genes for the viral F and HN-genes. Both transcriptional cassettes were flanked by identical viral transcriptional start and stop sequences (Fig. 1). Cassette 1 contains a unique PacI restriction site, cassette 2 contains a unique AscI restriction site for the insertion of a transgene cDNA.

25

The heavy and light chains of a recombinant function blocking therapeutic antibody against the extra-domain B (ED-B) of fibronectin (MOR03257) were cloned into the two additional unique restriction sites AscI and PacI respectively. The murine Iglambda light chain for the anti-ED-B antibody was
30inserted into the AscI site. The murine IgG heavy chain for the anti-ED-B antibody was inserted into the PacI site. The length of the inserts together with the adaptor sequences was adjusted to a base number which was a multiple of six in order to follow the rule of six for the length of the complete

genome of the recombinant virus. The resulting plasmid was designated pflMTH68 murine IgG ED-B (Fig. 2).

Using standard techniques for the rescue of recombinant NDV (transfection of T7-expressing BHK cells), a virus was produced that contained two additional genes coding for the two chains of the anti-ED-B IgG antibody. That virus was called MTH146.

Example 2:

10

Expression of an antibody by recombinant Newcastle Disease Virus. Cells infected with MTH146 produce an antibody that recognizes its antigen ED-B fibronectin (ELISA).

15 Materials and Methods:

HT29 (human colon carcinoma) and CHO (chinese hamster ovary) cells were seeded in 6well plates at 4×10^5 cells/well. The day after, cells were infected in triplicate with a MOI of 0,01 either with virus MTH146 (containing the genes for an anti-ED-B antibody) or with virus MTH115 (containing the gene for an irrelevant secreted transgene [beta-glucuronidase]).

At the time points 0h, 20h, 30h, 2d, 3d, 6d *post infectionem* an aliquot of the cell supernatant was taken and subjected to an antibody titer determination.

25

The antibody titer was determined by ELISA. Plastic wells were coated with the recombinant antigen ED-B. The tissue culture supernatant containing the antibody or as a standard known amounts of recombinant antibody was added to the wells. After washing, bound antibody was detected with a HRP-coupled secondary antibody raised against murine IgG. Using purified recombinant antibody (expressed by plasmid-transfected cells) as a standard the concentration of the virally produced antibody could be determined.

Results:

Infection with MTH146 leads to the expression of an antibody into the cell supernatant that specifically binds to its target ED-B (Fig. 3). Infection of the same cells with a virus expressing an irrelevant secreted transgene (MTH115) does not lead to a signal in the ED-B ELISA with the cell supernatant. In HT29 tumor cells the concentration of the antibody in the supernatant reaches titers of ca. 8 µg / ml (binding IgG), which is a sufficient concentration for biological activity. In CHO cells the antibody titer reaches 10 even > 20 µg / ml in the supernatant.

Example 3:**Virally expressed antibody binds to its target: Immunofluorescence**

15

Materials and Methods:

Murine F9 teratocarcinoma cells were seeded in 6well plates. The cells were infected either with MTH146 (anti-ED-B antibody) or MTH115 (irrelevant transgene β-glucuronidase) or mock infected.

Two days after the infection the cells were fixed with 4% formaldehyde. The cells were washed and bound antibody was visualized by staining with a Cy3-coupled secondary antibody directed against mouse IgG. As a positive control mock-infected cells were incubated prior to fixation for 1 hour with 5 25µg/ml recombinant α-ED-B IgG.

Results:

The negative controls do not show a significant staining of the F9 cells. Cells 30 infected with MTH146 show a staining pattern that is indistinguishable from the staining with the recombinant antibody (Fig. 4). Therefore it can be concluded that the viral infection leads to the production of the correct antibody that binds to its antigen like the recombinant antibody. The virally

produced antibody concentration is also sufficient to give a staining similar to an antibody concentration of 5 µg/ml. That is consistent with the estimated concentration of the virally expressed antibody, which is in the range of 5 µg/ml.

5

Example 4:**Virally expressed antibody binds to its target: Immunohistochemistry****10Materials and Methods:**

Cryopreserved tissue sections (10 µm) of the SK-MEL melanoma grown as xenograft subcutaneously in mice were fixed in cold acetone for 10 min, washed in PBS and stained with antibody. As control served a purified α-ED-15B IgG antibody MOR03257 (conc. 5 µg/ml for staining) that was expressed from stable transfected 293 cells. The negative control was incubated with buffer only and no primary antibody. The supernatants of 293 cells infected with recombinant viruses were used for staining as undiluted supernatants. Prior to staining, virus was inactivated by treatment with UV-light. MTH146-20infected cells produce the α-ED-B IgG antibody, control infected cells were infected with a recombinant virus that did not produce an antibody as a transgene. The bound antibody was visualized by detection with protein-A-peroxidase and staining with diaminobenzidine as a substrate. The sections were counterstained with hematoxylin QS. Photodocumentation was 25performed with a Zeiss Axiophot imaging system.

Results:

No unspecific staining of the cryosections can be observed when incubated 30without antibody or with a tissue culture supernatant from control-virus-infected 293 cells.

29

Staining with the purified α -ED-B antibody expressed from stable transfected 293 cells shows a characteristic signal for tumor vasculature where ED-B is present. The incubation with the supernatant from MTH146-infected cells yields an undistinguishable staining pattern (Fig. 5). This demonstrates that the virally expressed antibody is able to specifically bind its target ED-B also in tumor tissue sections and that the concentration in the supernatant of infected cells is sufficient to give a signal comparable to 5 μ g/ml purified antibody.

10Example 5:

Tumor-selective replication of recombinant NDV in vivo

This example demonstrates that intravenous injection of the GFP expressing oncolytic virus MTH87 leads to the expression of GFP in the tumor in a 15mouse xenograft model.

MiaPaCa pancreas carcinoma xenografts were grown subcutaneously in nude mice. The mice were treated repeatedly (6x) with 1×10^9 pfu of MTH87 (NDV with GFP as transgene) every other day.

20At day 21 and day 34 after the last treatment individual animals were sacrificed and sectioned. Sections of the organs (ca. 2 mm) were directly analysed under a fluorescence microscope to detect GFP-expression (Fig. 6).

Photographs of tumor sections show GFP-expression. No such GFP- 25expression could be found in any of the following organs: spleen, liver, lung, heart, kidney, intestine, adrenal.

Reisolation of NDV (MTH87) from organs:

30In order to prove that replicating virus was present in the tumor but not in the other organs, slices of the organs (ca. 2 mm thickness) were incubated on top of a monolayer of virus-sensitive HT29 cells in tissue-culture medium. The day after, the HT29 cells were scored for the expression of GFP which

indicated infection by MTH87 that originated from the organ/tumor. Reisolation of MTH87 was only possible from tumor pieces but not from any of the organs tested. Out of 6 tumor pieces from each tumor at least 4 were positive for the virus-reisolation. Negative organs were: spleen, liver, lung, heart, kidney, intestine, adrenal (no other organs were included in the test).

These results document that the recombinant virus MTH87 selectively replicates in tumor tissue and not in other organs. The virus replication is detectable many days after the last intravenous administration of the virus.

10

Example 6:**Generation of an oncolytic NDV that expresses an antibody-effector fusion protein L19-IL2:**

15

The fusion protein L19-IL2 is a antibody targeted cytokine. The antibody fragment L19 is directed against the extradomain B of fibronectin (ED-B) which is expressed mainly surrounding tumor blood vessels but also in the tumor stroma.

20 The cytokine Interleukin-2 induces proliferation of T-cells and activates NK-cells. Free, non-targeted interleukin-2 (Proleukin) is currently used in low dose application for treatment of Renal cell carcinoma (RCC). The clinical use of Proleukin is limited due to its high systemic toxicity. It has been shown that the targeted delivery of IL-2 by an antibody such as L19 can be used to
25 deliver therapeutic efficacious doses to tumors while maintaining non-toxic systemic levels of IL-2. The tumor specific delivery and expression of L19-IL2 combines the tumorselectivity of the oncolytic virus with the additional tumorselectivity of the L19 antibody fragment and the strong effector activity of IL-2.

Material and Methods:

Generation of recombinant NDV expressing the fusion protein L19-IL2

5

The plasmid pflMTH68 Pac contains the full genomic sequence of NDV MTH68 plus one additional transcriptional cassette with a unique PacI restriction site. A DNA-transgene coding for the fusion protein L19-IL2 is cloned into the PacI site. This transgene is composed of a Kozak sequence 10CCACC, a signal peptide for the extracellular secretion and the cDNA for the fusion protein L19-IL2 (Carnemolla et al., 2002). The total length of the genome is adjusted to be a multiple of 6 to follow the "rule of six" for the length of the viral genome. Recombinant virus is rescued from T7-expressing cells transfected with the full-length viral genomic plasmid containing the 15gene for L19-IL2 by a standard virus rescue technique. The resulting virus is designated MTH201. The virus is cultivated either in tissue culture or in the allantoic fluid of chicken eggs to produce high titres.

Murine F9-teratocarcinoma Xenograft experiment

20

Therapeutic studies are performed in the syngeneic F9 murine teratocarcinoma model. The murine F9-teratocarcinoma model is a rapid-growing syngenic tumor characterized by a high ED-B – fibronectin expression mainly in surrounding tumor blood vessels but also in the tumor 25stroma.

2×10^6 F9 tumor cells in 50% matrigel are implanted s.c. into nude mice strain 129 (clone SvHsd). When tumors reach a size of approximately 20 mm² mice are infected with recombinant NDV MTH201 (encoding the L19-IL2 fusion 30protein) or control virus MTH87 (encoding GFP as a transgene) at 1×10^8 pfu at days 1, 3, 5 and 7 intravenously. L19-IL2 (CHO-derived, dimer) and IL2

(PROLEUKINE) are administered as a daily i.v. bolus injection in sterile saline solution over a period of 5 days. All concentrations that are used in animal studies are in the range of 1.8 – 2.16 Mio. IU/kg/day.

After 12 days the mice are sacrificed and the tumor weight is assessed by measurement of the tumor area (product of the longest diameter and its perpendicular) or tumor volume using a caliper.

Result:

10

Dimeric L19-IL2 shows a 54.7% tumor weight reduction even at the lowest dose of 1430 IU/g/day corresponding to a low dose regimen used in humans whereas 3- and 6-fold higher doses only slightly improve the therapeutic efficacy of targeted IL2. PROLEUKINE reduces the tumor weight by 50.5% at its highest dose. No therapeutic efficacy is observed at 1430- and 4290 IU/g/day. Best results are obtained in the group of mice treated with NDV MTH201. Tumor weight reduction is above 55%. This can be explained by a combined action of the virus-expressed L19-IL2 and the oncolytic effect of the NDV. Another advantage is that the achieved results are obtained with less administrations of the NDV MTH201 compared to fusion protein alone.

Example 7:

Generation of an oncolytic NDV that expresses an ankyrin repeat protein that binds VEGF and is biologically active.

It has been demonstrated that VEGF and its receptor are essential for the growth of colorectal cancers and the formation and growth of colon cancer metastases in the liver in experimental models (Warren et al., 1995) and this principle has now been clinically validated by the systemic use of the VEGF-neutralizing human antibody avastin in patients with metastatic colorectal cancer (Salgaller, 2003).

VEGF (or VPF) is a homodimeric glycoprotein consisting of four isoforms (containing either 121, 165, 189, 206 amino acid residues in the mature monomer) which are generated by alternative splicing of mRNA derived from a single gene. While all forms of VEGF possess a signal sequence only the smaller two species are secreted. In contrast the larger forms are associated with heparin-bound-proteoglycans in the extracellular matrix. VEGF is mitogenic for a variety of large and small vessel endothelial cells, induces the production of tissue factor, collagenase, plasminogen activators, and their inhibitors and stimulates hexose transport in these cells as well. Most important receptors for VEGF are fms-like tyrosine kinase flt1 and KDR (Waltenberger et al., 1994). The Expression of VEGF has been demonstrated in several human cancer lines in vitro and in surgically resected tumors of the human gastrointestinal tract, ovary, brain, kidney, lung, and others. In many experimental tumor models the neutralization of VEGF leads to an efficient and significant growth inhibition (Gerber and Ferrara, 2005).

Here we demonstrate that the tumor targeted delivery of the anti-VEGF ankyrin repeat protein by the recombinant NDV is advantageous for the treatment of this disease. This is shown in an experimental athymic mouse model of colorectal cancer. Typically the liver is the first and most frequent site of metastasis in colorectal cancer. Therefore the potency of the new reagent is also demonstrated in an orthotopic experimental model of liver metastasis.

Material and Methods:

Generation of recombinant NDV expressing an ankyrin repeat protein that neutralizes VEGF

An anti-VEGF ankyrin repeat molecule of the type N₃C is selected with standard procedures (Binz et al., 2004). The sequence of the selected ankyrin repeat protein is known. An expression cassette coding for a

designed ankyrin repeat protein (dARPIN) with inhibitory activity against VEGF is cloned into the full-length genomic NDV-MTH68 plasmid.

The plasmid pflMTH68 Pac contains the full genomic sequence of NDV 5MTH68 plus one additional transcriptional cassette with a unique PacI restriction site. A DNA-transgene coding for the dARPIN against VEGF is cloned into the PacI site. This transgene is composed of a Kozak sequence CCACC, a signal peptide for the extracellular secretion and the cDNA for the ankyrin repeat molecule. The total length of the genome is adjusted to be a 10multiple of 6 to follow the "rule of six" for the length of the viral genome.

Recombinant virus is rescued from T7-expressing cells transfected with the full-length viral genomic plasmid containing the gene for the dARPIN against VEGF by a standard virus rescue technique. The resulting virus is designated MTH268. The virus is cultivated either in tissue culture or in the allantoic fluid 15of chicken eggs to produce high titres.

Subcutaneous tumors:

Confluent cultures of LS LiM6 cells are grown in 10 cm² Petri dishes and are 20harvested by brief trypsinization, (0.05% trypsin/0.02% EDTA in Ca²⁺/Mg²⁺-free HBSS) washed several times in Ca²⁺/Mg²⁺-free PBS and are resuspended at a final concentration of 5 x 10⁷ cells in serum free DMEM. The presence of single cells is confirmed by phase contrast microscopy, and cell viability is determined by trypan blue exclusion. Pathogen-free Balb/c 25NCR-NU athymic mice (3 - 4 week-old females obtained from Simonson laboratories, Gilroy, Ca) are housed in sterilized cages and injected subcutaneously with 5 x 10⁶ viable tumor cells. Animals are observed daily for tumor growth, and subcutaneous tumors are measured using a caliper every 3 d. On day 1, 3, 5 and 7 after the tumor inoculation groups of five 30animals are injected intraperitoneally with varying amounts of either anti VEGF mAb 4.6.1 (0 - 200µg per mouse), a control mAb of the same isotype (200 µg/ mouse), with anti-VEGF ankyrin repeat protein (0 - 200 µg/ per

mouse), 1×10^9 pfu NDV MTH268 or 1×10^9 control NDV MTH87. Prior to high-dose virus treatment the animals are desensitized with the increasing virus doses 1×10^6 pfu, 1×10^7 pfu, 1×10^8 pfu, 5×10^8 pfu every other day. Tumor volumes are calculated as previously described (Kuan et al., 1987).

5

Liver metastases:

H7 cells are grown to confluence and are harvested as described above for subcutaneous injection and resuspended in serum free DMEM at a concentration of 20×10^6 cell/ ml. Athymic mice are anesthetized with methoxyfluorance by inhalation prepared in a sterile fashion, and the spleen is exteriorized through a left flank incision. 2×10^6 cells in 100 μ l are slowly injected into the splenic pulp through a 27-gauge needle over 1 min, followed by splenectomy 1 min later. Experimental animals receive VEGF antibody 154.6.1, control antibody (100 μ g/ mouse), anti-VEGF ankyrin repeat protein (100 μ g/ ml) by intraperitoneal injection beginning 1 d after splenic-portal injection and every 3 to 4 days thereafter. Alternatively mice are treated intraperitoneally with 1×10^9 pfu NDV MTH268 or 1×10^9 control NDV MTH87 at days 1, 3, 5 and 7. All animals are killed when the first mouse appears lethargic and an enlarged liver is palpated (day 28). The livers are excised and weighed, and the metastases are enumerated using a dissecting microscope.

To estimate tumor volume, the diameter of each liver metastases is measured to the nearest millimeter, and the volume of each tumor is calculated by assuming it to be a sphere. The sum of the volumes of all tumors in each liver is determined. The livers of two control animals is nearly replaced by tumor and individual nodules can not be distinguished. Tumor volume is estimated in these two livers as follows: the total liver volume mass is measured by displacement of water in a 20-ml graduated cylinder and the tumor volume is estimated to represent 85% of the liver.

Result:

Subcutaneous tumors: The tumor size of treated animals is monitored and dose-dependent tumor growth inhibition is found for all tested reagents. The tumor size in the animals which received the control mAb is approximately 5100 mm³ on day 8, 400 mm³ on day 16 and 900 mm³ on day 22. For the mAb 4.6.1 the measured tumor size at day 22 is 500 mm³ when 10 µg of mAb are injected each time of administration, and 200 mm³ (100 µg), 150 mm³ (50 µg), 100 mm³ (200 µg) respectively. Similar dose dependency is found for the anti-VEGF ankyrin repeat protein when up to 200 µg are injected, with the best result of a tumor size of 100 – 500 mm³ when 200 µg of the reagent are applied. By treatment of athymic mice with the control NDV MTH87 the tumor size at day 22 is above 200 mm³. This antitumor effect is due to the antiproliferative effect caused oncolytic NDV. Best effects are found when athymic mice are infected with NDV MTH268 (expressing the anti-VEGF Ankyrin repeat protein). Measured tumor size is below 100 mm³. This effect is due to the advantageous combination of tumorselective expression of the VEGF-neutralizing ankyrin repeat binding protein and its antiangiogenic effect and the independent antiproliferative effect of the tumorselective NDV on the tumor cells. The tumorselective delivery and expression of the anti-VEGF ankyrin binding protein ensures a steady and high level site-specific expression of the neutralizing protein which overcomes pharmacological limitations of the systemic administered ankyrin repeat protein e.g. such as rapid clearance and non-specific tissue distribution and ensures efficient VEGF neutralisation. This effect is obtained at a reduced number of administrations and therefore a higher convenience for the patient population is expected.

Liver metastases:

All animals show evidence of hepatic tumors but differ in number, size and weight of liver metastases. A dramatic reduction in comparison to the control mAb treated mice is seen after anti-VEGF treatment. The average number of tumors per liver and the mean estimated tumor volume per liver is 10- and

18-fold lower in the anti-VEGF mAb 4.6.1-treated animals compared to the control antibody treated animals. Similar results are found for the anti-VEGF ankyrin repeat protein treated-mice. The most dramatic reduction is observed in the animals treated with NDV MTH268. Though administered less times the numbers of tumors in the liver is reduced and the tumor volume is smaller when compared to A4.6.1 treated mice.

As for the primary tumor the beneficial effect of NDV MTH268 on the inhibition of formation and growth of liver metastases is due the advantageous combination of tumorselective expression of the VEGF-neutralizing ankyrin repeat binding protein and its antiangiogenic effect and the independent antiproliferative effect of the tumorselective NDV on the tumor cells. The NDV selectively proliferates in these remaining tumor buds and exerts its antiproliferative effect on these tumor cells further decreasing the number of surviving tumor cells and number of detectable metastases.

15

An even increased therapeutic efficacy on the growth of the primary tumor and the number, size and weight of colorectal liver metastases is seen when a multi-specific ankyrin repeat binding protein is used which contains specificities for VEGF-A, VEGF-C and PDGF.

20

Example 8:

Generation of recombinant NDV expressing an intracellular ankyrin repeat protein that inhibits polo-like kinase activity and inhibits tumor growth

Plk-1 has been shown to be a target for cancer therapy. Expression of Plk-1 is elevated in neoplastic tissues and has a prognostic potential in a broad range of human tumors (see eg. WO2005042505 and references therein).

30

An anti-human Plk-1 ankyrin repeat molecule of the type N3C is selected with standard procedures (Binz et al., 2004, Amstutz et al., 2005). Binding to Plk-1

is measured in an ELISA with recombinant GST-Plk-1 on glutathion-plates as a substrate. Positive binders are selected and the corresponding genes are cloned into the eukaryotic CMV expression plasmid pcDNA3.1. The plasmids are transfected into HeLa and MaTu cells and the cells are subjected to a proliferation assay as described e.g. in WO2005042505. This method is preferred to an in vitro kinase assay in order to be able to also identify binding dARPINS that block function without directly blocking the kinase activity. The dARPIN with the best inhibitory activity of cell proliferation is selected for insertion into the genome of the oncolytic recombinant NDV. The sequence of the selected ankyrin repeat protein comprises 161 amino acids corresponding to 483 bp. An expression cassette coding for the designed ankyrin repeat protein (dARPIN) with inhibitory activity against human Plk-1 is cloned into the full-length genomic NDV-MTH68 plasmid.

The plasmid pflMTH68 Pac contains the full genomic sequence of NDV MTH68 plus one additional transcriptional cassette with a unique PacI restriction site. A DNA-transgene coding for the dARPIN against Plk-1 is cloned into the PacI site. This transgene is composed of a Kozak sequence CCACC and the cDNA for the ankyrin repeat molecule. The total length of the genome is adjusted to be a multiple of 6 to follow the "rule of six" for the length of the viral genome. Recombinant virus is rescued from T7-expressing cells transfected with the full-length viral genomic plasmid containing the gene for the dARPIN against Plk-1 by a standard virus rescue technique. The resulting virus is designated MTH261. The virus is cultivated either in tissue culture or in the allantoic fluid of chicken eggs to produce high titres. The virus is purified and concentrated using tangential flow filtration and eluted in buffer with 5% mannitol/1% L-lysine.

In vivo tumor growth inhibition.

Female NMRI nude mice are injected subcutaneously with $1,5 \times 10^6$ MaTu cells diluted 1:1 (medium : matrigel). When tumors have reached a size of 20-25 mm² (appr. 3 days later) the animals are treated with the recombinant virus. The animals are injected with 200 µl virus suspension (in 5% smannitol/1% L-lysine buffer) intravenously every other day with the following consecutive doses: 1×10^6 pfu, 1×10^7 pfu, 1×10^8 pfu, 5×10^8 pfu, 1×10^9 pfu, 1×10^9 pfu, 1×10^9 pfu, 1×10^9 pfu. The increasing doses at the beginning allow for a desensitisation of the mice against the virus. One group receives only buffer (5% mannitol/1% L-lysine), one group receives 10 recombinant virus MTH87 that expresses a non-therapeutic transgene (GFP) and one group the recombinant oncolytic virus MTH261 expressing the dARPIN that has inhibitory activity against Plk-1. Tumor growth is monitored for three weeks and the tumors are weighed at the end (day 21). Control tumors are in the range of 1,0 g. Tumors treated with MTH87 show a 15 significant weight reduction. Tumors treated with MTH261 are even smaller and show a significant weight reduction in comparison with MTH87. This demonstrates a benefit of the dARPIN expression by the virus compared to the virus treatment alone. The result also proves that an intracellularly active transgene can improve the oncolytic properties of a recombinant oncolytic 20 virus.

Example 9:

Generation of an oncolytic NDV that expresses an ankyrin repeat 25 protein that binds HIF1α and is biologically active

Hypoxia in tumors is developed if the tumor cells grow faster than the endothelial cells that form the blood vessel system, leading to a deprivation of oxygen and nutrients in the tumor.

30

The establishment of hypoxic areas in solid tumors promotes the progression of the tumor development. Oxygen deficiency in tumor cells leads to genetic instability, followed by a selection process, ending up in tumor cells with

reduced apoptotic potential and increased resistance against conventional therapies, like chemotherapy and radiation. As a consequence hypoxia in tumors contributes to a more malignant phenotype.

The hypoxia-inducible transcription factor HIF-1 α is mainly responsible for the activation of most genes in tumor cells under hypoxic conditions. HIF-1 α induced gene products are regulating processes like angiogenesis, glucose metabolism, cell growth and oxygen transport. Examples of upregulated genes by HIF-1 α are glucose transporter 1 and 3, adenylate-kinase 3, lactate dehydrogenase, VEGF, Flt-1 and others.

10The heterodimeric transcription factor HIF-1 α is composed of a HIF-1 α and a HIF-1 β subunit. The HIF-1 α -subunit and the HIF-1 β -subunits are constitutively expressed. But HIF-1 α is in contrast to HIF-1 β immediately degraded under normoxic conditions. In a normal oxygen milieu the HIF-1 β subunit is recognised and marked for proteasomal degradation by the Von-
15Hippel-Lindau protein (pVHL), which is part of an E3 ubiquitin ligase complex.

Under hypoxic condition the HIF-1 α -subunit is no more recognised by the pVHL and the protein is immediately transported into the nucleus. In the nucleus a dimerisation with the HIF-1 β -subunit takes place and DNA binding to a HRE (hypoxia response element) leads to specific gene induction.

20In the described experiment it is demonstrated that intracellular targeting of the HIF-1 α -transcription factor by an anti HIF-1 α ankyrin repeat protein expressed by a recombinant NDV in a solid tumor model is superior over NDV treatment alone and application of recombinant purified anti HIF-1 α ankyrin repeat protein alone. In vivo efficacy is proven in a prostate cancer
25xenograft model in nude mice.

Material and Methods

Generation of recombinant NDV expressing an ankyrin repeat protein 30that binds HIF-1 α

An anti-HIF-1 α ankyrin repeat molecule of the type N3C is selected with standard procedures (Binz et al., 2004). The sequence of the selected

ankyrin repeat protein is known. An expression cassette coding for a designed ankyrin repeat protein (dARPIN) with inhibitory activity against HIF-1 α is cloned into the full-length genomic NDV-MTH68 plasmid.

5The plasmid pflMTH68 Pac contains the full genomic sequence of NDV MTH68 plus one additional transcriptional cassette with a unique PacI restriction site. A DNA-transgene coding for the dARPIN against HIF1 α is cloned into the PacI site. This transgene is composed of a Kozak sequence CCACC and the cDNA for the ankyrin repeat molecule. The total length of
10the genome is adjusted to be a multiple of 6 to follow the "rule of six" for the length of the viral genome. Recombinant virus is rescued from T7-expressing cells transfected with the full-length viral genomic plasmid containing the gene for the dARPIN against HIF-1 α by a standard virus rescue technique. The resulting virus is designated MTH288. The virus is cultivated either in
15tissue culture or in the allantoic fluid of chicken eggs to produce high titers.

PC-3 xenograft model:

PC-3 xenografts are passaged in vivo in athymic female or male nude mice.
20Xenografts are established by subcutaneous (sc) injection of 5×10^5 PC-3 cells per animal. After the third passage tumors are cut into 2 mm³ pieces. Subcutaneous inoculation of nonnecrotic tumor tissues in nude mice is performed using sterile stainless steel needles. Mice are randomly allocated to various treatment groups, when the tumor volume reaches an average
25size of 150-200 mm³.

On day 0 after the group allocation the mice are treated every other day with increasing doses of MTH288 (encoding anti HIF-1 α dARPIN) or MTH87 (control virus encoding GFP as a transgene). Prior to high dose virus
30treatment, virus doses of 10^6 PFU, 10^7 PFU, 10^8 PFU and 5×10^8 PFU are given intravenously for desensitization against NDV. After desensitization the highest dose of 10^9 PFU is applied three times. The control group is treated

intravenously with purified anti HIF-1 α ankyrin repeat protein (200 μ g/per mouse). Application of the anti HIF-1 α ankyrin repeat protein starts at the time point of the first virus injection and is also repeated every other day as long as the virus treatment is done. A third control group is treated with PBS alone. On day 20 after the first treatment animals are observed for tumor growth and subcutaneous tumors are measured using a caliper.

Results:

10 On day 20 after first treatment the tumors of PBS injected animals show in average a volume of 1500 mm³. The second control group treated only with anti HIF-1 α ankyrin repeat protein displays a slight tumor growth reduction. Animals receiving the NDV MTH87 show a strong tumor reduction on day. The best tumor growth inhibition on day 20 is seen in mice injected with the 15 NDV MTH288 expressing the anti HIF-1 α ankyrin repeat protein. The inhibition of tumor growth after treatment with MTH288 is significantly better than after the other treatments.

This result demonstrates that intracellular expression of an ankyrin repeat 20 protein against HIF-1 α by NDV is advantageous over NDV treatment alone or over application of recombinant purified anti HIF-1 α ankyrin repeat protein.

It is expected that the viral expression of a secreted anti HIF-1 α ankyrin repeat protein fused to a cell penetrating peptide (e.g. tat peptide, 25 oligoarginine peptides, AntP peptide, VP22 peptide, penetratin, transportan (for review see (*Ford et al., 2001*) enhances the therapeutic effect. This strategy allows the targeting of tumor cells with the anti HIF-1 α ankyrin repeat fusion protein that are themselves not infected with NDV.

30 A virus that expresses simultaneously transgenes for two separate dARPINS – one intracellular against HIF-1 α and one secreted against interleukin-8 - is expected to have an increased anti-tumor activity due to blockade of two compensatory pathways (Mizukami et al., 2005).

Example 10**MTH1151 leads to expression of β -glucuronidase in infected cells****Materials and Methods:**

Hela cells were plated in 6well dishes. After reaching confluency cells were infected with very low MOI = 0.00001 of MTH87 and MTH115. At the indicated time points aliquots of the cell supernatant were taken and frozen at 10-20°C. 72 hours after the infection the activity of β -glucuronidase was measured simultaneously in all supernatants in a MUG-assay.

MUG-assay for the quantification of β -glucuronidase activity

MU (4-methylumbelliferon) and MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) are from Sigma. MU is used to produce a standard curve. Virus containing samples are UV-radiated for 30 min to inactivate virus prior to the MUG-assay. Samples are incubated in a 25 mM sodium-acetate buffer pH 5.6 with 10 μ M MUG for 60 min at 37°C. The reaction is stopped by addition of 200 mM glycine buffer pH 10.4. Fluorescence is measured with excitation at 320 nm and emission at 460 nm in a fluorescence photometer. From the fluorescence emission the specific activity in nmol per ml per hour is calculated.

Results:

25

The infection with MTH115 leads to a time-dependent increase in the expression of β -glucuronidase, which is a result of the viral replication (Figure 7). Although MTH87 eventually kills the cells and thus liberates endogenous β -glucuronidase from the cells the resulting activity in the supernatant is negligible. MTH115 infection clearly achieves a massive production of the transgene. The CPE by MTH115 is comparable to that of MTH87 and MTH68

(wt), so the expression of β -glucuronidase by the virus does neither attenuate replication of the virus nor decrease the cytopathogenicity of the virus.

Example 11

5

Quantification of transgene expression by MTH115 in various cells

Materials and Methods:

10Cells were seeded in 96well plates. The number of cells was chosen to reach confluency one day after plating:

Hela	15 000 Cells / well
HT29	30 000 Cells / well
15Fibroblasts	10 000 Cells / well
HDMVEC	20 000 Cells / well

One day after seeding cells were infected with the virus MTH115 at an MOI of 0.01. In detail cells were washed with PBS, inoculated with 100 μ l virus-
20suspension at 37°C, virus was aspirated and 200 μ l warm medium was added to the cells.

At the indicated time points the supernatants were taken off the cells and subject to a beta-glucuronidase MUG-assay. For each time point triplicate
25wells were analysed.

Results:

The results are summarized in Figure 8. In the normal cells HDMVEC and
30fibroblasts no transgene expression can be detected. Also no cytopathic effect was observed (not shown). In the tumor cells that are susceptible for the virus Hela and HT29 there is a massive production of the transgene beta-glucuronidase whose activity can be measured in the supernatant. Hela cells

which are killed by the virus within 48 hours produce relatively lower levels of the transgene. HT29 cells that die only after 5 days at the virus doses used, produce even higher activity of beta-glucuronidase, about 10fold more than Hela cells and more than 1000fold over background.

5

Example 12

NDV-beta-glucuronidase and HMR1826 synergistically kill cells that are resistant to either treatment alone

10

Materials and Methods:

Cells were plated on day 1 in 24well dishes. On day 2 the cells were infected with NDV-beta-glucuronidase (MTH115) at an MOI of 0,001. On day 3 the 15cells were treated either with doxorubicin at 1 μ M or the Doxorubicin-glucuronide HMR1826 at 1 μ M. On day 8 the cells were washed, fixed and stained with Giemsa and photographs of the wells were taken.

Results:

20

The results are summarized in Figure 9 and Figure 10. Doxorubicin alone kills the cells at the given concentration. The prodrug at the same concentration is not toxic to the cells. The virus alone at the given MOI is also not toxic because tumor cells were selected that have a degree of resistance 25to the virus treatment. The combination of both glucuronidase-expressing virus and the prodrug is able to kill cells that are not killed by either treatment alone. A control virus (that expresses GFP instead of beta-glucuronidase) does not show any synergy with the prodrug treatment.

30

References

- Adams, G.P. and Welner, L.M. (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 23, 1147-1157.
- 5 Alexander, D.J. (1988) *Newcastle disease*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.
- Allen, T.M. (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2, 750-763.
- 10 Amstutz, P., Binz, H.K., Parizek, P., Stumpp, M.T., Kohl, A., Grutter, M.G., Forrer, P. and Pluckthun, A. (2005) Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed ankyrin repeat proteins. *J Biol Chem*, 280, 24715-24722.
- 15 Antoniow, P., Springer, C.J., Bagshawe, K.D., Searle, F., Melton, R.G., Rogers, G.T., Burke, P.J. and Sherwood, R.F. (1990) Disposition of the prodrug 4-(bis (2-chloroethyl) amino) benzoyl-L-glutamic acid and its active parent drug in mice. *Br J Cancer*, 62, 909-914.
- 20 Bagshawe, K.D., Springer, C.J., Searle, F., Antoniow, P., Sharma, S.K., Melton, R.G. and Sherwood, R.F. (1988) A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites. *Br J Cancer*, 58, 700-703.
- 25 Batra, J.K., Fitzgerald, D.J., Chaudhary, V.K. and Pastan, I. (1991) Single-chain immunotoxins directed at the human transferrin receptor containing *Pseudomonas* exotoxin A or diphtheria toxin: anti-TFR(Fv)-PE40 and DT388-anti-TFR(Fv). *Mol Cell Biol*, 11, 2200-2205.
- 30 Batra, J.K., Kasprzyk, P.G., Bird, R.E., Pastan, I. and King, C.R. (1992) Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 5867-5871.
- Bell, J.C., Garson, K.A., Lichty, B.D. and Stojdl, D.F. (2002) Oncolytic viruses: programmable tumor hunters. *Curr Gene Ther*, 2, 243-254.
- 35 Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M.G. and Pluckthun, A. (2004) High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. *Nat Biotechnol*, 22, 575-582.
- 40 Bosslet, K., Czech, J., Lorenz, P., Sedlacek, H.H., Schuermann, M. and Seemann, G. (1992) Molecular and functional characterisation of a fusion protein suited for tumor specific prodrug activation. *Br J Cancer*, 65, 234-238.
- 45 Carnemolla, B., Borsi, L., Balza, E., Castellani, P., Meazza, R., Berndt, A., Ferrini, S., Kosmehl, H., Neri, D. and Zardi, L. (2002) Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood vessel extracellular matrix. *Blood*, 99, 1659-1665.
- 50 Chaudhary, V.K., Gallo, M.G., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1990) A recombinant single-chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9491-9494.
- 55 Chaudhary, V.K., Queen, C., Junghans, R.P., Waldmann, T.A., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1989) A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature*, 339, 394-397.
- Chiocca, E.A. (2002) Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer*, 2, 938-950.

- Csatary, L.K., Gosztanyi, G., Szeberenyi, J., Fabian, Z., Liska, V., Bodey, B. and Csatary, C.M. (2004) MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol*, **67**, 83-93.
- 5 De Lorenzo, C., Arciello, A., Cozzolino, R., Palmer, D.B., Laccetti, P., Piccoli, R. and D'Alessio, G. (2004) A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Res*, **64**, 4870-4874.
- 10 Engel-Herbert, I., Werner, O., Teifke, J.P., Mebatsion, T., Mettenleiter, T.C. and Romer-Oberdorfer, A. (2003) Characterization of a recombinant Newcastle disease virus expressing the green fluorescent protein. *J Virol Methods*, **108**, 19-28.
- 15 Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P. and Novotny, W. (2004) Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, **3**, 391-400.
- Ford, K.G., Souberbielle, B.E., Darling, D. and Farzaneh, F. (2001) Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene Ther*, **8**, 1-4.
- 20 Georgakis, G.V., Li, Y., Humphreys, R., Andreeff, M., O'Brien, S., Younes, M., Carbone, A., Albert, V. and Younes, A. (2005) Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell death. *Br J Haematol*, **130**, 501-510.
- 25 Gerber, H.P. and Ferrara, N. (2005) Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res*, **65**, 671-680.
- 30 Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Herbst, R.S. and Langer, C.J. (2002) Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. *Semin Oncol*, **29**, 27-36.
- 35 Högberg, M., Eklund, M., Nygren, P.A. and Nordlund, P. (2003) Structural basis for recognition by an in vitro evolved affibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3191-3196.
- 40 Huang, Z., Elankumaran, S., Yunus, A.S. and Samal, S.K. (2004) A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of Infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *J Virol*, **78**, 10054-10063.
- 45 Huang, Z., Krishnamurthy, S., Panda, A. and Samal, S.K. (2001) High-level expression of a foreign gene from the most 3'-proximal locus of a recombinant Newcastle disease virus. *J Gen Virol*, **82**, 1729-1736.
- 50 Kreitman, R.J., Chaudhary, V.K., Waldmann, T.A., Hanchard, B., Cranston, B., FitzGerald, D.J. and Pastan, I. (1993) Cytotoxic activities of recombinant immunotoxins composed of Pseudomonas toxin or diphtheria toxin toward lymphocytes from patients with adult T-cell leukemia. *Leukemia*, **7**, 553-562.
- 55 Kreitman, R.J. and Pastan, I. (1995) Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of Pseudomonas exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. *Biochem J*, **307** (Pt 1), 29-37.
- Krishnamurthy, S., Huang, Z. and Samal, S.K. (2000) Recovery of a virulent strain of newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. *Virology*, **278**, 168-182.
- 60

- Kuan, S.F., Byrd, J.C., Basbaum, C.B. and Kim, Y.S. (1987) Characterization of quantitative mucin variants from a human colon cancer cell line. *Cancer Res*, **47**, 5715-5724.
- Ladner, R.C. and Ley, A.C. (2001) Novel frameworks as a source of high-affinity ligands. *Curr Opin Biotechnol*, **12**, 406-410.
- Lamb, R.A., Kolakofsky, D. (2001) *Paramyxoviridae: The Viruses And Their Replication*. In Fields, B.N. (ed.), *Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1305-1485.
- 10 Lorence, R.M., Pecora, A.L., Major, P.P., Hotte, S.J., Laurie, S.A., Roberts, M.S., Groene, W.S. and Barnat, M.K. (2003) Overview of phase I studies of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus. *Curr Opin Mol Ther*, **5**, 618-624.
- 15 Mizukami, Y., Jo, W.S., Duerr, E.M., Gala, M., Li, J., Zhang, X., Zimmer, M.A., Illopoulos, O., Zukerberg, L.R., Kohgo, Y., Lynch, M.P., Rueda, B.R. and Chung, D.C. (2005) Induction of Interleukin-8 preserves the angiogenic response in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nat Med*, **11**, 992-997.
- 20 Nakaya, T., Cros, J., Park, M.S., Nakaya, Y., Zheng, H., Sagrera, A., Villar, E., Garcia-Sastre, A. and Palese, P. (2001) Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J Virol*, **75**, 11868-11873.
- Noonberg, S.B. and Benz, C.C. (2000) Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs*, **59**, 753-767.
- 25 Nord, K., Gunneriusson, E., Uhl Inverted question mark, M. and Nygren, P.A. (2000) Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and taq DNA polymerase. *J Biotechnol*, **80**, 45-54.
- 30 Roffler, S.R., Wang, S.M., Chern, J.W., Yeh, M.Y. and Tung, E. (1991) Anti-neoplastic glucuronide prodrug treatment of human tumor cells targeted with a monoclonal antibody-enzyme conjugate. *Biochem Pharmacol*, **42**, 2062-2065.
- 35 Romer-Oberdorfer, A., Mundt, E., Mebatsion, T., Buchholz, U.J. and Mettenleiter, T.C. (1999) Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J Gen Virol*, **80** (Pt 11), 2987-2995.
- 40 Rowlinson-Busza, G., Barnias, A., Krausz, T. and Epenetos, A.A. (1992) Antibody guided enzyme nitrile therapy (Agent): in vitro cytotoxicity and in vivo tumor localisation. In Epenetos, a. (ed.), *Monoclonal Antibodies 2. Applications in Clinical Oncology*. Chapman and Hall, London, pp. 111-118.
- Russell, S.J. (2002) RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther*, **9**, 961-966.
- 45 Salgaller, M.L. (2003) Technology evaluation: bevacizumab, Genentech/Roche. *Curr Opin Mol Ther*, **5**, 657-667.
- Schnell, M.J., Mebatsion, T. and Conzelmann, K.K. (1994) Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *Embo J*, **13**, 4195-4203.
- 50 Sinkovics, J.G. and Horvath, J.C. (2000) Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol*, **16**, 1-15.
- Skerra, A. (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*, **1482**, 337-350.
- 55 Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marlius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., Brown, E.G., Durbin, R.K., Durbin, J.E., Hiscott, J. and Bell, J.C. (2003) VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*, **4**, 263-275.
- 60

- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10, 789-799.
- 5 Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M. and Heldin, C.H. (1994) Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 269, 26988-26995.
- 10 Wang, S.M., Chern, J.W., Yeh, M.Y., Ng, J.C., Tung, E. and Roffler, S.R. (1992) Specific activation of glucuronide prodrugs by antibody-targeted enzyme conjugates for cancer therapy. *Cancer Res*, 52, 4484-4491.
- 15 Warren, R.S., Yuan, H., Matli, M.R., Gillett, N.A. and Ferrara, N. (1995) Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest*, 95, 1789-1797.
- Zewe, M., Rybak, S.M., Dubel, S., Coy, J.F., Welschof, M., Newton, D.L. and Little, M. (1997) Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion. *Immunotechnology*, 3, 127-136.
- 20 Zhao, H. and Peeters, B.P. (2003) Recombinant Newcastle disease virus as a viral vector: effect of genomic location of foreign gene on gene expression and virus replication. *J Gen Virol*, 84, 781-788.

