

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones



SOLICITUD

PCT

PATENTE DE INVENCION

08-133446

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

PROCESO PARA PRODUCIR POXVIRUS Y COMPOSICIONES DE POXVIRUS

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE

TRANSGENE S.A.

DOMICILIO

STRASBOURG CEDEX, FRANCIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO
C.C. 428.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-133446- -00000-0000

Fecha: 2008-12-16 16:16:13 Dep. 2020.NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios. 91

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

20 ene 2009

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.
☐ Capítulo I.☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **TRANSGENE S.A.**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Francia.Dirección: 11, rue de Molsheim,
F-67082 Strasbourg Cedex,
FranciaDomicilio: Strasbourg Cedex,
Francia**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**1. **Daniel MALARME**
14, rue du Klintz,
67280 Oberhaslach,
Francia3. **Claude SENE**
17, rue des Foulons,
67200 Strasbourg,
Francia2. **Yves CORDIER**
13, Boulevard Leblois,
F-67000 Strasbourg,
Francia

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/EP2007/005302Fecha: 15 de junio de 2007Publicación Internacional No. WO 2007/147528 A1Fecha: 27 de diciembre de 2007

6

Título (54)**PROCESO PARA PRODUCIR POXVIRUS Y COMPOSICIONES DE POXVIRUS**

7

Clasificación Internacional (51) C12N 015/863

8

PrioridadSI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

EP
US

(32) Fecha

20 de junio de 2006
29 de noviembre de 2006

(31) Número de Solicitud

06360027.4
60/861,452

9

Comprobante de pago No.: 08-91,662**Fecha:** 25 de noviembre de 2008

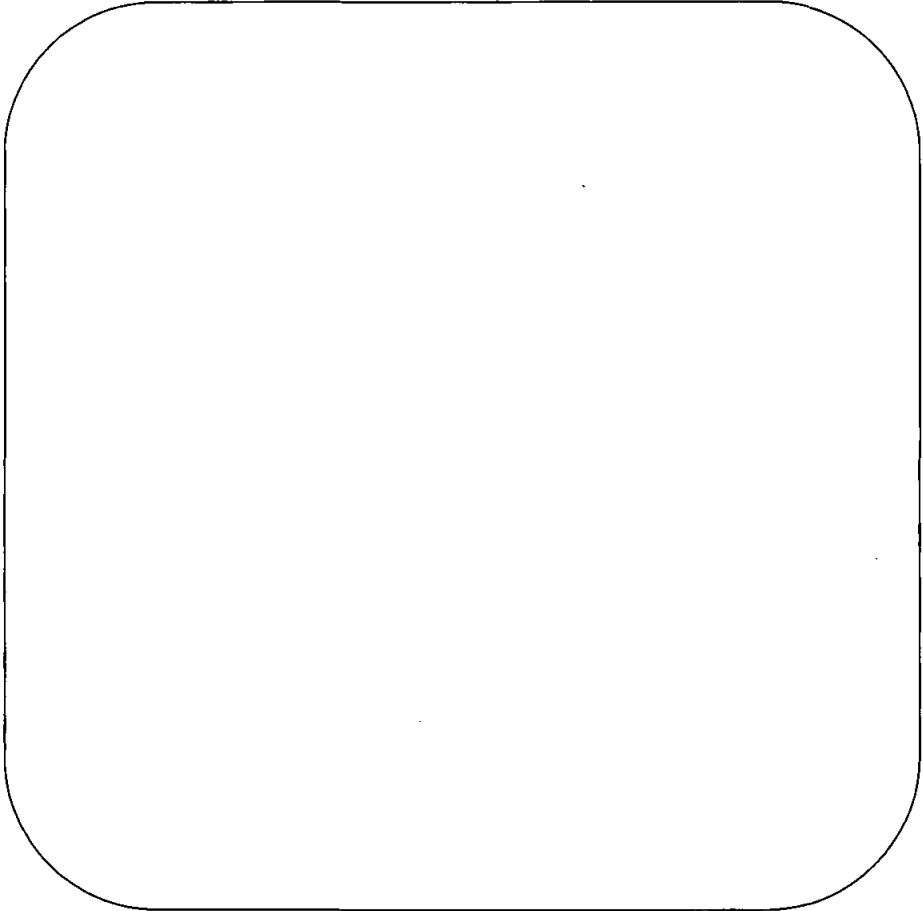
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 501.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