Claims

1. A recombinant oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a binding protein that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.
2. The virus of claim 1, which is a negative-strand RNA virus.
103. The virus of claim 1 or 2, which is a paramyxovirus.
4. The virus of any one of claims 1-3, which is a Newcastle disease virus (NDV).
155. The virus of claim 4 which is a non-lentogenic NDV, e.g. a mesogenic or velogenic NDV, in particular the mesogenic strain MTH68.
6. The virus according to any one of claims 1-5 wherein the binding protein belongs to the following group: a natural ligand or a genetically modified ligand, a recombinant soluble domain of a natural receptor or a modified version of it, a peptide- or polypeptide-ligand, an antibody molecule or a fragment or a derivative thereof or an antibody-like molecule like an ankyrin-repeat protein or a fragment or derivatives thereof.
257. The virus according to any one of claims 1-6 wherein the binding protein is of mammalian, e.g. human, murine or closely related origin or a chimeric protein.

8. The virus according to any of the preceding claims wherein the binding protein is a monomeric, dimeric, trimeric, tetrameric or multimeric protein.
9. The virus according to any one of the preceding claims wherein the binding protein is monospecific, bispecific or multispecific.
10. The virus according to any one of the preceding claims wherein the binding protein is a fusion protein comprising at least one binding domain and a heterologous domain.
11. The virus according to claim 13 wherein the binding protein is a fusion protein with a toxin such as human RNase (pseudomonas exotoxin, Diphtheria toxin), or a fusion protein with an enzyme like beta-glucuronidase, beta-galactosidase, beta-glucosidase, carboxypeptidase, beta-lactamase or a fusion protein with an immune-stimulatory protein with cytokine activity like IL-2, IL-12, TNF-alpha, IFN-beta or GM-CSF.
12. The virus according to any one of the preceding claims wherein the binding protein is selected from the following group: blocking proteins of autonomous active growth factor receptors (eg. EGFR, Met), competitive binders for growth factors (antagonists), blocking proteins for Rb-phosphorylation, blocking proteins for E2F-dependent transcription; stabilizers for p53; antagonistic binders for antiapoptotic proteins (eg. Bcl-2); antagonistic binders for cyclins; antagonistic binders for Ras effectors (eg. GEFs); antagonistic binders for hypoxia induced proteins (eg. HIF1 α); inhibitors of transcription factors that interfere with dimerization or DNA-binding or cofactor binding (eg. Myc/Max); Inducers of differentiation; Inhibitors of smad signalling/translocation; inhibitors of cellular adhesion interactions (cadherins, integrins, eg. $\beta\alpha5\beta1$, $\alpha\alpha\beta3$); inhibitors of enzymes that degrade the extracellular matrix (eg. MMPs); antagonistic binders for proangiogenic ligands (eg. soluble VEGF-R); antagonistic binders to proangiogenic receptors; inhibitors of scaffold

complex formation (eg. KSR/Ras); inhibitors of translation initiation (eg. eIF4E, EIF2a); inhibitors of mitotic kinases (eg. Plk-1).

13. A nucleocapsid of a recombinant oncolytic RNA virus of any one of
5 claims 1-12.

14. A genome of a recombinant oncolytic RNA virus of any one of claims 1-
12.

10 15. A DNA molecule encoding the genome and/or antigenome of a
recombinant oncolytic RNA virus of any one of claim 1-12.

16. The DNA molecule of claims 15 operatively linked to a transcriptional
control sequence.

15

17. A cell comprising a recombinant oncolytic virus of any one of claims 1-12,
a virus genome of claims 14 or a DNA molecule of claim 15 or 16.

18. A pharmaceutical composition comprising a recombinant oncolytic virus
20 of any one of claims 1-12, a virus genome of claims 14 or a DNA
molecule of claim 15 or 16 as an active ingredient optionally together with
pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants.

19. The pharmaceutical composition of claim 18 for the prevention and/or
25 treatment of cancer.

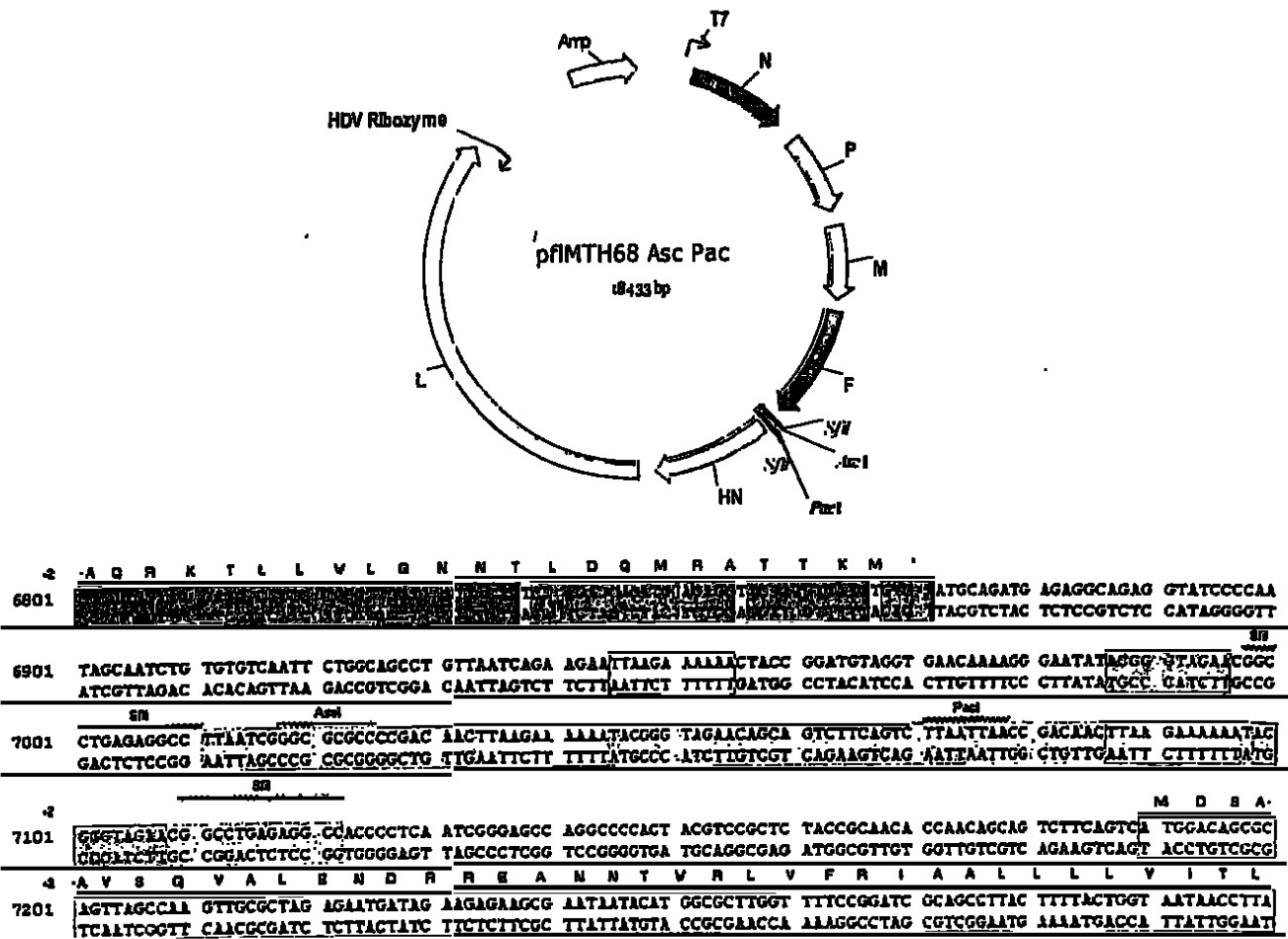
20. A method for the prevention and/or treatment of cancer comprising
administering a subject in need thereof a pharmaceutically effective
amount of a composition of claim 18 or 19.

30

21. The method of claim 20 wherein the subject is a human patient.
22. A recombinant oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a
5 prodrug-converting enzyme that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.
23. A recombinant oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a
10 protease that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.
24. A pharmaceutical composition comprising a recombinant oncolytic virus of any one of claims 1 to 12, a virus genome of claim 14, and/or a DNA
15 molecule of claims 15 or 16 as an active ingredient optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants, which virus, virus genome and/or DNA molecule comprises at least one transgene encoding for a prodrug-converting enzyme.
2025. The pharmaceutical composition of claim 24 further comprising a prodrug which can be converted into a therapeutically active compound by the prodrug-converting enzyme encoded by the virus, virus genome and/or DNA molecule of claim 24.
2526. The pharmaceutical composition of claim 24 or 25 for treatment and/or alleviation of a proliferative disorder.
27. A method for treatment of a proliferative disease, comprising administering in a pharmaceutically effective amount to a subject in need
30 thereof

- (a) a recombinant oncolytic virus of any one of claims 1 to 12, a virus genome of claim 14, and/or a DNA molecule of claims 15 or 16 comprising at least one transgene encoding for a prodrug-converting enzyme, and
- 5 (b) a prodrug suitable for treatment of the proliferative disease, which prodrug can be converted into a pharmaceutically active compound by the prodrug-converting enzyme of (a).
28. A pharmaceutical composition comprising a recombinant oncolytic virus
10 of any one of claims 1 to 12, a virus genome of claim 14, and/or a DNA molecule of claims 15 or 16 as an active ingredient optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants, which virus, virus genome and/or DNA molecule comprises at least one transgene encoding for a protease.
- 15 29. The pharmaceutical composition of claim 28 for treatment and/or alleviation of a proliferative disorder.
30. A method for treatment of a proliferative disease, comprising
20 administering in a pharmaceutically effective amount to a subject in need thereof a recombinant oncolytic virus of any one of claims 1 to 12, a virus genome of claim 14, and/or a DNA molecule of claims 15 or 16 comprising at least one transgene encoding for a protease.

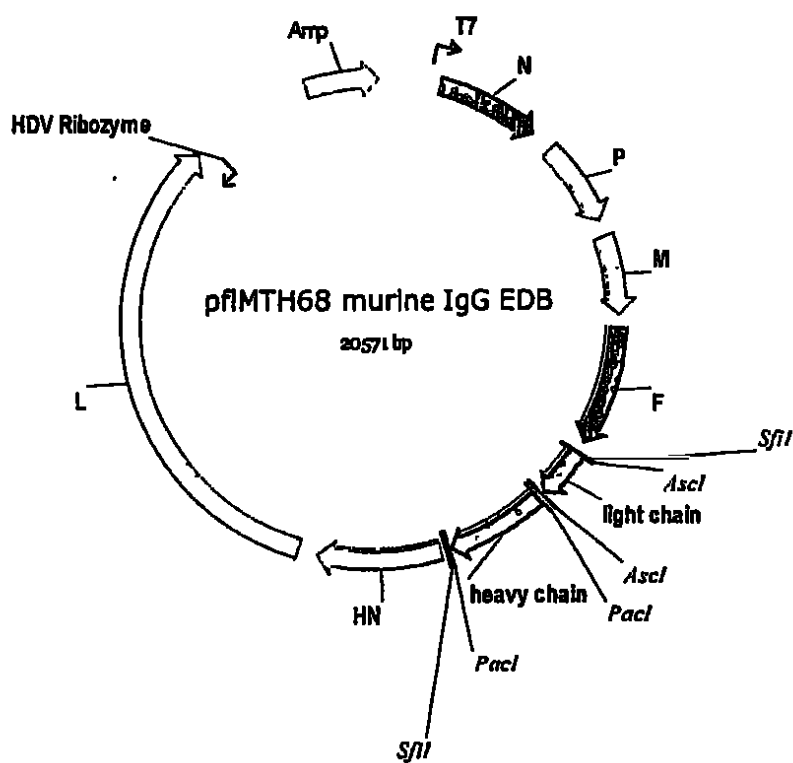
Fig1:
plasmid pflMTH68_Asc_Pac



blue: end of F-protein coding sequence
red: stop signal for gene transcription
green: start signal for gene transcription
grey: newly introduced non-coding bases into the genome
red: start of the HN-protein coding sequence

Fig 2:

plasmid **pflMTH68 murine IgG ED-B**



43

Fig. 3:

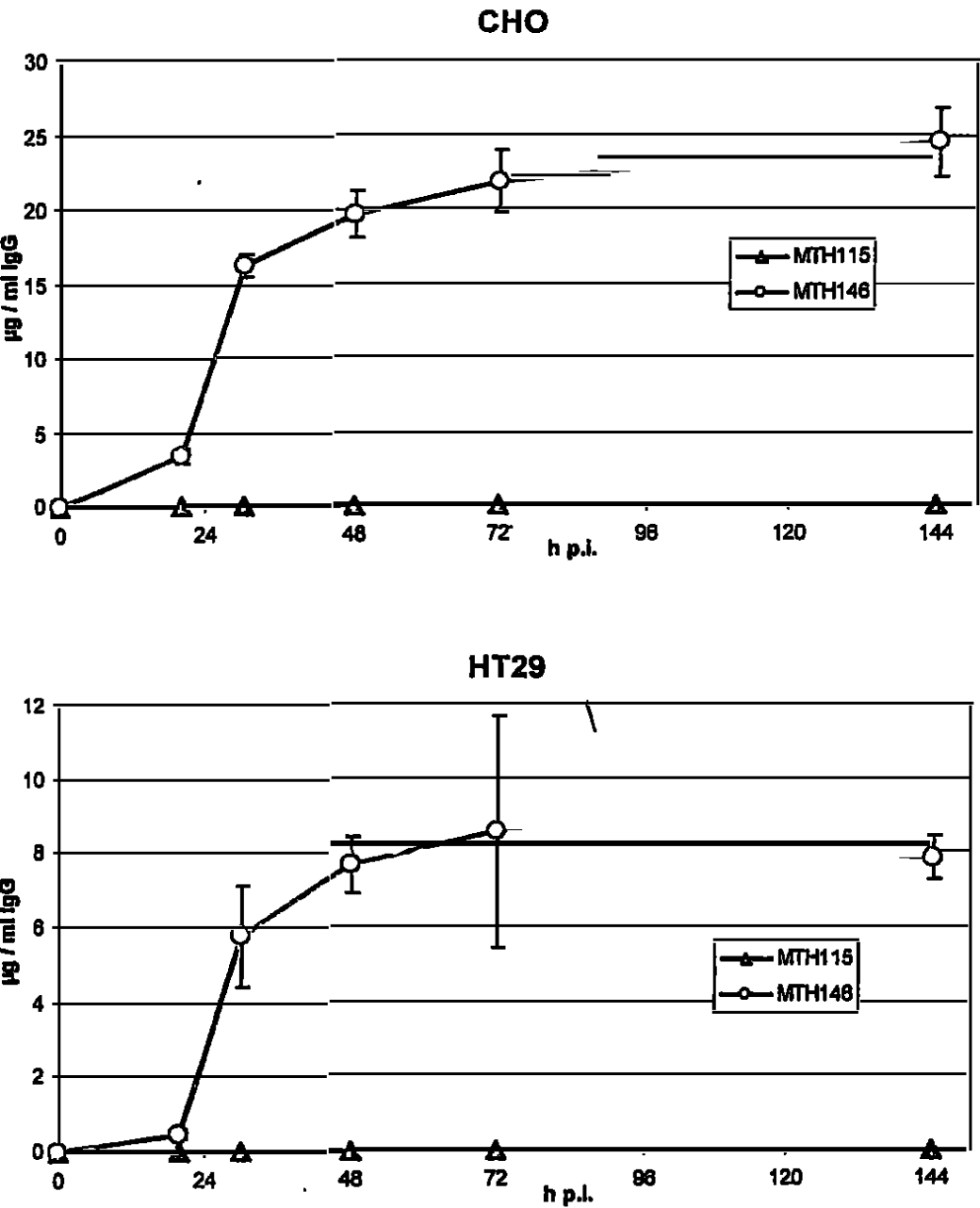
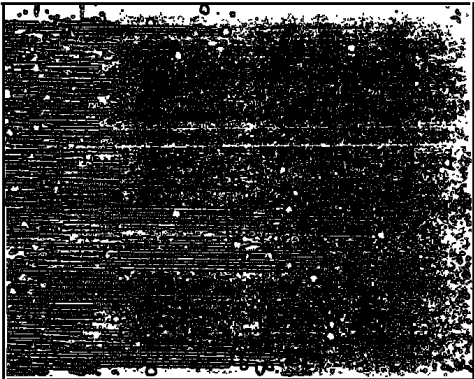


Fig 4

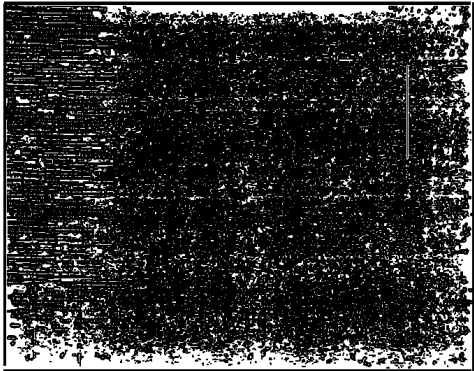
MTH146



Mock + MOR03257 5 µg / ml



MTH115



Mock



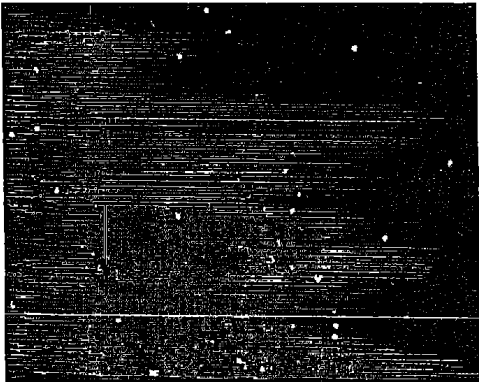
20x



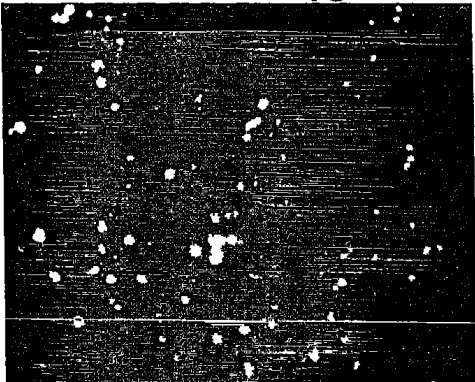
F9 cells

Fig 4b

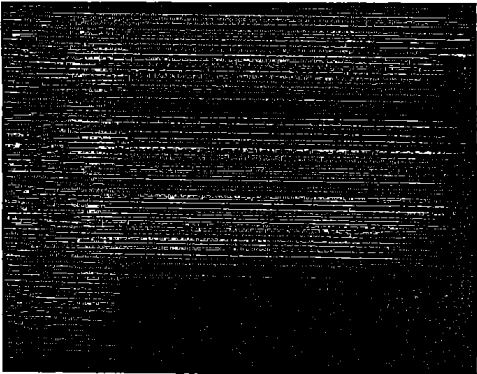
MTH146



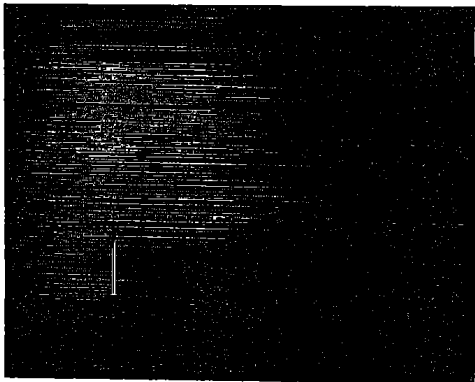
Mock + MOR03257 5 µg / ml



MTH115



Mock



20x

F9 cells, 22. Juli 2005

44

~~24~~

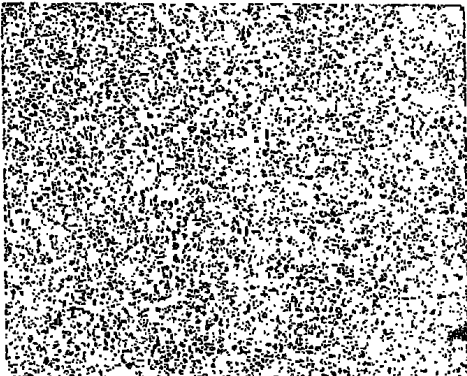
Fig 5

IHC SK-MEL tumors

pur. Ab MOR03257 from 293 cells 5µg/ml



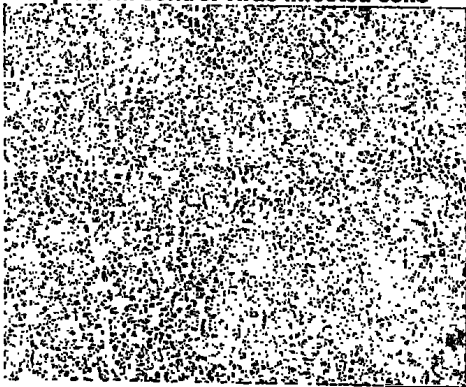
control (no Ab)



spn from MTH146 infected cells



spn from control virus infected cells



10x



75

Fig. 6

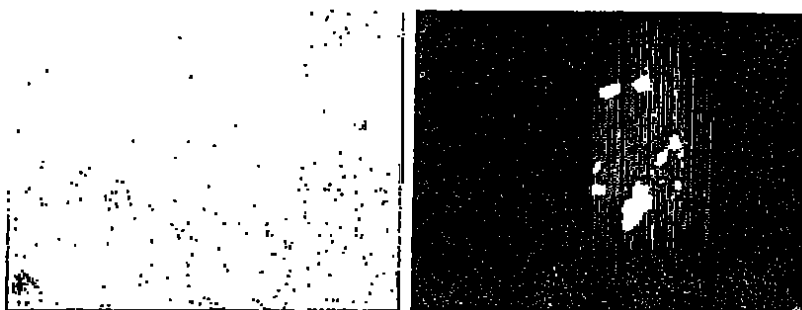
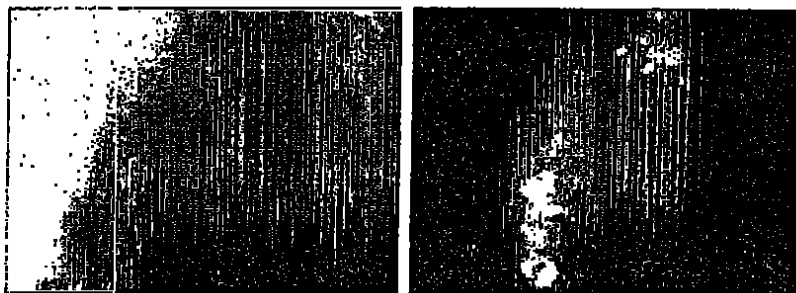
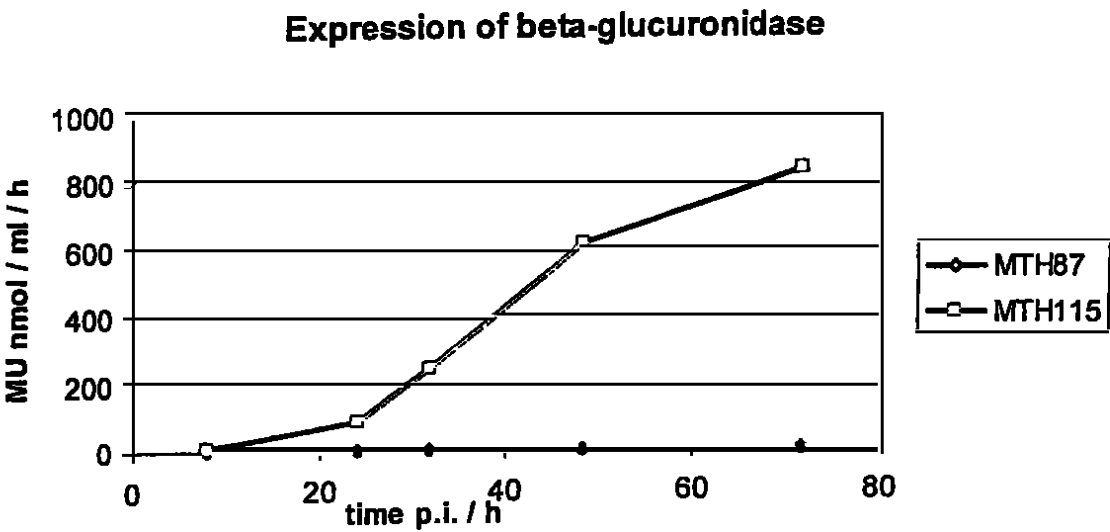
MiaPaCa xenografts, i.v. treated with MTH87**21 d
after treatment****34 d
after treatment****10x**

Fig. 7:



Hela cells, MOI 0,00001

Fig. 8:

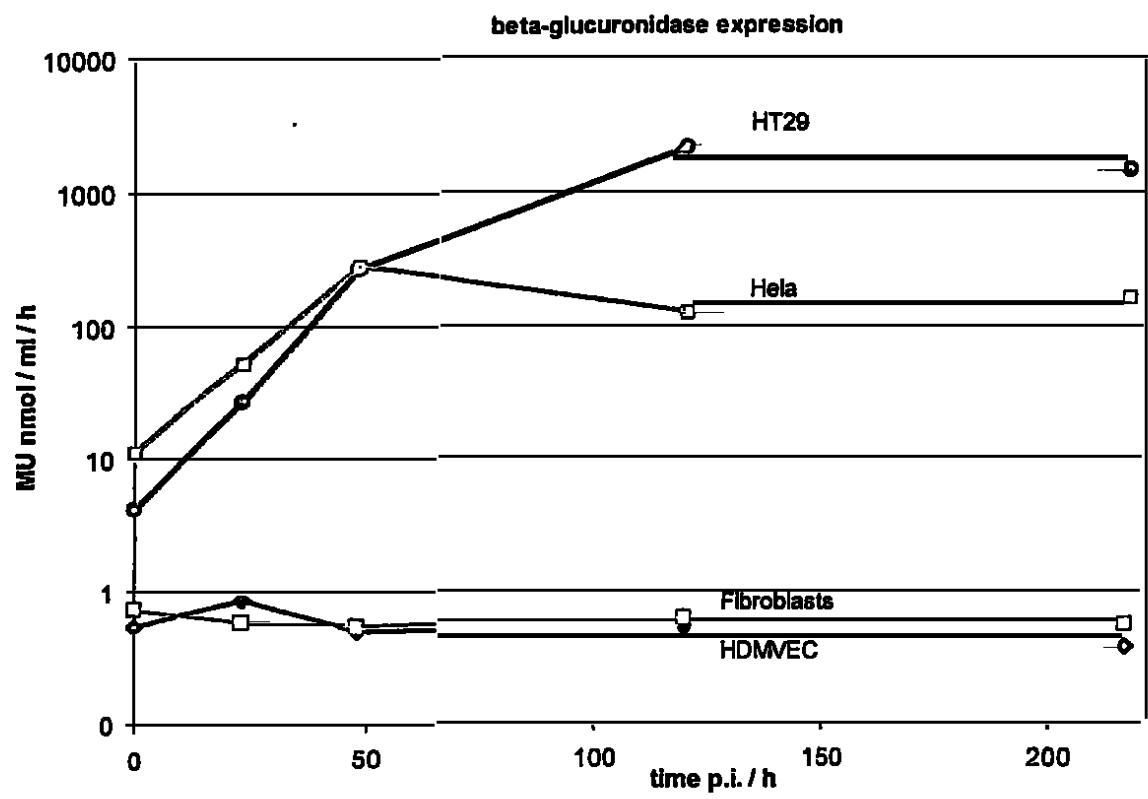
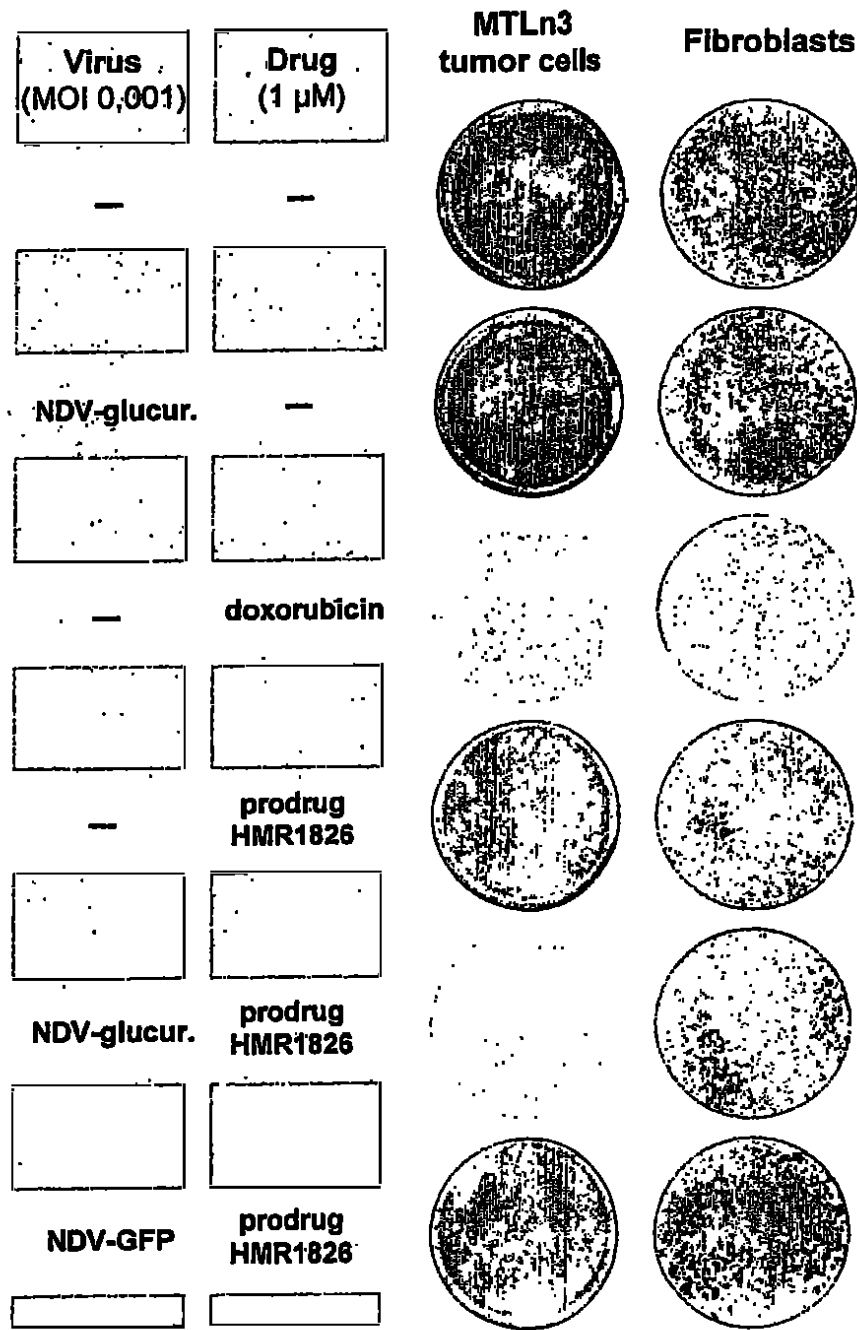


Fig. 9:

NDV-β-glucuronidase and HMR1826 synergistically kill cells that are resistant to either treatment alone



Giemsa staining 6 d p.i.

47

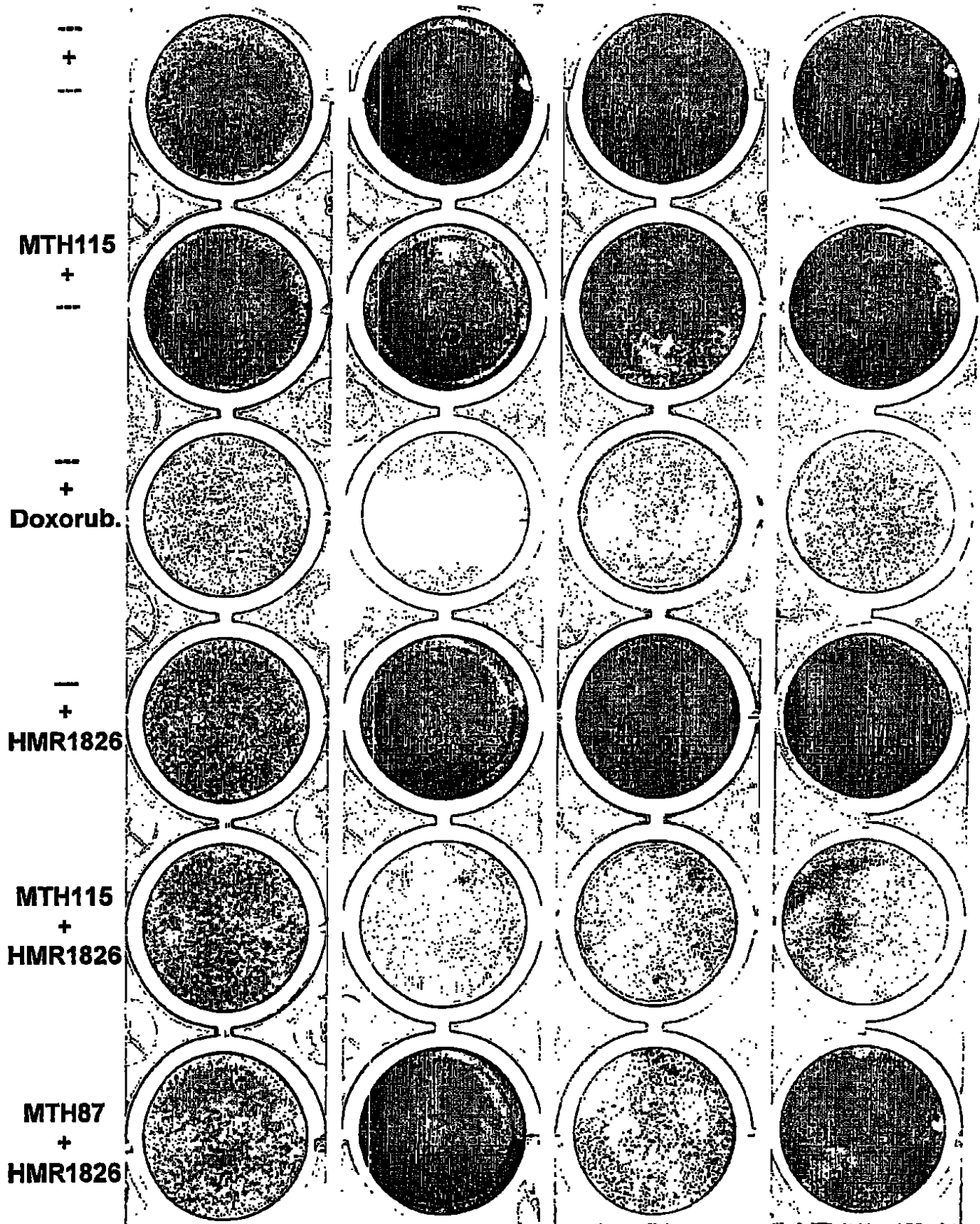
Fig. 10:

3×10^4
Fibroblasts

1×10^4
MTLn3

3×10^4
HaCaT

1×10^5
Du145



MOI 0,001, 6 d p.i.

Sequenzprotokoll

<110> Schering AG

<120> Recombinant Newcastle Disease Virus

<130> 53277A

<150> EP04090432.8

<151> 2004-11-11

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> sfi fw, DNA-Oligonucleotide

<400> 1

aggccttaat taaccgacaa ctttaagaaaa aatacgggta gaacggcctg ag 52

<210> 2

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> sfi back, DNA-Oligonucleotide

<400> 2

aggccgttct acccgatttt tttcttaagt tgtcgggttaa ttaaggcctc tc 52

<210> 3

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Asc fw, DNA-Oligonucleotide

<400> 3

cgggcgcgcc ccgacaactt aagaaaaaat acgggtagaa cagcagtctt cagtcttaat 60

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Asc back, DNA-Oligonucleotide

<400> 4

taagactgaa gactgctgtt ctaccgtat tttttcttaa gttgtcgggg cgcgcccgat 60

<210> 5

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial

Sequenzprotokoll

48

<220>
<223> Intergenic region between F and HN of plasmid pflMTH68_Asc_Pac,
DNA-Oligonucleotide

<400> 5
atgcagatga gaggcagagg tatccccaat agcaatctgt gtgtcaattc tggcagcctg 60
ttaatcagaa gaattaagaa aaaactaccg gatgtaggtg aacaaaaggg aatatacggg 120
tagaacggcc tgagaggcct taatcgggcg cgccccgaca acttaagaaa aaatacgggt 180
agaacagcag tcttcagtct taattaaccg acaacttaag aaaaaatacg ggtagaacgg 240
cctgagaggc caccctcaa tcgggagcca ggccccacta cgtccgctct accgcaacac 300
caacagcagt cttcagtc 318

- (12) **Publicación de la solicitud internacional bajo PCT**
 (19) **Organización Mundial de Propiedad Intelectual**
Oficina Internacional
 (43) **Fecha de publicación internacional : 18 de mayo de 2006 (18.05.2006)**
 5(10) **Número de publicación internacional: WO 2006/050984 A2**
-

- (51) **Clasificación internacional de patentes:**
No clasificado
 (21) **Número de solicitud internacional: PCT/EP2005/012186**
 10(22) **Fecha de presentación internacional: 10 de noviembre de 2005**
 (10.11.2005)
 (25) **Idioma de la presentación: inglés**
 (26) **Idioma de la publicación: inglés**
 (30) **Antecedentes de prioridad:**
 15 04090432.8 del 12 de noviembre de 2004 (12.11.2004) EP
 (71) **Solicitante (para todos los estados designados con excepción de**
US): SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; Müllerstrasse 178,
13342 Berlin (DE).
 (72) **Inventores; y**
 20(75) **Inventor/Solicitante (solamente para US): BEIER, Rudolf [DE/DE];**
Kiautschoustrasse 1, 13353 Berlin (DE). PÜHLER, Florian [DE/DE];
Naumannstrasse 2, 10829 Berlin (DE).
 (81) **Estados designados (en la medida en que no se indique lo contrario,**
para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT,
 25 **AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,**
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,
 30 **TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.**
 (84) **Estados designados (en la medida en que no se indique lo contrario,**
para cada tipo de protección regional disponible): Patente ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea
 35 **(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT,**
LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ,
CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- 40- sin el informe de búsqueda internacional y será republicado luego de recibir dicho informe

Véanse las explicaciones („Guidance Notes on Codes and Abbreviations“) al
 45comienzo de cada edición regular de la Gaceta-PCT para la explicación del
 código de dos dígitos y de las otras abreviaturas

(54) Título: VIRUS RECOMBINANTE DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

5

(57) Resumen

El objetivo de la invención es incrementar la actividad terapéutica del VEN oncolítico. Este problema se resuelve con un Virus de la Enfermedad de Newcastle que comprende un ácido nucleico recombinante, en donde el ácido nucleico codifica para una proteína de unión que tiene una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus. Las proteínas de unión pertenecen al siguiente grupo: un ligando natural o un ligando modificado genéticamente, un dominio soluble recombinante de un receptor natural o una versión modificada del mismo, un ligando peptídico, una molécula de anticuerpo y derivados del mismo o molécula similar a anticuerpos tal como moléculas con repeticiones de anquirina o derivados de las mismas.

VIRUS RECOMBINANTE DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Introducción

5 La invención se refiere a un virus a ARN recombinante, preferiblemente un paramixovirus, preferiblemente un Virus de la Enfermedad de Newcastle (VEN) para el tratamiento de enfermedades, especialmente para tratamiento oncolítico de tumores. Se producen virus recombinantes que codifican
10 proteínas de unión (anticuerpos, moléculas de repeticiones de anquirina, péptidos etc.), enzimas convertidoras de pro-drogas y/o proteasas y se conduce a la expresión selectiva de estas moléculas en células tumorales infectadas con virus. La actividad de estas proteínas de unión, enzimas
15 convertidoras de pro-drogas y/o proteasas incrementa el efecto anti-tumoral del virus. Además, la invención describe la fabricación y el uso de dichos virus modificados para el tratamiento del cáncer.

Descripción del Estado del Arte

20 **Virus de la Enfermedad de Newcastle**

 Los virus oncolíticos para el tratamiento de tumores están resumidos en general en Chiocca (2002). El Virus de la Enfermedad de Newcastle se ha usado como un agente terapéutico experimental durante más de 40 años, y al mismo
25 se lo revisa en Sinkovics y Horvath (2000). El Virus de la

Enfermedad de Newcastle en general está descrito en el libro de Alexander (1988). La cepa PV701 de VEN se está desarrollando como un tratamiento contra el cáncer para glioblastoma (Lorence et al., 2003). La cepa MTH68 de VEN se
5 ha usa como tratamiento de cáncer experimental y se lo ha administrado a humanos durante más de 30 años (Csatary et al., 2004).

En el trabajo de Stojdl et al. (2003) está descrito que en el rango del 80% de todas las líneas celulares que se
10 probaron, hay un defecto en la respuesta de interferón que sigue a la infección con Virus de Estomatitis Vesicular (VSV). Se puede asumir que un porcentaje similar de líneas celulares tumorales serán susceptibles a la infección con VEN debido a que tanto VSV como VEN son miembros del orden
15 mononegavirales. También se ha demostrado que el mecanismo de replicación selectiva de VEN en las células tumorales se basa en un defecto de la respuesta de interferón celular contra el virus (véase por ejemplo EE.UU.: 20030044384).

Paramixovirus Recombinantes

20 EP-A-0702085 se relaciona con mutantes de virus a ARN de sentido negativo no segmentados infecciosos y genéticamente manipulados, que comprenden una inserción y/o delección en un marco abierto de lectura, una región pseudogénica o una región intergénica del genoma del virus.

25 WO 99/66045 se relaciona con virus VEN genéticamente

modificados que se obtienen de moléculas de ADNc de longitud completa del genoma del virus.

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

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

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

EE.UU. 6.699.479 describe mutantes de VEN que expresan la proteína V a un nivel reducido y que comprenden sustituciones de nucleótido en un locus de edición.

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

Manipulación genética de VEN

VEN se puede manipular genéticamente usando la tecnología de genética reversa como se describe por ejemplo
25 en EP-A-0702 085. Por ejemplo, se sabe que la misma hace

construcciones de VEN recombinantes que comprenden ácidos nucleicos adicionales que codifican para fosfatasa alcalina secretada (Zhao y Peeters, 2003), proteína fluorescente verde (Engel-Herbert et al., 2003), proteína VP2 de virus de enfermedad infecciosa de la bursa (Huang et al., 2004), hemaglutinina de virus de influenza (Nakaya et al., 2001) y cloranfenicol acetil transferasa (Huang et al., 2001) (Krishnamurthy et al., 2000). Ninguno de estos VEN recombinantes se ha construido para usar en el tratamiento de enfermedades humanas. Los VENs recombinantes se hicieron para estudiar la virología básica de VEN o bien para desarrollar cepas de vacuna para aves de corral. Como cepas de virus parentales, sirvieron las cepas lentogénicas de VEN. Estas cepas no tienen propiedades oncolíticas significativas.

Resumen de la invención

Esta presente invención se relaciona con un virus a ARN, por ejemplo un VEN que tiene actividad oncolítica incrementada. Más particularmente, la invención se relaciona con un virus a ARN, en particular un virus de enfermedad de Newcastle que comprende un ácido nucleico recombinante que tiene relevancia terapéutica en el tratamiento de cáncer, en donde el ácido nucleico codifica para una proteína de unión, una enzima convertidora de pro-droga y/o una proteasa que tiene una actividad terapéutica cuando es expresada por la

célula tumoral infectada con virus.

Más preferidos son los virus oncolíticos recombinantes, por ejemplo los VENs que comprenden uno o más transgenes, en donde el/los transgen(es) codifica/n para una proteína de
5 unión, una enzima convertidora de pro-droga y/o una proteasa. Son posibles combinaciones de diferentes especificidades.

Además, la invención se relaciona con la nucleocápside del virus recombinante como se indica anteriormente, que
10 comprende ARN viral complejoado con proteínas de cápside o con el ARN viral y/o un ARN complementario al ARN viral en su forma aislada.

Más aún, la invención se relaciona con un ADN, por ejemplo un ADNc que codifica al ARN viral y/o un ADN
15 complementario al ARN viral. Más aún, la invención se relaciona con la prevención o tratamiento de enfermedades tumorales.

Descripción Detallada de la Realizaciones Preferidas:

Virus

20 La invención se relaciona en general con virus a ARN, preferiblemente virus a ARN de sentido negativo, más preferiblemente virus de dicho tipo que tienen propiedades oncolíticas y que se pueden tratar mediante ingeniería genética. Dichos virus son:

25 - paramixovirus, preferiblemente Virus de la Enfermedad de

Newcastle (VEN), virus de rubéola, virus de paperas, virus Sendai;

- ortomixovirus, preferiblemente el virus de influenza;

- rabdovirus, preferiblemente el virus de estomatitis

5 vesicular.

Por lo tanto, el tema de la presente invención es un virus oncolítico recombinante a ARN que comprende un ácido nucleico con al menos un transgen, en donde el ácido nucleico de este/estos transgen/es codifica/n para una
10 proteína de unión que tiene una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus.

Otro tema de la presente invención es un virus oncolítico recombinante a ARN que comprende un ácido nucleico con al menos un transgen, en donde el ácido
15 nucleico de este/estos transgen/es codifica/n para una enzima convertidora de pro-droga que tiene una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus, preferiblemente en combinación con la pro-droga correspondiente.

20 Aún otro tema de la presente invención es un virus oncolítico recombinante a ARN que comprende un ácido nucleico con al menos un transgen, en donde el ácido nucleico de este/estos transgen/es codifica/n para una proteasa que tiene una actividad terapéutica cuando es
25 expresada por la célula tumoral infectada con virus.

Preferiblemente el virus de la presente invención exhibe una infección selectiva de tumor que conduce a una expresión del trasgen codificado selectiva en tumores.

El virus oncolítico recombinante de la presente
5 invención puede llevar al menos un gen transgénico que se selecciona de forma independiente de transgenes que codifican para proteínas de unión, enzimas convertidoras de pro-drogas, y/o proteasas.

Se prefiere que el virus de la presente invención sea
10 un virus a ARN de sentido negativo, más preferiblemente un paramixovirus.

En el contexto de la presente invención, un ácido nucleico con al menos un trasgen es un ácido nucleico que comprende un gen que es heterólogo al virus oncolítico a ARN
15 en el que se basa el virus recombinante a ARN de la presente invención. El término "heterólogo" se refiere al gen completo o a una parte del mismo, que puede ser la región codificante del gen o una parte del mismo.

El gen heterólogo puede ser una secuencia artificial o
20 se puede obtener a partir de fuentes naturales o mediante recombinación de al menos dos secuencias que se seleccionan de secuencias que se obtienen de fuentes naturales y/o secuencias artificiales. "Fuentes naturales" incluye a animales tales como mamíferos, plantas, hongos, y
25 microorganismos tales como bacterias, protozoarios y virus,

que pueden ser diferentes de otros virus oncolíticos a ARN de la presente invención. El transgen también puede codificar para una proteína de fusión. Entre los mamíferos se incluye a humanos y a ratones.

5 En una realización especialmente preferida, el virus de la presente invención es un Virus de la Enfermedad de Newcastle, (VEN), más preferido es la cepa MTH68 de VEN. El VEN puede ser una cepa lentogénica, mesogénica o velogénica. Se prefieren especialmente las cepas mesogénicas o
10 velogénicas de VEN. El virus es preferiblemente competente para replicación.

Manipulación Genética de los Virus

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

20 Proteína de unión

En el virus oncolítico a ARN recombinante de la presente invención, al menos un transgen puede codificar para una proteína de unión.

Las proteínas de unión son proteínas que, cuando se
25 expresan en una célula blanco, son capaces de unirse a un

componente de dicha célula y/o de una célula vecina. Preferiblemente, las proteínas de unión son proteínas que se unen a componentes intracelulares.

En una realización preferida, las proteínas de unión pertenecen al siguiente grupo: un ligando natural o un
5 ligando modificado genéticamente, un dominio soluble recombinante de un receptor natural o una versión modificada del mismo, por ejemplo un ligando peptídico o polipeptídico, una molécula de anticuerpo y fragmentos y derivados del
10 mismo o una molécula similar a anticuerpo y derivados del mismo.

Una revisión incompleta de entramados de unión de alta afinidad se da en Ladner y Ley (2001).

Las proteínas de unión que se describieron
15 anteriormente pueden ser de origen humano, murino o de cercanamente relacionadas, o sea una proteína que puede ser una proteína de fusión que comprende secuencias de especies diferentes, por ejemplo humano y ratón.

Las moléculas de unión recombinantes que se basan en la
20 descripción anterior pueden ser monoméricas, diméricas, triméricas, tetraméricas o multiméricas y bi-específicas o multi-específicas.

Las proteínas de unión preferidas se seleccionan de proteínas de unión que tienen una actividad terapéutica.

25 Un ligando natural, como se describió anteriormente,

puede ser un factor de crecimiento o un péptido. Un ligando modificado genéticamente puede ser un análogo de un factor de crecimiento o péptido de origen natural.

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

Las moléculas de anticuerpo como se mencionan anteriormente pueden ser anticuerpos monoclonales de inmunoglobulina de cualquier especificidad e isotipo conocido, fragmentos de los mismos y/o fragmentos de los
15 mismos fusionados con proteínas efectoras. Las moléculas de anticuerpo pueden ser quiméricas, humanizadas o anticuerpos humanos. Los fragmentos de anticuerpo contienen al menos un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos se han descrito extensamente en la literatura
20 (revisados por ejemplo en Allen (2002), incorporado a la presente como referencia). Los ejemplos preferidos son los fragmentos de Fv de simple cadena, los fragmentos de Fab, F(ab2'), las versiones con dominios delecionados llamados minicuerpos, y otras porciones inmunoactivas, fragmentos,
25 segmentos y otras estructuras de anticuerpo más pequeñas o

más grandes en donde la misma posee propiedades de direccionamiento o actividad inmunológica estimuladora o inhibitoria suficientes de modo que sea terapéuticamente útil dentro de los métodos de la presente invención.

5 Dichos anticuerpos pueden derivar de experimentos de clonado de hibridomas mediante el uso de ratones transgénicos o de selecciones de presentación en fagos, selecciones de presentación en ribosomas, o cribados de filtros con colonias de bibliotecas de anticuerpos que
10 contienen secuencias de anticuerpo humano o metodologías relacionadas.

 Las proteínas de unión con propiedades similares a anticuerpo, como se describió anteriormente, pueden ser proteínas o dominios de la misma modificados genéticamente
15 en donde uno o más bucles peptídicos se arman al azar al nivel de sus aminoácidos de manera tal que se pueden enriquecer en moléculas de unión de alta afinidad con alta especificidad contra cualquier antígeno a partir de bibliotecas de dichas moléculas mediante presentación en
20 fagos, presentación en ribosomas, cribados por filtros de colonias o metodologías relacionadas. Las proteínas seleccionadas usualmente tienen alta estabilidad térmica y termodinámica y se expresan bien en sistemas de expresión recombinantes tales como sistemas de expresión en E.coli,
25 levadura, insecto y mamífero. Entre los ejemplos de dichas

proteínas de unión con propiedades similares a anticuerpo
están las proteínas de repeticiones de anquirina como las
descritas en Binz et al. (2004), las lipocalinas como las
descritas en Skerra (2000), las gama-cristalinas como las
5 descritas en DE199 32 688.6, el almacén proteico de proteína
A modificada (*affibodies*) como se describe en Hogbom et al.
(2003), o Nord et al. (2000), o el almacén proteico de
fibronectina y otros. Las moléculas similares a anticuerpos
pueden ser moléculas monoméricas o repetitivas ya sea
10 construidas como moléculas de simple cadena o como moléculas
de cadena múltiple en donde la molécula similar a anticuerpo
posee propiedades de direccionamiento o actividad
inmunológica estimuladora o inhibitoria suficientes, de
modo que sean terapéuticamente útiles dentro de los métodos
15 de la presente invención.

Moléculas de unión con función adicional

La proteína de unión puede ser una proteína de fusión
que comprende al menos un dominio de unión, por ejemplo a
partir de un anticuerpo, y un dominio heterólogo.
20 "Heterólogo" tiene el significado que se expuso
anteriormente en el contexto de genes heterólogos.

Las proteínas de unión que se describen más arriba son
capaces de administrar una carga útil a un sitio específico
de enfermedad (por ejemplo un tumor) como si fuera un
25 intracuerpo o como proteína de unión disponible

extracelularmente. La carga útil administrada puede ser un dominio heterólogo, por ejemplo una toxina tal como ARNasa humana (De Lorenzo et al., 2004) (Zewe et al., 1997) endotoxina de *Pseudomonas* (Chaudhary et al., 1989) (Kreitman y Pastan, 1995) (Batra et al., 1992) , toxina de *Diphtheria* (Kreitman et al., 1993) (Chaudhary et al., 1990) (Batra et al., 1991), o una enzima tal como beta-galactosidasa, beta-glucuronidasa (Roffler et al., 1991) (Wang et al., 1992) (Bosslet et al., 1992), beta-glucosidasa (Rowlinson-Busza, 1992), carboxipeptidasa, (Antoniw et al., 1990), (Bagshawe et al., 1988), beta-lactamasa con eficacia terapéutica, o una proteína estimuladora del sistema inmune con actividad de citoquina tal como IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN-beta o GM-CSF (véase por ejemplo el resumen de Allen (2002).

En otro ejemplo las proteínas de unión que se describen más arriba tienen ellas mismas eficacia antagonista o agonista que es terapéuticamente útil. Entre los ejemplos de moléculas de unión antagonistas/bloqueantes se incluye al anticuerpo inhibidor de VEGF Avastina (Ferrara et al., 2004), el anticuerpo bloqueante del receptor HER2/neu Herceptina (Noonberg y Benz, 2000) o el anticuerpo bloqueante de receptor de EGF Erbitux (Herbst y Langer, 2002). Las proteínas de unión agonistas pueden ser proteínas de unión que inducen, por ejemplo, apoptosis (Georgakis et al., 2005) o que tienen actividad regulatoria sobre el ADN,

ARN o proteínas (por ejemplo inducen la transcripción, estabilizan proteínas). La revisión (Adams y Weiner, 2005) describe diferentes anticuerpos terapéuticos que también se pueden incorporar a un virus oncolítico

5 **Enzimas convertidoras de pro-droga**

En el virus oncolítico a ARN recombinante de la presente invención, al menos un transgen puede codificar para una enzima convertidora de pro-droga.

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

Por lo tanto otro tema de la presente invención es una
15 composición farmacéutica que comprende un virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma viral de la presente invención, un anti-genoma de virus de la presente invención, y/o una molécula de ADN de la presente invención como ingrediente activo opcionalmente junto con vehículos,
20 diluyentes y/o adyuvantes aceptables para su uso farmacéutico, en donde el virus, genoma viral, antígenoma y/o molécula de ADN comprende al menos un transgen que codifica para una enzima convertidora de pro-droga.

La composición farmacéutica puede comprender además una
25 pro-droga que se puede convertir en un compuesto

terapéuticamente activo a través de la enzima convertidora de pro-droga codificada por el virus, genoma viral, antígeno y/o molécula de ADN. La composición farmacéutica puede ser apropiada para el tratamiento y/o mejora de un
5 desorden proliferativo.

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

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

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

5 En el contexto de la presente invención, la pro-droga puede ser un derivado o un precursor de un compuesto terapéuticamente activo apropiado para tratamiento y/o mejora de un desorden proliferativo, en donde la pro-droga se puede convertir por parte de una enzima convertidora de pro-droga. La pro-droga puede ser un compuesto conocido por
10 una persona experta en la materia. Los derivados y/o precursores son conocidos por un experto en la materia.

Se prefiere que la pro-droga sea esencialmente farmacéuticamente activa y/o no tóxica.

15 Entre los ejemplos de enzimas convertidoras de pro-drogas de la presente invención están la beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, carboxipeptidasa, beta-lactamasa, D-aminoácido oxidasa. Además, los ejemplos son conocidos por un experto en la materia.

20 Se prefiere que la enzima convertidora de pro-droga esencialmente no se exprese en células no tumorales.

La enzima convertidora de pro-droga se puede obtener a partir de un organismo que se selecciona de mamíferos, plantas, hongos, y microorganismos tales como bacterias,
25 protozoarios y virus.

Una combinación mayormente preferida de la enzima convertidora de pro-droga y una pro-droga es la de beta-glucuronidasa de E. coli y una pro-droga que puede ser convertida por la beta-glucuronidasa en un compuesto
5 citotóxico activo. Un ejemplo es la HMR1826 (glucurónido de doxorubicina) que se puede convertir en doxorubicina que es un compuesto conocido para el tratamiento del cáncer.

Otro tema de la presente invención es un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, en particular
10 una enfermedad hiperproliferativa, tal como un cáncer, que comprende administrar, en una cantidad terapéuticamente efectiva, a una sujeto que lo necesite,

(a) un virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma viral de la presente invención, un
15 antigenoma viral de la presente invención, y/o una molécula de ADN de la presente invención que comprende al menos un transgen que codifica para una enzima convertidora de pro-droga, y

(b) una pro-droga apropiada para el tratamiento de una
20 enfermedad proliferativa, en donde la pro-droga se puede convertir en un compuesto farmacéuticamente activo a través de la enzima convertidora de pro-droga de (a).

El método puede comprender la administración de una composición farmacéutica individual que comprende ambos
25 componentes (a) y (b), o puede comprender la administración

de dos composiciones farmacéuticas solas, en donde una de las cuales comprende el componente (a) y la otra comprende (b).

Proteasas

5 En el virus oncolítico a ARN recombinante de la presente invención, al menos un transgen puede codificar para una proteasa.

Por lo tanto un tema de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un virus oncolítico
10 recombinante de la presente invención, un genoma viral de la presente invención, un antígenoma viral de la presente invención, y/o una molécula de ADN de la presente invención como ingrediente activo opcionalmente junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para su uso
15 farmacéutico, en donde el virus, genoma viral, antígenoma y/o molécula de ADN comprende al menos un transgen que codifica para una proteasa. La composición farmacéutica puede ser apropiada para tratamiento y/o mejora de un desorden proliferativo.

20 Si el virus oncolítico a ARN recombinante de la presente invención codifica para una proteasa, el virus oncolítico de la presente invención causa la expresión selectiva de la proteasa en una célula blanco infectada con virus (en particular una célula tumoral) que usualmente no
25 expresa la proteasa o no lo hace de una forma suficiente.

Por consiguiente, durante el tratamiento de un sujeto en necesidad del mismo, la proteasa puede clivar en forma irreversible un polipéptido blanco en una célula blanco, inhibiendo de esa forma la proliferación y/o crecimiento de la célula blanco o matando la célula blanco, pero puede 5 esencialmente no clivar la molécula blanco en una célula no blanco, en particular en una célula sana del sujeto a tratar. Mediante esta estrategia, se reducen los efectos colaterales no deseados del tratamiento con la proteasa.

10 Se prefiere que la proteasa sea una proteasa de secuencia específica. Más preferida es una proteasa que cliva específicamente un polipéptido blanco. La proteasa puede ser o bien de origen natural y puede derivar de cualquier especie o bien puede ser producida por ingeniería 15 genética. Las secuencias de aminoácidos apropiadas para un clivado específico de un polipéptido blanco determinado pueden ser determinadas por un experto en la materia, por ejemplo en base a las bases de datos de secuencias disponibles públicamente. EE.UU. 2005-0175581 y EE.UU. 2004- 20 0072276 describen la generación de proteasas hechas por ingeniería en base a la proteína con una especificidad de sustrato predeterminada. Estos dos documentos se incluyen en la presente como referencia.

La molécula blanco de la proteasa puede ser cualquier 25 molécula blanco como se describe a continuación para los

blancos de las proteínas de unión.

Otro tema de la presente invención es un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, en particular una enfermedad hiperproliferativa, tal como un cáncer, que
5 comprende administrar en una cantidad terapéuticamente efectiva a un sujeto que lo necesite un virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma viral de la presente invención, un antigenoma viral de la presente invención, y/o una molécula de ADN de la presente invención
10 que comprende al menos un transgen que codifica para una proteasa.

El transgen de la presente invención puede codificar para una proteína de fusión de una enzima convertidora de pro-droga como se definió anteriormente, una molécula de
15 unión como se definió anteriormente y/o una proteasa como se definió anteriormente. Se prefiere especialmente una proteína de fusión de una enzima convertidora de pro-droga y una molécula de unión o una proteína de fusión de una proteasa y una molécula de unión.

20 **Aplicaciones Terapéuticas**

La presente invención muestra por primera vez que un transgen que codifica para una proteína de unión, una enzima convertidora de pro-droga y/o una proteasa se puede expresar en forma funcional en células tumorales infectadas con virus
25 oncolítico. Por consiguiente, la presente invención se

71

relaciona con una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo un virus como se indica anteriormente, una nucleocápside del virus, un genoma del virus o una molécula de ADN que codifica el genoma y/o el
5 antígenoma del virus, opcionalmente junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para su uso farmacéutico.

La composición farmacéutica se puede proveer como una solución, suspensión, un liofilizado o en cualquier otra
10 forma apropiada. Además del ingrediente activo, la composición puede comprender vehículos, amortiguadores, tensioactivos y/o adyuvantes conocidos en el arte. La composición se puede administrar por ejemplo en forma oral, tópica, nasal, pulmonar o por medio de inyección local o
15 intravenosa. La composición farmacéutica se administra en una cantidad farmacéuticamente activa dependiendo del tipo de desorden, de la condición y peso del paciente, la ruta de administración etc. Preferiblemente se administran entre 10⁹ y 10¹² partículas virales, entre 10⁸ y 10¹¹, entre 10⁷ y
20 10¹⁰, o entre 10⁶ y 10⁹ partículas virales por aplicación. La terapia oncolítica se puede combinar en forma opcional con otras terapias para tumores tales como cirugía, radiación y/o quimioterapia tales como tratamiento con ciclofosfamida y/o tratamiento por hipertermia.

25 De acuerdo a la presente invención, un paramixovirus

72

oncolítico recombinante puede expresar una proteína de unión soluble, una enzima convertidora de pro-droga y/o una proteasa que puede permanecer o en la célula infectada o puede ser secretada, tal como un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, una proteína de repetición de anquirina u otra molécula de unión como se especifica a continuación. No se ha descrito en forma específica que dicha proteína se pueda expresar por parte de una cepa oncolítica de un virus a ARN, por ejemplo de un virus de la enfermedad de Newcastle.

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

20 Las proteínas de unión, como las que se describieron anteriormente, se han demostrado como con alto potencial terapéutico.

25 La combinación de VEN oncolítico con proteínas de unión, enzimas convertidoras de pro-drogas y/o proteasas terapéuticas con las propiedades descritas más arriba, tendrá la eficacia sumada, o incluso sinérgica, de los

dos principios terapéuticos. El virus autoreplicante oncolítico envía a la droga de proteína de unión, la enzima convertidora de pro-droga y/o la proteasa al sitio de acción preferido en donde se expresa *in situ* en concentraciones
5 locales altas. Dicha expresión de proteína se espera que sea muy selectiva y que la proteína de unión, la enzima convertidora de pro-droga y/o la proteasa con sus respectivos modos de acción, se sumen a la actividad terapéutica oncolítica intrínseca del VEN. En base a la
10 naturaleza de competencia para replicación del virus que se usa y de la replicación selectiva en células tumorales, la cantidad de transgen que se expresa [proteína de unión, enzima convertidora de pro-droga y/o proteasa] se espera que sea casi proporcional a la masa del tumor.

15 Las moléculas de anticuerpo o las moléculas similares a anticuerpo o los derivados de ellas son proteínas de unión ideales para usarse con el sistema VEN. Las moléculas de anticuerpo se han sometido a investigación intensiva y ahora hay tecnologías disponibles para generar moléculas de
20 anticuerpo que son no inmunogénicas, muy selectivas y de alta afinidad. La expresión local de moléculas de anticuerpo a altas concentraciones conduce a eficacias agonistas o antagonistas muy significativas o a direccionamiento eficiente de moléculas efectoras con perfil de toxicidad
25 reducido en comparación con la terapia estándar.

79

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

Debido a que las moléculas de repeticiones de anquirina son extremadamente estables aún en condiciones reductoras, estas moléculas se pueden diseñar para direccionarse a proteínas dentro de la célula ("Intracuerpo").

También es posible el uso de bibliotecas de secuencias

75

codificantes de proteína de unión con VEN para la identificación de blancos *in vivo*.

Los blancos posibles para moléculas de unión y/o proteasas pueden ser todas las estructuras de una célula
5 blanco o de la matriz extracelular que rodea a la célula blanco que se puede reconocer por parte de las proteínas de unión y/o proteasas descritas y que relevante para un cierto tipo de fenotipo patológico. Estas pueden ser proteínas estructurales, enzimas, factores de crecimiento, receptores
10 de factores de crecimiento, integrinas, factores de transcripción, etc.

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

15 La combinación del VEN oncolítico y de las proteínas de unión, enzimas convertidoras de pro-drogas y/o proteasas terapéuticas, como se las describió anteriormente, se consideran para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, por ejemplo artritis reumatoide y de cáncer.

20 Para el tratamiento de cáncer, todas las vías que contribuyen al desarrollo del cáncer pueden ser blanco. Estas vías son: auto suficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a señales inhibitorias del crecimiento (anticrecimiento), evasión de apoptosis, potencial
25 replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida, e invasión

76

tisular y metástasis. Un resumen de estas vías se encuentra en (Hanahan y Weinberg, 2000). Las vías de señalización que están involucradas en el proceso de tumorigénesis y que pueden ser alcanzadas por el método descrito son la vía del
 5 receptor de tirosina quinasa (RTK), la vía de RB y p53, la vía de apoptosis, la vía de APC, la vía de HIF1, la vía de GLI, la vía de PI3K y la vía de SMAD. Una descripción detallada de estas vías de señalización se da en Vogelstein y Kinzler (2004).

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

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

- proteínas de bloqueo de receptores de factor de crecimiento activo autónomo (por ejemplo EGFR, Met)
- uniones competitivas para factores de crecimiento
 20 (antagonistas)
- proteínas de bloqueo para Rb-fosforilación
- proteínas de bloqueo para transcripción dependiente de E2F
- estabilizantes para p53
- uniones antagonistas para proteínas antiapoptóticas (por
 25 ejemplo Bcl-2)

77

- uniones antagonistas para ciclinas
- uniones antagonistas de efectores de Ras (por ejemplo GEFs)
- uniones antagonistas para proteínas inducidas por hipoxia
- 5 (por ejemplo HIF1 α)
- inhibidores de factores de transcripción que interfieren con la dimerización o la unión a ADN o la unión al cofactor (por ejemplo Myc/Max)
- inductores de diferenciación
- 10 - inhibidores de señalización/translocación de smad
- inhibidores de interacciones de adhesión celular (cadherinas, integrinas, por ejemplo $\alpha 5 \beta 1$, $\alpha v \beta 3$)
- inhibidores de enzimas que degradan la matriz extracelular (por ejemplo MMPs)
- 15 - uniones antagonistas para ligandos pro-angiogénicos (por ejemplo VEGF-R soluble)
- inhibidores de quinasas mitóticas (por ejemplo Plk-1)
- uniones antagonistas a receptores pro-angiogénicos
- inhibidores de formación de complejos de armazones
- 20 proteicos (por ejemplo KSR/Ras)
- inhibidores de inicio de traducción (eIF4E, EIF2a)

La proteasa de la presente invención, la enzima convertidora de pro-droga y/o el compuesto terapéuticamente activos que deriva de las pro-drogas de la presente

25 invención a través de la enzima convertidora de pro-droga

también puede intervenir en forma beneficiosa en las vías descritas anteriormente de las células cancerosas.

Definiciones

Virus de la Enfermedad de Newcastle:

5 Los paramixovirus contienen genomas de ARN de simple cadena de polaridad negativa que tienen entre 15 y 19 kb de longitud (tipo salvaje) y los genomas contienen entre 6 y 10 genes. La envoltura viral está formada por las glicoproteínas de superficie y una parte de membrana que
10 deriva de la célula hospedadora. Las glicoproteínas de superficie (F y HN o H o G) median la entrada y salida del virus de la célula hospedadora. La nucleocápside está dentro de la envoltura y contiene el genoma de ARN genoma y la proteína de nucleocápside (NP), fosfo-proteínas (P) y
15 proteínas grandes (L) responsables de la transcripción y traducción intracelular del virus. La proteína de matriz (M) conecta la envoltura viral y la nucleocápside. Además de estos genes que codifican proteínas estructurales, los Paramyxoviridae pueden contener genes "accesorios" que
20 pueden ser unidades transcripcionales adicionales interpuestas entre los genes que se mencionaron anteriormente. En su mayoría, los genes accesorios son ORFs que se solapan con la unidad transcripcional del gen P. Una descripción completa de paramyxoviridae se puede encontrar
25 en (Lamb, 2001).

VEN es el miembro prototípico del género Avulavirus en la familia Paramyxoviridae que pertenece al orden Mononegavirales. El genoma viral es un ARN de sentido negativo de simple cadena que codifica para seis proteínas principales: la proteína de nucleocápside (NP), fosfoproteína (P), proteína de matriz (M), proteína de fusión (F), proteína hemaglutinina (HN), y la proteína polimerasa (L). Por medio de la maduración del ARNm de la proteína P, se traducen una o dos proteínas adicionales, (V y W).

Las cepas de VEN se clasifican según su patogenicidad en las gallinas como cepas velogénicas (alta virulencia) que conducen a infección letal aguda de las gallinas de todas las edades, aislados mesogénicos (virulencia intermedia) que son solamente letales en gallinas jóvenes, cepas lentogénicas (no virulenta) que se manifiestan en una forma moderada o imperceptible de la enfermedad. La clasificación de los aislados de VEN en velo-, meso- o lentogénico está determinada por el tiempo de muerte promedio (MDT) del embrión de gallina en huevos embrionados de 9 días de edad luego de la inoculación con la dosis letal mínima que mata al embrión. Uno de los determinantes de la virulencia del VEN parece ser el sitio de clivaje del precursor de la proteína F.

Los VEN se caracterizan en detalle en Alexander (1988)



y Lamb (2001).

Virus Recombinante

Virus recombinante significa un virus que tiene una alteración definida mediante ingeniería genética en su
5 secuencia de ARN genómico. Esta alteración puede ser una o más inserciones, deleciones, mutaciones puntuales o combinaciones de los mismos.

Un virus recombinante a ARN de la presente invención puede comprender la secuencia genómica completa de un virus
10 a ARN natural (sin modificar) o una secuencia derivada de la misma, y puede comprender además al menos un casete transcripcional recombinante. El al menos un casete transcripcional puede localizarse entre dos genes (unidades transcripcionales) del genoma viral. En este caso, el al
15 menos un casete transcripcional está flanqueado por secuencias de comienzo y finalización de transcripción. El al menos un casete transcripcional puede localizarse también entre una unidad transcripcional del genoma viral. En este caso, no se requieren secuencias adicionales de comienzo y
20 finalización de la transcripción.

El al menos un casete transcripcional puede comprender sitios de restricción, tal como PacI y/o AscI, los que pueden ser únicos. Si están presentes dos casetes transcripcionales, los mismos pueden comprender sitios de
25 restricción diferentes.

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

En el al menos un casete transcripcional de la presente invención, hay un transgen localizado, que puede codificar
5 para una proteína de unión, una enzima convertidora de pro-
droga y/o una proteasa como se describió anteriormente.

Cualquier región intergénica entre cada uno de los dos genes (unidades transcripcionales) del genoma viral es apropiada para introducir el al menos un casete
10 transcripcional recombinante. Si hay presentes más de un casete transcripcional recombinante, los mismos se pueden localizar en las mismas o diferentes regiones intergénicas. La Figura 1 describe un ejemplo de dos casetes transcripcionales recombinantes dentro de una región
15 intergénica. Se prefiere que al menos un casete transcripcional recombinante se localice entre los genes virales F y HN, en particular si el virus a ARN de la presente invención es un Virus de la Enfermedad de Newcastle recombinante.

20 No hay un límite superior conocido para el tamaño del genoma de Paramyxoviridae. Por lo tanto, no hay un límite superior para el número y tamaño de transgenes que se introducen dentro del virus recombinante a ARN de la presente invención. Se prefiere que el transgen tenga un
25 tamaño de hasta alrededor de 10 kb, más preferiblemente de

hasta alrededor de 5 kb, más preferiblemente de hasta alrededor de 2 kb.

El virus recombinante a ARN de la presente invención preferiblemente lleva hasta cinco transgenes, más
5 preferiblemente hasta cuatro transgenes, aún más preferiblemente hasta tres transgenes, más preferiblemente uno o dos transgenes. Si el virus recombinante de la presente invención lleva al menos dos transgenes, los mismos pueden ser idénticos o diferentes. El virus recombinante a
10 ARN de la presente invención puede llevar más de una copia de un transgen particular, en particular dos, tres, cuatro o cinco copias.

En la expresión (que incluye transcripción del ARN viral a ARNm y traducción del ARNm) del transgen, se usan
15 las secuencias del control de la expresión tales como las secuencias de inicio y terminación transcripcional y las secuencias que controlan la traducción. Las secuencias del control de la expresión de un virus a ARN que se pueden usar pueden ser las del virus a ARN en el que se basa el virus
20 recombinante a ARN de la presente invención. En particular, las secuencias de inicio y terminación de la transcripción se pueden obtener a partir de un virus a ARN. Las secuencias del control de la expresión también se pueden obtener a partir de una célula blanco, en particular las secuencias
25 que controlan la traducción y/o el transporte de proteína.

Debido al mecanismo de replicación de Paramyxoviridae, los ARNs genómico y antígenómico usualmente no aparecen como ARNs desnudos. Los ARNs genómicos y antígenómicos se ensamblan con la nucleoproteína. Por lo tanto, otro tema de

5 la presente invención es una nucleocápside de un virus oncolítico recombinante a ARN de la presente invención. La nucleocápside comprende la molécula de ARN que codifica el genoma y/o el antígenoma del virus a ARN y la proteína de nucleocápside. La nucleocápside también puede comprender la

10 proteína polimerasa L y/o la fosfoproteína P.

También un tema de la presente invención es el antígenoma del genoma de la presente invención como se describió anteriormente.

Otro aspecto de la presente invención es una molécula

15 de ADN que codifica el genoma y/o el antígenoma de un virus oncolítico recombinante a ARN de la presente invención. La molécula de ADN puede ser un plásmido. La molécula de ADN de la presente invención se puede usar para tratar mediante ingeniería genética el virus a ARN de la presente invención.

20 Además, la molécula de ADN se puede usar para producir el virus a ARN de la presente invención. Por lo tanto, la molécula de ADN se puede ligar en forma operativa a una secuencia de control transcripcional, por ejemplo una secuencia de control de la transcripción procariota o

25 eucariota.

Un ejemplo de moléculas de ADN de la presente invención es la EDB IgG murina pflMTH68 (Fig. 2).

El genoma, antigenoma, nucleocápside y/o molécula de ADN de la presente invención puede comprender al menos un transgen que se puede localizar entre los casetes transcripcionales como se describió anteriormente. Como se discutió anteriormente, el transgen puede codificar para una proteína de unión, una enzima convertidora de pro-droga y/o una proteasa.

Otro aspecto de la presente invención es un método para producir un virus oncolítico recombinante a ARN que comprende expresar una molécula de ADN que codifica el genoma y/o el antigenoma de un virus oncolítico recombinante de la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención es una célula que comprende el virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma viral de la presente invención, un antigenoma viral de la presente invención y/o una molécula de ADN de la presente invención. La célula puede ser una célula procariota o una célula eucariota. La célula puede ser de una línea celular, en particular una línea celular de mamífero, más en particular una línea celular humana o murina. La célula se puede usar en el método de la presente invención para producir el virus a ARN de la presente invención. Los sistemas apropiados para transcribir una

molécula de ADN son conocidos por un experto en la materia, por ejemplo sistemas en procariotas tales como E. coli o sistemas eucariotas tales como HeLa o CHO.

Aún otro aspecto es un virus oncolítico a ARN, un
5 genoma o anti-genoma del mismo o una molécula de ADN que comprende el juego completo de genes de Paramyxoviridae o un juego de genes de Paramyxoviridae en donde al menos un gen o región intergénica se modifica genéticamente, y comprende además al menos un casete transcripcional recombinante como
10 se describió anteriormente. Dicho virus, genoma o antigenoma o molécula de ADN se puede usar para fabricar un medicamento y/o tratamiento de cáncer. Dicho virus a ARN, genoma, anti-genoma o molécula de ADN es apropiada para construir un virus Paramyxoviridae recombinante, en particular un Virus
15 de la Enfermedad de Newcastle recombinante por medio de técnicas de ingeniería genética con el objetivo de introducir una secuencia recombinante en el casete de transcripción. Para este propósito, el al menos un casete de transcripción puede comprender un sitio de restricción. Si
20 está presente más de un casete de transcripción, los sitios de restricción únicos de los casetes transcripcionales pueden ser diferentes. Un ejemplo es el plásmido pflMTH68_Asc_Pac de la Fig. 1.

Relevancia terapéutica:

25 Tratamiento de cáncer significa la inhibición del

crecimiento del tumor, preferiblemente la muerte de las células tumorales o el bloqueo de la proliferación en un espacio de tiempo por infección. El VEN se replica en forma selectiva en células tumorales.

5 El virus de la presente invención se puede usar para tratar desordenes proliferativos, en particular desordenes hiperproliferativos. Preferiblemente se pueden tratar neoplasias con el virus descrito, preferiblemente cánceres del grupo que consiste en pulmón, colon, próstata, mama y de
10 cerebro.

Más preferiblemente se puede tratar un tumor sólido.

Más preferiblemente se puede tratar un tumor sólido de baja proliferación.

Entre los ejemplos de tumores con baja tasa de
15 proliferación están el cáncer de próstata o cáncer de mama.

Más preferiblemente se puede tratar un tumor de cerebro.

Más preferiblemente se puede tratar un glioblastoma.

Fabricación del virus recombinante a ARN

20 El virus recombinante a ARN de la presente invención, en particular el VEN recombinante, se puede construir como se describe en Romer-Oberdorfer et al. (1999). La construcción de las nuevas secuencias de ácido nucleico es a nivel del ADNc que luego se traduce a ARN dentro de una
25 célula eucariótica mediante el uso de los siguientes

87

plásmidos de partida:

pCITE P, pCITE N, pCITE L, pX85T flNDV

El VEN puede ser de cualquier cepa del Virus de la
Enfermedad de Newcastle, más preferida es una cepa que sea
5 oncolítica en su forma de tipo salvaje.

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

El virus recombinante a ARN de la presente invención,
en particular el VEN recombinante, se puede recuperar
10 inicialmente a partir de células que expresan polimerasa T7,
por ejemplo células BHK T7 o CHO transfectadas
transitoriamente con T7 polimerasa. El mismo se puede
amplificar en células del tipo 293, CEC32, HT29 o A431.
También se puede amplificar en el fluido alantoico de huevos
15 de gallina embrionados.

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

A -20°C durante hasta un mes.

A -80°C durante hasta 10 años.

Uso del VEN recombinante como Medicamento

El virus recombinante a ARN de la presente invención,
25 en particular el VEN purificado recombinante de acuerdo a la

68

invención, se puede usar como medicamento, debido a que el mismo muestra efectos farmacológicos.