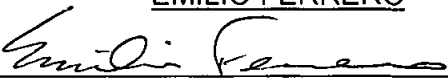
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA : 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/147528 A1

Descripción:

Páginas 23 en el idioma original

Páginas 36 en español

Reivindicaciones: Número (s) 29

Figuras: Número (s) 3

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 December 2007 (27.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/147528 A1

(51) International Patent Classification:

C12N 15/863 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 35/76 (2006.01)
C12N 7/02 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2007/005302

(22) International Filing Date: 15 June 2007 (15.06.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

06360027.4 20 June 2006 (20.06.2006) EP
60/861,452 29 November 2006 (29.11.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): TRANS-
GENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67082 Stras-
bourg Cedex (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): MALARME,
Daniel [BE/FR]; 14, rue du Klintz, 67280 Oberhaslach
(FR). CORDIER, Yves [FR/FR]; 13, boulevard Leblois,
F-67000 Strasbourg (FR). SENE, Claude [FR/FR]; 17,
rue des Foulons, 67200 Strasbourg (FR).

(74) Agent: VOSSIUS & Partner; Siebertstrasse 4, 81675
Munich (DE).

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

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, 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, MT, 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:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

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

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING POXVIRUSES AND POXVIRUS COMPOSITIONS

(57) Abstract: The present invention relates to compositions and pharmaceutical compositions comprising poxviruses and more particularly extracellular enveloped viruses. The present invention also relates to a process for producing poxviruses and poxviruses obtained thereof. Moreover, the present invention also relates to the use of said poxvirus and said composition for the preparation of a medicament.

WO 2007/147528 A1

Process for producing poxviruses and poxvirus compositions

The present invention relates to compositions and pharmaceutical compositions comprising poxviruses and more particularly extracellular enveloped viruses. The present invention also relates to a process for producing poxviruses and poxviruses obtained thereof. Moreover, the present invention also relates to the use of said poxvirus and said composition for the preparation of a medicament.

The arising of new threats (avian flu, west nile virus, anthrax, etc...) as well as the development of gene therapy has increased the need for producing and purifying poxviruses for prophylactic or therapeutic purposes. This is notably the case for the Mammalian Virus Ankara (MVA). This poxvirus which was initially used for vaccinating immunodeficient patients against Variola, is now also used as a vector for gene therapy purposes. For example, MVA is utilized as a vector for the MUC1 gene for vaccinating patients against tumor expressing Muc1 (Scholl et al., 2003, J Biomed Biotechnol., 2003, 3, 194-201). MVA carrying the gene coding HPV antigens is also used as a vector for the therapeutic treatment of ovarian carcinoma.

Poxviruses are a group of complex enveloped viruses that distinguish them principally by their unusual morphology, their large DNA genome and their cytoplasmic site of replication. The genome of several members of poxviridae, including the Copenhagen vaccinia virus (VV) strain (Goebel et al., 1990, Virol. 179, 247-266 and 517-563; Johnson et al., 1993, Virol. 196, 381-401) and the modified vaccinia virus Ankara (MVA) strain (Antoine et al., 1998, Virol. 244, 365-396), have been mapped and sequenced. VV has a double-stranded DNA genome of about 192 kb coding for about 200 proteins of which approximately 100 are involved in virus assembly. MVA is a highly attenuated vaccinia virus strain generated by more than 500 serial passages of the Ankara strain of vaccinia virus on chicken embryo fibroblasts (Mayr et al., 1975, Infection 3, 6-16). The MVA virus was deposited before Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) under depositary N⁶⁰² I-721. Determination of the complete sequence of the MVA genome and comparison with the Copenhagen VV genome allows the precise identification of the alterations which occurred in the viral genome and the definition of seven deletions (I to VII) and

numerous mutations leading to fragmented ORFs (Open Reading Frame) (Antoine et al., 1998, Virology 244, 365-396).