El virus recombinante a ARN de la presente invención, en particular el VEN de la invención, es un medicamento especialmente para la prevención y/o tratamiento de cáncer, especialmente para la prevención y/o tratamiento de cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de cerebro, cáncer de colon, cáncer de mama.

La invención comprende el virus recombinante a ARN de la presente invención, en particular el VEN de la invención como medicamento combinado con vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables. Dichos vehículos y diluyentes se describen en Remington's Pharmaceutical Science, 15ava ed. Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (1980). Los títulos de virus que se usan pueden estar en el rango de entre 10^9 y 10^{12} ufc por dosis, en el rango de entre 10^8 y 10^{11} ufc, en el rango de entre 10^7 y 10^{10} ufc o en el rango de entre 10^6 y 10^9 ufc dependiendo de la indicación del tratamiento.

Por lo tanto, otro tema de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende un virus oncolítico recombinante de la presente invención, un genoma viral de la presente invención, o una molécula de ADN de la presente invención junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para su uso farmacéutico. La composición

farmacéutica de la presente invención se puede usar para la prevención y/o tratamiento de un desorden proliferativo, tal como cáncer.

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

10 Aún otro tema de la presente invención es un método para la prevención y/o tratamiento de un desorden proliferativo, en particular cáncer, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica de
15 la presente invención. Una cantidad terapéuticamente efectiva es un título del virus oncolítico a ARN de la presente invención, en particular del VEN de la presente invención, del genoma del virus de la presente invención, o de la molécula de ADN de la presente invención que cure o
20 suprima la enfermedad.

Para el efecto terapéutico la dosis aceptable es diferente y depende por ejemplo de la construcción, del paciente, de las vías de administración y del tipo de cáncer.

25 Se prefiere que el sujeto (el paciente) sea un

mamífero, más preferiblemente un paciente humano.

Aún otro aspecto de la presente invención es el uso del virus recombinante a ARN de la presente invención, en particular del VEN de la invención, el genoma del virus de la presente invención, o la molécula de ADN de la presente invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

La presente invención se ilustra adicionalmente a través de las siguientes Figuras y Ejemplos.

10 **Leyendas de las Figuras**

La Figura 1 describe el plásmido pflMTH68_Asc_Pac que comprende el genoma completo de VEN y dos casetes transcripcionales que comprenden el sitio de restricción único AscI o PacI, respectivamente. La secuencia nucleotídica describe la región intergénica entre F y HN que comprende dos casetes transcripcionales recombinantes (SEQ. ID. NO: 5).

La Figura 2 describe el plásmido pflMTH68 con IgG ED-B murino, que se basa en pflMTH68_Asc_Pac y comprende las secuencias que codifican la cadena liviana y la cadena pesada del anticuerpo IgG anti-ED-B MOR03257 (véase la reivindicación 42 de La Solicitud de Patente Alemana DE10 2004 05 0101.7-43; Seq ID No. 77). La cadena liviana y la cadena pesada se insertan cada una en los casetes transcripcionales.

al

La Figura 3 describe que la infección de células CHO o HT29 con VEN MTH146 conteniendo los genes para el anticuerpo IgG anti-ED-B MOR03257 conduce a la expresión del anticuerpo en el sobrenadante celular. 24 horas luego de la infección, se consigue un nivel de alrededor de 20% de la expresión máxima. Alrededor de 72 horas luego de la infección, se consigue la máxima expresión del anticuerpo. Como control, se incubaron las células con MTH115 (conteniendo el gen para beta-glucuronidasa). En estas células no se detectó IgG.

La Figura 4 demuestra mediante inmunofluorescencia que las células infectadas con MTH146 exhiben un patrón de marcado indistinguible del marcado con el anticuerpo recombinante MOR03257.

La Figura 5 demuestra mediante inmunohistoquímica que el sobrenadante de células MTH146 infectadas muestra un patrón de marcado indistinguible comparado con el anticuerpo α ED-B purificado MOR03257 que se expresa a partir de transfección estable de células 239 en la vasculatura tumoral en donde está presente el ED-B.

La Figura 6 demuestra que la inyección intravenosa de MTH87 conduce a la expresión de GFP en el tumor en un modelo de xenoinjerto de ratón.

La Figura 7 describe la expresión de β -glucuronidasa en células Hela infectadas con MTH115.

GA

anticuerpo terapéutico de función bloqueante recombinante
contra el dominio extra B (ED-B) de fibronectina (MOR03257)
en los dos sitios de restricción AscI y PacI adicionales
únicos, respectivamente. La cadena liviana de Iglambda
5 murina para el anticuerpo anti-ED-B se insertó en el sitio
AscI. La cadena pesada de IgG murina para el anticuerpo
anti-ED-B se insertó en el sitio PacI. La longitud de de los
insertos junto con las secuencias adaptadoras se ajustó a un
número base que fue un múltiplo de seis, con el objetivo de
10 seguir la regla de seis para la longitud del genoma completo
del virus recombinante. El plásmido resultante se designó
pflMTH68 ED-B IgG murino (Fig. 2).

Usando técnicas estándar para el rescate de VEN
recombinante (transfección de células BHK que expresan T7),
15 se produjo un virus que contuvo dos genes adicionales que
codifican para dos cadenas del anticuerpo IgG anti-ED-B. Ese
virus se llamó MTH146.

Ejemplo 2:

Expresión de un anticuerpo mediante Virus de la
20 Enfermedad de Newcastle recombinante.

Las células infectadas con MTH146 producen un
anticuerpo que reconoce su antígeno fibronectina ED-B
(ELISA).

Materiales y Métodos:

25 Las células HT29 (carcinoma de colon humano) y CHO

95

(ovario de hámster chino) se sembraron en placas de 6 fosas a 4×10^5 células/fosa. El día después, las células se infectaron por triplicado con una MOI de 0,01 ya sea con virus MTH146 (conteniendo los genes para un anticuerpo anti-ED-B) o bien con el virus MTH115 (conteniendo el gen para un transgen secretado irrelevante [beta-glucuronidasa]).

En los puntos de tiempo de 0h, 20h, 30h, 2d, 3d, 6d luego de la infección se tomó una alícuota del sobrenadante celular y se sometió a una determinación de título de anticuerpo.

El título del anticuerpo se determinó por ELISA. Las fosas de plástico se recubrieron con el antígeno ED-B recombinante. Se agregó a las fosas el sobrenadante del cultivo tisular conteniendo el anticuerpo o cantidades conocidas de anticuerpo recombinante como control. Luego del lavado, el anticuerpo unido se detectó con un anticuerpo secundario acoplado a HRP hecho contra IgG murina. Usando anticuerpo recombinante purificado (expresado por células transfectadas con plásmido) como estándar, se pudo determinar la concentración del anticuerpo producido viralmente.

Resultados:

La infección con MTH146 conduce a la expresión de un anticuerpo en el sobrenadante celular que se une en forma específica a su ED-B blanco (Fig. 3). La infección de las

96

mismas células con un virus que expresa un transgen secretado irrelevante (MTH115) no conduce a una señal en el ELISA contra ED-B con el sobrenadante celular. En células tumorales HT29 la concentración del anticuerpo en el sobrenadante alcanza títulos de ca. 8 µg / ml (IgG de unión), que es una concentración suficiente para la actividad biológica. En células CHO, el título del anticuerpo alcanza hasta > 20 µg / ml en el sobrenadante.

Ejemplo 3:

10 Anticuerpo expresado viralmente se une a su blanco:
Inmunofluorescencia

Materiales y Métodos:

Células de teratocarcinoma murino F9 se sembraron en placas de 6 fosas. Las células se infectaron ya sea con MTH146 (anticuerpo anti-ED-B) o MTH115 (transgen irrelevante de β-glucuronidasa) o se infectaron con un placebo.

Dos días después de la infección, las células se fijaron con 4% de formaldehído. Las células se lavaron y el anticuerpo unido se visualizó mediante marcado con un anticuerpo secundario acoplado a Cy3 dirigido contra IgG de ratón. Como control positivo se incubaron células infectadas con placebo antes del fijado durante 1 hora con 5 µg/ml de α-IgG ED-B recombinante.

Resultados:

25 Los controles negativos no muestran una marcación

97

significativa de las células F9. Las células infectadas con MTH146 muestran un patrón de marcación que es indistinguible de la marcación con el anticuerpo recombinante (Fig. 4). Por lo tanto, se puede concluir que la infección viral conduce a la producción del anticuerpo correcto que se une a su antígeno como el anticuerpo recombinante. La concentración de anticuerpo recombinante producido viralmente es también suficiente para dar una marcación similar a una concentración de anticuerpo de 5 µg/ml. Eso es consistente con la concentración estimada del anticuerpo expresado viralmente, que está en el rango de 5 µg/ml.

Ejemplo 4:

Los anticuerpos expresados viralmente se unen a su blanco:
Inmunohistoquímica

15 Materiales y Métodos:

Se fijaron secciones de tejido criopreservado (10 µm) del melanoma SK-MEL crecido en ratones como un xenoinjerto subcutáneo en acetona fría durante 10 min, se lavaron en PBS y se marcó con anticuerpo. Como control fue útil un anticuerpo IgG α-ED-B MOR03257 purificado (conc. 5 µg/ml para marcar) que se expresó a partir de células 293 transfectadas estables. El control negativo se incubó sólo con buffer y sin anticuerpo primario. Los sobrenadantes de células 293 infectadas con el virus recombinante se usaron como sobrenadantes sin dilución para marcar. Antes de la

marcación, el virus se inactivó por tratamiento con luz UV. Las células MTH146 infectadas producen el anticuerpo IgG α -ED-B, las células control infectadas se infectaron con un virus recombinante que no produjo un anticuerpo como transgen. El anticuerpo unido se visualizó por detección con proteína-A-peroxidasa y tinción con diaminobencidina como sustrato. Las secciones se contratiñieron con hematoxilina QS. La fotodocumentación se realizó con un sistema de adquisición de imágenes Zeiss Axiophot.

10 Resultados:

Cuando se incubaba sin anticuerpo o con un sobrenadante del cultivo tisular de células 293 control infectadas con virus no se puede observar tinción inespecífica de las criosecciones.

15 La tinción con el anticuerpo α -ED-B purificado expresado a partir de células 293 transfectadas estables muestra una señal característica para la vasculatura del tumor donde está presente ED-B. La incubación con el sobrenadante de las células MTH146 infectadas produce un patrón de tinción

20 indistinguible (Fig. 5). Esto demuestra que el anticuerpo expresado viralmente puede unir su blanco ED-B de manera específica también en secciones de tejido de tumor y que la concentración en el sobrenadante de células infectadas es suficiente para dar una señal comparable a 5 μ g/ml de

25 anticuerpo purificado.

99

Ejemplo 5:

Replicación tumor-selectiva in vivo de VEN recombinante

Este ejemplo demuestra que la inyección intravenosa del virus oncolítico MTH87 que expresa GFP lleva a la expresión
5 de GFP en el tumor de un modelo de ratón xenoinjertado.

Se hicieron crecer xenoinjertos de carcinoma de páncreas MiaPaCa de manera subcutánea en ratones desnudos. Los ratones se trataron en forma repetida (6x) con 1×10^9 pfu de MTH87 (VEN con GFP como transgen) cada dos días.

10 Al día 21 y día 34 luego del último tratamiento los animales individuales se sacrificaron y se seccionaron. Las secciones de los órganos (aprox. 2 mm) se analizaron directamente con un microscopio de fluorescencia para detectar la expresión de GFP (Fig. 6).

15 Las fotografías de las secciones del tumor muestran la expresión de GFP. Dicha expresión de GFP no se pudo encontrar en ninguno de los siguientes órganos: bazo, hígado, pulmón, corazón, riñón, intestino, suprarrenales.

Reaislamiento de VEN (MTH87) de los órganos:

20 Con el objeto de probar que el virus replicante estaba presente en el tumor pero no en los otros órganos, se incubaron rodajas de los órganos (aproximadamente 2 mm de espesor) sobre una monocapa de células HT29 sensibles a virus en medio de cultivo tisular. Al día siguiente, las
25 células HT29 se calificaron según la expresión de GFP que

100

indicaba la infección por MTH87 que se originó en el órgano/tumor. El reaislamiento de MTH87 sólo fue posible a partir de los trozos de tumor pero no de cualquiera de los órganos estudiados. De cada tumor, al menos 4 de 6 trozos de tumor fueron positivos para el reaislamiento del virus. Los órganos negativos fueron: bazo, hígado, pulmón, corazón, riñón, intestino, suprarrenales (no se incluyó ningún otro órgano en el ensayo).

Estos resultados documentan que el virus recombinante MTH87 se replica selectivamente en tejido tumoral y no en otros órganos. La replicación del virus es detectable muchos días después de la última administración intravenosa del virus.

Ejemplo 6:

Generación de un VEN oncolítico que expresa una proteína de fusión anticuerpo efector L19-IL2:

La proteína de fusión L19-IL2 es una citoquina dirigida por anticuerpo. El fragmento de anticuerpo L19 está dirigido contra el extradominio B de fibronectina (ED-B) que se expresa principalmente alrededor de los vasos sanguíneos del tumor pero también en el estroma del tumor.

La citoquina Interleuquina-2 induce la proliferación de células T y activa las células NK. La interleuquina-2 no dirigida (Proleuquina), libre, se usa actualmente aplicada en bajas dosis para el tratamiento de carcinoma de células renales (RCC). El uso clínico de la Proleuquina está

limitado por la alta toxicidad sistémica. Se ha mostrado que la administración dirigida de IL-2 por medio de un anticuerpo tal como L19 se puede utilizar para administrar dosis terapéuticas eficaces a tumores mientras se mantienen
5 niveles sistémicos no tóxicos de IL-2. La administración tumor específica y expresión de L19-IL2 combina la selectividad del virus oncolítico por el tumor con la selectividad adicional del fragmento de anticuerpo L19 por el tumor y la potente actividad efectora de IL-2.

10 Materiales y Métodos:

Generación de VEN recombinante que expresa la proteína de fusión L19-IL2

El plásmido pflMTH68 Pac contiene la secuencia genómica completa de VEN MTH68 más un casete de transcripción
15 adicional con un único sitio de restricción PacI. Se clona un ADN-transgen que codifica para la proteína de fusión L19-IL2 en el sitio PacI. Este transgen está compuesto por una secuencia CCACC de Kozak, un péptido señal para la secreción extracelular y el ADNc para la proteína de fusión L19-IL2
20 (Carnemolla et al., 2002). La longitud total del genoma está ajustada para que sea un múltiplo de 6 para seguir la "regla de seis" para la longitud del genoma viral. El virus recombinante se recupera de células que expresan T7 transfectadas con el plásmido del genoma viral de longitud
25 completa que contiene el gen para L19-IL2 con una técnica

102

estándar para recuperar virus. El virus resultante se designa como MTH201. El virus se cultiva en cultivo tisular o en el fluido alantóico de huevos de gallina para producir altos títulos.

- 5 Experimento de xenoinjerto de teratocarcinoma murino F9
- Se realizan estudios terapéuticos en el modelo de teratocarcinoma murino F9 singénico. El modelo de teratocarcinoma murino F9 es un tumor singénico de crecimiento rápido caracterizado por una alta expresión de
- 10 ED-B de fibronectina principalmente en los vasos sanguíneos de alrededor del tumor pero también en el estroma del tumor. Se implantan s.c. 2×10^6 células tumorales F9 en 50% matrigel en ratones desnudos cepa 129 (clon SvHsd). Cuando los tumores alcanzan un tamaño de aproximadamente 20 mm²,
- 15 los ratones se infectan por vía intravenosa con VEN recombinante MTH201 (que codifica para la proteína de fusión L19-IL2) o virus control MTH87 (que codifica para GFP como transgen) a 1×10^9 pfu en los días 1, 3, 5 y 7. Se administran L19-IL2 (derivado CHO, dímero) e IL2
- 20 (PROLEUQUINA) como una inyección en bolo i.v. diaria en solución salina estéril durante un período de 5 días. Todas las concentraciones que se usan en los estudios animales están en el rango entre 1,8 y 2,16 Mio. UI/kg/día.
- Luego de 12 días se sacrifican los ratones y se evalúa el
- 25 peso del tumor por medida del área del tumor (producto del

diámetro más largo y su perpendicular) o volumen del tumor con el uso de un calibre.

Resultado:

L19-IL2 dimérico muestra una reducción del peso del tumor de 54,7% incluso a la dosis más baja de 1430 UI/g/día que se corresponde con un régimen de baja dosis usado en humanos mientras que dosis entre 3 y 6 veces más altas solo mejoran levemente la eficacia terapéutica de IL2 dirigida. PROLEUQUINA reduce el peso del tumor un 50,5% en su dosis más alta. No se observa ninguna eficacia terapéutica a 1430- ni 4290 UI/g/día. Se obtienen mejores resultados en el grupo de ratones tratados con VEN MTH201. La reducción de peso del tumor es más del 55%. Esto se puede explicar por una acción combinada de L19-IL2 expresada por virus y el efecto oncolítico del VEN. Otra ventaja es que los resultados alcanzados se obtienen con menos administraciones del VEN MTH201 en comparación con la proteína de la fusión sola.

Ejemplo 7:

Generación de un VEN oncolítico que expresa una proteína con repeticiones de anquirina que une VEGF y es biológicamente activa.

Se ha demostrado que VEGF y su receptor son esenciales para el crecimiento de cánceres colorectales y la formación y el crecimiento de metástasis de cáncer de colon en el hígado en modelos experimentales (Warren et al., 1995) y este

104

principio ahora se ha validado clínicamente por el uso sistémico del anticuerpo humano neutralizante de VEGF avastin en pacientes con cáncer colorectal metastático (Salgaller, 2003).

5 VEGF (o VPF) es una glicoproteína homodimérica que consiste en cuatro isoformas (que contienen 121, 165, 189, 206
residuos de aminoácidos en el monómero maduro) que se
generan por corte y empalme alternativo de ARNm derivado de
un único gen. Aun que todas las formas de VEGF poseen una
10 secuencia señal, sólo se secretan las dos especies más
pequeñas. Por el contrario las formas más grandes están
asociadas a proteoglicanos unidos a heparina en la matriz
extracelular. VEGF es mitogénico para una variedad de
células endoteliales de vasos grandes y pequeños, induce la
15 producción de factor tisular, colagenasa, activadores del
plasminógeno, y sus inhibidores y también estimula el
transporte de hexosa en estas células. Los receptores más
importantes para VEGF son la quinasa de tirosina tipo fms
flt1 y KDR (Waltenberger et al., 1994). La Expresión de VEGF
20 se ha demostrado en varias líneas de cáncer humano in vitro
y en tumores extraídos quirúrgicamente del tracto
gastrointestinal, ovario, cerebro, riñón, pulmón, y otros
órganos humanos. En muchos modelos experimentales de tumores
la neutralización de VEGF conduce a una inhibición eficaz y
25 significativa del crecimiento (Gerber y Ferrara, 2005).

Los solicitantes demuestran aquí que la administración de la proteína con repeticiones de anquirina anti-VEGF dirigida por el VEN recombinante es ventajosa para el tratamiento de esta enfermedad. Esto se muestra en un modelo experimental de ratón atímico de cáncer colorectal. Generalmente el hígado es el primer sitio y más frecuente de metástasis en cáncer colorectal. Por lo tanto la potencia del nuevo reactivo se demuestra en un modelo experimental ortotópico de metástasis de hígado.

10 Materiales y Métodos:

Generación de VEN recombinante que expresa una proteína con repeticiones de anquirina que neutraliza VEGF

Una molécula con repeticiones de anquirina anti-VEGF del tipo N3C se selecciona con procedimientos estándares (Binz et al., 2004). La secuencia de la proteína con repeticiones de anquirina seleccionada es conocida. Un casete de expresión que codifica para una proteína con repeticiones de anquirina diseñada (dARPIN) con actividad inhibitoria contra VEGF se clona en el plásmido VEN-MTH68 genómico de longitud completa.

El plásmido pflMTH68 Pac contiene la secuencia genómica completa de VEN MTH68 más un casete transcriptional adicional con un único sitio de restricción PacI. Se clona un ADN-transgen que codifica para dARPIN contra VEGF en el sitio PacI. Este transgen está compuesto por una secuencia

106

CCACC de Kozak, un péptido señal para la secreción extracelular y el ADNc para la proteína con repeticiones de anquirina. La longitud total del genoma se ajusta para que sea un múltiplo de 6 para seguir la "regla de seis" para la longitud del genoma viral. El virus recombinante se recupera de células que expresan T7 transfectadas con el plásmido del genoma viral de longitud completa que contiene el gen para dARPIN contra VEGF con una técnica estándar para recuperar virus. El virus resultante se designa MTH268. El virus se cultiva en cultivo tisular o en fluido alantóico de huevos del gallina para producir altos títulos.

Tumores subcutáneos:

Se hacen crecer cultivos confluentes de células LiM6 LS en placas de Petri de 10 cm² y se colectan por tripsinización suave, (0,05% tripsina/0,02% EDTA en HBSS libre de Ca²⁺/Mg²⁺) se lavan varias veces en PBS libre de Ca²⁺/Mg²⁺ y se resuspenden a una concentración final de 5 x 10⁷ células en DMEM libre de suero. La presencia de células únicas se confirma por microscopía de contraste de fase, y la viabilidad celular se determina por exclusión de azul de tripán. Se crían ratones atímicos Balb/c NCR-NU libres de patógenos (hembra de entre 3 y 4 semanas de edad obtenidas de los laboratorios Simonson, Gilroy, Ca) en jaulas esterilizadas y se inyectaron de manera hipodérmica con 5 x 10⁶ células tumorales viables. Todos los días se observa el

107

crecimiento del tumor en los animales, y los tumores subcutáneos se miden con un calibre cada 3 d. Al día 1, 3, 5 y 7 luego de la inoculación del tumor se inyectan grupos de cinco animales de manera intraperitoneal con diferentes cantidades de mAB 4.6.1 anti VEGF (entre 0 y 200 µg por ratón), un mAb control del mismo isotipo (200 µg/ratón), con proteína con repeticiones de anquirina anti-VEGF (entre 0 y 200 µg/por ratón), 1x10⁹ pfu de VEN MTH268 o 1x10⁹ VEN control MTH87. Antes del tratamiento con alta dosis de virus los animales se desensibilizan con dosis crecientes de virus 1x10⁶ pfu, 1x10⁷ pfu, 1x10⁸ pfu, 5x10⁸ pfu cada dos días. Los volúmenes de los tumores se calculan como se describió previamente (Kuan et al., 1987).

Metástasis de hígado:

Se hacen crecer células H7 hasta confluencia y se colectan tal como se describió anteriormente para la inyección subcutánea y se resuspenden en DMEM libre de suero a una concentración de 20 x 10⁶ células/ml. Los ratones atímicos se anestesian con metoxifluorano por inhalación preparada de forma estéril, y el bazo se exterioriza a través de una incisión en el lateral izquierdo. Se inyectan 2 x 10⁶ células en 100 µl en la pulpa del bazo, despacio a través de una aguja de calibre 27 durante 1 min, seguido por esplenectomía 1 min después. Los animales experimentales reciben anticuerpo VEGF 4.6.1, anticuerpo control (100

100

µg/ratón), proteína con repeticiones de anquirina anti-VEGF (100 µg/ml) por inyección intraperitoneal con inicio 1 d después de la inyección esplénica-portal y cada 3 a 4 días a partir de entonces. Alternativamente, se tratan los ratones
5 de manera intraperitoneal con 1×10^9 pfu VEN MTH268 o 1×10^9 VEN MTH87 control a los días 1, 3, 5 y 7. Todos los animales se matan cuando el primer ratón parece letárgico y se palpa un hígado agrandado (día 28). Los hígados se extirpan y se pesan, y las metástasis se enumeran con el uso de un
10 microscopio de disección.

Para estimar el volumen del tumor, el diámetro de cada metástasis de hígado se mide al milímetro más exacto, y el volumen de cada tumor se calcula asumiendo que es una esfera. Se determina la suma de los volúmenes de todos los
15 tumores en cada hígado. Los hígados de dos animales control casi se reemplazan por tumor y no se pueden distinguir nódulos individuales. El volumen del tumor se estima en estos dos hígados como sigue: la masa del volumen de hígado total se mide por desplazamiento de agua en un cilindro
20 graduado de 20-ml y el volumen del tumor se estima que representa el 85% del hígado.

Resultado:

Tumores subcutáneos: se controla el tamaño del tumor de animales tratados y se encuentra inhibición dosis-
25 dependiente del crecimiento del tumor para todos los

109

reactivos ensayados. El tamaño del tumor en los animales que recibieron el mAb control es aproximadamente 100 mm³ al día 8, 400 mm³ al día 16 y 900 mm³ al día 22. Para el mAb 4.6.1 el tamaño medido del tumor al día 22 es 500 mm³ cuando se
5 inyectan 10 µg de mAb a cada tiempo de administración, y 200 mm³ (100 µg), 150 mm³ (50 µg), 100 mm³ (200 µg) respectivamente. Una dependencia de dosis similar se encuentra para la proteína con repeticiones de anquirina anti-VEGF cuando se inyectan hasta 200 µg, con el mejor
10 resultado de un tamaño de tumor de entre 100 y 500 mm³ cuando se aplican 200 µg del reactivo. Mediante el tratamiento de ratones atímicos con el VEN MTH87 control el tamaño del tumor en el día 22 es mayor a 200 mm³. Este efecto antitumoral se debe al efecto antiproliferativo
15 causado por el VEN oncolítico. Los mejores efectos se encuentran cuando se infectan ratones atímicos con VEN MTH268 (que expresa la proteína con repeticiones de anquirina anti-VEGF). El tamaño del tumor medido es menor a 100 mm³. Este efecto se debe a la combinación ventajosa de
20 la expresión selectiva del tumor de la proteína de unión con repeticiones de anquirina neutralizante de VEGF y su efecto antiangiogénico y el efecto antiproliferativo independiente de los VEN tumor-selectivos sobre las células tumorales. La entrega tumor-selectiva y expresión de la proteína de unión
25 con repeticiones de anquirina anti-VEGF aseguran un nivel

estable y alto de expresión sitio-específica de la proteína neutralizante, que supera las limitaciones farmacológicas de la proteína con repeticiones de anquirina administrada de forma sistémica como por ejemplo la depuración rápida y la
5 distribución no específica a tejidos, y aseguran la neutralización eficaz de VEGF. Este efecto se obtiene con un número reducido de administraciones y por consiguiente se espera una mayor conveniencia para la población de pacientes.

10 Metástasis hepáticas:

Todos los animales muestran evidencia de tumores hepáticos pero difieren en el número, tamaño y peso de las metástasis hepáticas. Una reducción dramática en comparación con los ratones control tratados con mAb se observa luego del
15 tratamiento con anti-VEGF. El número promedio de tumores por hígado y el volumen medio estimado del tumor por hígado es entre 10 y 18 veces más bajo en los animales tratados con el mAb anti-VEGF 4.6.1 comparado con los animales tratados con el anticuerpo control. Se observan resultados similares para
20 los ratones tratados con la proteína con repeticiones de anquirina anti-VEGF. La reducción más dramática se observa en los animales tratados con VEN MTH268. Aunque se administre menos veces, el número de tumores en el hígado se reduce y el volumen del tumor es más pequeño cuando se
25 compara con ratones tratados con A4.6.1.

111

Como para el tumor primario, el efecto beneficioso de VEN MTH268 sobre la inhibición de la formación y crecimiento de metástasis hepáticas se debe a la combinación ventajosa de expresión tumor-selectiva de la proteína de unión con repeticiones de anquirina neutralizante de VEGF y su efecto antiangiogénico y el efecto antiproliferativo independiente de los VEN tumor-selectivos sobre las células tumorales. El VEN prolifera selectivamente en estos brotes de tumor remanentes y ejerce su efecto antiproliferativo sobre estas células tumorales para disminuir aun más el número de células tumorales sobrevivientes y el número de metástasis detectables.

Se observa una eficacia terapéutica constante aumentada en el crecimiento del tumor primario y el número, tamaño y peso de las metástasis hepáticas colorectales cuando se usa una proteína de unión con repeticiones de anquirina con especificidad múltiple que contiene especificidades para VEGF-A, VEGF-C y PDGF.

Ejemplo 8:

20 Generación de VEN recombinante que expresa una proteína intracelular con repeticiones de anquirina que inhibe la actividad quínasa del tipo Polo e inhibe el crecimiento del tumor

Se ha mostrado que Plk-1 es un blanco para la terapia del 25 cáncer. La expresión de Plk-1 está aumentada en tejidos

112

neoplásicos y tiene un pronóstico potencial en un amplio rango de tumores humanos (véase por ejemplo WO2005042505 y sus referencias).

Se selecciona una molécula con repeticiones de anquirina anti-Plk humana del tipo N3C con procedimientos estándares (Binz et al., 2004, Amstutz et al., 2005). La unión a Plk-1 se mide con un ELISA con GST-Plk-1 recombinante en placas de glutatión como sustrato. Se seleccionan las ligadoras positivas y los genes correspondientes se clonan en el plásmido de expresión eucariota de CMV pCDNA3.1. Los plásmidos se transfectan en células Hela y MaTu y las células se someten a un ensayo de proliferación como se describe por ejemplo en WO2005042505. Este método se prefiere a un ensayo de quinasa in vitro con el objeto de ser capaz de identificar también dARPINS ligadoras que bloqueen la función sin bloquear directamente la actividad quinasa. La dARPIN con la mejor actividad inhibitoria de proliferación celular se selecciona para la inserción en el genoma del VEN oncolítico recombinante. La secuencia de la proteína con repeticiones de anquirina seleccionada comprende 161 aminoácidos que corresponden a 483 pb. Se clona un casete de expresión que codifica para la proteína con repeticiones de anquirina diseñada (dARPIN) con actividad inhibitoria contra Plk-1 humana en el plásmido VEN-MTH68 genómico de longitud completa.

El plásmido pflMTH68 Pac contiene la secuencia completa del
genoma de VEN MTH68 más un casete transcripcional adicional
con un único sitio de restricción PacI. Un transgen de ADN
que codifica para dARPIN contra Plk-1 se clona en el sitio
5 PacI. Este transgen está compuesto por una secuencia CCACC
de Kozak y el ADNc para la molécula con repeticiones de
anquirina. La longitud total del genoma se ajusta para que
sea un múltiplo de 6 para seguir la "regla de seis" para la
longitud del genoma viral. El virus recombinante se recupera
10 desde células que expresan T7 transfectadas con el plásmido
del genoma viral de longitud completa que contiene el gen
para la dARPIN contra Plk-1 mediante una técnica estándar de
recuperación de virus. El virus resultante se designa
MTH261. El virus se cultiva en cultivo tisular o en el
15 fluido alantóico de huevos de gallina para producir altos
títulos. El virus se purifica y se concentra con el uso de
filtración por flujo tangencial y se eluye con buffer con 5%
manitol/1% L-lisina.

Inhibición in vivo del crecimiento tumoral.

20 Se inyectan ratones desnudos NMRI hembra en forma subcutánea
con $1,5 \times 10^6$ células MaTu diluidas 1:1 (medio: matrigel).
Cuando los tumores han alcanzado un tamaño de entre 20 y 25
mm² (aproximadamente 3 días después) se tratan los animales
con el virus recombinante. Se inyectan los animales de
25 manera intravenosa con 200 µl de suspensión viral (en buffer

112

5% manitol/1% L-lisina) cada dos días con las siguientes dosis consecutivas: 1×10^6 pfu, 1×10^7 pfu, 1×10^8 pfu, 5×10^8 pfu, 1×10^9 pfu, 1×10^9 pfu, 1×10^9 pfu, 1×10^9 pfu, 1×10^9 pfu. Las dosis crecientes al inicio permiten una desensibilización de los ratones contra el virus. Un grupo sólo recibe buffer (5% manitol/1% L-lisina), un grupo recibe virus recombinante MTH87 que expresa un transgen no terapéutico (GFP) y un grupo el virus oncolítico recombinante MTH261 que expresa la dARPIN que tiene actividad inhibitoria contra Plk-1. Se controla el crecimiento del tumor durante tres semanas y al final se pesan los tumores (día 21). Los tumores control están en el rango de 1,0 g. Los tumores tratados con MTH87 muestran una reducción de peso significativa. Los tumores tratados con MTH261 son aun más pequeños y muestran una reducción de peso significativa en comparación con MTH87. Esto demuestra un beneficio de la expresión de dARPIN por el virus en comparación con el tratamiento con virus solo. El resultado también prueba que un transgen intracelular activo puede mejorar las propiedades oncolíticas de un virus oncolítico recombinante.

Ejemplo 9:

Generación de un VEN oncolítico que expresa una proteína con repeticiones de anquirina que liga HIF1 α y es biológicamente activa

La hipoxia en los tumores se desarrolla si las células tumorales crecen más rápido que las células endoteliales que forman el sistema de vasos sanguíneos, que lleva a una privación de oxígeno y nutrientes en el tumor.

- 5 El establecimiento de áreas de hipoxia en los tumores sólidos promueve la progresión del desarrollo del tumor. La deficiencia de oxígeno en células tumorales lleva a inestabilidad genética, seguida por un proceso de selección, que termina en células tumorales con reducido potencial
- 10 apoptótico y resistencia aumentada contra las terapias convencionales, como la quimioterapia y radiación. Como consecuencia, la hipoxia en los tumores contribuye a un fenotipo más maligno.

El factor de transcripción inducible por hipoxia HIF-1 α es

15 el principal responsable de la activación de la mayoría de los genes en células tumorales bajo condiciones de hipoxia. Los productos de genes inducidos por HIF-1 α regulan procesos como angiogénesis, metabolismo de glucosa, crecimiento celular y transporte de oxígeno. Los transportadores de

20 glucosa 1 y 3, adenilato-quinasa 3, lactato deshidrogenasa, VEGF, Flt-1 y otros, son ejemplos de genes sobre regulados por HIF-1 α .

El factor de transcripción heterodimérico HIF-1 α está compuesto por una subunidad HIF-1 α y una HIF-1 β . La

25 subunidad HIF-1 α y la subunidad HIF-1 β se expresan

116

constitutivamente. Pero HIF-1 α , a diferencia de HIF-1 β , se degrada inmediatamente bajo condiciones normóxicas. En un entorno de oxígeno normal la subunidad HIF-1 α se reconoce y se marca para la degradación proteasomal por la proteína de Von-Hippel-Lindau (pVHL), la cual es parte de un complejo E3 ubiquitina ligasa. Bajo condiciones de hipoxia la subunidad HIF-1 α deja de ser reconocida por el pVHL y la proteína se transporta inmediatamente al núcleo. En el núcleo tiene lugar una dimerización con la subunidad HIF-1 β y unión del ADN a HRE (elemento de respuesta a la hipoxia) que lleva a la inducción de genes específicos.

En el experimento descrito se demuestra que el direccionamiento intracelular del factor de transcripción HIF-1 α por una proteína con repeticiones de anquirina anti HIF-1 α expresada por un VEN recombinante en un modelo de tumor sólido, es superior al tratamiento con VEN sólo y a la aplicación de proteína con repeticiones de anquirina anti HIF-1 α recombinante purificada solamente. La eficacia in vivo se probó en un modelo de xenoinjerto de cáncer de próstata en ratones desnudos.

Materiales y Métodos

Generación de VEN recombinante que expresa una proteína con repeticiones de anquirina que liga HIF-1 α

Se selecciona una molécula con repeticiones de anquirina anti-HIF-1 α del tipo N3C con procedimientos estándares (Binz

117

et al., 2004). La secuencia de la proteína con repeticiones de anquirina seleccionada es conocida. Un casete de expresión que codifica para una proteína con repeticiones de anquirina diseñada (dARPIN) con actividad inhibitoria contra HIF-1 α se clona en el plásmido VEN-MTH68 genómico de longitud completa.

El plásmido pflMTH68 Pac contiene la secuencia genómica completa de VEN MTH68 más un casete transcriptional adicional con un sitio único de restricción PacI. Un transgen de ADN que codifica para la dARPIN contra HIF1 α se clona en el sitio PacI. Este transgen está compuesto por una secuencia CCACC de Kozak y el ADNc para la molécula con repeticiones de anquirina. La longitud total del genoma se ajusta para que sea un múltiplo de 6 para seguir la "regla de seis" para la longitud del genoma viral. El virus recombinante se recupera de células que expresan T7 transfectadas con el plásmido genómico viral de longitud completa que contiene el gen para la dARPIN contra HIF-1 α por una técnica estándar de recuperación de virus. El virus resultante se designa MTH288. El virus se cultiva en cultivo tisular o en el fluido alantóico de huevos del gallina para producir altos títulos.

Modelo de xenoinjerto PC-3:

Se hace el pasaje de xenoinjertos PC-3 in vivo en ratones desnudos atímicos hembra o macho. Los xenoinjertos se

establecen mediante inyección subcutánea (sc) de 5×10^5 células PC-3 por animal. Luego del tercer pasaje, los tumores se cortan en trozos de 2 mm³. Se realiza la inoculación subcutánea de tejidos de tumor no necróticos en
5 ratones desnudos con el uso de agujas de acero inoxidable estériles. Cuando el volumen del tumor alcanza un tamaño promedio de entre 150 y 200 mm³, los ratones se asignan al azar a varios grupos de tratamiento.

Al día 0 luego de la asignación de grupo los ratones se
10 tratan cada dos días con dosis crecientes de MTH288 (que codifica para dARPIN anti HIF-1 α) o MTH87 (virus control que codifica para GFP como un transgen). Antes del tratamiento con altas dosis de virus, se dan en forma intravenosa dosis virales de 10⁶ pfu, 10⁷ pfu, 10⁸ pfu y 5x10⁸ pfu para la
15 desensibilización contra VEN. Después de la desensibilización la dosis más alta de 10⁹ pfu se aplica tres veces. El grupo control se trata en forma intravenosa con proteína con repeticiones de anquirina anti HIF-1 α purificada (200 μ g/por ratón). La aplicación de la proteína
20 con repeticiones de anquirina anti HIF-1 α comienza al momento de la primera inyección del virus y también se repite cada dos días a la vez que se realiza el tratamiento con virus. Un tercer grupo control se trata sólo con PBS. Se observan los animales al día 20 luego del primer tratamiento
25 para el crecimiento del tumor y se miden los tumores

119
44

subcutáneos con el uso de un calibre.

Resultados:

Al día 20 luego del primer tratamiento los tumores de los animales que se inyectaron con PBS muestran un volumen promedio de 1500 mm³. El segundo grupo control que se trató sólo con proteína con repeticiones de anquirina anti HIF-1 α expusieron una ligera reducción del crecimiento tumoral. Los animales que reciben el VEN MTH87 muestran una fuerte reducción del tumor ese día. La mejor inhibición de crecimiento tumoral al día 20 se ve en los ratones que se inyectaron con el VEN MTH288 que expresa la proteína con repeticiones de anquirina anti HIF-1 α . La inhibición del crecimiento tumoral luego del tratamiento con MTH288 es significativamente mejor que luego de los otros tratamientos.

Este resultado demuestra que la expresión intracelular por VEN de una proteína con repeticiones de anquirina contra HIF-1 α es ventajoso por sobre el tratamiento de VEN sólo o sobre la aplicación de proteína con repeticiones de anquirina anti HIF-1 α recombinante purificada.

Se espera que la expresión viral de una proteína con repeticiones de anquirina anti HIF-1 α secretoria fusionada a un péptido que penetra en la célula (por ejemplo péptido tat, péptidos de oligoarginina, péptido de AntP, péptido de VP22, penetratina, transportan (para una revisión véase Ford

120

et al., 2001)) refuerce el efecto terapéutico. Esta estrategia permite el direccionamiento hacia células tumorales que no se encuentran en si mismas infectadas por VEN, de la proteína de fusión con repeticiones de anquirina
5 anti HIF-1 α .

Se espera que un virus que exprese en forma simultánea transgenes para dos dARPINS separadas - una intracelular contra HIV-1 α y una secretoria contra interleuquina-8 - tenga una actividad anti tumoral aumentada debido al bloqueo
10 de dos vías compensatorias (Mizukami et al., 2005).

Ejemplo 10

MTH1151 lleva a la expresión de β -glucuronidasa en células infectadas

Materiales y Métodos:

15 Se plaquearon células Hela en placas de 6 pocillos. Luego de alcanzar confluencia las células se infectaron con MOI muy baja = 0,00001 de MTH87 y MTH115. En los momentos indicados de tiempo se tomaron alícuotas del sobrenadante celular y se congelaron a -20°C. 72 horas después de la infección se
20 midió la actividad de β -glucuronidasa con un ensayo MUG en todos los sobrenadantes en forma simultánea.

Ensayo MUG para la cuantificación de la actividad β -glucuronidasa

MU (4-metilumbeliferona) y MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido) son de Sigma. Se utiliza MU para realizar una
25

121

curva estándar. Se irradian con UV durante 30 min muestras que contiene virus para inactivar al virus antes del ensayo MUG. Las muestras se incuban en un buffer 25 mM de acetato de sodio de pH 5,6 con 10 μ M de MUG durante 60 min a 37°C.

5 La reacción se detiene mediante la adición de buffer glicina 200 mM de pH 10,4. La fluorescencia se mide con excitación a 320 nm y emisión a 460 nm en un fotómetro de fluorescencia. Se calcula la actividad específica en nmol por ml por hora a partir de la emisión de fluorescencia.

10 Resultados:

La infección con MTH115 lleva a un aumento en la expresión de β -glucuronidasa dependiente del tiempo, que es un resultado de la replicación viral (Figura 7). A pesar de que MTH87 mata en forma eventual a las células y así libera la

15 β -glucuronidasa endógena de las células, la actividad resultante en el sobrenadante es insignificante. La infección de MTH115 logra una producción masiva evidente del transgen. El CPE por MTH115 es comparable al de MTH87 y MTH68 (wt), por lo tanto la expresión de β -glucuronidasa por

20 el virus no atenúa la replicación del virus ni disminuye la citopatogenicidad del virus.

Ejemplo 11

Cuantificación de la expresión del transgen por MTH115 en diversas células

25 Materiales y Métodos:

122

Se sembraron células en placas de 96 pocillos. El número de células se eligió para alcanzar la confluencia un día después del plaqueo:

Hela 15000 células/pocillo

5 HT29 30000 células/pocillo

Fibroblastos 10000 células/pocillo

HDMVEC 20000 células/pocillo

Las células se infectaron con el virus MTH115 a un MOI de 0,01 un día después de sembrarlas. En detalle, se lavaron
10 las células con PBS, se inocularon con 100 µl de suspensión de virus a 37°C, el virus se aspiró y se agregaron 200 µl de medio tibio a las células.

En los tiempos indicados los sobrenadantes se quitaron de las células y se realizó un ensayo MUG de beta-glucuronidasa. Para cada tiempo se analizaron los pocillos
15 por triplicado.

Resultados:

Los resultados se resumen en la Figura 8. En las células normales HDMVEC y fibroblastos no se pudo detectar ninguna
20 expresión del transgen. Tampoco se observó efecto citopático (no mostrado). En las células tumorales que son susceptibles al virus, Hela y HT29 hay una producción masiva del transgen beta-glucuronidasa cuya actividad se puede medir en el sobrenadante. Las células Hela que mueren por el virus
25 dentro de las 43 horas producen niveles relativamente más

123

bajos del transgen. Las células HT29 que sólo se mueren luego de 5 días a las dosis de virus utilizadas, producen actividad aun más alta de beta-glucuronidasa, aproximadamente 10 veces más que células Hela y más de 1000 veces por encima del basal.

Ejemplo 12

VEN-beta-glucuronidasa y HMR1826 matan en forma sinérgica células que son resistentes a cualquiera de estos tratamientos solos

10 Materiales y Métodos:

Las células se plaquearon el día 1 en placas de 24 pocillos. Al día 2 las células se infectaron con VEN-beta-glucuronidasa (MTH115) a un MOI de 0,001. Al día 3 las células se trataron con doxorubicina a 1 μ M o con el glucurónido de doxorubicina HMR1826 a 1 μ M. Al día 8 las células se lavaron, se fijaron y se tiñeron con Giemsa y se tomaron fotografías de los pocillos.

Resultados:

Los resultados se resumen en la Figura 9 y la Figura 10. La doxorubicina sola mata a las células a la concentración dada. La pro-droga a la misma concentración no es tóxica para las células. El virus solo a la MOI dada tampoco es tóxico porque se seleccionan células tumorales que poseen un nivel de resistencia al tratamiento con virus. La combinación de virus que expresan glucuronidasa y la pro-

124

droga es capaz de matar células que no mueren por ninguno de los tratamientos solos. Un virus control (que expresa GFP en lugar de beta-glucuronidasa) no muestra ningún sinergismo con el tratamiento de la pro-droga.

5 Referencias

- Adams, G.P. y Weiner, L.M. (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol*, 23, 1147-1157.
- Alexander, D.J. (1988) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.
- 10 Allen, T.M. (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2, 750-763.
- Amstutz, P., Binz, H.K., Parizek, P., Stumpp, M.T., Kohl, A., Grutter, M.G., Forrer, P. y Pluckthun, A. (2005) Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial
- 15 libraries of designed ankyrin repeat proteins. *J Biol Chem*, 280, 24715-24722.
- Antoniw, P., Springer, C.J., Bagshawe, K.D., Searle, F., Melton, R.G., Rogers, G.T., Burke, P.J. y Sherwood, R.F. (1990) Disposition of the prodrug 4-(bis (2-chloroethyl)
- 20 amino) benzoyl-L-glutamic acid and its active parent drug in mice. *Br J Cancer*, 62, 909-914.
- Bagshawe, K.D., Springer, C.J., Searle, F., Antoniow, P., Sharma, S.K., Melton, R.G. y Sherwood, R.F. (1988) A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer
- 25 sites. *Br J Cancer*, 58, 700-703.

175

- Batra, J.K., Fitzgerald, D.J., Chaudhary, V.K. y Pastan, I. (1991) Single-chain immunotoxins directed at the human transferrin receptor containing *Pseudomonas* exotoxin A or diphtheria toxin: anti-TFR(Fv)-PE40 and DT388-anti-TFR(Fv).
5 Mol Cell Biol, 11, 2200-2205.
- Batra, J.K., Kasprzyk, P.G., Bird, R.E., Pastan, I. y King, C.R. (1992) Recombinant anti-erbB2 immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin. Proc Natl Acad Sci U S A, 89, 5867-5871.
- 10 Bell, J.C., Garson, K.A., Lichty, B.D. y Stojdl, D.F. (2002) Oncolytic viruses: programmable tumor hunters. Curr Gene Ther, 2, 243-254.
- Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C., Forrer, P., Grutter, M.G. y Pluckthun, A. (2004) High-
15 affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries. Nat Biotechnol, 22, 575-582.
- Bosslet, K., Czech, J., Lorenz, P., Sedlacek, H.H., Schuermann, M. y Seemann, G. (1992) Molecular and functional characterisation of a fusion protein suited for tumor
20 specific prodrug activation. Br J Cancer, 65, 234-238.
- Carnemolla, B., Borsi, L., Balza, E., Castellani, P., Meazza, R., Berndt, A., Ferrini, S., Kosmehl, H., Neri, D. y Zardi, L. (2002) Enhancement of the antitumor properties of interleukin-2 by its targeted delivery to the tumor blood
25 vessel extracellular matrix. Blood, 99, 1659-1665.

126
196

- Chaudhary, V.K., Gallo, M.G., FitzGerald, D.J. y Pastan, I. (1990) A recombinant single-chain immunotoxin composed of anti-Tac variable regions and a truncated diphtheria toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9491-9494.
- 5 Chaudhary, V.K., Queen, C., Junghans, R.P., Waldmann, T.A., FitzGerald, D.J. y Pastan, I. (1989) A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. *Nature*, 339, 394-397.
- Chiocca, E.A. (2002) Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer*, 2, 938-950.
- 10 Csatory, L.K., Gosztonyi, G., Szeberenyi, J., Fabian, Z., Liszka, V., Bodey, B. y Csatory, C.M. (2004) MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas. *J Neurooncol*, 67, 33-93.
- 15 De Lorenzo, C., Arciello, A., Cozzolino, R., Palmer, D.B., Laccetti, P., Piccoli, R. y D'Alessio, G. (2004) A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Res*, 64, 4870-4874.
- Engel-Herbert, I., Werner, O., Teifke, J.P., Mebatsion, T., 20 Mettenleiter, T.C. y Romer-Oberdorfer, A. (2003) Characterization of a recombinant Newcastle disease virus expressing the green fluorescent protein. *J Virol Methods*, 108, 19-28.
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P. y Novotny, W. (2004) 25 Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF

nt

antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov, 3, 391-400.

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

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

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

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

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

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

108

- Huang, Z., Elankumaran, S., Yunus, A.S. y Samal, S.K. (2004)
A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2
protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects
against NDV and IBDV. *J Virol*, 78, 10054-10063.
- 5 Huang, Z., Krishnamurthy, S., Panda, A. y Samal, S.K. (2001)
High-level expression of a foreign gene from the most 3'-
proximal locus of a recombinant Newcastle disease virus. *J*
Gen Virol, 82, 1729-1736.
- Kreitman, R.J., Chaudhary, V.K., Waldmann, T.A., Hanchard,
10 B., Cranston, B., FitzGerald, D.J. y Pastan, I. (1993)
Cytotoxic activities of recombinant immunotoxins composed of
Pseudomonas toxin or diphtheria toxin toward lymphocytes
from patients with adult T-cell leukemia. *Leukemia*, 7, 553-
562.
- 15 Kreitman, R.J. y Pastan, I. (1995) Importance of the
glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of
Pseudomonas exotoxin derivatives and for increased binding
to the KDEL receptor. *Biochem J*, 307 (Pt 1), 29-37.
- Krishnamurthy, S., Huang, Z. y Samal, S.K. (2000) Recovery
20 of a virulent strain of newcastle disease virus from cloned
cDNA: expression of a foreign gene results in growth
retardation and attenuation. *Virology*, 278, 168-182.
- Kuan, S.F., Byrd, J.C., Basbaum, C.B. y Kim, Y.S. (1987)
Characterization of quantitative mucin variants from a human
25 colon cancer cell line. *Cancer Res*, 47, 5715-5724.

129

- Ladner, R.C. y Iley, A.C. (2001) Novel frameworks as a source of high-affinity ligands. *Curr Opin Biotechnol*, 12, 406-410.
- Lamb, R.A., Kclakofsky, D. (2001) Paramyxoviridae: The Viruses And Their Replication. In Fields, B.N. (ed.), *Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1305-1485.
- 5 Lorence, R.M., Pecora, A.L., Major, P.P., Hotte, S.J., Laurie, S.A., Roberts, M.S., Groene, W.S. y Bamat, M.K. (2003) Overview of phase I studies of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus. *Curr Opin Mol*
- 10 *Ther*, 5, 618-624.
- Mizukami, Y., Co, W.S., Duerr, E.M., Gala, M., Li, J., Zhang, X., Zimmer, M.A., Iliopoulos, O., Zukerberg, L.R., Kohgo, Y., Lynch, M.P., Rueda, B.R. y Chung, D.C. (2005) Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic response
- 15 in HIF-1alpha-deficient colon cancer cells. *Nat Med*, 11, 992-997.
- Nakaya, T., Cros, J., Park, M.S., Nakaya, Y., Zheng, H., Sagrera, A., Villar, E., Garcia-Sastre, A. y Palese, P. (2001) Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine
- 20 vector. *J Virol*, 75, 11868-11873.
- Noonberg, S.B. y Benz, C.C. (2000) Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs*, 59, 753-767.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Uhl inverted question mark, M. y Nygren, P.A. (2000) Ligands selected from combinatorial
- 25

130

libraries of protein A for use in affinity capture of apolipoprotein A-1M and taq ADN polymerase. J Biotechnol, 80, 45-54.

Roffler, S.R., Wang, S.M., Chern, J.W., Yeh, M.Y. y Tung, E.
5 (1991) Anti-neoplastic glucuronide prodrug treatment of human tumor cells targeted with a monoclonal antibody-enzyme conjugate. Biochem Pharmacol, 42, 2062-2065.

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

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

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

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

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

Sinkovics, J.G. y Horvath, J.C. (2000) Newcastle disease
25 virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. J Clin

- Virology, 16, 1-15.
- Skerra, A. (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 337-350.
- Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M.,
5 Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin,
L., Atkins, H., Brown, E.G., Durbin, R.K., Durbin, J.E.,
Hiscott, J. y Bell, J.C. (2003) VSV strains with defects in
their ability to shutdown innate immunity are potent
systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*, 4, 263-275.
- 10 Vogelstein, B. y Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the
pathways they control. *Nat Med*, 10, 789-799.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya,
M. y Heldin, C.H. (1994) Different signal transduction
properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular
15 endothelial growth factor. *J Biol Chem*, 269, 26988-26995.
- Wang, S.M., Chern, J.W., Yeh, M.Y., Ng, J.C., Tung, E. y
Roffler, S.R. (1992) Specific activation of glucuronide
prodrugs by antibody-targeted enzyme conjugates for cancer
therapy. *Cancer Res*, 52, 4484-4491.
- 20 Warren, R.S., Yuan, H., Matli, M.R., Gillett, N.A. y
Ferrara, N. (1995) Regulation by vascular endothelial growth
factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model
of experimental liver metastasis. *J Clin Invest*, 95, 1789-
1797.
- 25 Zewe, M., Rybak, S.M., Dubel, S., Coy, J.F., Welschhof, M.,

132

Newton, D.L. y Little, M. (1997) Cloning and cytotoxicity of a human pancreatic RNase immunofusion. Immunotechnology, 3, 127-136.

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

133

Reivindicaciones

1. Un virus oncolítico recombinante a ARN que comprende un ácido nucleico con al menos un transgen, en
5 donde el ácido nucleico de este/estos transgen/es codifica/n para una proteína de unión que tiene una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus.
2. El virus de la reivindicación 1, que es un virus
10 de cadena negativa a ARN.
3. El virus de la reivindicación 1 ó 2, que es un paramixovirus.
4. El virus de cualquiera de las reivindicaciones entre 1 y 3, que es un virus de la enfermedad de Newcastle
15 (VEN).
5. El virus de la reivindicación 4 que es un VEN no lentogénico, por ejemplo un VEN mesogénico o velogénico, en particular la cepa mesogénica MTH68.
6. El virus de acuerdo a cualquiera de las
20 reivindicaciones entre 1 y 5 en donde la proteína de unión pertenece al siguiente grupo: un ligando natural o un ligando modificado genéticamente, un dominio soluble recombinante de un receptor natural o una versión modificada del mismo, un ligando peptídico o polipeptídico, una
25 molécula de anticuerpo o un fragmento o un derivado de la

134

misma o una molécula similar a anticuerpo tal como una proteína con repeticiones de anquirina o un fragmento o derivado de la misma.

7. El virus de cualquiera de las reivindicaciones entre 1 y 6 en donde la proteína de unión es de origen mamífero, por ejemplo humano, murino o de relación cercana o una proteína quimérica.

8. El virus de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la proteína de unión es una proteína monomérica, dimérica, trimérica, tetramérica o multimérica.

9. El virus de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la proteína de unión es mono-específica, bi-específica o multi-específica.

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

11. El virus de acuerdo a la reivindicación 13 en donde la proteína de unión es una proteína de fusión con una toxina tal como RNAsa humana (exotoxina de pseudomonas, toxina de Difteria), o una proteína fusión con una enzima tal como beta-glucuronidasa, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, carboxipeptidasa, beta-lactamasa o una proteína de fusión con una proteína estimuladora del sistema inmune

135

con actividad citoquina como IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN-beta o GM-CSF.

12. El virus de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la proteína de unión
5 se selecciona del siguiente grupo: proteínas bloqueantes de receptores de factor de crecimiento activos autónomos (por ejemplo EGFR, Met), ligandos competitivos de factores de crecimiento (antagonistas), proteínas bloqueantes de fosforilación de Rb, proteínas bloqueantes de la
10 transcripción dependiente de E2F; estabilizantes de p53; ligandos antagonistas de proteínas antiapoptóticas (por ejemplo Bcl-2); ligandos antagónicos de ciclinas; ligandos antagónicos de efectores de Ras (por ejemplo GEFs); ligandos antagónicos de proteínas inducidas por hipoxia (por ejemplo HIF1 α); inhibidores de factores de transcripción que
15 interfieren con la dimerización o la unión de ADN o unión de cofactores (por ejemplo Myc/Max); Inductores de diferenciación; Inhibidores de señalización/translocación del smad; inhibidores de interacciones de adherencia celular
20 (caderinas, integrinas, por ejemplo $\beta\alpha5\beta1$, $\alpha v\beta3$); inhibidores de enzimas que degradan la matriz extracelular (por ejemplo MMPs); ligandos antagónicos para ligandos proangiogénicos (por ejemplo VEGF-R soluble); ligandos antagónicos de receptores proangiogénicos; inhibidores de la
25 formación de complejo de anclaje (por ejemplo KSR/Ras);

136

inhibidores de la iniciación de traducción (por ejemplo eIF4E, eIF2a); inhibidores de quinasas mitóticas (por ejemplo Plk-1).

13. Una nucleocápside de un virus oncolítico
5 recombinante a ARN de cualquiera de las reivindicaciones entre 1 y 12.

14. Un genoma de un virus oncolítico recombinante a ARN de cualquiera de las reivindicaciones entre 1 y 12.

15. Una molécula de ADN que codifica para el genoma
10 y/o antígeno de un virus oncolítico recombinante a ARN de cualquiera de las reivindicaciones entre 1 y 12.

16. La molécula de ADN de la reivindicación 15 unida de modo funcional a una secuencia de control transcripcional.

15 17. Una célula que comprende un virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones entre 1 y 12, un genoma de virus de la reivindicación 14 o una molécula de ADN de las reivindicaciones 15 ó 16.

18. Una composición farmacéutica que comprende un
20 virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones entre 1 y 12, un genoma de virus de la reivindicación 14 o una molécula de ADN de las reivindicaciones 15 ó 16 como un ingrediente activo opcionalmente junto con vehículos, adyuvantes y/o diluyentes
25 aceptables para uso farmacéutico.

137

19. La composición farmacéutica de la reivindicación 18 para la prevención y/o tratamiento de cáncer.

20. Un método para la prevención y/o tratamiento de cáncer que comprende la administración a un sujeto con esa
5 necesidad de una cantidad farmacéuticamente eficaz de una composición de la reivindicación 18 ó 19.

21. El método de la reivindicación 20 en donde el sujeto es un paciente humano.

22. Un virus oncolítico recombinante a ARN que
10 comprende un ácido nucleico con al menos un transgen, en donde el ácido nucleico de este/estos transgen/es codifica/n para una enzima convertidora de pro-droga que tiene una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus.

15 23. Un virus oncolítico recombinante a ARN que comprende un ácido nucleico con al menos un transgen, en donde el ácido nucleico de este/estos transgen/es codifica/n para una proteasa que tiene una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus.

20 24. Una composición farmacéutica que comprende un virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones entre 1 y 12, un genoma de virus de la reivindicación 14, y/o una molécula de ADN de las reivindicaciones 15 ó 16 como un ingrediente activo
25 opcionalmente junto con vehículos, adyuvantes y/o diluyentes

138

aceptables para uso farmacéutico, dicho virus, genoma de virus y/o molécula de ADN comprende al menos un transgen que codifica para una enzima convertidora de pro-droga.

25. La composición farmacéutica de la reivindicación 5 24 que comprende una pro-droga que se puede convertir en un compuesto terapéuticamente activo por la enzima convertidora de pro-droga codificada por el virus, genoma del virus y/o molécula de ADN de la reivindicación 24.

26. La composición farmacéutica de la reivindicación 10 24 ó 25 para el tratamiento y/o alivio de un desorden proliferativo.

27. Un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, que comprende la administración a un sujeto con esa necesidad de una cantidad farmacéuticamente eficaz 15 de

(a) un virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones entre 1 y 12, un genoma de virus de la reivindicación 14, y/o molécula de ADN de las reivindicaciones 15 ó 16 que comprende al menos un transgen 20 que codifica para una enzima convertidora de pro-droga, y

(b) una pro-droga adecuada para el tratamiento de la enfermedad proliferativa, dicha pro-droga se puede convertir en un compuesto farmacéuticamente activo por la enzima convertidora de pro-droga de(a).

25 28. Una composición farmacéutica que comprende un

139

virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones entre 1 y 12, un genoma de virus de la reivindicación 14, y/o molécula de ADN de las reivindicaciones 15 ó 16 como un ingrediente activo
5 opcionalmente junto con vehículos, adyuvantes y/o diluyentes aceptables para uso farmacéutico, dicho virus, virus de genoma, y/o molécula de ADN comprende al menos un transgen que codifica para una proteasa.

29. La composición farmacéutica de la reivindicación
10 28 para el tratamiento y/o alivio de un desorden proliferativo.

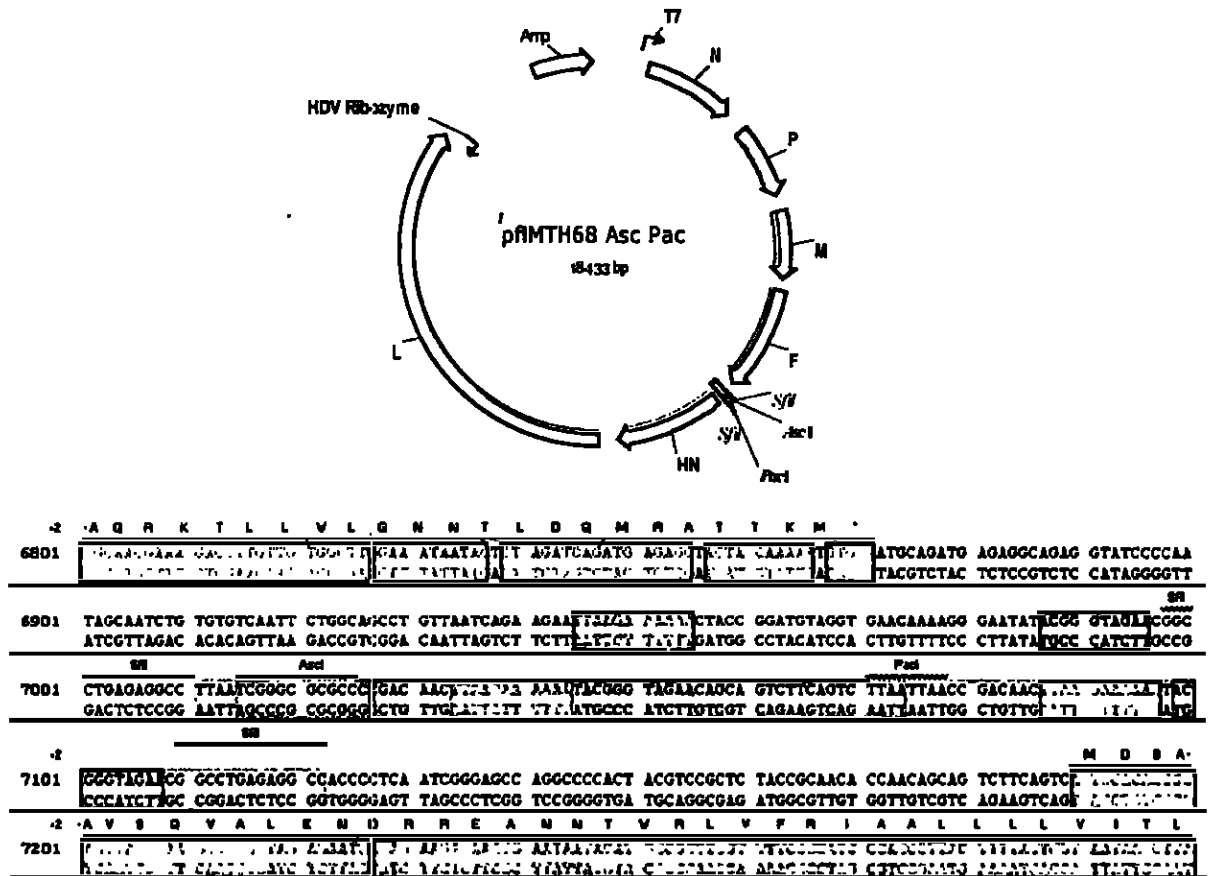
30. Un método para el tratamiento de una enfermedad proliferativa, que comprende la administración a un sujeto con esa necesidad de una cantidad farmacéuticamente eficaz
15 de un virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones entre 1 y 12, genoma de virus de la reivindicación 14, y/o molécula de ADN de las reivindicaciones 15 ó 16 que comprende al menos un transgen que codifica para una proteasa.

140

VIRUS RECOMBINANTE DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**Resumen**

El objetivo de la invención es incrementar la actividad
5 terapéutica del VEN oncolítico. Este problema se resuelve
con un Virus de la Enfermedad de Newcastle que comprende un
ácido nucleico recombinante, en donde el ácido nucleico
codifica para una proteína de unión que tiene una actividad
terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral
10 infectada con virus. Las proteínas de unión pertenecen al
siguiente grupo: un ligando natural o un ligando modificado
genéticamente, un dominio soluble recombinante de un
receptor natural o una versión modificada del mismo, un
ligando peptídico, una molécula de anticuerpo y derivados
15 del mismo o molécula similar a anticuerpos tal como
moléculas con repeticiones de anquirina o derivados de las
mismas.

plásmido pfilMTH68_Asc_Pac



Azul: final de secuencia codificante de proteína F
 Rojo: señal de terminación para la transcripción del gen
 Verde: señal de inicio para la transcripción del gen
 Gris: bases no codificantes introducidas nuevas en el genoma
 Rojo: inicio de secuencia codificante de proteína NH

Fig 2:
plásmido **pflMTH68** murina **IgG ED-B**

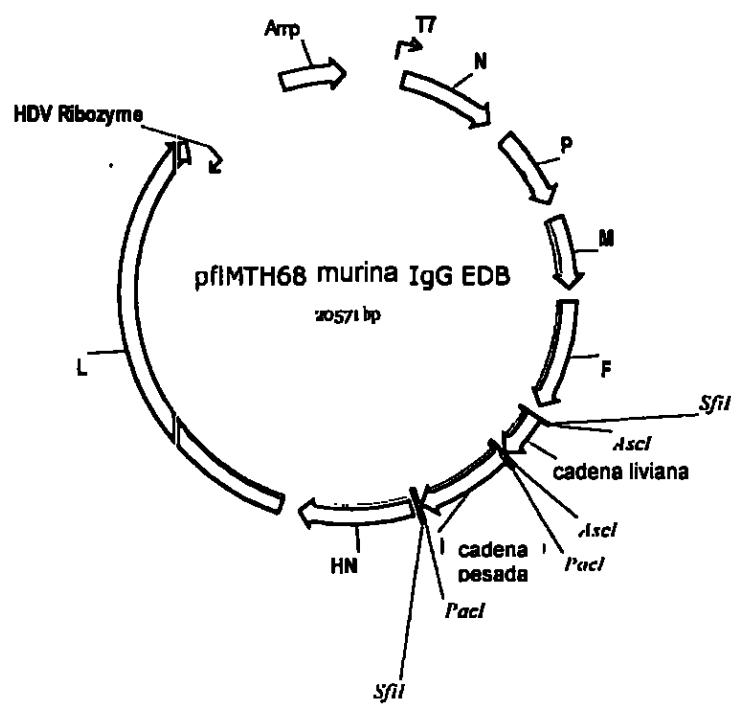


Fig. 3:

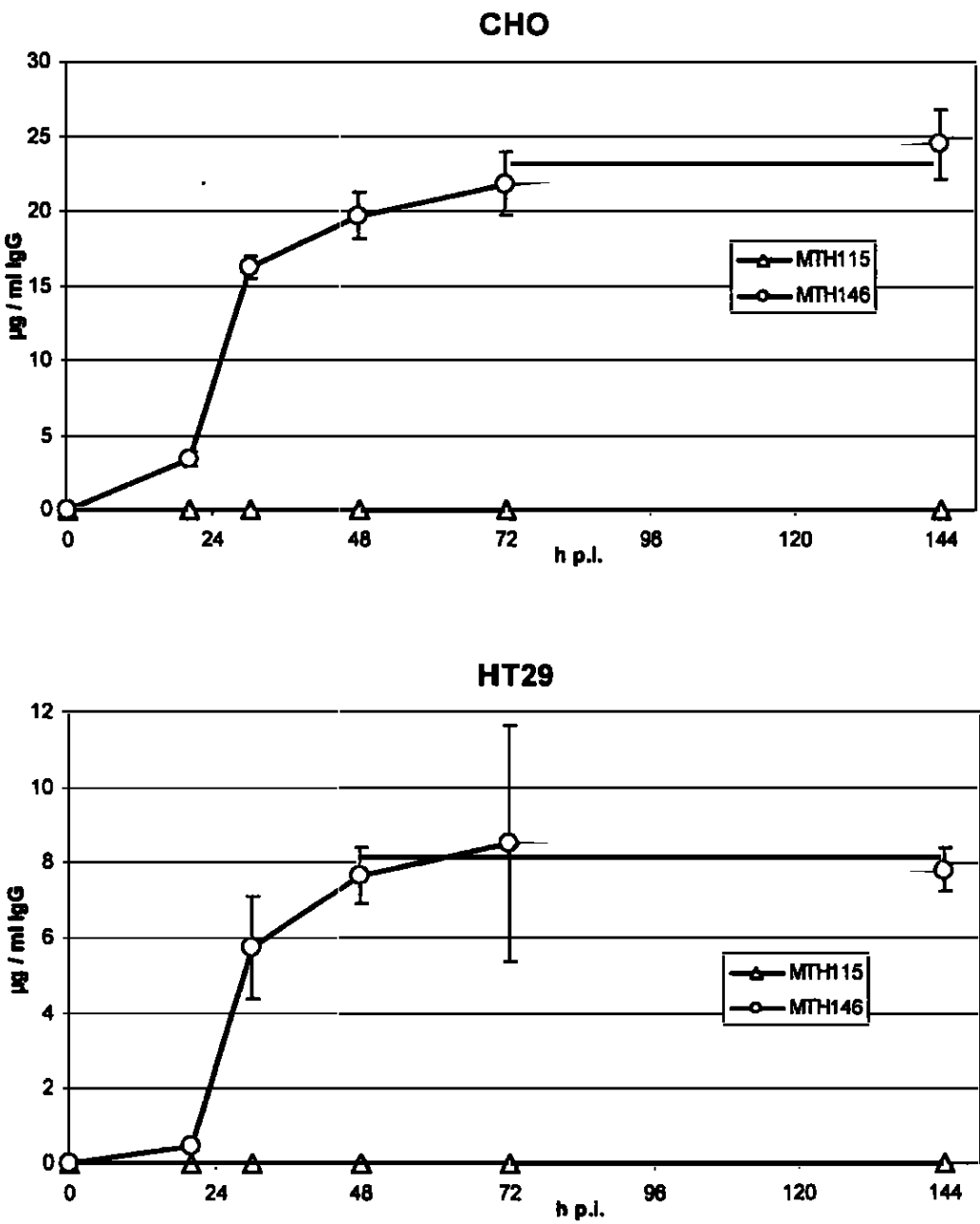
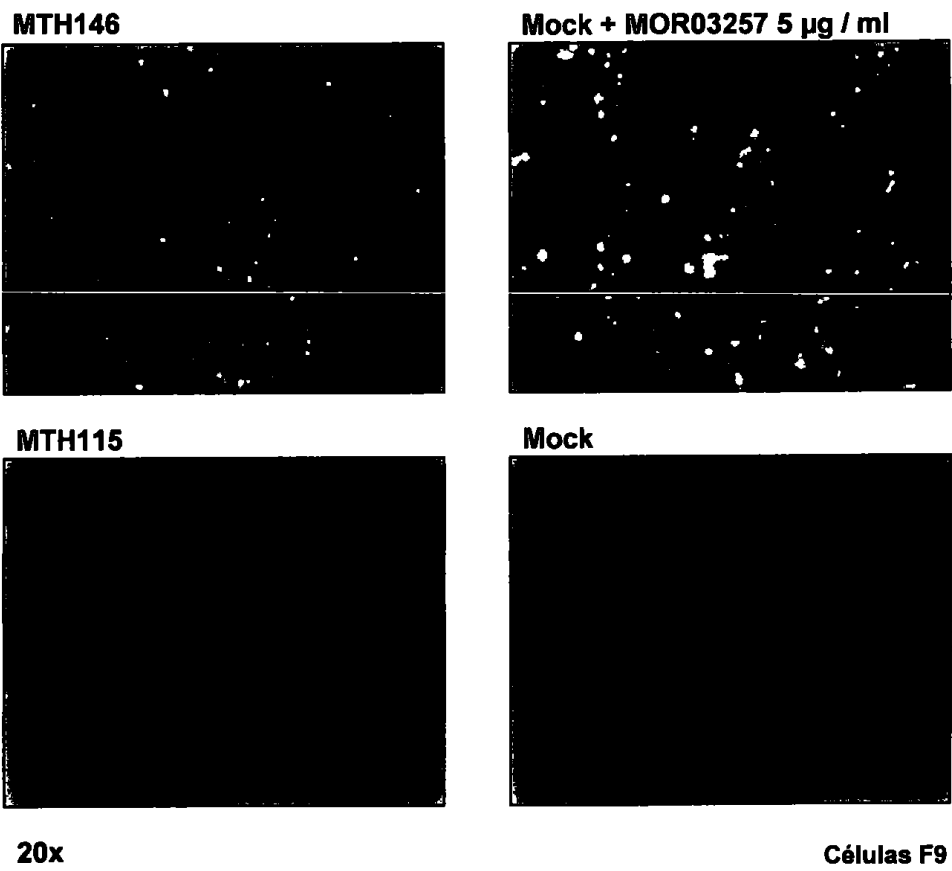


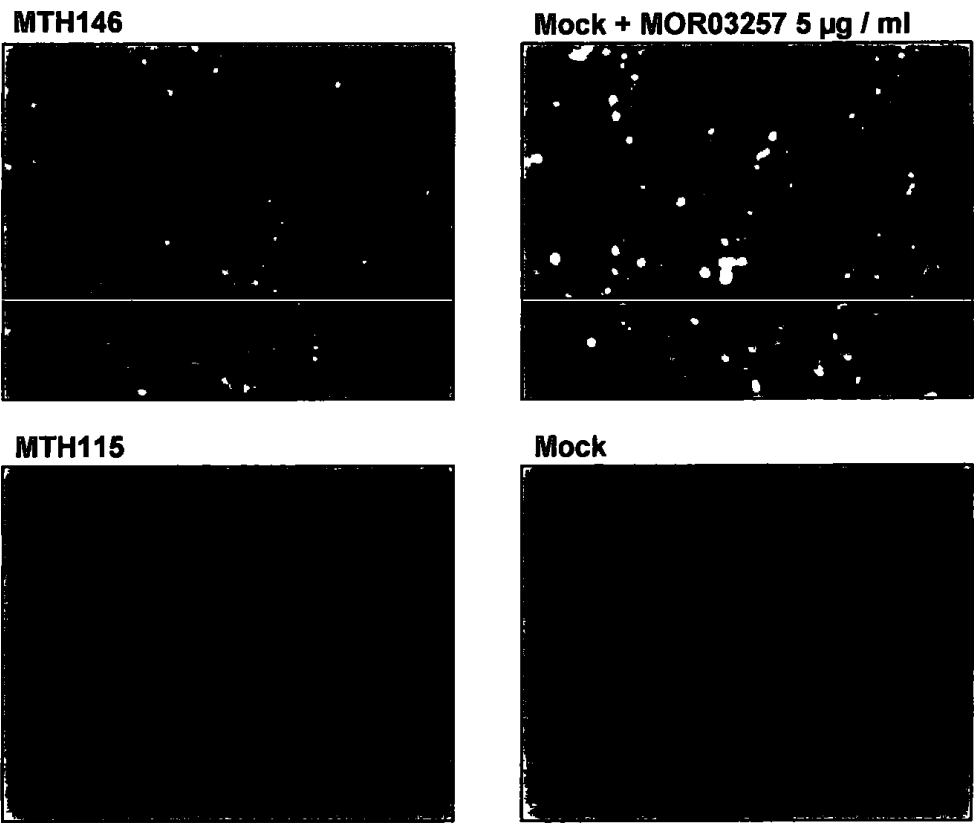
Fig 4



144

Fig 4b

145



20x

Células F9, 22 de julio de 2005

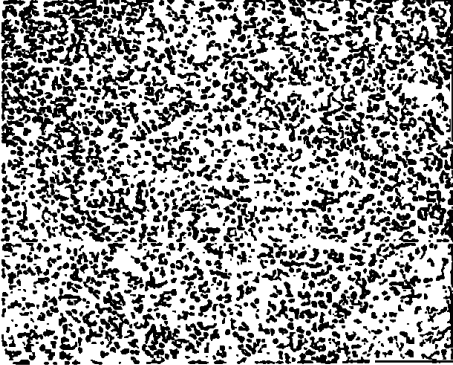
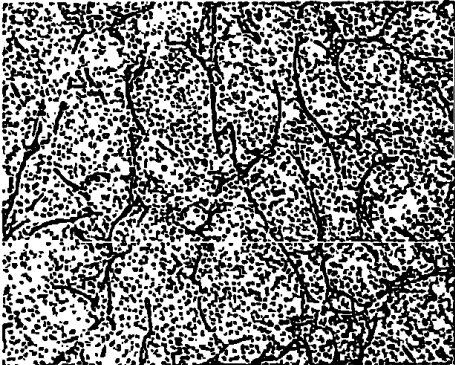
145

Fig 5

Tumor IHC SK-MEL

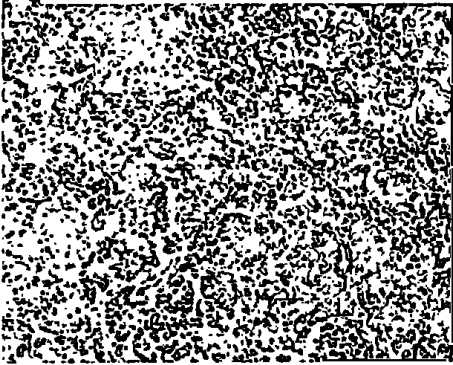
Anticuerpo purificado MOR03257 de células 293 5µg/ml

Control sin anticuerpo



spn de células infectadas con MTH146

spn de células infectadas con virus control



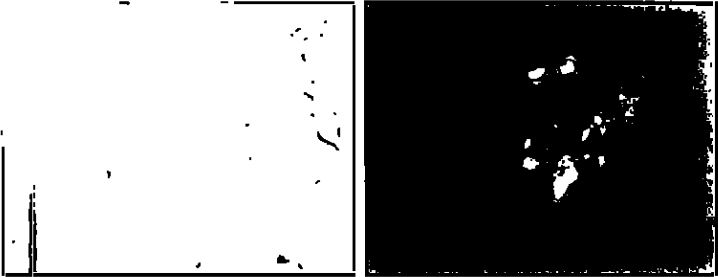
10x

Fig. 6

MiaPaCa xenografts, i.v. treated with MTH87

Xenoinjertos MiaPaCa, tratados I.V. con MTH87

21 d
after treatment
21 d luego de
tratamiento



34 d
after treatment
34 d luego de
tratamiento



10x

Fig. 7:

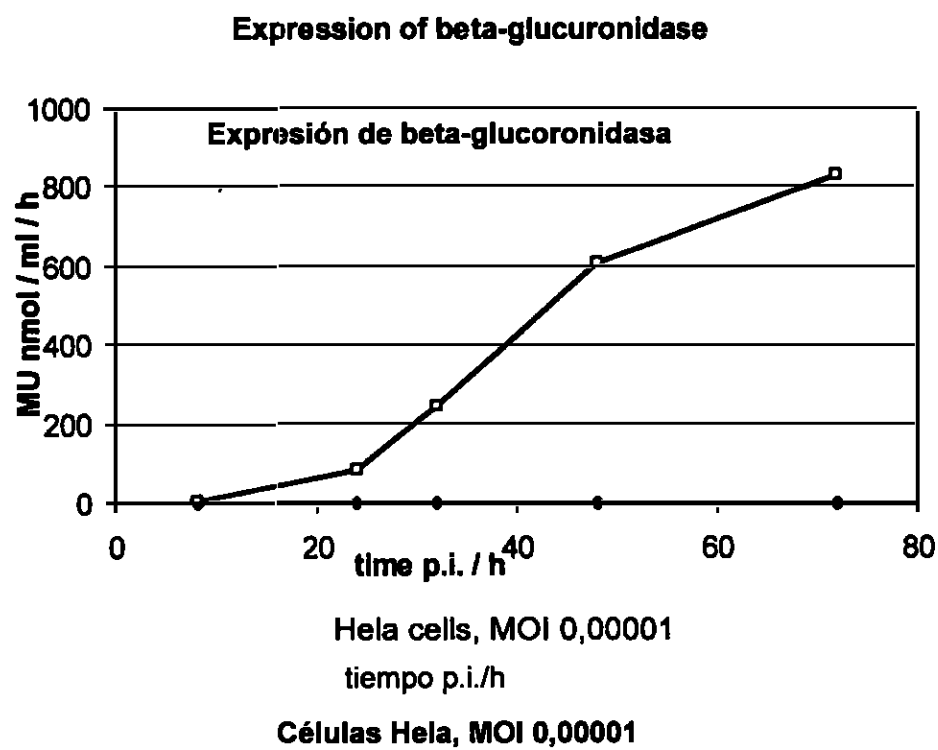
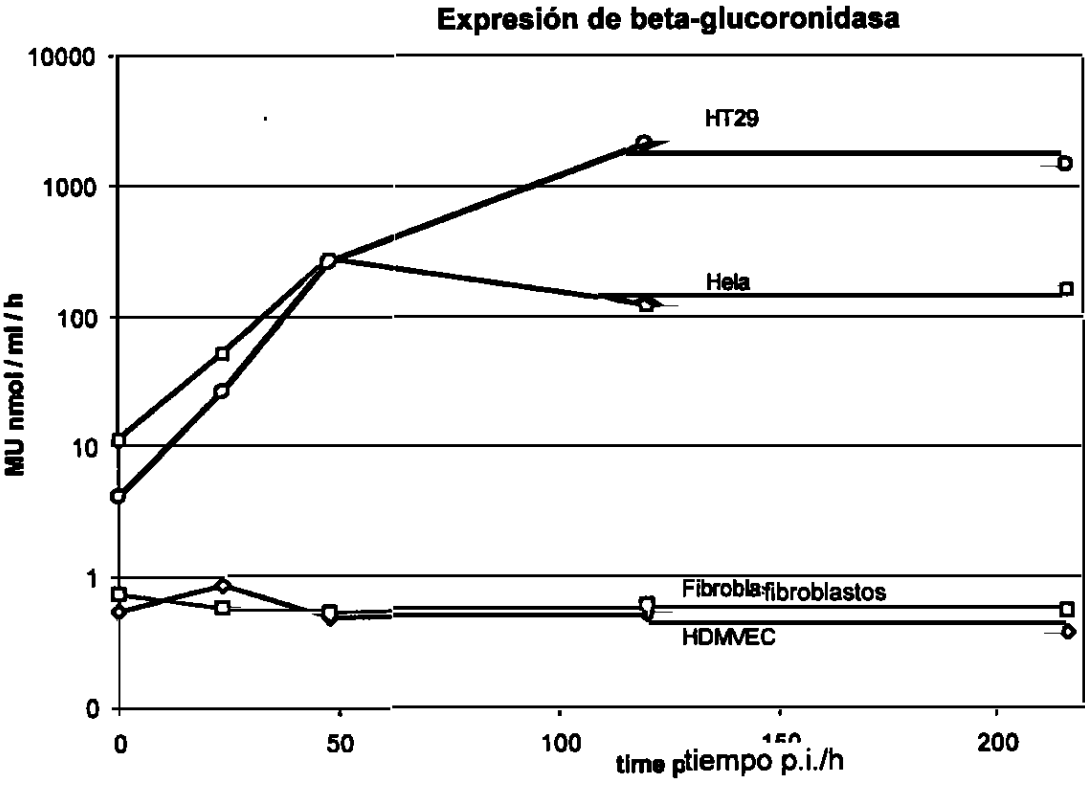


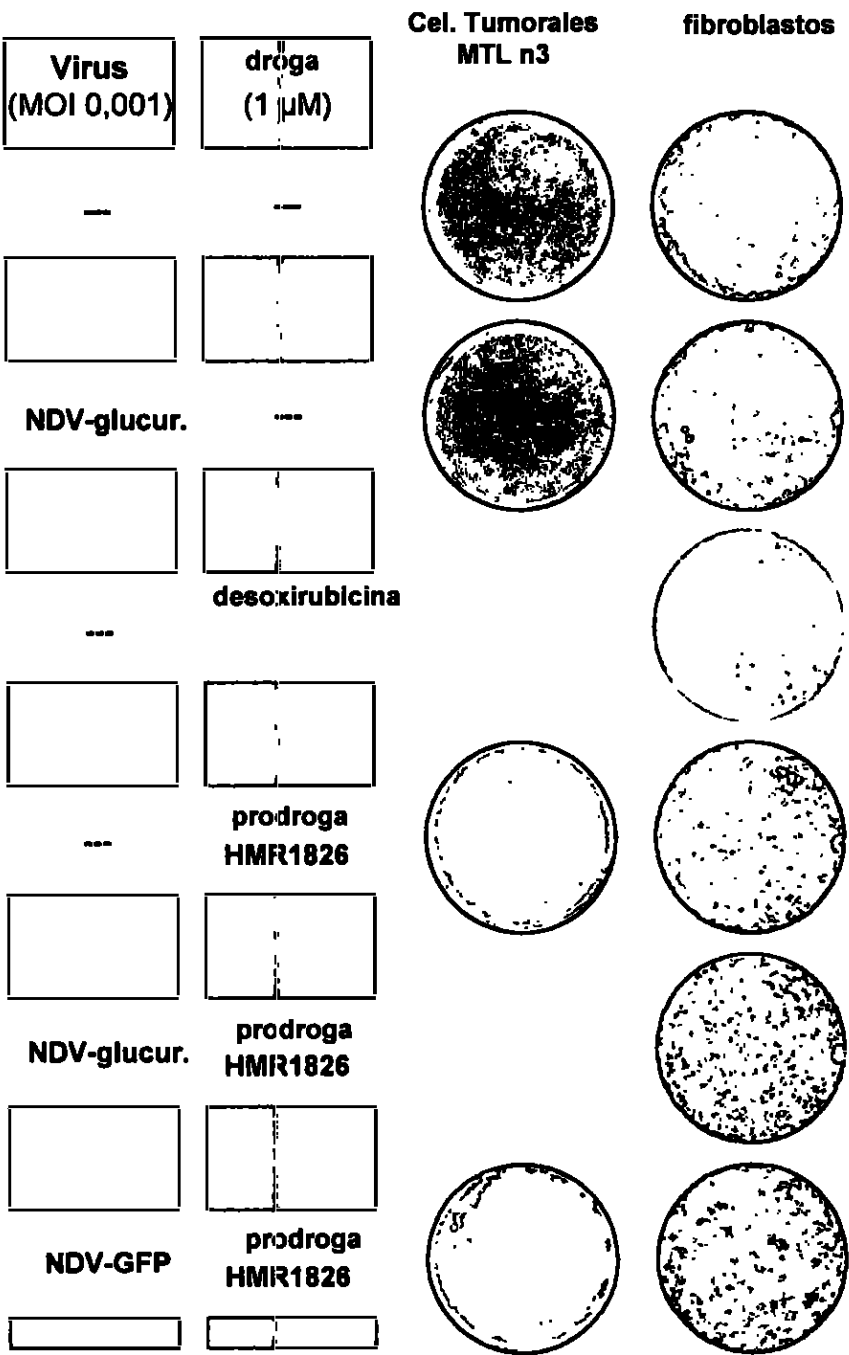
Fig. 8:



150

Fig. 9:

Células muertas sinérgicamente con NVD-beta-glucoronidasa y HMR1826 que no son resistentes a ninguno de los tratamientos solos



Tinción con Giemsa 6 d p.i.

11/11

Fig. 10:

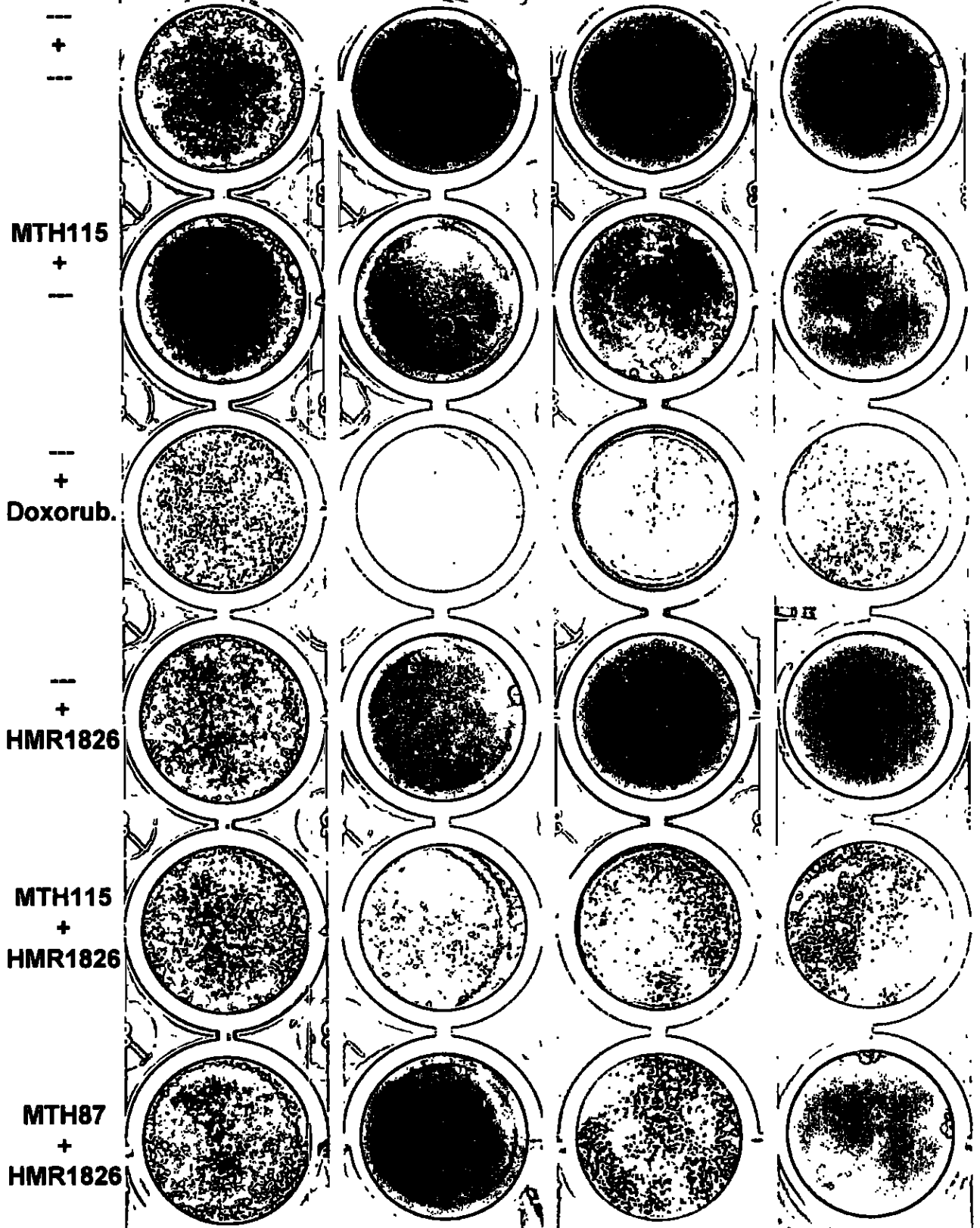
3×10^4
Fibroblasts
Fibroblastos

1×10^4
MTLn3

3×10^4
HaCaT

1×10^5
Du145

151



MOI 0,001, 6 d p.i.

152

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Schering AG

<120> Virus Recombinante de la Enfermedad de Newcastle

5 <130> 53277A

<150> EP04090432.8

<151> 2004-11-11

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1

<211> 52

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Sfi directo, Oligonucleótido de ADN

<400> 1

aggccttaat taaccgacaa cttaagaaaa aatacgggta gaacggcctg ag 52

<210> 2

20 <211> 52

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Sfi reverso, Oligonucleótido de ADN

25 <400> 2

153

aggccgttct acccgatattt tttcttaagt tgtcggtaa ttaaggcctc tc

52

<210> 3

<211> 60

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Asc directo, Oligonucleótido de ADN

<400> 3

10 cgggcgcgcc ccgacaactt aagaaaaaat acgggtagaa cagcagtcctt cagtcttaat

60

<210> 4

<211> 60

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Asc reverso, Oligonucleótido de ADN

<400> 4

taagactgaa gactgctgtt ctaccgcat tttttcttaa gttgtcgggg cgcgccgat

60

20

<210> 5

<211> 318

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

139

<223> Region intergénica entre F y HN del plásmido pflMTH68_Asc_Pac,
Oligonucleótido de ADN

<400> 5

	atgcagatga gaggcagagg tatccccaat agcaatctgt gtgtcaattc tggcagcctg	60
5	ttaatcagaa gaattaagaa aaaactaccg gatgtaggtg aacaaaaggg aatatacggg	120
	tagaacggcc tgagaggcct taatcgggcg cgcccgaca acttaagaaa aaatacgggt	180
	agaacagcag tcttcagtct taattaaccg acaacttaag aaaaaatacg ggtagaacgg	240
	cctgagagge caccctcaa tcgggagcca ggcccacta cgtccgctct accgcaacac	300
	caacagcagt cttcagtc	318

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

Notificación de registro de
una modificación

(regla PCT 92bis.1 e
Instrucciones Administrativas , sección 422)

A:

WEICKMANN & WEICKMANN
Postfach 860 820
81635 München
Alemania

Fecha de envío (día/mes/año): 21 de marzo de 2007 (21.03.2007)	
Referencia del solicitante o del agente: 53277AWO	NOTIFICACIÓN IMPORTANTE
Solicitud Internacional N°: PCT/EP2005/012186	Fecha de presentación (día/mes/año): 10 de noviembre de 2005 (02.09.2005)

1. Las siguientes indicaciones aparecen en los registros concernientes a:		
☒ el solicitante	☐ el inventor	☐ el agente
☐ el representante común		
Nombre y dirección: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT Müllerstrasse 178 13342 Berlin Alemania	Pais de Nacionalidad DE	Pais de Residencia DE
	Teléfono N°: +4930-468-12744	
	Facsimil N°: +4930-468-12058	
	Telex N°:	
2. La Oficina Internacional notifica por este medio al solicitante que se registró la siguiente modificación, concerniente a:		
☐ la persona	☒ el nombre	☐ el domicilio
☐ la nacionalidad	☐ la residencia	
Nombre y dirección: BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT Müllerstrasse 178 13342 Berlin ALEMANIA	Pais de Nacionalidad DE	Pais de Residencia DE
	Teléfono N°: +4930-468-12744	
	Facsimil N°: +4930-468-12058	
	Telex N°:	
3. Otras observaciones, si son necesarias:		
4. Se envía una copia de esta notificación a:		
☒ la Oficina receptora	☐ las Oficinas concernientes designadas	
☐ el Organismo de Búsqueda Internacional	☒ las Oficinas concernientes seleccionadas	
☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional	☒ otros: BAYER SCHERING PHARMA	

La Oficina Internacional de WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Suiza	Funcionario autorizado: Sanson Eric
Facsimil N°: (41-22) 338.82.70	Facsimil N° +41 22 338 70 80
Formulario PCT/IB/306 (octubre 2005)	Teléfono N°: +41 22 338 82 37

I/C7EV3WTRO

Copy for (OTHER)
PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP2005/012186

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 21 March 2007 (21.03.2007)	To: WEICKMANN & WEICKMANN Postfach 860 820 81635 München ALLEMAGNE ONBT	Patente / 2. April 2007 Bv/tv
Applicant's or agent's file reference 53277AWO	ON	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. V PCT/EP2005/012186	International filing date (day/month/year) V 10 November 2005 (10.11.2005)	

1 The following indications appeared on record concerning: ☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative		
Name and Address SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT Müllerstrasse 178 13342 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No. +49(030)468 12744	
	Facsimile No. +49(030)468 12058	
	Teleprinter No.	
2 The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: ☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence		
Name and Address BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT Müllerstrasse 178 13342 Berlin Germany	State of Nationality DE	State of Residence DE
	Telephone No. +49(030)468 12744	
	Facsimile No. +49(030)468 12058	
	Teleprinter No.	
3 Further observations, if necessary:		
4 A copy of this notification has been sent to: ☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned ☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned ☐ the International Preliminary Examining Authority ☒ other: BAYER SCHERING PHARMA		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Sanson Eric
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. +41 22 338 70 80 Telephone No. +41 22 338 82 37

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

157

PCT Notificación de registro de una modificación (regla PCT 92bis.1 e Instrucciones Administrativas , sección 422)		A: <i>WEICKMANN & WEICKMANN</i> <i>Postfach 860 820</i> <i>81635 Munich</i> <i>ALEMANIA</i>										
Fecha de envío (día/mes/año): <i>30 de noviembre de 2006 (30.11.2006)</i>												
Referencia del solicitante o del agente: <i>53277AWO</i>		NOTIFICACIÓN IMPORTANTE										
Solicitud Internacional N°: <i>PCT/EP 2005/012186</i>		Fecha de presentación (día/mes/año): <i>10 de noviembre de 2005 (10.11.2005)</i>										
1. Las siguientes indicaciones aparecen en los registros concernientes a: ☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común <table><tr><td rowspan="4">Nombre y dirección:</td><td>País de Nacionalidad</td><td>País de Residencia</td></tr><tr><td colspan="2">Teléfono N°:</td></tr><tr><td colspan="2">Facsimil N°:</td></tr><tr><td colspan="2">Telex N°:</td></tr></table>				Nombre y dirección:	País de Nacionalidad	País de Residencia	Teléfono N°:		Facsimil N°:		Telex N°:	
Nombre y dirección:	País de Nacionalidad	País de Residencia										
	Teléfono N°:											
	Facsimil N°:											
	Telex N°:											
2. La Oficina Internacional notifica por este medio al solicitante que se registró la siguiente modificación, concerniente a: ☒ la persona ☐ el nombre ☐ el domicilio ☐ la nacionalidad ☐ la residencia <table><tr><td rowspan="4">Nombre y dirección:</td><td>País de Nacionalidad</td><td>País de Residencia</td></tr><tr><td colspan="2">Teléfono N°:</td></tr><tr><td colspan="2">Facsimil N°:</td></tr><tr><td colspan="2">Telex N°:</td></tr></table>				Nombre y dirección:	País de Nacionalidad	País de Residencia	Teléfono N°:		Facsimil N°:		Telex N°:	
Nombre y dirección:	País de Nacionalidad	País de Residencia										
	Teléfono N°:											
	Facsimil N°:											
	Telex N°:											
3. Otras observaciones, si son necesarias: <i>La persona identificada en el campo 2 es registrada ahora como solicitante solo en los Estados Unidos de América y como inventor en todos los estados designados.</i>												
5. Se envía una copia de esta notificación a: <table><tr><td>☒ la Oficina receptora</td><td>☒ las Oficinas concernientes designadas</td></tr><tr><td>☐ el Organismo de Búsqueda Internacional</td><td>☐ las Oficinas concernientes seleccionadas</td></tr><tr><td>☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional</td><td>☐ otros:</td></tr></table>				☒ la Oficina receptora	☒ las Oficinas concernientes designadas	☐ el Organismo de Búsqueda Internacional	☐ las Oficinas concernientes seleccionadas	☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional	☐ otros:			
☒ la Oficina receptora	☒ las Oficinas concernientes designadas											
☐ el Organismo de Búsqueda Internacional	☐ las Oficinas concernientes seleccionadas											
☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional	☐ otros:											
La Oficina Internacional de WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Suiza Facsimil N°: (41-22) 338.82.70		Funcionario autorizado: <i>Saadallah Soumia</i> Facsimil N° +41-22 338 70 80 Teléfono N°: +41-22 338 84 21										

From the INTERNATIONAL BUREAU

158

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

WEICKMANN & WEICKMANN
Postfach 860 820
81635 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)
30 November 2006 (30.11.2006)

Applicant's or agent's file reference
53277AWO

International application No.
PCT/EP2005/012186

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)
10 November 2005 (10.11.2005)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person ☐ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

State of Nationality State of Residence

WILLUDA, Hans Jörg
Latanenstrasse 3
13156 Berlin
Germany

DE

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for the United States of America only and
inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☒ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☐ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Saadallah Soumia

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Telephone No. +41 22 338 84 21

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/306 (October 2005)

1/C2ISQLUF0

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

159

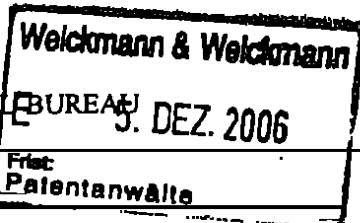
De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT Notificación de registro de una modificación (regla PCT 92bis.1 e Instrucciones Administrativas , sección 422)		A: WEICKMANN & WEICKMANN Postfach 860 820 81635 Munich ALEMANIA												
Fecha de envío (día/mes/año): 30 de noviembre de 2006 (30.11.2006)														
Referencia del solicitante o del agente: 53277AWO		NOTIFICACIÓN IMPORTANTE												
Solicitud Internacional N°: PCT/EP 2005/012186		Fecha de presentación (día/mes/año): 10 de noviembre de 2005 (10.11.2005)												
1. Las siguientes indicaciones aparecen en los registros concernientes a: ☒ el solicitante ☒ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común <table><tr><td rowspan="4">Nombre y dirección:</td><td>País de Nacionalidad</td><td>País de Residencia</td></tr><tr><td colspan="2">Teléfono N°:</td></tr><tr><td colspan="2">Facsimil N°:</td></tr><tr><td colspan="2">Telex N°:</td></tr></table>				Nombre y dirección:	País de Nacionalidad	País de Residencia	Teléfono N°:		Facsimil N°:		Telex N°:			
Nombre y dirección:	País de Nacionalidad	País de Residencia												
	Teléfono N°:													
	Facsimil N°:													
	Telex N°:													
2. La Oficina Internacional notifica por este medio al solicitante que se registró la siguiente modificación, concerniente a: ☒ la persona ☐ el nombre ☐ el domicilio ☐ la nacionalidad ☐ la residencia <table><tr><td rowspan="4">Nombre y dirección:</td><td>País de Nacionalidad</td><td>País de Residencia</td></tr><tr><td>DE</td><td>DE</td></tr><tr><td colspan="2">Teléfono N°:</td></tr><tr><td colspan="2">Facsimil N°:</td></tr><tr><td colspan="2">Telex N°:</td></tr></table>				Nombre y dirección:	País de Nacionalidad	País de Residencia	DE	DE	Teléfono N°:		Facsimil N°:		Telex N°:	
Nombre y dirección:	País de Nacionalidad	País de Residencia												
	DE	DE												
	Teléfono N°:													
	Facsimil N°:													
Telex N°:														
3. Otras observaciones, si son necesarias: La persona identificada en el campo 2 es registrada ahora como solicitante solo en los Estados Unidos de América y como inventor en todos los estados designados.														
4. Se envía una copia de esta notificación a: <table><tr><td>☒ la Oficina receptora</td><td>☒ las Oficinas concernientes designadas</td></tr><tr><td>☐ el Organismo de Búsqueda Internacional</td><td>☐ las Oficinas concernientes seleccionadas</td></tr><tr><td>☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional</td><td>☐ otros:</td></tr></table>				☒ la Oficina receptora	☒ las Oficinas concernientes designadas	☐ el Organismo de Búsqueda Internacional	☐ las Oficinas concernientes seleccionadas	☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional	☐ otros:					
☒ la Oficina receptora	☒ las Oficinas concernientes designadas													
☐ el Organismo de Búsqueda Internacional	☐ las Oficinas concernientes seleccionadas													
☐ el Organismo de Examen Preliminar Internacional	☐ otros:													
La Oficina Internacional de WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Suiza Facsimil N°: (41-22) 338.82.70		Funcionario autorizado: Saadallah Soumia Facsimil N° +41-22 338 70 80 Teléfono N°: +41-22 338 84 21												

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU



To:

WEICKMANN & WEICKMANN
Postfach 860 820
81635 München
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)

30 November 2006 (30.11.2006)

Applicant's or agent's file reference

53277AWO

International application No.

PCT/EP2005/012186

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)

10 November 2005 (10.11.2005)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant☒ the inventor☐ the agent☐ the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person☐ the name☐ the address☐ the nationality☐ the residence

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

OSSLET, Klaus

DE

DE

im Amseltal 57

13465 Berlin

Germany

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

The person identified in Box 2 should be added to the record as applicant for the United States of America only and inventor for all designated States.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office☐ the International Searching Authority☐ the International Preliminary Examining Authority☒ the designated Offices concerned☐ the elected Offices concerned☐ other:The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Saadallah Soumia

Facsimile No. +41 22 338 70 80

Telephone No. +41 22 338 84 21

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/306 (October 2005)

1/C21SOR300

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(Capítulo II del Tratado de Cooperación Internacional en Materia de Patentes)

(Artículo PCT 36 y regla PCT 70)

Referencia del Solicitante o Agente 36423P WO	PROCEDER Ver formulario PCT/IPEA/416)	
Referencia Internacional PCT/EP 2005/012186	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) 10.11.2005	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 12.11.2004
Clasificación Internacional de Patente (CIP) o Clasificación Nacional y CIP INV. A61K335/76, C07K14/115		
Solicitante SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al.		

1. Este informe se trata del Examen Preliminar Internacional, confeccionado por el organismo encargado del Examen Preliminar Internacional según el artículo 35 y enviado al solicitante según el artículo 36.

2. Este INFORME comprende, en total, 12 hojas, incluida esta carátula.

3. Además, este informe posee ANEXOS; los mismos comprenden:

a. ☒ (remitidos al solicitante y a la Oficina Internacional) en total 5 hojas; aquí se trata de:

☒ hojas con las descripciones, reivindicaciones, y/o ilustraciones que fueron modificadas y en las cuales se basó este informe y/u hojas con correcciones que aprobó el organismo (ver regla 70.16 y sector 607 de los reglamentos administrativos de PCT).

☐ hojas que reemplazan hojas anteriores pero que, según opinión del organismo, contienen una modificación por los motivos indicados en el campo N° 1, punto 4, superando el contenido revelado en la Solicitud Internacional en la versión presentada originalmente.

b. ☐ (remitidos solo a la Oficina Internacional) en total (rogamos indicar tipo y cantidad del (los) soporte(s) electrónico(s) que contiene(n), solo en forma legible por computadora, el (los) protocolo de secuencias y/o las tablas correspondientes tal como está indicado en el campo suplementario referido al protocolo de secuencias (ver sector 802 de las normas administrativas).

4. Este informe contiene indicaciones acerca de los siguientes puntos:

☒ Campo N° I Fundamento del informe

☐ Campo N° II Prioridad

☒ Campo N° III No realización de ningún dictamen sobre novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial

☐ Campo N° IV Falta de uniformidad de la invención

☒ Campo N° V Resolución fundada según regla PCT 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y aclaraciones destinadas a apoyar esta resolución.

☐ Campo N° VI Documentos específicos expuestos

☐ Campo N° VII Carencias específicas de la solicitud internacional

☐ Campo N° VIII Observaciones específicas a la solicitud internacional

Fecha de presentación de la solicitud 13.09.2006	Fecha de confección de este informe 26.02.2007
nombre y dirección postal del organismo encargado del examen preliminar internacional European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Holanda Tel. (+31-70) 340-2040; Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3018	Funcionario Apoderado Schulz, Regine Tel: +31 70 340-4381

Campo N° I Fundamento del Informe

1. Con respecto al idioma, el informe está basado sobre
 - ☒ la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada
 - ☐ una traducción del idioma original al siguiente idioma, el que se trata del idioma de la traducción suministrada a los siguientes efectos:
 - ☐ búsqueda internacional (según reglas 12.3 y 23.1 b))
 - ☐ publicación de la solicitud internacional (según regla 12.4(a))
 - ☐ examen preliminar internacional (según regla 55.2 y 55.3)
 2. Con respecto a los **elementos*** de la Solicitud Internacional, el informe se basa en *(las hojas de reemplazo que fueron presentadas al organismo como invitación según el artículo 14 son válidas como "presentadas originalmente" en el marco de este informe y no se adjuntan)*:

Descripción, páginas:

1-55 en la versión presentada originalmente

Listados de secuencias como parte de la descripción. páginas

1 – 2 en la versión presentada originalmente

Reivindicaciones, N°

1 – 28 recibidas el 13.09.2006 con escrito del 13.09.2006

Ilustraciones, hojas

1/11-11/11 en la versión presentada originalmente

 - ☒ un listado de secuencias y/o eventual(es) tabla(s) relacionada(s) – con respecto al protocolo de secuencias, ver campo adicional. - 3. ☒ Como consecuencia de las modificaciones caducaron los siguientes documentos:
 - ☐ Descripción: páginas
 - ☒ Reivindicaciones N°: 29, 30
 - ☐ Ilustraciones: hoja/figura
 - ☐ Listado de secuencias (*especificar*):
 - ☐ Eventual(es) tabla(s) perteneciente(s) al listado de secuencias (*especificar*):
 - 4. ☐ Este informe fue elaborado sin tomar en consideración (algunas de) las modificaciones adjuntas a este informe, dado que se considera que las mismas exceden el contenido revelado en el texto presentado originalmente (regla 70.2(c)), tal como se indica en el campo suplementario.
 - ☐ Descripción: páginas
 - ☐ Reivindicaciones N°:
 - ☐ Ilustraciones: hojas/figuras
 - ☐ Listado de secuencias (*especificar*):
 - ☐ Eventual(es) tabla(s) perteneciente(s) al listado de secuencias (*especificar*):
- * Cuando corresponde el punto 4, algunas o todas estas hojas pueden estar provistas de la observación "reemplazada".

163

Campo N° III No realización de ningún dictamen sobre novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial

Las cuestiones acerca de si la invención reivindicada parece ser novedosa, descansa en actividad inventiva (no obvio) o es aplicable industrialmente no ha sido examinada con respecto a:

- ☐ La solicitud internacional completa
- ☒ Reivindicaciones N° 18, 19, 25, 28 con respecto a la aplicabilidad industrial ,
porque:
- ☒ La solicitud internacional completa o las reivindicaciones N° 18, 19, 25, 28 mencionadas anteriormente se refieren al objeto siguiente, para el cual no es necesario efectuar un Examen Preliminar Internacional (*especificar*):

ver hoja adjunta

- ☐ la descripción, las reivindicaciones o las ilustraciones (*se ruega especificar detalladamente*) o las reivindicaciones N° mencionadas anteriormente son tan poco claras que no se pudo realizar ningún peritaje coherente (*especificar*):
- ☐ las reivindicaciones o las reivindicaciones N° mencionadas anteriormente están tan inadecuadamente apoyadas por la descripción que no se pudo realizar ningún peritaje coherente (*especificar*):
- ☒ no se realizó ningún Informe de Búsqueda Internacional para tales reivindicaciones N° 18, 19, 25, 28 con respecto a la aplicabilidad industrial
- ☐ no se pudo confeccionar un informe coherente sin el listado de secuencias; el solicitante, en el plazo prescrito:
 - ☐ no suministró sobre papel un listado de secuencias que cumpla con el estándar provisto para ello en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y tal listado no estaba disponible para el Organismo de Búsqueda Internacional en un formulario y manera aceptable.
 - ☐ no suministró en forma electrónica un listado de secuencias que cumpla con el estándar provisto para ello en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y tal listado no estaba disponible para el Organismo de Búsqueda Internacional en un formulario y manera aceptable.
 - ☐ no pagó la tasa requerida por la presentación tardía de un listado de secuencias en respuesta a una invitación según las reglas 13ter.1(a) o (b).
- ☐ no se pudo confeccionar un informe coherente sin las tablas relacionadas con el listado de secuencias; el solicitante no suministró en el plazo prescrito tales tablas en forma electrónica para cumplir con los requisitos técnicos provistos para ello en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y tal listado no estaba disponible para el Organismo de Búsqueda Internacional en un formulario y manera aceptable.
- ☐ las tablas relacionadas con el listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos, si están sólo en forma legible por computadora, no cumplen con los requerimientos técnicos provistos por el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ Para otras indicaciones, ver hoja adjunta

164

1. Resolución
- | | | | |
|-------------------------------|----|-------------------|---------------------|
| Novedad (N) | Sí | Reivindicaciones: | 1-28 |
| | No | Reivindicaciones: | |
| Actividad inventiva (IS) | Sí | Reivindicaciones: | |
| | No | Reivindicaciones: | 1-28 |
| Aplicabilidad industrial (IA) | Sí | Reivindicaciones: | 1-17, 20-24, 26, 27 |
| | No | Reivindicaciones: | 18, 19, 25, 28 |
2. Documentos y aclaraciones (regla 70.7):
- ver hoja adjunta

Campo Suplementario referente al Listado de Secuencias

165

Continuación del campo I, ítem 2

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos o aminoácidos revelados en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, este informe fue confeccionado sobre la base de:
 - a. tipo de material
 - ☒ un listado de secuencias
 - ☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencias
 - b. formato del material
 - ☒ en papel
 - ☒ en forma electrónica
 - c. momento de presentación/suministro
 - ☒ contenido en la solicitud internacional tal como fue presentada
 - ☐ presentada en forma electrónica con la solicitud internacional
 - ☒ suministrada posteriormente a este Organismo a los propósitos de búsqueda y/o examinación
 - ☐ recibido por este Organismo como enmienda* el
2. ☒ Habiéndose presentado más de una versión o copia de un protocolo de secuencias y/o la tabla correspondiente se deben presentar adicionalmente las declaraciones requeridas de que la información de las copias presentadas posteriormente o adicionales coincide con la versión original de la solicitud o que no la supera.
3. Comentarios adicionales:
- * *Si corresponde el ítem 4 del campo I, el listado y/o la(s) tabla(s) relacionadas con el mismo, que constituyen parte del fundamento del informe, deben ser marcadas con "reemplazado".*

166

Con respecto al ítem III

No formulación de un dictamen con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial

III.1 Las reivindicaciones 18, 19, 25 y 28 se refieren a objetos considerados por este Organismo cubiertos por las previsiones de la regla PCT 67.1(iv). En consecuencia, no se formula un dictamen con respecto a la aplicabilidad industrial del objeto de estas reivindicaciones (artículo PCT 34(4)(a)(I)).

Con respecto al ítem V

Declaración fundada con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; menciones y explicaciones que apoyan tal declaración

La presente solicitud se refiere a paramixovirus oncolíticos recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica para al menos un transgénico, es decir, una proteína de enlace, una enzima convertidora de prodroga, o una proteasa, que posee actividad terapéutica cuando está expresado por la célula tumoral infectada por el virus, así como a composiciones farmacéuticas tales como virus RNA oncolítico recombinante y su uso en la manufactura de un medicamento destinado al tratamiento del cáncer.

V.1 Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: Ebert, O. et al (2004) Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. Cancer Research. 64(9), 3265 - 3270

D2: Porosnicu, M.(2003) The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene. Cancer Research 63(23), 8366 - 8376

D3: Ries, S J and Brandts, C. H. (2004) Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials. DDT 9(17), 759 - 768,

V.1.1 El documento D4 no fue mencionado en el informe de búsqueda internacional. Se adjunta una copia del documento al presente.

D4: Huang, Zhihui et al.: (2004) A recombinant newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. J. Virol. 78(18), 10054 - 10063.

V.2 Enmiendas (artículo PCT 34(2))

V.2.1 Las enmiendas presentadas con el escrito fechado el 13.06.2006 no introduce ningún objeto que se extiende más allá del contenido de la solicitud tal como fue presentada y, en consecuencia, está de acuerdo con el artículo PCT 34(2).

V.3 Novedad (artículo PCT 34(1)(2))

V.3.1 D3 da a conocer "un paramixovirus oncolítico recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica para al menos un transgénico, donde el ácido nucleico de este(os) transgénico(s) codifica para una proteína de enlace", es decir, un paramixovirus new castle recombinante (NDV) que expresa proteína VP2 de virus infeccioso de enfermedad bursal (IBDV). "La vacunación con el virus recombinante induce fuertes respuestas inmunes humorales frente a ambos VDV y IBDV y confiere una protección completa contra los dos virus luego de una inmunización secundaria (pp. 10055, columna izquierda), 4º párrafo)".

167

- V.3.2 Dado el hecho de que "un paramixovirus oncolítico recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica para al menos un transgénico, donde el ácido nucleico de este(os) transgénico(s) codifica para una proteína de enlace", es conocido por medio de D4 y ante el hecho de que la reivindicación 1 carece de claridad en el sentido del artículo PCT 6, los objetos de las reivindicaciones 1-19 no pueden considerados como novedosos en el sentido del artículo PCT 33(1)(2).
- V.3.2.1 Al presente, el transgénico de la reivindicación 1 que codifica para una proteína de enlace está definido funcionalmente haciendo referencia al resultado a obtener sobre su expresión, a saber, "una actividad terapéutica cuando es expresado por células tumorales infectadas por el virus". A la vista del estado de la técnica, esto es, es conocido que el paramixovirus (NDV) posee inherente una selectividad a tumores (D3: pp. 759, columna derecha, último párrafo) y ya ha sido utilizado en estudios clínicos para el tratamiento de cáncer (D3: tabla 1, pp. 760), el objeto de la reivindicación 1 debe ser definido en términos más concretos, esto es, haciendo referencia a las realizaciones (Ejemplos 6-9), a los fines de permitir al experto distinguir el paramixovirus oncolítico recombinante de aquellos conocidos en el estado de la técnica
- V.3.2.1 No obstante, incluso en el caso de reconocimiento de novedad, las reivindicaciones 1-19 no cumplen los requisitos del PCT, dado que están consideradas como carentes de actividad inventiva en el sentido del artículo PCT 33(2)(3).
- V.4 Actividad inventiva (artículo PCT 33(2)(3))
- V.4.1 La presente solicitud no cumple los criterios del artículo PCT 33(1), porque el objeto de las reivindicaciones 1-19 no involucra una actividad inventiva en el sentido del artículo PCT 33 (3):
- V.4.2 El documento D4 es considerado como el estado de la técnica más cercano al objeto de la reivindicación 1, y da a conocer "un paramixovirus oncolítico recombinante que comprende un ácido nucleico que codifica para al menos un transgénico, donde el ácido nucleico de este(os) transgénico(s) codifica para una proteína de enlace", esto es, un NDV recombinante expresando una proteína VP2 IBDV.
- V.4.3 El objeto de la reivindicación 1 difiere de este paramixovirus recombinante conocido con respecto al transgénico, esto es, la proteína de enlace referida en la reivindicación 1 "posee una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada por el virus", donde aquella de D4 "induce fuertes respuestas inmunes humorales frente a ambos VDV y IBDV y confiere una protección completa contra los dos virus luego de una inmunización secundaria" (pp. 10055, columna izquierda), 4º párrafo".
- V.4.4 El problema a resolver por la presente invención puede ser considerado como la provisión de un paramixovirus oncolítico recombinante para uso terapéutico, o sea, para el tratamiento de cáncer.
- V.4.5 La solución propuesta por la reivindicación 1 de la presente solicitud no puede ser considerada como involucrando una actividad inventiva en el sentido del artículo PCT 33(3) por las siguientes razones:

168

- V.4.5.1 Los autores de D4 ya consideran el uso de NDV en el tratamiento de cáncer y terapia genética (pp. 10032, columna derecha, último párrafo). Adicionalmente es conocido en el estado de la técnica que el NDV tanto posee una selectividad inherente a tumores (D3: pp. 759, columna derecha, último párrafo) como ya ha sido usado en estudios clínicos y preclínicos (D3: tabla 1, pp. 760). Por ello, debido al hecho de que D1 revela "un virus RNA oncolítico recombinante que comprende al menos un transgénico, donde el ácido nucleico de este(os) transgénico(s) codifican para una proteína de enlace que posee una actividad terapéutica cuando está expresada por la célula tumoral infectada por el virus", o sea, un VSV recombinante que expresa una proteína mutante (L289A) F de NDV, o sea, la proteína F o proteína de fusión requerida para la fusión de membrana (fig. 1, fig. 6), que posee una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada por el virus, es decir, la expresión con la que accede a propiedades oncolíticas mejoradas frente al carcinoma hepatocelular multifocal (HCC) en el hígado de ratas inmunocompetentes, el experto está considerado como suficientemente capaz de seleccionar una proteína de enlace apropiada e insertar el respectivo ácido nucleico que codifica para ello en un paramixovirus oncolítico, o sea, NDV, arribando así al objeto de la reivindicación 1 sin necesidad de ejercitar su actividad inventiva.
- V.4.5.2 El razonamiento se aplica al objeto de las reivindicaciones 11-13 y 15-18.
- V.4.5.3 Las reivindicaciones dependientes 2-10, 14 y 19 no contienen características que, combinadas con las características de cualquier reivindicación a la que se refiera, cumplan los requisitos del PCT en lo referente a la novedad y/o la actividad inventiva, ya que las respectivas características aparentan ser de conocimiento técnico general y/o de práctica normal en el estado de la técnica, de manera que el experto puede considerar su selección como una selección de avanzada que no requiere ninguna actividad inventiva.
- V.4.6 Básicamente por las mismas razones, el objeto de la reivindicación 20 no puede ser considerado como inventivo frente al estado de la técnica.
- V.4.6.1 El documento D2 es considerado como el estado de la técnica más cercano al objeto de la reivindicación 20, y da a conocer un virus RNA oncolítico recombinante que comprende un transgénico que codifica para una enzima convertidora de prodroga que posee actividad terapéutica es expresada por la célula tumoral infectada por el virus es decir, para la expresión del gen suicida de fusión E. coli citosina deaminasa (CD) / fosforibosil transferasa (UPRT) – un sistema de enzimas prodroga bien caracterizado que funciona similarmente al paradigma de herpesvirus TK". Se comprobó que la inserción del gen de fusión CD / UPRT potencia la eficiencia oncolítica del VSV. Se genera un fuerte efecto colateral que contribuye a la activación del sistema inmune general frente al tumor sin alterar negativamente la cinética de la oncolisis mediada por el virus. Se discute la utilidad del virus en el tratamiento de enfermedades malignas.
- V.4.6.2 El objeto de la reivindicación 20 difiere de este virus RNA oncolítico recombinante conocido en que se refiere a "un paraximovirus oncolítico recombinante que comprende un ácido nucleico con al menos un transgénico, donde el ácido nucleico de este(os) transgénico(s) codifican para una enzima convertidora de prodroga que posee actividad terapéutica cuando está expresada por la célula tumoral infectada por el virus.
- V.4.6.3 El problema a resolver por la presente invención puede entonces ser considerado como la provisión de otro virus RNA oncolítico recombinante para uso terapéutico, o sea, para el tratamiento de cáncer.