The natural pathway for intracellular uptake of enveloped viruses involves a series of steps including the binding of a viral polypeptide exposed at the virus surface to a cellular receptor and a fusion mechanism between the viral and cellular membranes resulting in viral genome release into the cytoplasm of the infected cell.

However, in poxvirus special case, the exact delivery pathway analysis is complicated by the existence of two morphologically distinct forms of infectious virus, termed intracellular mature virus (IMV) and extracellular enveloped virus (EEV). The IMV form is, among other particularities, characterized by a monolipid envelope surrounding the viral core and is principally localized in the cytoplasm of the infected cells, although it might be extracellularly released after lysis of the infected cells. Many of the natural polypeptides exposed at the surface of the IMV lipid envelope have been identified, such as for example the p14 kDa and p21 kDa proteins, respectively encoded by the A27L gene (Rodriguez et al., 1985, J. Virol. 56, 482-488; Rodriguez et Estaban, 1987, J. Virol. 61, 3550-3554) and the A17L gene, as well as proteins encoded by L1R, A14L, D8L, A9L (Yeh et al., 2000, J. Virol. 74, 9701-9711), E10R (Senkevich et al., 2000, Virol. 5, 244-252) and H3L genes. Compared to the IMV, the EEV form has an additional outer lipid membrane envelope (double lipid layer) acquired from the trans-Golgi network cisternae. It corresponds to the viral form released outside the infected cells. The EEV surface membrane envelope shows about 10 proteins which are absent from the IMV surface, such as for example the encoded B5R, A34R and hemagglutinin (HA) gene products. The co-existence of said IMV and EEV forms has been described for most of the vaccinia strains (e.g. Copenhagen and MVA strains) as well as for other poxviruses such as the fowl poxvirus (Boulanger et al., 2000, J. Gen. Virol. 81, 675-687).

As they are most stable in the environment, IMVs play a predominant role in a host to host transmission (Hooper et al. Virology, 2003, 306, 181-185). With this respect, IMV particles have been the vectors of choice for gene therapy purposes. For this reason, the available poxvirus purification processes only treat the virus present in the packaging cells (i.e. IMV), whereas the EEV particles shed into the culture media are discarded. Because of the presence at its surface of a larger variety of polypeptides than onto the IMV surface, the use of recombinant EEVs

7

having a targeted infection specificity has already been proposed (US20050208074; Galmiche et al. J. Gen. Virol., 1997, 78, 3019-3027). However, even for this specific use, IMV particles are particularly preferred (US20050208074, page 4, chapter 29).

Surprisingly, the applicant has found that EEVs with no targeted infection specificity have a greater therapeutic and/or prophylactic efficacy compared to IMV.

With this respect, the present invention relates to a poxvirus and preferably a recombinant poxvirus, wherein said poxvirus is an EEV with no targeted infection specificity. The present invention also relates to a composition and preferably a pharmaceutical composition comprising recombinant EEV with no targeted infection specificity.

As used throughout the entire application, the terms "a" and "an" are used in the sense that they mean "at least one", "at least a first", "one or more" or "a plurality" of the referenced components or steps, unless the context clearly dictates otherwise. For example, the term "a cell" includes a plurality of cells, including mixtures thereof.

The term "and/or" wherever used herein includes the meaning of "and", "or" and "all or any other combination of the elements connected by said term".

The term "about" or "approximately" as used herein means within 20%, preferably within 10%, and more preferably within 5% of a given value or range.

As used herein, the term "comprising" is intended to mean that the products, compositions and methods include the referenced components or steps, but not excluding others. "Consisting essentially of" when used to define products, compositions and methods, shall mean excluding other components or steps of any essential significance. Thus, a composition consisting essentially of the recited components would not exclude trace contaminants and pharmaceutically acceptable carriers. "Consisting of" shall mean excluding more than trace elements of other components or steps.