169

- V.4.6.4 La solución propuesta por la presente solicitud no puede ser considerada como involucrando una actividad inventiva en el sentido del artículo PCT 33(3) por las siguientes razones:
- V.4.6.5 Como se declaró anteriormente, tanto el NDV como el VSV poseen inherentes una selectividad de tumores y ya han sido utilizados en estudios clínicos y preclínicos (D3: pp. 759, columna derecha, último párrafo, pp. 760, tabla 1)
El experto es considerado como combinando las revelaciones de D4 y D3, arribando así a los paramixovirus de la reivindicación 20. En consecuencia, no se puede reconocer actividad inventiva en el sentido del artículo PCT 33(1)(3) para el objeto de la mencionada reivindicación.
- V.4.7 Además, se aplican los mismos razonamientos al objeto de la reivindicación 21:
- V.4.7.1 El objeto de la reivindicación 21 difiere del del estado de la técnica más cercano (D4) en lo referente al transgénico, esto es, haciendo referencia a "una proteasa que posee actividad terapéutica cuando está expresada por la célula tumoral infectada por el virus".
- V.4.7.2 El problema a resolver puede ser considerado entonces como la provisión de otro paramixovirus recombinante que comprende al menos un transgénico que codifica para una proteína que posee una actividad cuando está expresada por la célula tumoral infectada por el virus.
- V.4.7.2 No obstante, ante el hecho de que el concepto "virus armados terapéuticamente" está bien establecido en el estado de la técnica (D3), el experto parece ser suficientemente capaz de seleccionar otros transgénicos, por ejemplo, una proteasa que posea un efecto beneficioso en la célula tumoral infectada. En consecuencia, él/ella puede arribar a la solución propuesta por la reivindicación 23 sin ejercitar ninguna actividad inventiva. Por ello, el objeto de la reivindicación 23 no puede ser considerado como cumpliendo los requisitos del artículo PCT 33(1)(3).
- V.4.8 Ninguno de los documentos da a conocer o provee algún incentivo para la generación de las composiciones farmacéuticas mencionadas en las reivindicaciones 22 y 26, y el objeto de tales reivindicaciones puede, en principio, aparecer como comprendiendo una actividad inventiva. No obstante, dado que la presente solicitud no da a conocer ninguna de estas composiciones farmacéuticas, el objeto de las reivindicaciones 24, 26 y 27 no puede ser considerado como una solución de un problema técnico y, en consecuencia, no cumple los requisitos del artículo PCT 33(1)(3).
- V.4.8.1 El mismo razonamiento se aplica a los objetos de las reivindicaciones 25 y 28.
- V.5 **Aplicabilidad Industrial (artículo PCT 33(1))**
- V.5.1 Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 18, 19, 25 y 28 acerca de la cuestión de si son aplicables industrialmente no existe un criterio unificado en los estados dignatarios del PCT. La patentabilidad puede depender entonces de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable el objeto de reivindicaciones destinado el uso de un compuesto en tratamientos medicinales, pero permite, no obstante, reivindicaciones de un compuesto novedoso para un primer uso en tratamientos medicinales y el uso de un compuesto de tal tipo en la manufactura de un medicamento destinado a un nuevo tratamiento medicinal.

170

Solicitud de Patente Internacional PCT/EP2005/O 12186**Reivindicaciones 1-28**

1. Un paramixovirus oncolítico recombinante que comprende un ácido nucleico con al menos un transgen, en donde el ácido nucleico de este transgen(es) codifica para una proteína de unión que tiene una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus.

2. El virus de la reivindicación 1, que es un virus de la Enfermedad de Newcastle (VEN).

3. El virus de la reivindicación 2 que es un VEN no lentogénico, por ejemplo un VEN mesogénico o velogénico, en particular la cepa mesogénica MTH68.

4. El virus de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en donde la proteína de unión pertenece al siguiente grupo: un ligando natural o un ligando modificado genéticamente, un dominio soluble recombinante de un receptor natural o una versión modificada del mismo, un ligando de péptido o polipéptido, una molécula de anticuerpo o un fragmento o un derivado del mismo o una molécula similar a anticuerpo como una proteína de repeticiones de anquirina o un fragmento o derivados de los mismos.

5. El virus de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en donde la proteína de unión es de mamífero, por ejemplo humana, murina o de origen

171

cercanamente relacionado o una proteína quimérica.

6. El virus de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la proteína de unión es una proteína monomérica, dimérica, trimérica, tetramérica o multimérica.

7. El virus de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la proteína de unión es monoespecífica, biespecífica o multiespecífica.

8. El virus de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la proteína de unión es una proteína de fusión que comprende al menos un dominio de unión y un dominio heterólogo.

9. El virus de acuerdo a la reivindicación 8 en donde la proteína de unión es una proteína de fusión con una toxina tal como ARNasa humana (exotoxina de pseudomonas, toxina de Diphtheria), o una proteína de fusión con una enzima como betaglucuronidasa, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, carboxipeptidasa, beta-lactamasa o una proteína de fusión con una proteína estimuladora del sistema inmune con actividad citoquina como IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN-beta o GM-CSF.

10. El virus de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde la proteína de unión se selecciona del siguiente grupo: proteínas bloqueantes de receptores de factor de crecimiento activo autónomo (por

172
172

ejemplo EGFR, Met), factores competitivos para factores de crecimiento (antagonistas), proteínas bloqueantes para fosforilación de Rb, proteínas bloqueantes para transcripción dependiente de E2F; estabilizantes para p53; factores antagonistas para proteínas anti-apoptóticas (por ejemplo BcL-2); factores antagonistas para ciclinas; factores antagonistas para factores Ras (por ejemplo GEF5); factores antagonistas para proteínas inducidas por hipoxia (por ejemplo HiEla); inhibidores de factores de transcripción que interfieren con la dimerización o unión al DNA o unión al cofactor (por ejemplo Myc/Max); inductores de diferenciación; inhibidores de señalización/translocación de smad; inhibidores de interacciones de adhesión celular (cadherinas, integrinas, por ejemplo $\beta\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$); inhibidores de enzimas que degradan la matriz extracelular (por ejemplo MMP5); factores antagonistas para ligandos pro-angiogénicos (por ejemplo VEGF-R soluble); factores antagonistas de receptores pro-angiogénicos; inhibidores de formación de complejos de plegado (por ejemplo KSR/Ras); inhibidores de inicio de traducción (por ejemplo eIF4E, EIF2a); inhibidores de quinasas mitóticas (por ejemplo PIK-1).

11. Una nucleocápside de un paramixovirus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

12. Un genoma de un paramixovirus oncolítico

173

recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

13. Una molécula de ADN que codifica el genoma y/o antígenoma de un paramixovirus oncolítico recombinante de cualquiera de la reivindicación 1-10.

14. La molécula de ADN de la reivindicación 13 ligada en forma operable a una secuencia de control de la transcripción.

15. Una célula que comprende un paramixovirus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, un genoma viral de la reivindicación 12 o una molécula de ADN de la reivindicación 13 o 14.

16. Una composición farmacéutica que comprende un paramixovirus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, un genoma viral de la reivindicación 12 o una molécula de ADN de la reivindicación 13 o 14 como ingrediente activo opcionalmente junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para su uso farmacéutico.

17. La composición farmacéutica de la reivindicación 16 para la prevención y/o tratamiento de cáncer.

18. Un método para la prevención y/o tratamiento de cáncer que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad farmacéuticamente efectiva de una composición de la reivindicación 16 o 17.

19. El método de la reivindicación 18 en donde el

174

sujeto es un paciente humano.

20. Un paramixovirus oncolítico recombinante que comprende un ácido nucleico con al menos un transgen, en donde el ácido nucleico de este transgen(es) codifica para una enzima convertidora de pro-droga que tiene una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada con virus.

21. Un paramixovirus oncolítico recombinante que comprende un ácido nucleico con al menos un transgen, en donde el ácido nucleico de este transgen(es) codifica para una proteasa que tiene una actividad terapéutica cuando se expresa en la célula tumoral infectada con virus.

22. Una composición farmacéutica que comprende un virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un genoma viral de la reivindicación 12, y/o una molécula de ADN de las reivindicaciones 13 o 14 como ingrediente activo opcionalmente junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para su uso farmacéutico, en donde el virus, genoma viral y/o molécula de ADN comprende al menos un transgen que codifica para una enzima convertidora de pro-droga.

23. La composición farmacéutica de la reivindicación 22 que además comprende una pro-droga que se puede convertir en un compuesto terapéuticamente activo mediante la enzima

175

convertidora de pro-droga codificada por el virus, genoma viral y/o molécula de ADN de la reivindicación 22.

24. La composición farmacéutica de la reivindicación 22 o 23 para tratamiento y/o mejora de un desorden proliferativo.

25. Un método para tratamiento de una enfermedad proliferativa, que comprende administrar en una cantidad farmacéuticamente efectiva, a un sujeto que lo necesite

(a) un virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un genoma viral de la reivindicación 12, y/o una molécula de ADN de las reivindicaciones 13 o 14 que comprende al menos un transgen que codifica para una enzima convertidora de pro-droga, y

(b) una pro-droga apropiada para tratamiento de la enfermedad proliferativa, en donde la pro-droga se puede convertir en un compuesto farmacéuticamente activo mediante la enzima convertidora de pro-droga de (a).

26. Una composición farmacéutica que comprende un virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un genoma viral de la reivindicación 12, y/o una molécula de ADN de las reivindicaciones 14 o 15 como ingrediente activo opcionalmente junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes aceptables para su uso farmacéutico, en donde el virus, genoma viral y/o molécula de ADN comprende al menos un

176

transgen que codifica para una proteasa.

27. La composición farmacéutica de la reivindicación 26 para tratamiento y/o mejora de un desorden proliferativo.

28. Un método para tratamiento de una enfermedad proliferativa, que comprende administrar, en una cantidad farmacéuticamente efectiva, a un sujeto que lo necesite, un virus oncolítico recombinante de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un genoma viral de la reivindicación 12, y/o una molécula de ADN de las reivindicaciones 13 o 14 que comprende al menos un transgen que codifica para una proteasa.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

177

Applicant's or agent's file reference 36423P WO	FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEA/416	
International application No. PCT/EP2005/012186	International filing date (day/month/year) 10.11.2005	Priority date (day/month/year) 12.11.2004
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K35/76 C07K14/115		
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 12 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau) a total of 5 sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in Item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 13.09.2006	Date of completion of this report 26.02.2007	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3016	Authorized officer: Schulz, Regine Telephone No. +31 70 340-4381 	

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on (*replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report*):

Description, Pages

1-55 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1, 2 as originally filed

Claims, Numbers

1-28 received on 13.09.2006 with letter of 13.09.2006

Drawings, Sheets

1/11-11/11 as originally filed

- ☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☒ the claims, Nos. 29, 30
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing (*specify*):
- ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

178

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 18, 19, 25, 28 with regard to industrial applicability (IA)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 18, 19, 25, 28 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
- see separate sheet**
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 18, 19, 25, 28 with regard to IA
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1 - 28
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1 - 28
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1 - 17, 20 - 24, 26, 27
	No: Claims	18, 19, 25, 28

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2005/012186

129

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

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

a. type of material:

- ☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material:

- ☒ on paper
☒ in electronic form

c. time of filing/furnishing:

- ☒ contained in the international application as filed
☐ filed together with the international application in electronic form
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination
☐ received by this Authority as an amendment* on

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

3. Additional comments:

* If item 4 in Box No. 1 applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded."

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

III.1 Claims 18, 19, 25 and 28 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Art. 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

The present application relates to recombinant oncolytic paramyxoviruses comprising a nucleic acid coding for at least one transgene, e. a binding protein, a prodrug-converting enzyme or a protease having a therapeutic activity when expressed by the virus infected tumor cell as well as a pharmaceutical compositions such a recombinant oncolytic RNA virus and its use for the manufacture of a medicament for the treatment of cancer.

V.1 Reference is made to the following document:

D1: Ebert, O. et al. (2004) Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. Cancer Research 64(9), 3265 - 3270.

D2: Porosnicu, M. (2003) The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene. Cancer Research 63(23), 8366 - 8376.

D3: Ries, S. J. and Brandts, C. H. (2004) Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials. DDT 9(17), 759 - 768.

V.1.1 The document D4 was not cited in the international search report. A copy of the document is appended hereto.

D4: Huang, Zhuhui et al. (2004) A recombinant newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. J. Virol. 78(18), 10054 - 10063.

V.2 Amendments (Art. 34(2) PCT)

V.2.1 The amendments filed with the letter dated 13.09.2006 do not introduce any subject-matter which extends beyond the content of the application as filed and are thus in agreement with Art. 34(2) PCT.

V.3 Novelty (Art. 33(1)(2) PCT)

V.3.1 D4 discloses "a recombinant oncolytic paramyxovirus comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a binding protein", i.e. a recombinant new castle virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV). "Vaccination with the recombinant virus induced strong humoral immune responses against both VDV and IBDV and conferred complete protection against both viruses after secondary immunization (p. 10055, left-hand side column, 4th para)".

V.3.2 Given the fact that "a recombinant oncolytic paramyxovirus comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a binding protein" is known from D4 and due to the fact that claim 1 lacks clarity in the sense of Art. 6 PCT, subject-matter of claims 1 - 19 cannot be considered as novel in the sense of Art. 33(1)(2) PCT.

V.3.2.1 At present the transgene of claim 1 coding for a binding protein is functionally defined by referring to the result to be achieved upon its expression, namely "a therapeutic activity when expressed by virus-infected tumor cells". In view of the state of the art, i.e. paramyxovirus (NDV) known to possess inherent tumor-selectivity (D3: p. 759, right-hand side column, last para) and having already been used in clinical studies for the treatment of cancer (D3: Table 1, p. 760), the subject-matter of claim 1 needs to be defined in more concrete terms, i.e. by referring to the embodiments (Ex. 6 - 9) in order to enable the skilled person to

distinguish the recombinant oncolytic paramyxovirus from the ones known in the art.

- V.3.2.2 However, even in case novelty were to be acknowledge, claims 1 - 19 do not meet the requirements of the PCT, since they are considered as lacking an inventive step in the sense of Art. 33(1)(3) PCT as outlined below.

V.4 Inventive step (Art. 33(2)(3) PCT)

- V.4.1 The present application does not meet the criteria of Art. 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1 - 19 does not involve an inventive step in the sense of Art. 33(3) PCT:
- V.4.2 The document D4 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claim 1, and discloses "a recombinant oncolytic paramyxovirus comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a binding protein", i.e. a recombinant NDV expressing IBDV VP2 protein.
- V.4.3 The subject-matter of claim 1 differs from this known recombinant paramyxovirus with regard to the transgene, i.e. the binding protein referred to in claim 1 "has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell" whereas the one of D4 "induced strong humoral immune responses against NDV and IBDV and conferred complete protection against both viruses after secondary immunisation" (p. 10055, left-hand side column, 4th para).
- V.4.4 The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of a recombinant oncolytic paramyxovirus for therapeutic use, i.e. for the treatment of cancer.
- V.4.5 The solution proposed in claim 1 of the present application cannot be considered as involving an inventive step in the sense of Art. 33(3) PCT for the following reasons:

- V.4.5.1 D4's authors already consider the use of the recombinant NDV in cancer treatment and gene therapy (p. 10062, right-hand side column, last para). In addition, it is known in the art that NDV as well as vesicular stomatitis virus (VSV) possess inherent tumor-selectivity (D3: p. 759, right-hand side column, last para) and have already been used in clinical and preclinical studies (D3: Table 1, p. 760). Therefore, due to the fact that D1 already discloses "a recombinant oncolytic RNA virus comprising at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a binding protein that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell", i.e. a recombinant VSV expressing a mutant (L289A) F protein from NDV, i.e. the F protein or fusion protein that is required for membrane fusion (Fig. 1, Fig. 6) that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell, i.e. the expression of which led to enhanced oncolytic properties against multifocal hepatocellular carcinoma (HCC) in the livers of immunocompetent rats, the skilled person is considered as sufficiently enabled to choose an appropriate binding protein and insert the respective nucleic acid coding for it into an oncolytic paramyxovirus, i.e. NDV thereby arriving at the subject-matter of claims 1 without having to exercise his / her inventive activity.
- V.4.5.2 The same reasoning applies to subject-matter of claims 11 - 13 and 15 - 18.
- V.4.5.3 Dependent claims 2 - 10, 14 and 19 do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT in respect of novelty and/or inventive step since the respective features appear to be of general technical knowledge and/or of standard practice in the art, so that the skilled person would regard their choice as a straightforward choice not requiring any inventive activity.
- V.4.6 Basically for the same reasons, subject-matter of claim 20 cannot be considered as inventive over the prior art:
- V.4.6.1 The document D2 is regarded as being the closest prior art to the subject-matter of claim 20, and discloses a recombinant oncolytic RNA virus comprising a transgene coding for a prodrug-converting enzyme having therapeutic activity when

expressed by the virus-infected tumor cell, i.e. a recombinant VSV for the expression of the fusion suicide gene *E. coli* cytosine deaminase (CD)/uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) - a well-characterised enzyme prodrug system that functions similar to the herpesvirus TK paradigm. The insertion of the fusion CD/UPRT gene was found to potentiate the oncolytic efficiency of VSV. A strong bystander effect was generated that contributed to the activation of the immune system against the tumour without detrimentally altering the kinetics of the virus-mediated oncolysis. The virus' usefulness for the treatment of malignant diseases is discussed.

V.4.6.2 The subject-matter of claim 20 differs from this known recombinant oncolytic RNA virus in that it refers to "a recombinant oncolytic **paramyxovirus** comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a prodrug-converting enzyme that has a therapeutic activity when expressed by the infected tumour cell".

V.4.6.3 The problem to be solved by the present invention may therefore be regarded as the provision of another recombinant oncolytic RNA virus for therapeutic use, i.e. for the treatment of cancer.

V.4.6.4 The solution proposed in claim 20 of the present application cannot be considered as involving an inventive step in the sense of Art. 33(3) PCT) for the following reasons:

V.4.6.5 As stated above, NDV as well as VSV possess inherent tumor-selectivity and have already been used in clinical and preclinical studies (D3: p. 759, right-hand side column, last para; Table 1, p. 760).

The skilled person is therefore considered to combine D4's and D2's disclosures, thereby arriving at the recombinant oncolytic paramyxovirus of claim 20. Consequently, no inventive step in the sense of Art. 33(1)(3) PCT can be acknowledged for subject-matter of said claim.

V.4.7 Moreover, the same reasons apply for the subject-matter of claim 21:

- V.4.7.1 Subject-matter of claim 21 differs from the closest prior art (D4) with regard to the transgene, i.e. referring to "a protease that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell".
- V.4.7.2 The problem to be solved may therefore be regarded as the provision of a further recombinant paramyxovirus comprising at least one transgene coding for a protein having a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.
- V.4.7.2 However, given the fact that the concept of "armed therapeutic viruses" is well established in the art (D3), the skilled person appears sufficiently enabled to choose another transgene, e.g. a protease having a beneficial effect in the virus-infected tumour cell. Consequently, he/she would arrive at the solution provided by claim 23 without the exercise of any inventive activity. Subject-matter of claim 23 therefore cannot be considered as meeting the requirements of Art. 33(1)(3) PCT.
- V.4.8 None of the documents neither discloses nor provides any incentive for the generation of the pharmaceutical compositions referred to in claims 22 and 26, the subject-matter of said claims might in principle appear as comprising an inventive step. However, since the present application does not disclose any such pharmaceutical composition either, subject-matter of claims 24, 26 and 27 cannot be considered as a solution of a technical problem and consequently does not meet the requirements of Art. 33(1)(3) PCT.
- V.4.8.1 The same reasoning applies for subject-matter of claims 25 and 28.

V.5 Industrial applicability (Art. 33(1) PCT)

- V.5.1 For the assessment of the present claims 18, 19, 25 and 28 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new.

medical treatment.



International Patent Application PCT/EP2005/012186
36423P WO/WWDIkd

Claims 1-28

1. A recombinant oncolytic paramyxovirus comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a binding protein that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.
2. The virus of claim 1, which is a Newcastle disease virus (NDV).
3. The virus of claim 2 which is a non-lentogenic NDV, e.g. a mesogenic or velogenic NDV, in particular the mesogenic strain MTH68.
4. The virus according to any one of claims 1-3 wherein the binding protein belongs to the following group: a natural ligand or a genetically modified ligand, a recombinant soluble domain of a natural receptor or a modified version of it, a peptide- or polypeptide-ligand, an antibody molecule or a fragment or a derivative thereof or an antibody-like molecule like an ankyrin-repeat protein or a fragment or derivatives thereof.
5. The virus according to any one of claims 1-4 wherein the binding protein is of mammalian, e.g. human, murine or closely related origin or a chimeric protein.
6. The virus according to any of the preceding claims wherein the binding protein is a monomeric, dimeric, trimeric, tetrameric or multimeric protein.

7. The virus according to any one of the preceding claims wherein the binding protein is monospecific, bispecific or multispecific.
8. The virus according to any one of the preceding claims wherein the binding protein is a fusion protein comprising at least one binding domain and a heterologous domain.
9. The virus according to claim 8 wherein the binding protein is a fusion protein with a toxin such as human RNase (pseudomonas exotoxin, Diphtheria toxin), or a fusion protein with an enzyme like beta-glucuronidase, beta-galactosidase, beta-glucosidase, carboxypeptidase, beta-lactamase or a fusion protein with an immune-stimulatory protein with cytokine activity like IL-2, IL-12, TNF-alpha, IFN-beta or GM-CSF.
10. The virus according to any one of the preceding claims wherein the binding protein is selected from the following group: blocking proteins of autonomous active growth factor receptors (eg. EGFR, Met), competitive binders for growth factors (antagonists), blocking proteins for Rb-phosphorylation, blocking proteins for E2F-dependent transcription; stabilizers for p53; antagonistic binders for antiapoptotic proteins (eg. Bcl-2); antagonistic binders for cyclins; antagonistic binders for Ras effectors (eg. GEFs); antagonistic binders for hypoxia induced proteins (eg. HIF1 α); inhibitors of transcription factors that interfere with dimerization or DNA-binding or cofactor binding (eg. Myc/Max); inducers of differentiation; inhibitors of smad signalling/translocation; inhibitors of cellular adhesion interactions (cadherins, integrins, eg. $\beta\alpha5\beta1$, $\alpha\beta3$); inhibitors of enzymes that degrade the extracellular matrix (eg. MMPs); antagonistic binders for proangiogenic ligands (eg. soluble VEGF-R); antagonistic binders to proangiogenic receptors; inhibitors of scaffold complex formation (eg. KSR/Ras); inhibitors of translation initiation (eg. eIF4E, EIF2a); inhibitors of mitotic kinases (eg. Plk-1).
11. A nucleocapsid of a recombinant oncolytic paramyxovirus of any one of

claims 1-10.

12. A genome of a recombinant oncolytic paramyxovirus of any one of claims 1-10.
13. A DNA molecule encoding the genome and/or antigenome of a recombinant oncolytic paramyxovirus of any one of claim 1-10.
14. The DNA molecule of claim 13 operatively linked to a transcriptional control sequence.
15. A cell comprising a recombinant oncolytic paramyxovirus of any one of claims 1-10, a virus genome of claims 12 or a DNA molecule of claim 13 or 14.
16. A pharmaceutical composition comprising a recombinant oncolytic paramyxovirus of any one of claims 1-10, a virus genome of claims 12 or a DNA molecule of claim 13 or 14 as an active ingredient optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants.
17. The pharmaceutical composition of claim 16 for the prevention and/or treatment of cancer.
18. A method for the prevention and/or treatment of cancer comprising administering a subject in need thereof a pharmaceutically effective amount of a composition of claim 16 or 17.
19. The method of claim 18 wherein the subject is a human patient.
20. A recombinant oncolytic paramyxovirus comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a prodrug-converting enzyme that has a therapeutic activity when

- expressed by the virus-infected tumor cell.
21. A recombinant oncolytic paramyxovirus comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a protease that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.
22. A pharmaceutical composition comprising a recombinant oncolytic virus of any one of claims 1 to 10, a virus genome of claim 12, and/or a DNA molecule of claims 13 or 14 as an active ingredient optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants, which virus, virus genome and/or DNA molecule comprises at least one transgene encoding for a prodrug-converting enzyme.
23. The pharmaceutical composition of claim 22 further comprising a prodrug which can be converted into a therapeutically active compound by the prodrug-converting enzyme encoded by the virus, virus genome and/or DNA molecule of claim 22.
24. The pharmaceutical composition of claim 22 or 23 for treatment and/or alleviation of a proliferative disorder.
25. A method for treatment of a proliferative disease, comprising administering in a pharmaceutically effective amount to a subject in need thereof
- (a) a recombinant oncolytic virus of any one of claims 1 to 10, a virus genome of claim 12, and/or a DNA molecule of claims 13 or 14 comprising at least one transgene encoding for a prodrug-converting enzyme, and
 - (b) a prodrug suitable for treatment of the proliferative disease, which prodrug can be converted into a pharmaceutically active compound by the prodrug-converting enzyme of (a).

26. A pharmaceutical composition comprising a recombinant oncolytic virus of any one of claims 1 to 10, a virus genome of claim 12, and/or a DNA molecule of claims 14 or 15 as an active ingredient optionally together with pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants, which virus, virus genome and/or DNA molecule comprises at least one transgene encoding for a protease.
27. The pharmaceutical composition of claim 26 for treatment and/or alleviation of a proliferative disorder.
28. A method for treatment of a proliferative disease, comprising administering in a pharmaceutically effective amount to a subject in need thereof a recombinant oncolytic virus of any one of claims 1 to 10, a virus genome of claim 12, and/or a DNA molecule of claims 13 or 14 comprising at least one transgene encoding for a protease.

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

PCT
Informe de Búsqueda Internacional

(Artículo PCT 18, así como reglas PCT 43 y 44)

Referencia del solicitante o del agente 53277AWO	PROCEDER Ver notificación formulario PCT/ISA/220, así como, en tanto corresponda, el punto 5.abajo	
Referencia Internacional PCT/EP 2005/012186	Fecha de presentación Internacional 10.11.2005	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) 12.11.2004
*Solicitante SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

Este Informe de Búsqueda Internacional fue elaborado por el Organismo de Búsqueda Internacional y, de acuerdo con el artículo 18, es enviado al solicitante. Se envía una copia a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda Internacional comprende, en total, 7 hojas.

☒ Además se adjunta una copia de cada uno de los antecedentes del estado de la técnica mencionados en este informe

1. Fundamentos del Informe

a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional fue llevada a cabo sobre la base de:

☒ la solicitud internacional en el idioma en que fue presentada
☐ una traducción de la solicitud internacional al _____, que es el idioma de una traducción suministrada a los fines de la búsqueda internacional (reglas 12.3(a) y 23.1 (b)).

b. ☒ Con respecto a los nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la solicitud internacional, ver campo N° 1

2. ☒ Determinadas reivindicaciones no eran investigables (ver campo II).

3. ☐ La invención carece de unidad (ver campo III).

4. Con respecto al título,

☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por el organismo como sigue:

5. Con respecto al resumen,

☒ se aprueba el texto presentado por el solicitante.
☐ el texto fue establecido por el organismo, de acuerdo con la regla 38.2 b), en la versión indicada en el campo IV. El solicitante puede presentar una posición ante el organismo durante el transcurso de un mes a partir de la fecha de envío de este Informe de Búsqueda Internacional.

6. Con respecto a las ilustraciones

a. Con el resumen se debe publicar la siguiente figura de Las Ilustraciones: figura N° ____.

☐ sugerida por el solicitante.
☐ seleccionada por el organismo, dado que el mismo solicitante no sugiere ninguna figura.
☐ seleccionada por el organismo, dado que esta figura caracteriza mejor la invención.

b. ☒ con el resumen no se publica ninguna de las ilustraciones

186

Campo I: Secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos (continuación del ítem 1.b de la hoja 1)

- 1- Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelados en la solicitud internacional y necesarios para la invención reivindicada, la búsqueda internacional fue llevada a cabo basada sobre:
- a. Tipo de material
- ☒ un listado de secuencia
- ☐ tabla(s) relacionada(s) con el listado de secuencia
- b. Formato del material
- ☒ en papel
- ☒ en forma electrónica
- c. Momento de presentación/suministro
- ☒ contenido en la solicitud internacional tal como fue presentada
- ☐ presentado con la solicitud internacional en forma electrónica
- ☒ suministrado posteriormente a los propósitos de la búsqueda
2. ☒ Adicionalmente, en caso de que fueran presentadas o suministradas más de una versión o copia del listado de secuencia y/o tabla relacionada a éste, se suministra la declaración requerida de que la información incluida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella incluida en la solicitud tal como fue presentada o no supera la solicitud tal como fue presentada, lo que sea apropiado.
3. Comentarios adicionales

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. A61K35/76 C07K14/115

Según la clasificación internacional de patentes (IPK) o la clasificación internacional la IPK

B. AMBITOS INVESTIGADOS

Material mínimo investigado (Sistema de clasificación y símbolos de clasificación)

A61K C61K

Publicaciones investigadas pero no pertenecientes al material mínimo investigado, en tanto pertenezcan al ámbito investigado

Banco electrónico de datos consultado durante la búsqueda internacional (nombre del banco de datos y expresiones de búsqueda eventualmente empleadas)

EPO-Internal, WPI Data, BIC-SIS, MEDLINE

C. ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Con referencia a reivindicación Nº
X	EBERT OLIVER ET AL: "Syncytia induction enhances the oncolitic potential of vesicular stomatitis virus in vinotherapy for cancer" CANCER RESEARCH, 1 MAY 2004 vol. 64, Nº 9, 1 de mayo de 1994 (2004.05.01) pp. 3265-3270 XP002384970 ISSN: 0008-5472 todo el documento	1, 2, 6 8-10 13-21

☒ Otras publicaciones están listadas en la continuación del campo C

☒ Ver familia de patentes en el anexo

"A" Categorías particulares indicadas en publicaciones que define el estado general de la técnica pero no considerada como particularmente importante	"T" publicaciones posteriores a las difundidas en la fecha de presentación internacional o de la fecha de prioridad y que no colisionan con la solicitud, sino que solo están indicadas para mayor entendimiento del principio fundamental de la invención o de la teoría sobre la cual se basa
"B" documento anterior pero publicado recién o después de la de la fecha de presentación internacional	"X" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada, solo como consecuencia de esta publicación, como novedosa o apoyarse en una actividad inventiva
"L" publicación adecuada para hacer aparecer como dudosa una reivindicación de prioridad, o mediante la cual debe ser considerada la fecha de divulgación de otra publicación mencionada en el Informe de búsqueda o que es indicada por otra razón particular (como realizada)	"Y" publicación de particular importancia: la invención reivindicada no puede ser considerada como apoyada en una actividad inventiva cuando puede ser relacionada con una o varias otras publicaciones de esta categoría y tal relación es notoria para un especialista
"O" publicación que se refiere a una revelación oral, a una utilización, a una exposición o a otras disposiciones	"&" publicación que es miembro de la misma familia
"P" publicación realizada antes de la fecha de presentación internacional pero luego de la fecha de prioridad reivindicada	

Fecha de finalización de la búsqueda internacional

13 de junio de 2006

Fecha de envío del Informe de Búsqueda Internacional

28.06.2005

Nombre y Código Postal de 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

Funcionario Apoderado

Schulz, R

189

C. (continuación) ANTECEDENTES CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría	Denominación de la publicación, así como, de ser requerido, indicación de los pasajes relevantes	Con referencia a reivindicación Nº
X	POROSNICU MERCEDES ET AL: "The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene" CANCER RESEARCH. 1 DIC 2003 vol. 63, Nº 23, 1 de diciembre de 2003 (2003.12.01), pp. 8366-8376 XP002384971 ISSN: 0008-5472 todo el documento	22
A	RIES S J ET AL: "Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials" DDT – DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB vol 9, Nº 17, septiembre 2004 (2004.09) pp. 759-768, XP004534151 ISSN: 1259-6446 pp. 765; figura 1; tables 1, 2	1-30
A	HERMISTON TERRY ET AL: "Armed therapeutic viruses: Strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes" CANCER GENE THERAPY, vol 9, Nº 12, diciembre 2002 (2002.12) pp. 1022-1035, XP002384972 ISSN: 0929-1903 todo el documento	1-30
P, X	WO 2005/014017 A (SHINO, YUJI; SUNOUCHI, KOUTA; ASANO, TAKEHIDE; SHIRASAWA, HIROSHI) 17 de febrero de 2005 (2005.02.17) resumen	1, 13-21

190

Campo II: Observaciones acerca de porque determinadas reivindicaciones no eran investigables (continuación del ítem 2 de la hoja 1)

Este Informe de Búsqueda Internacional no fue confeccionado con respecto a algunas reivindicaciones, según el artículo 17(2)(a), por las siguientes razones:

1.

☒ Reivindicaciones N°: ,
porque se refieren a objetos que no requieren ser investigados por este Organismo, a saber:

A pesar de que las reivindicaciones 20, 21, 27 y 30 están referidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda se llevó a cabo y estuvo basada sobre los efectos alegados del compuesto/composición.
2.

☐ Reivindicaciones N°:
porque se refieren a partes de la Solicitud Internacional que no cumplen con los requisitos prescritos en una extensión que no permite llevar a cabo una búsqueda internacional, específicamente:
3.

☐ Reivindicaciones N°:
porque son reivindicaciones dependientes y no están desarrolladas en acordanza con la segunda y la tercera frase de la regla 6.4(a).

Campo III: Observaciones por falta de uniformidad de la invención (continuación del ítem 3 de la hoja 1)

Este Organismo de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud Internacional, a saber:

ver hoja adicional

1.

☐ Como todas las tasas adicionales fueron abonadas en término por el solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2.

☒ Como todas las reivindicaciones investigables pueden ser investigadas sin un esfuerzo que justifique una tasa adicional, este Organismo no solicita ningún pago o tasa adicional.
3.

☐ Como solo algunas de las tasas adicionales fueron abonadas en término por el solicitante, este Informe de Búsqueda Internacional cubre solo aquellas reivindicaciones para los cuales fueron abonadas las tasas, específicamente, las reivindicaciones N°:
4.

☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas fue abonada en término por el solicitante. En consecuencia, este Informe de Búsqueda Internacional está restringido a la invención mencionada inicialmente en las reivindicaciones; la misma está cubierta por las reivindicaciones N°:

Observaciones sobre protestas

- ☐ Las tasas adicionales fueron acompañadas por la protesta del solicitante
- ☐ Las tasas adicionales no fueron acompañadas por ninguna protesta.

191

Este Organismo de Búsqueda Internacional encontró múltiples (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, a saber:

1. reivindicaciones: 1-21 (completas), 24-27 (parcialmente)

virus RNA recombinante oncolítico que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un transgénico, por ejemplo, un proteína de enlace que posee una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada por el virus; una nucleocápside, un genoma, una molécula de ADN de tal virus RNA oncolítico recombinante; una célula, una composición farmacéutica que comprende tal virus RNA oncolítico recombinante; su uso en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer; una composición farmacéutica que comprende el virus RNA oncolítico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-12; un genoma de virus según la reivindicación 14 y/o una molécula de ADN según las reivindicaciones 15 o 16; etc., cuyo virus, genoma de virus y/o molécula de ADN comprende al menos un transgénico que codifica una enzima prodroga; su uso en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

2. reivindicaciones: 22 (completa), 24-27 (parcialmente)

virus RNA recombinante oncolítico que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un transgénico, por ejemplo, una prodroga que convierte enzimas que posee una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada por el virus; una composición farmacéutica que comprende el virus RNA oncolítico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-12; un genoma de virus según la reivindicación 14 y/o una molécula de ADN según las reivindicaciones 15 o 16; etc., cuyo virus, genoma de virus y/o molécula de ADN comprende al menos un transgénico que codifica una enzima prodroga; así como su uso en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

3. reivindicaciones: 23 (completa), 28-30 (parcialmente)

virus RNA recombinante oncolítico que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un transgénico, por ejemplo, una proteasa que posee una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada por el virus; una composición farmacéutica que comprende el virus RNA oncolítico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-12; un genoma de virus según la reivindicación 14 y/o una molécula de ADN según las reivindicaciones 15 o 16; etc., cuyo virus, genoma de virus y/o molécula de ADN comprende al menos un transgénico que codifica una proteasa; su uso en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL Detalle de publicaciones que pertenecen a la misma familia de patentes			Referencia Internacional <i>PCT/EP 2005/012186</i>
Documentos de Patente citados en el Informe de Búsqueda	Fecha de la publicación	Miembros de la familia de patentes	Fecha de la publicación
WO 2005014017 A	17.02.2005	NINGUNO	

192

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

Remite: EL ORGANISMO DE BÚSQUEDA
INTERNACIONAL

PCT

193

A SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT Müllerstrasse 178 13342 Berlin Alemania	NOTIFICACIÓN DE ENVÍO DEL INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL Y DEL INFORME ESCRITO DEL ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL O DE LA DECLARACIÓN (regla PCT N° 44.1)
	Fecha de envío (día/mes/año) 28.06.2006
Referencia del Solicitante o Agente 53277AWO	PROCEDER Ver abajo, puntos 1 y 4
Referencia Internacional PCT/EP 2005/012186	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) 10.11.2005
Solicitante SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT	

1.	☒ Se notifica al solicitante de la confección del Informe de Búsqueda Internacional y de la opinión escrita del organismo de búsqueda internacional y de que se los envía adjunto a la presente. Presentación de modificaciones y una declaración, según artículo 19: El solicitante puede modificar por su propia voluntad las reivindicaciones de la solicitud internacional (ver regla 46): ¿Hasta cuando se pueden presentar las modificaciones? El plazo para la presentación de tales modificaciones es usualmente de dos meses a partir del envío del Informe de Búsqueda Internacional. ¿Dónde se deben presentar las modificaciones? Directamente en la Oficina Internacional de la WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Ginebra 20, Suiza, Telefax N°: (41-22) 740.14.35 Instrucciones más detalladas se pueden obtener en las instrucciones de la hoja adjunta.
2.	☐ Se notifica al solicitante de que no se confecciona un Informe de Búsqueda Internacional y de que, según el artículo 17(2)a, se adjunta a la presente la declaración a tales efectos y el informe escrito del Organismo de Búsqueda Internacional.
3.	☐ Acerca de la protesta contra el pago de una tasa adicional (tasas adicionales) según la regla 40.2, se notifica al solicitante que ☐ la protesta y la resolución han sido enviadas desde aquí a la Oficina Internacional, junto con su solicitud de envío del texto, así como el requerimiento del solicitante a los organismos designados de impulsar la objeción y la resolución., ☐ No existe todavía ninguna resolución acerca de la objeción; el solicitante será informado en cuanto se tome una resolución.
4.	Recordatorios: Brevemente tras el transcurso de 18 meses a partir de la fecha de prioridad la Oficina Internacional publicará la solicitud internacional. Si el solicitante quiere impedir o postergar la publicación, debe presentar en la Oficina Internacional, según la regla 90bis.1 a 90bis.3, antes de concluir las preparaciones técnicas para la publicación internacional, una declaración acerca del desistimiento de la solicitud internacional o de la reivindicación de prioridad. El solicitante puede presentar en la Oficina Internacional una posición informal acerca del informe escrito del Organismo de Búsqueda Internacional. La Oficina Internacional remite una copia de esta posición a todos los organismos designados en tanto no esté o recién hubiera sido confeccionado un Examen Preliminar Internacional. Tal posición también se hará pública, pero solo después de transcurrir 30 meses a partir de la fecha de prioridad. Cuando el solicitante desea postergar en hasta 30 meses (en algunos organismos hasta más) a partir de la fecha de prioridad el ingreso en la fase nacional, debe presentar una solicitud de Examen Preliminar Internacional dentro de los 19 meses a partir de la fecha de prioridad; de otra manera, para ingresar en la etapa de la fase nacional, el solicitante debe llevar a cabo, dentro de los 20 meses a partir de la fecha de prioridad, las gestiones prescriptas por estos organismos. En otros organismos designados también es válido el plazo de 30 meses (o algún plazo más largo) cuando no se presenta tal solicitud en el plazo de 19 meses. Ver anexo del formulario PCT/IB/301. Indicaciones precisas de los plazos válidos en los organismos individuales se exhiben en PCT Applicants Guide, Volumen II, capítulo nacional, así como el sitio de Internet de WIPO.