Poxvirus family comprises viruses of the Chordopoxvirus and Entomopoxvirus subfamilies. Among these, the poxvirus according to the invention is preferably chosen from the group comprising Orthopoxviruses, Parapoxviruses, Avipoxviruses, Capripoxviruses, Leporipoxviruses, Suipoxviruses, Molluscipoxviruses, Yatapoxviruses. According to a more preferred embodiment, the poxvirus of the invention is an orthopoxvirus.

The Orthopoxvirus is preferably a vaccinia virus and more preferably a modified vaccinia virus Ankara (MVA) in particular MVA 575 (ECACC V00120707) and MVA-BN (ECACC V00083008).

As previously indicated, an IMV particle comprises the viral core including the viral genome surrounded by a monolayer lipid envelope. The term "EEV" refers to an IMV particle surrounded by an additional bilayer lipid envelope exposing at its surface cellular as well as viral polypeptides.

The term "targeted infection specificity" as used herein refers to a controlled infection specificity, where a poxviral particle is engineered to display a new or enhanced tropism towards a target cells, compared to a related non modified poxvirus particle. As a result, a poxviral particle with a targeted infection specificity shows a propensity to infect said target cells unlike its related non modified poxviral particle, which means that the poxviral particle with a targeted infection specificity infects more efficiently or more rapidly its target cells (displaying at their surface the anti-ligand recognized by the ligand moiety displayed at the surface of the poxviral particle of the invention) than non target cells (that do not display at their surface such an anti-ligand), whereas a related poxviral particle with no targeted infection specificity will infect said target cells with a lower or a similar efficiency compared to non-target cells.

The term "recombinant virus" refers to a virus comprising an exogenous sequence inserted in its genome. As used herein, an exogenous sequence refers to a nucleic acid which is not naturally present in the parent virus.

In one embodiment, the exogenous sequence encodes a molecule having a directly or indirectly cytotoxic function. By "directly or indirectly" cytotoxic, we mean that the molecule encoded by the exogenous sequence may itself be toxic (for example ricin, tumour necrosis factor, interleukin-2, interferon-gamma, ribonuclease, deoxyribonuclease, Pseudomonas exotoxin A) or it may be metabolised to form a toxic product, or it may act on something else to form a toxic product. The sequence of ricin cDNA is disclosed in Lamb et al (Eur. J. Biochem., 1985, 148, 265-270) incorporated herein by reference.

In a preferred embodiment of the invention, the exogenous sequence is a suicide gene. A suicide gene encodes a protein able to convert a relatively non-toxic prodrug to a toxic drug. For example, the enzyme cytosine deaminase converts 5-

9

containing prodrugs, 5-fluorocytosine and other 5-fluorouridine prodrugs which can be converted. Examples of cytotoxic drugs that can be derivatized into a prodrug form for use in this invention include, but are not limited to, etoposide, teniposide, adriamycin, daunomycin, carminomycin, aminopterin, dactinomycin, mitomycins, cis-platinum and cis-platinum analogues, bleomycins, esperamicins (see for example US4,675,187), 5-fluorouracil, melphalan and other related nitrogen mustards.

In a further embodiment the exogenous gene encodes a ribozyme capable of cleaving targeted RNA or DNA. The targeted RNA or DNA to be cleaved may be RNA or DNA which is essential to the function of the cell and cleavage thereof results in cell death or the RNA or DNA to be cleaved may be RNA or DNA which encodes an undesirable protein, for example an oncogene product, and cleavage of this RNA or DNA may prevent the cell from becoming cancerous.

In a still further embodiment the exogenous gene encodes an antisense RNA.

By "antisense RNA" we mean an RNA molecule which hybridises to, and interferes with the expression from a mRNA molecule encoding a protein or to another RNA molecule within the cell such as pre-mRNA or tRNA or rRNA, or hybridises to, and interferes with the expression from a gene.

In another embodiment of the invention, the exogenous sequence replaces the function of a defective gene in the target cell. There are several thousand inherited genetic diseases of mammals, including humans, which are caused by defective genes. Examples of such genetic diseases include cystic fibrosis, where there is known to be a mutation in the CFTR gene; Duchenne muscular dystrophy, where there is known to be a mutation in the dystrophin gene; sickle cell disease, where there is known to be a mutation in the HbA gene. Many types of cancer are caused by defective genes, especially protooncogenes, and tumour-suppressor genes that have undergone mutation.

Examples of protooncogenes are ras, src, bcl and so on; examples of tumour-suppressor genes are p53 and Rb.

In a further embodiment of the invention, the exogenous sequence encodes a Tumor Associated Antigen (TAA). TAA refers to a molecule that is detected at a higher frequency or density in tumor cells than in non-tumor cells of the same tissue type. Examples of TAA includes but are not limited to CEA, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GP-100, MUC-1, MUC-2, pointed mutated ras oncogene, normal or point

mutated p53, overexpressed p53, CA-125, PSA, C-erb/B2, BRCA I, BRCA II, PSMA, tyrosinase, TRP-1, TRP-2, NY-ESO-1, TAG72, KSA, HER-2/neu, bcr-abl, pax3-fkhr, ewe-fli-1, surviving and LRP. According to a more preferred embodiment the TAA is MUC1.

The recombinant poxvirus can comprise more than one exogenous sequence and each exogenous sequence can encode more than one molecule. For example, it can be useful to associate in a same recombinant poxvirus, an exogenous sequenced coding a TAA with an exogenous sequence coding a cytokine.

In another embodiment of the invention, the exogenous gene encodes an antigen. As used herein, "antigen" refers to a ligand that can be bound by an antibody; an antigen need not itself be immunogenic.

Preferably the antigen is derived from a virus such as for example HIV-1, (such as gp 120 or gp 160), any of Feline Immunodeficiency virus, human or animal herpes viruses, such as gD or derivatives thereof or Immediate Early protein such as ICP27 from HSV1 or HSV2, cytomegalovirus (such as gB or derivatives thereof), Varicella Zoster Virus (such as gpl, II or III), or from a hepatitis virus such as hepatitis B virus for example Hepatitis B Surface antigen or a derivative thereof, hepatitis A virus, hepatitis C virus (preferentially non structural protein from genotype 1b strain ja) and hepatitis E virus, or from other viral pathogens, such as Respiratory Syncytial Virus, Human Papilloma Virus (preferentially the E6 and E7 protein from the HPV16 strain) or Influenza virus, or derived from bacterial pathogens such as Salmonella, Neisseria, Borrelia (for example OspA or OspB or derivatives thereof), or Chlamydia, or Bordetella for example P.69, PT and FHA, or derived from parasites such as plasmodium or Toxoplasma.

In a particularly preferred embodiment of the invention, the recombinant poxvirus encodes the same proteins than TG4010 (Rochlitz et al. J Gene Med. 2003 Aug;5(8):690-9) and TG4001 (Liu et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14567-71). In another particularly preferred embodiment of the invention, the poxvirus of the invention has a sequence which is more than 90% homologous to the sequence of TG4010 or of TG4001.

Advantageously, the recombinant poxvirus further comprises the elements necessary for the expression of the exogenous sequence. The elements necessary for the expression comprise of the set of elements allowing the transcription of a

nucleotide sequence to RNA and the translation of a mRNA to a polypeptide, in particular the promoter sequences and/or regulatory sequences which are effective in the cell to be infected by the recombinant poxvirus of the invention, and optionally the sequences required to allow the excretion or the expression at the surface of the cells for said polypeptide. These elements may be inducible or constitutive. Of course, the promoter is adapted to the recombinant poxvirus selected and to the host cell. There may be mentioned, by way of example, the vaccinia virus promoters p7.5K pH5R, pK1L, p28, p11 or a combination of said promoters. The literature provides a large amount of information relating to such promoter sequences.