Nombre y Dirección Postal del Organismo de Búsqueda Internacional Oficina de Patentes Europea, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario Apoderado René De Hoogd
--	--

INSTRUCCIONES PARA EL FORMULARIO PCT/ISA/220

Estas Instrucciones son indicaciones básicas para la presentación de modificaciones según el artículo 19. Estas observaciones se basan sobre los requisitos del Tratado de Cooperación Internacional en Materia de Patentes (PCT), del reglamento de aplicación y de las normas administrativas del mismo. Ante diferencias entre estas observaciones y los textos mencionados anteriormente son decisivos los últimos. Otros detalles se pueden obtener en el Manual PCT para solicitantes, una publicación de la WIPO.

Las expresiones "artículo", "regla" y "párrafo" empleados en estas instrucciones se refieren siempre a las disposiciones del Tratado PCT, al reglamento de aplicación PCT o a las normas administrativas PCT.

INSTRUCCIONES PARA MODIFICACIONES SEGÚN ARTÍCULO 19

Luego de recibir el Informe de Búsqueda Internacional y el informe escrito del Organismo de Búsqueda Internacional, el solicitante tiene la posibilidad de modificar una vez las reivindicaciones de la solicitud internacional. Sin embargo, se debe hacer notar que, dado que todas las partes de la solicitud internacional (reivindicaciones, descripción y figuras) pueden ser modificados durante el Examen Preliminar Internacional, no existe usualmente la necesidad de presentar modificaciones de las reivindicaciones según el artículo 19, excepto cuando el solicitante desea la publicación de estas reivindicaciones o presenta algún otro motivo para la modificación de las reivindicaciones de su publicación internacional, por ejemplo, a los fines de una protección provisoria. También se enfatiza que una protección provisoria se puede obtener solo en algunos estados (ver *PCT Applicant's Guide*, Volumen I/A, Anexos B1 y B2).

Se hace notar al solicitante el hecho de que las enmiendas de las reivindicaciones según el artículo 19 no son admitida cuando el Organismo de Búsqueda Internacional ha declarado, según el artículo 17(2), que no se confeccionó un informe de búsqueda internacional (ver *PCT Applicant's Guide*, Volumen I/A, párrafo 296).

¿Que partes de una solicitud internacional pueden ser modificadas?

En el marco del artículo 19 solo pueden ser modificadas las reivindicaciones.

En la fase internacional, según el artículo 34, las reivindicaciones también pueden ser modificadas (o nuevamente modificadas) ante el Organismo Encargado del Examen Preliminar Internacional. Según el artículo 34, la descripción y las figuras solo pueden ser modificadas ante el organismo encargado del Examen Preliminar Internacional.

Al ingresar en la fase nacional, según el artículo 28 o, cuando corresponde, el artículo 41, pueden ser modificadas todas las partes de la solicitud internacional.

¿Hasta cuando se pueden presentar modificaciones?

Dentro de los dos meses a partir del envío del informe de búsqueda internacional o dentro de dieciséis meses a partir de la fecha de prioridad, según el plazo que venza más tarde. No obstante, las modificaciones son consideradas como válidas cuando son enviadas a la Oficina Internacional luego del plazo establecido pero antes de la conclusión de las preparaciones técnicas para la publicación internacional (regla 46.1).

¿Dónde no se deben presentar las modificaciones?

Las modificaciones solo pueden ser presentadas ante la Oficina Internacional y no en la Oficina de Ingreso o en el organismo de búsquedas internacionales (regla 46.2).

En caso de presentarse o haber presentado una solicitud de Examen Preliminar Internacional, ver abajo.

¿En que forma pueden ser llevadas a cabo modificaciones?

Una modificación puede proceder en la versión presentada mediante la eliminación de una o varias reivindicaciones, mediante el agregado de una o varias reivindicaciones nuevas o mediante modificaciones del texto de una o varias reivindicaciones.

Se debe presentar una hoja de reemplazo por cada hoja de reivindicaciones que, como consecuencia de una o varias modificaciones, se diferencia de la presentada originalmente.

Todas las reivindicaciones que aparecen una hoja de reemplazo deben estar numeradas con cifras arábigas. Así, cuando se elimina una reivindicación, las demás no deben ser numeradas nuevamente. En el caso de una nueva numeración, las reivindicaciones deben ser numeradas en forma sucesiva (normas administrativas, ítem 205b)).

Las modificaciones deben estar redactadas en el idioma en que fue publicada la solicitud internacional.

¿Qué documentos deben acompañar a las modificaciones?

Escrito adjunto (ítem 205b)):

Las modificaciones se deben presentar con un escrito adjunto.

El escrito adjunto no se publica junto con la solicitud internacional y las reivindicaciones modificadas. No se debe confundir con "aclaración según artículo 19(1)" (Ver abajo, "aclaración según artículo 19(1)").

El escrito adjunto puede estar redactado, a elección del solicitante, en idioma inglés o francés. En solicitudes internacionales vertidas en idioma inglés, el escrito adjunto debe estar redactado asimismo en idioma inglés y en las solicitudes internacionales redactadas en idioma francés en idioma francés.

TRATADO DE COOPERACIÓN INTERNACIONAL
EN MATERIA DE PATENTES

Del ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		PCT	
A ver formulario PCT/ISA/220		INFORME ESCRITO DEL ORGANISMO DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL (regla PCT N° 43bis.1)	
		Fecha de envío (día/mes/año) ver formulario PCT/ISA/210 (hoja 2)	
Referencia del Solicitante o Agente ver formulario PCT/ISA/220		PROCEDER Ver abajo, punto 2	
Referencia Internacional PCT/EP 2005/012186	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) 10.11.2005	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 12.11.2004	
Clasificación Internacional de Patentes (IPK) o clasificación nacional e IPK INV. A61K35/76, C07K14/115			
Solicitante SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT			

1. Este informe contiene indicaciones acerca de los siguientes puntos:	
☒	Campo N° I Fundamento del informe
☐	Campo N° II Prioridad
☒	Campo N° III No realización de dictamen alguno sobre novedad, actividad inventiva y aplicabilidad industrial
☒	Campo N° IV Falta de uniformidad de la invención
☒	Campo N° V Declaración fundada según regla PCT 43bis.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; documentos y declaraciones destinadas a apoyar esta resolución.
☐	Campo N° VI Documentos específicos expuestos
☐	Campo N° VII Falencias específicas de la solicitud Internacional
☐	Campo N° VIII Observaciones específicas a la solicitud internacional
2. PROCEDER	
Cuando se solicita un Examen Preliminar Internacional, este informe es válido como informe escrito del organismo encargado de la búsqueda internacional ("IPEA"); esto no es así cuando, según la regla 66.1bis(b), el solicitante elige otro organismo distinto a este como IPEA y el IPEA elegido informó a la Oficina Internacional que los informes escritos de este organismo de búsqueda internacional no serán reconocidos.	
Cuando este informe es válido como informe escrito de IPEA, tal como está previsto arriba, el solicitante es intimado a presentar ante IPEA una posición por escrito, y cuando corresponde, modificaciones, en el plazo de 3 meses a partir de la fecha en la que fue remitido el formulario PCT/ISA/220 o en el plazo de 22 meses a partir de la fecha de prioridad, según el plazo que venza más tarde.	
Para otras opciones, ver formulario PCT/ISA/220.	
3. Para otros detalles, ver las instrucciones del formulario PCT/ISA/220.	

Nombre y Dirección Postal del ISA Oficina de Patentes Europea – P.B. 5818 Patentlaan NL-2280 HV Rijswijk – Holanda Tel.: +31 70 340 - 2040; Tx: 31 651 epo.nl Fax: +31 70 340 - 3016	Fecha de confección de este informe: ver formulario PCT/ISA(210)	Funcionario autorizado Schulz, R Teléfono N° +31 70 340 - 4381
--	--	--

Formulario PCT/ISA/237 (carátula) (abril 2005)

Campo Nº 1	Fundamento del informe
1.	Con respecto al idioma, el informe fue confeccionado, basado sobre la solicitud internacional, en el idioma en que fue presentada, en tanto en este punto no se indique otra cosa. ☒ La solicitud internacional en el idioma en que fue presentada ☐ El informe está basado sobre una traducción del idioma original al siguiente idioma, el que se trata del idioma de la traducción presentada a los efectos de la búsqueda internacional (según las reglas 12.3 y 23.1 b)).
2.	Con respecto a la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelada en la solicitud internacional y requerida para la invención reivindicada, el informe fue confeccionado sobre la siguiente base: a. Tipo de material ☒ listado de secuencias ☐ tablas del listado de secuencias b. Forma del material ☒ en forma escrita ☒ en forma legible por computadora c. Momento de la presentación ☒ comprendido en la presentación internacional tal como fue presentada ☐ presentado, junto con la solicitud internacional, en forma legible por computadora ☒ suministrado posteriormente ante el organismo a los efectos de la búsqueda
3.	☒ Habiendose presentado más de una versión o copia de un protocolo de secuencias y/o la tabla correspondiente se deben presentar adicionalmente las declaraciones requeridas de que la información de las copias presentadas posteriormente o adicionales coincide con la versión original de la solicitud o que no la supera.
4.	Observaciones adicionales

196

1 a 2
14

Campo Nº III	No confección de un Informe con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial
--------------	---

La cuestión acerca de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucra actividad inventiva (no obvia) o es aplicable industrialmente no fue examinada con respecto a:

- ☐ toda la solicitud internacional
- ☒ reivindicaciones Nº: 20, 21, 27, 30 con respecto a la aplicabilidad industrial

porque

- ☒ las mencionadas solicitud internacional completa o reivindicaciones Nº 20, 21, 27, 30 se refieren al siguiente objeto, el que no requiere un examen preliminar internacional (*especificar*):
ver hoja adjunta
- ☐ la descripción, reivindicaciones o ilustraciones (*indicar elementos particulares abajo*) o las mencionadas reivindicaciones Nº son tan poco claras que no se puede confeccionar un informe coherente (*especificar*):
- ☐ las reivindicaciones o las mencionadas reivindicaciones Nº está apoyadas tan inadecuadamente por la descripción que no se puede confeccionar un informe coherente.
- ☒ no se confeccionó ningún informe de búsqueda para toda la solicitud o para las mencionadas reivindicaciones 20, 21, 27, 30
- ☐ no se pudo confeccionar un informe coherente sin el listado de secuencias; el solicitante, en el plazo prescripto:
 - ☐ no suministró sobre papel un listado de secuencias que cumpla con el estándar provisto para ello en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y tal listado no estaba disponible para el Organismo de Búsqueda Internacional en un formulario y manera aceptable.
 - ☐ no suministró en forma electrónica un listado de secuencias que cumpla con el estándar provisto para ello en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y tal listado no estaba disponible para el Organismo de Búsqueda Internacional en un formulario y manera aceptable.
 - ☐ no pagó la tasa requerida por la presentación tardía de un listado de secuencias en respuesta a una invitación según las reglas 13ter.1(a) o (b).
- ☐ no se pudo confeccionar un informe coherente sin las tablas relacionadas con el listado de secuencias; el solicitante no suministró en el plazo prescripto tales tablas en forma electrónica para cumplir con los requisitos técnicos provistos para ello en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y tal listado no estaba disponible para el Organismo de Búsqueda Internacional en un formulario y manera aceptable.
- ☐ las tablas relacionadas con el listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos, si están sólo en forma legible por computadora, no cumplen con los requerimientos técnicos provistos por el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.
- ☐ para otros detalles, ver hoja adjunta

198

Campo N° IV	Falta de uniformidad de la invención
1.	☐ En respuesta a la invitación (formulario PCT/ISA/206) a pagar tasas adicionales, el solicitante, dentro de los correspondientes plazos: ☐ ha pagado las tasas adicionales ☐ ha pagado las tasas adicionales bajo protesta y, si corresponde, las tasas de protesta ☐ ha pagado las tasas adicionales bajo protesta pero no pagó la correspondiente tasa de protesta ☐ no ha pagado las tasas adicionales
2.	☒ Este Organismo encontró que no se cumplen los requisitos de unidad de la invención y opta por no invitar al solicitante a pagar tasas adicionales
3.	Este Organismo considera que los requisitos de unidad acordes con las reglas 13.1, 13.2 y 13.3 ☐ se cumplen ☒ no se cumplen por las siguientes razones: ver hoja adjunta
4.	En consecuencia, este Informe ha sido confeccionado con respecto a las siguientes partes de la solicitud internacional: ☒ todas las partes ☐ las partes relacionadas con las reivindicaciones N°: 1 (parcial), 2 (parcial), 6-8 (parcial), 26, 27
Campo N° V	Resolución fundada según regla PCT 43b/s.1(a)(i) con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad Industrial; documentos y declaraciones destinadas a apoyar esta resolución

1.	Resolución			
	Novedad	Si	Reivindicaciones:	3-5, 7, 11, 12, 21, 23-30
		No	Reivindicaciones:	1, 2, 6, 8-10, 13-20, 22
	Actividad inventiva	Si	Reivindicaciones:	3-5, 24-30
		No	Reivindicaciones:	7, 11, 12, 21, 23
	Aplicabilidad industrial	Si	Reivindicaciones:	1-19, 22-26, 28, 29
		No	Reivindicaciones:	
2.	Documentos y declaraciones:			
	ver hoja adjunta			

199

Con respecto al ítem III

No formulación de un dictamen con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial

III.1 Las reivindicaciones 20, 21, 27 y 30 se refieren a objetos considerados por este Organismo cubiertos por las previsiones de la regla PCT 67.1(iv). En consecuencia, no se formula un dictamen con respecto a la aplicabilidad industrial del objeto de estas reivindicaciones (artículo PCT 34(4)(a)(I)).

Con respecto al ítem IV

Carencia de unidad de la invención

IV.1. Se hace referencia a los siguientes documentos:

- D1: Ebert, O. et al (2004) Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. Cancer Research. 64(9), 3265-3270
- D2: Porosnicu, M.(2003) The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene. Cancer Research 63(23), 8366-8376
- D3: Ries, S J and Brandts, C. H. (2004) Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials. DDT 9(17), 759-768,

IV.2 La presente solicitud se refiere a un virus RNA recombinante oncolítico que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un transgénico, es decir, un proteína de enlace, una enzima convertidora de prodroga o una proteasa, que posee una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada por el virus, así como a composiciones farmacéuticas tales como virus RNA recombinante oncolítico y su uso en la manufactura e un medicamento para el tratamiento de cáncer.

IV.2.1 Este Organismo considera que existen tres invenciones cubiertas por las reivindicaciones, indicadas como sigue:

- I. Las reivindicaciones: 1-21 (completas), 24-27 (parcialmente) están relacionadas con un virus RNA recombinante oncolítico que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un transgénico, es decir, un proteína de enlace que posee una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada por el virus; una nucleocápside, un genoma, una molécula de ADN de tal virus RNA oncolítico recombinante; una célula, una composición farmacéutica que comprende tal virus RNA oncolítico recombinante; su uso en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer; una composición farmacéutica que comprende el virus RNA oncolítico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-12; un genoma de virus según la reivindicación 14 y/o una molécula de ADN según las reivindicaciones 15 o 16; etc., cuyo virus, genoma de virus y/o molécula de ADN comprende al menos un transgénico que codifica una enzima prodroga; su uso en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer.
- II. Las reivindicaciones: 22 (completa), 24-27 (parcialmente) están relacionadas con un virus RNA recombinante oncolítico que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un transgénico, es decir, una prodroga que convierte enzimas que posee una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada por el virus; una composición farmacéutica que comprende el virus RNA oncolítico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-12; un genoma de virus según la reivindicación 14 y/o una molécula de ADN según las reivindicaciones 15 o 16; etc., cuyo virus, genoma de virus y/o molécula de ADN comprende al menos un transgénico que codifica una enzima prodroga; así como su uso en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer.

200

- III. Las reivindicaciones: 23 (completa), 28-30 (parcialmente) están relacionadas con un virus RNA recombinante oncolítico que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un transgénico, es decir, una proteasa que posee una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada por el virus; una composición farmacéutica que comprende el virus RNA oncolítico recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1-12; un genoma de virus según la reivindicación 14 y/o una molécula de ADN según las reivindicaciones 15 o 16; etc., cuyo virus, genoma de virus y/o molécula de ADN comprende al menos un transgénico que codifica una proteasa; su uso en la manufactura de un medicamento para el tratamiento de cáncer.
- IV.2.2 Las razones por las cuales estas invenciones no están derivadas como para formar un concepto inventivo general individual, como lo requiere la regla PCT 13.1, son las siguientes:

D1 da a conocer la construcción de un "virus RNA oncolítico recombinante", es decir, un virus de estomatitis vesicular (VSV) recombinante que "comprende un ácido nucleico con al menos un transgénico", es decir, una proteína mutante de NDV (L289A), "en la cual el ácido nucleico de este(os) transgénico(s) codifican para una proteína de enlace", es decir, la proteína F o proteína de fusión requerida para la fusión de membrana (fig. 1, fig. 6), "que posee una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada por el virus", es decir, la expresión con la que accede a propiedades oncolíticas mejoradas frente al carcinoma hepatocelular multifocal (HCC) en el hígado de ratas inmunocompetentes (resumen).

Además, D2 da a conocer un "virus RAN oncolítico recombinante", es decir, un VSV recombinante que "comprende un ácido nucleico con al menos un transgénico, en el cual el ácido nucleico de este(os) transgénico(s) codifican para una enzima convertidora de prodroga", es decir, para la expresión del gen suicida de fusión E. coli citosina deaminasa (CD) / fosforibosil transferasa (UPRT) – un sistema de enzimas prodroga bien caracterizado que funciona similarmente al paradigma de herpesvirus TK "que posee una actividad terapéutica es expresado por la célula tumoral infectada por el virus, es decir, se comprobó que la inserción del gen de fusión CD / UPRT potencia la eficiencia oncolítica del VSV.

A la luz del estado de la técnica, el problema subyacente en la presente solicitud puede ser considerado como la provisión de otros virus RNA oncolíticos recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica para al menos un transgénico que posee una actividad terapéutica cuando es expresado por la célula tumoral infectada por el virus.

En vista del hecho de que tales virus RNA oncolíticos recombinantes ya han sido revelados en el estado de la técnica, (D1, D2), debido a la diferencia esencial entre los respectivos transgénicos que representan las tres soluciones alternativas y debido al hecho de que no se puede distinguir otra característica técnica que, a la luz del estado de la técnica, pueda ser considerada como característica técnica acorde con la regla PCT 13.1, no se puede identificar ningún concepto inventivo individual (regla PCT 13.1) que sirva de base a estas tres soluciones reivindicadas por la presente solicitud.

En consecuencia, el grupo de reivindicaciones no están derivadas por características técnicas especiales comunes o correspondientes y las diferentes invenciones no están derivadas por un concepto inventivo general individual.

Por ello, esta solicitud no cumple los requisitos de unidad de invención tal como están definidos en las reglas PCT 13.1 y 13.2.

Con respecto al ítem V

Declaración fundada con respecto a la novedad, la actividad inventiva y la aplicabilidad industrial; menciones y explicaciones que apoyan tal declaración

V.1 Novedad (artículo PCT 33(1)(2))

201

- V.1.2 La presente solicitud no cumple los criterios del artículo PCT 33(1) porque el objeto de las reivindicaciones 1, 2, 6, 8-10, 13-20 y 22 no es novedoso en el sentido del artículo PCT 33(2).
- V.1.2.1 D1 da a conocer la construcción de un virus de estomatitis vesicular recombinante (VSV) capaz de inducir formación de syncytia entre células tumorales mediante fusión de membrana a pH neutro. El virus desarrolla propiedades oncolíticas mejoradas frente a un carcinoma hepatocelular multifocal (HCC) en el hígado de ratas inmunocompetentes (resumen). En realidad, el VSV recombinante revelado en tal documento es perjudicial con respecto a la novedad de los objetos de las reivindicaciones 1, 2, 6, 8-10, 13-20, desde que tal VSV recombinante es "un virus RNA oncolítico que comprende un ácido nucleico con al menos un transgénico", es decir, una proteína mutante de NDV (L289A), en el cual el ácido nucleico de este(os) transgénico(s) codifican para una proteína de enlace, es decir, la proteína F o proteína de fusión requerida para la fusión de membrana (fig. 1, fig. 6), que posee una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada por el virus, es decir, la expresión con la que accede a propiedades oncolíticas mejoradas frente al carcinoma hepatocelular multifocal (HCC) en el hígado de ratas inmunocompetentes.
- V.1.2.2 D2 da a conocer un VSV recombinante para la expresión del gen suicida de fusión E. coli citosina deaminasa (CD) / uracil fosforibosiltransferasa (UPRT) - un sistema de enzimas prodroga bien caracterizado que funciona similarmente al paradigma de herpesvirus TK. Se comprobó que la inserción del gen de fusión CD / UPRT potencia la eficiencia oncolítica del VSV. Se genera un fuerte efecto colateral que contribuye a la activación del sistema inmune general frente al tumor sin alterar negativamente la cinética de la oncolisis mediada por el virus. Se discute la utilidad del virus en el tratamiento de enfermedades malignas.
A la luz de la revelación de D2, el objeto de la reivindicación 22 no puede ser considerado como novedoso en el sentido del artículo PCT 33(1)(2).
- V.1.2.3 El objeto de las reivindicaciones 7, 11, 12, 21, 23-30 no parece ser novedoso con respecto al estado de la técnica, y no cumple los requisitos del artículo PCT 33(1)(2).
- V.3 **Actividad inventiva** (artículo PCT 33(2)(3))
- V.3.1 La presente solicitud no cumple el criterio del artículo PCT 33(1), porque el objeto de las reivindicaciones 7, 11, 12, 21 y 23 no involucran una actividad inventiva en el sentido del artículo PCT 33(3).
- V.3.2 En vista de la revelación de D1, es decir, dando ya a conocer "un virus RNA oncolítico recombinante que comprende al menos un transgénico en el cual el ácido nucleico de este(os) transgénico(s) codifican para una proteína de enlace que posee una actividad terapéutica cuando es expresada por la célula tumoral infectada por el virus", el experto es considerada como suficientemente capaz de seleccionar cualquier proteína de enlace de interés e inserta el respectivo código de ácido nucleico en el virus RNA, arribando con ello al objeto de las reivindicaciones dependientes 7, 11, 12 y 21 sin ejercitar una actividad inventiva.
- V.3.3 Los documentos D1 y/o D2 pueden ser considerados como el estado de la técnica más cercano para el objeto de la reivindicación 23, dando a conocer virus RNA oncolíticos recombinantes que comprenden una codificación transgénica tanto para una proteína de enlace (D1) como para una enzima convertidora de prodroga (D2) que posee una actividad terapéutica cuando están expresadas por la célula tumoral infectada por el virus.
El objeto de la reivindicación 23 difiere en que se relaciona un virus RNA oncolítico recombinante que comprende al menos un transgénico, en el cual el ácido nucleico de este(os) transgénico(s) codifica(n) para una proteasa que posee una actividad terapéutica cuando está expresada por la célula tumoral infectada por el virus.

202

El problema a resolver puede ser considerado como la provisión de otros virus RNA oncolíticos recombinantes que comprenden al menos una codificación transgénica para una proteína que posee una actividad terapéutica cuando está expresada por la célula tumoral infectada por el virus.

No obstante, ante el hecho de que el concepto "virus armados terapéuticamente" está bien establecido en el estado de la técnica (D3), el experto parece ser suficientemente capaz de seleccionar otros transgénicos, por ejemplo, una proteasa que posea un efecto beneficioso en la célula tumoral infectada. En consecuencia, él/ella puede arribar a la solución propuesta por la reivindicación 23 sin ejercitar ninguna actividad inventiva. Por ello, el objeto de la reivindicación 23 no puede ser considerado como cumpliendo los requisitos del artículo PCT 33(1)(3).

- V.3.4 Ninguno de los documentos da a conocer o provee algún incentivo para la generación de las composiciones farmacéuticas mencionadas en las reivindicaciones 24 a 28, y el objeto de tales reivindicaciones puede, en principio, aparecer como comprendiendo una actividad inventiva. No obstante, dado que la presente solicitud no da a conocer ninguna de estas composiciones farmacéuticas, el objeto de las reivindicaciones 24-30 no puede ser considerado como una solución de un problema técnico y, en consecuencia, no cumple los requisitos del artículo PCT 33(1)(3). En línea con el razonamiento anterior (V.3.3), el objeto de las reivindicaciones 24-30 es considerado otro virus RNA oncolítico recombinante que comprenden al menos una codificación transgénica para una o más proteínas que posee(n) una actividad terapéutica cuando están expresadas por la célula tumoral infectada por el virus.

V.4 Aplicabilidad Industrial (artículo PCT 33(1))

- V.4.1 Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 20, 21, 27 y 30 acerca de la cuestión de si son aplicables industrialmente no existe un criterio unificado en los estados dignatarios del PCT. La patentabilidad puede depender entonces de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable el objeto de reivindicaciones destinado el uso de un compuesto en tratamientos medicinales, pero permite, no obstante, reivindicaciones de un compuesto novedoso para un primer uso en tratamientos medicinales y el uso de un compuesto de tal tipo en la manufactura de un medicamento destinado a un nuevo tratamiento medicinal.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

203
203

Applicant's or agent's file reference 5327ZAWO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2005/012186	International filing date (day/month/year) 10/11/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 12/11/2004
Applicant SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT		

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

This international search report consists of a total of 7 sheets.

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

1. Basis of the report

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

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

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

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

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

4. With regard to the title,

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

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/012186

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

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

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☒

on paper

☒

in electronic form

c. time of filing/furnishing

☒

contained in the international application as filed

☐

filed together with the international application in electronic form

☒

furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☒

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/012186

204

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K35/76 C07K14/115

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K C07K

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EBERT OLIVER ET AL: "Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer." CANCER RESEARCH. 1 MAY 2004, vol. 64, no. 9, 1 May 2004 (2004-05-01), pages 3265-3270, XP002384970 ISSN: 0008-5472 the whole document ----- -/--	1,2,6, 8-10, 13-21



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

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

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "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.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 June 2006

Date of mailing of the international search report

28/06/2006

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

Schulz, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2005/012186

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	POROSNICU MERCEDES ET AL: "The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene." CANCER RESEARCH. 1 DEC 2003, vol. 63, no. 23, 1 December 2003 (2003-12-01), pages 8366-8376, XP002384971 ISSN: 0008-5472 the whole document	22
A	RIES.S J ET AL: "Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials" DDT - DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 9, no. 17, September 2004 (2004-09), pages 759-768, XP004534151 ISSN: 1359-6446 page 765; figure 1; tables 1,2	1-30
A	HERMISTON TERRY W ET AL: "Armed therapeutic viruses: Strategies and challenges to arming oncolytic viruses with therapeutic genes." CANCER GENE THERAPY, vol. 9, no. 12, December 2002 (2002-12), pages 1022-1035, XP002384972 ISSN: 0929-1903 table 1 the whole document	1-30
P,X	WO 2005/014017 A (SHINO, YUJI; SUNOUCHI, KOUTA; ASANO, TAKEHIDE; SHIRASAWA, HIROSHI) 17 February 2005 (2005-02-17) abstract	1,13-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2005/012186

205

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: —
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 20, 21, 27 and 30 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-21 (complete), 24 - 27 (in part)

recombinant oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid coding for at least one transgene, i.e. a binding protein having a therapeutic activity when expressed by the virus infected tumor cell; a nucleocapsid, a genome, a DNA molecule of said recombinant oncolytic RNA virus; a cell, a pharmaceutical composition comprising said recombinant oncolytic RNA virus; its use for the manufacture of a medicament for the treatment of cancer; a pharmaceutical composition comprising the recombinant oncolytic RNA virus of any of claims 1 - 12, a virus genome of claim 14, and/or a DNA molecule of claims 15 or 16 etc. which virus, virus genome and/or DNA molecule comprises at least one transgene encoding for a prodrug enzyme; its use for the manufacture of a medicament for the treatment of cancer.

2. claims: 22 (complete), 24 - 27 (in part)

recombinant oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid coding for at least one transgene, i.e. a prodrug converting enzyme having a therapeutic activity when expressed by the virus infected tumor cell; a pharmaceutical composition comprising the recombinant oncolytic RNA virus of any of claims 1 - 12, a virus genome of claim 14, and/or a DNA molecule of claims 15 or 16 etc. which virus, virus genome and/or DNA molecule comprises at least one transgene encoding for a prodrug enzyme as well as its use for the manufacture of a medicament for the treatment of cancer.

3. claims: 23, 28 - 30 (complete)

recombinant oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid coding for at least one transgene, i.e. a protease having a therapeutic activity when expressed by the virus infected tumor cell; a pharmaceutical composition comprising the recombinant oncolytic RNA virus of any of claims 1 - 12, a virus genome of claim 14, and/or a DNA molecule of claims 15 or 16 etc. which virus, virus genome and/or DNA molecule comprises at least one transgene encoding for a protease as well as its use for the manufacture of a medicament for the treatment of cancer.

Information on patent family members

PCT/EP2005/012186

206

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005014017 A	17-02-2005	NONE	

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2005/012186

International filing date (day/month/year)
10.11.2005

Priority date (day/month/year)
12.11.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K35/76 C07K14/115

Applicant
SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for International preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office - P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas Tel. +31 70 340 - 2040 Tx: 31 651 epo nl Fax: +31 70 340 - 3018	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Schulz, R Telephone No. +31 70 340-4381
--	--	--



207

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2005/012186

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
- a. type of material:
- ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material:
- ☒ on paper
 - ☒ in electronic form
- c. time of filing/furnishing:
- ☒ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

- ☐ the entire international application
- ☒ claims Nos. 20, 21, 27, 30 with regard to industrial applicability

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 20, 21, 27, 30 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 20, 21, 27, 30
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:
- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).
- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See Supplemental Box for further details

208

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☐ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☒ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(I) with regard to novelty, Inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	3 - 5, 7, 11, 12, 21, 23 - 30
	No: Claims	1, 2, 6, 8 - 10, 13 - 20, 22
Inventive step (IS)	Yes: Claims	3 - 5, 24 - 30
	No: Claims	7, 11, 12, 21, 23
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-19, 22 - 26, 28, 29
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

III.1 Claims 20, 21, 27 and 30 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item IV

Lack of unity of invention

IV.1 Reference is made to the following document:

D1: Ebert, O. et al. (2004) Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer. Cancer Research 64(9), 3265 - 3270.

D2: Porosnicu, M. (2003) The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene. Cancer Research 63(23), 8366 - 8376.

D3: Ries, S. J. and Brandts, C. H. (2004) Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials. DDT 9(17), 759 - 768.

IV.2 The present application relates to recombinant oncolytic RNA viruses comprising a nucleic acid coding for at least one transgene, e. a binding protein, a prodrug converting enzyme or a protease having a therapeutic activity when expressed by the virus infected tumor cell as well as a pharmaceutical compositions such a recombinant oncolytic RNA virus and its use for the manufacture of a medicament for the treatment of cancer.

IV.2.1 This Authority considers that there are three inventions covered by the claims indicated as follows:

209

- I: Claims 1 - 21 (completely), 24 - 27 (in part) directed to a recombinant oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid coding for at least one transgene, i.e. a binding protein having a therapeutic activity when expressed by the virus infected tumor cell; the respective nucleocapsid, genome, DNA molecule of the recombinant oncolytic RNA virus; a cell, a pharmaceutical composition comprising said recombinant oncolytic RNA virus; its use for the manufacture of a medicament for the treatment of cancer; a pharmaceutical composition comprising the recombinant oncolytic RNA virus of any of claims 1 - 12, a virus genome of claim 14, and/or a DNA molecule of claims 15 or 16 etc. which virus, virus genome and/or DNA molecule comprises at least one transgene encoding for a prodrug enzyme; its use for the manufacture of a medicament for the treatment of cancer.
- II: Claims 22 (completely), 24 - 27 (in part) directed to a recombinant oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid coding for at least one transgene, i.e. a prodrug converting enzyme having a therapeutic activity when expressed by the virus infected tumor cell; a pharmaceutical composition comprising the recombinant oncolytic RNA virus of any of claims 1 - 12, a virus genome of claim 14, and/or a DNA molecule of claims 15 or 16 etc. which virus, virus genome and/or DNA molecule comprises at least one transgene encoding for a prodrug enzyme as well as its use for the manufacture of a medicament for the treatment of cancer.
- III: Claims 23 (completely), 28 - 30 (in part) directed to a recombinant oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid coding for at least one transgene, i.e. a protease having a therapeutic activity when expressed by the virus infected tumor cell; a pharmaceutical composition comprising the recombinant oncolytic RNA virus of any of claims 1 - 12, a virus genome of claim 14, and/or a DNA molecule of claims 15 or 16 etc. which virus, virus genome and/or DNA molecule comprises at least one transgene encoding for a protease as well as its use for the manufacture of a medicament for the treatment of cancer.

IV.2.2 The reasons for which these inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, as required by Rule 13.1 PCT, are as follows:

D1 discloses the construction of "a recombinant oncolytic RNA virus", i.e. a

recombinant vesicular stomatitis virus (VSV), "comprising a nucleic acid with at least one transgene", i.e. a mutant (L289A) F protein from NDV, "wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a binding protein", i.e. the F protein or fusion protein that is required for membrane fusion (Fig. 1, Fig. 6), "that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell", i.e. the expression of which led to enhanced oncolytic properties against multifocal hepatocellular carcinoma (HCC) in the livers of immunocompetent rats (abstract).

Moreover, D2 discloses "a recombinant oncolytic RNA virus", i.e. a recombinant VSV "comprising a nucleic acid with at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a prodrug-converting enzyme", i.e. for the expression of the fusion suicide gene E. coli cytosine deaminase (CD) / uracil phosphoribosyl transferase (UPRT) - a well-characterised enzyme prodrug system that functions similar to the herpesvirus TK paradigm "that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell, i.e. the insertion of the fusion CD / UPRT gene was found to potentiate the oncolytic efficiency of VSV. In light of the prior art, the problem underlying the present application can be regarded as the provision of further recombinant oncolytic RNA viruses comprising a nucleic acid coding for at least one transgene having a therapeutic activity when expressed by the virus infected tumor cell.

In view of the fact that such recombinant oncolytic RNA viruses have already been disclosed in the prior art (D1, D2), due to the essential difference between the respective transgenes representing the three alternative solutions and due to the fact that no further technical feature could be distinguished which in the light of the prior art could be regarded as special technical feature according to Rule 13.1 PCT, no single inventive concept (Rule 13.1 PCT) underlying these three solutions claimed by the present application could be identified.

Consequently, the groups of claims are not so linked by common or corresponding special technical features and the different inventions are not so linked by a single general inventive concept.

The application, hence does not meet the requirements of unity of invention as defined in Rules 13.1 and 13.2 PCT.

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability;

citations and explanations supporting such statement

V.1 Novelty (Art. 33(1)(2) PCT)

V.1.2 The present application does not meet the criteria of Art. 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1, 2, 6, 8 -10, 13 - 20 and 22 is not new in the sense of Art. 33(2) PCT:

V.1.2.1 D1 discloses the construction of a recombinant vesicular stomatitis virus (VSV) capable of inducing syncytia formation between tumour cells through membrane fusion at neutral pH. The virus displayed enhanced oncolytic properties against multifocal hepatocellular carcinoma (HCC) in the livers of immunocompetent rats (abstract). In fact, the recombinant VSV disclosed by said document is prejudicial with regard to novelty of subject-matter of claims 1, 2, 6, 8 - 10, 13 - 20, since said recombinant VSV is "an oncolytic RNA virus comprising a nucleic acid with at least one transgene", i.e. a mutant (L289A) F protein from NDV, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a binding protein, i.e. the F protein or fusion protein that is required for membrane fusion (Fig. 1, Fig. 6), that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell, i.e. the expression of which led to enhanced oncolytic properties against multifocal hepatocellular carcinoma (HCC) in the livers of immunocompetent rats.

V.1.2.2 D2 discloses a recombinant VSV for the expression of the fusion suicide gene *E. coli* cytosine deaminase (CD)/uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) - a well-characterised enzyme prodrug system that functions similar to the herpesvirus TK paradigm. The insertion of the fusion CD/UPRT gene was found to potentiate the oncolytic efficiency of VSV. A strong bystander effect was generated that contributed to the activation of the immune system against the tumour without detrimentally altering the kinetics of the virus-mediated oncolysis. The virus usefulness for the treatment of malignant diseases is discussed. In the light of D2's disclosure, subject-matter of claim 22 cannot be considered as novel in the sense of Art. 33(1)(2) PCT.

V.1.2.3 Subject-matter of claims 7, 11, 12, 21, 23 - 30 appears to be novel over the art and

to meet the requirements of Art. 33(1)(2)PCT.

V.3 Inventive step (Art. 33(2)(3) PCT)

V.3.1 The present application does not meet the criteria of Art. 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 7, 11, 12, 21 and 23 does not involve an inventive step in the sense of Art. 33(3) PCT:

V.3.2 In view of D1's disclosure, i.e. already disclosing "a recombinant oncolytic RNA virus comprising at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a binding protein that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell", the skilled person is considered as sufficiently enabled to chose any binding protein of interest and insert the respective nucleic acid coding for it into the oncolytic RNA virus thereby arriving at the subject-matter of dependent claims 7, 11, 12 and 21 without the exercise of any inventive activity.

V.3.3 The documents D1 and/or D2 can be considered as closest prior art for subject-matter of claim 23 disclosing recombinant oncolytic RNA viruses comprising a transgene coding for either a binding protein (D1) or a prodrug-converting enzyme (D2) that have a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.

Subject-matter of claim 23 differs in that it refers to a recombinant oncolytic RNA virus comprising at least one transgene, wherein the nucleic acid of this transgene(s) codes for a protease that has a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.

The problem to be solved may therefore be regarded as the provision of further recombinant oncolytic RNA viruses comprising at least one transgene coding for a protein having a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.

However, given the fact that the concept of "armed therapeutic viruses" is well established in the art (D3), the skilled person appears sufficiently enabled to choose another transgene, e.g. a protease having a beneficial effect in the virus-infected tumour cell. Consequently, he/she would arrive at the solution provided by

claim 23 without the exercise of any inventive activity. Subject-matter of claim 23 therefore cannot be considered as meeting the requirements of Art. 33(1)(3) PCT.

V.3.4 None of the documents neither discloses nor provides any incentive for the generation of the pharmaceutical compositions referred to in claims 24 and 28, the subject-matter of said claims might be in principle appear as comprising an inventive step. However, since the present application does not disclose any such pharmaceutical composition either, subject-matter of claims 24 - 30 cannot be considered as a solution of a technical problem and consequently does not meet the requirements of Art. 33(1)(3) PCT. In line with the above reasoning (V.3.3), subject-matter of claims 24 - 30 is considered as just another recombinant oncolytic RNA virus comprising at least one transgene coding for one or more proteins that has/have a therapeutic activity when expressed by the virus-infected tumor cell.

V.4 Industrial applicability (Art. 33(1) PCT)

V.4.1 For the assessment of the present claims 20, 21, 27 and 30 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.



No. 07-058654- -00000-0000

Fecha: 2007-06-08 17:01:20 Dep. 2020 NUECREACIONES
 Trib. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 211

Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

212

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

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 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 gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se 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 trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []

Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
 Conmutador: 3 82 08 40
 Fax: 350 52 20
 E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

213

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RAISBECK J. IAN
Apoderado(a) y/o Representante de
BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT

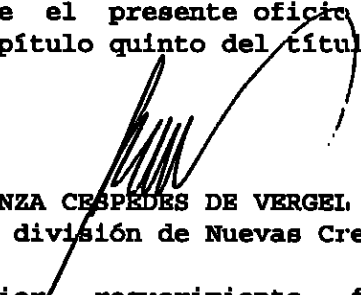
REFERENCIA	Radicación No.	7 58654
	Solicitud internacional	PCT/EP2005/012186
	Fecha inicio fase nacional	12/07/07
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	10973

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 Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

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 Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CRESPEDES DE VERGEL,
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 07 SET. 2007
jfernand