The elements necessary may, in addition, include additional elements which improve the expression of the exogenous sequence or its maintenance in the host cell. There may be mentioned in particular the intron sequences (WO 94/29471), secretion signal sequences, nuclear localization sequences, internal sites for reinitiation of translation of the IRES type, poly A sequences for termination of transcription.

Available poxvirus production processes comprised the replication of the virus in a cell line (e.g. HeLaS3), in embryonated eggs or in Chicken Embryo Fibroblasts. After the replication of the virus, the culture media is discarded, the cells are lysed and the poxvirus released from the cells is purified by sucrose cushion centrifugation (Kotwal and Abraham; Poxvirus growth, Purification and titrating in Vaccinia Virus and Poxvirology, 2004, 101-108, Humana Press Inc., Totowa, NJ; USA). With these processes, no EEVs are present in the purified composition.

However, the available virus production processes are not satisfactory. Firstly, they comprise the use of compounds deriving from animals such as serum and enzymes. The use of compounds deriving from animals in production processes has several drawbacks. For example, the chemical composition of these compounds may vary between lots, even from a single manufacturer. The compounds may also be contaminated with infectious agents (e.g., mycoplasma and viruses) which can seriously undermine the health of the cultured cells when these contaminated supplements are used in cell culture media formulations. Moreover, the use of serum supplementation of culture media can complicate and increase the costs of the purification of the desired substances from the culture media due to nonspecific co-purification of serum or extract proteins. Most importantly, the use of undefined

12

compounds may hinder the approval by medical agencies of the pharmaceutical composition obtained by the process.

The present invention further provides a process for producing a poxviral particle according to the invention, comprising the steps of:

- a) preparing a culture of packaging cells,
- b) infecting said cell culture,
- c) culturing said infected cells for an appropriate period of time,
- d) recovering the poxviral particles produced from the culture supernatant and/or the packaging cells, and
- e) optionally, purifying the recovered poxviral particles.

The process according to the invention is preferably free from animal products.

The process according to the invention can also be used for the production of a wild type, and/or an attenuated poxvirus.

As used herein, the term "attenuated poxvirus" refers to any poxvirus that has been modified so that its pathogenicity in the intended subject is substantially reduced. Preferably, the poxvirus is attenuated to the point it is nonpathogenic from a clinical standpoint, i.e., that subjects exposed to the poxvirus do not exhibit a statistically significant increased level of pathology relative to control subjects. According to a preferred embodiment of the invention, the attenuated virus is an attenuated Vaccinia virus such as MVA.

The term "infection" refers to the transfer of the viral nucleic acid to a cell, wherein the viral nucleic acid is replicated, viral proteins are synthesized, or new viral particles assembled.

As used herein, the term "packaging cell" refers to a cell which can be infected by the poxvirus to be produced. The packaging cell can be a primary cell, a recombinant cell and/or a cell line. For example, a recombinant cell which contains the elements necessary for the production of a recombinant virus which are lacking in a recombinant viral vector can be used.

In one embodiment of the invention, the packaging cell is an immortal avian cell.

In one embodiment of the invention, the packaging cell is a DF1 cell (US5,879,924), which is a spontaneously immortalized chicken cell line derived from 10 day old East Lansing Line (ELL-0) eggs.

13

Immortal avian cell can be derived from embryonic stem cells by progressive severance from growth factors and feeder layer, thus maintaining growth features and infinite lifespan characteristic of undifferentiated stem). For example, the Ebx chicken cell line (WO2005007840) has been obtained by this process.

According to a preferred embodiment, a duck embryo permanent cell line can also be used. For example, the cell line, designated as DEC 99 (Ivanov et al. Experimental Pathology And Parasitology, 4/2000 Bulgarian Academy of Sciences) has been cultured over 140 consecutive passages and it is not tumorigenic for birds. The DEC 99 cell line is a standard cell culture system that has been used for research and can be applied for the needs of biotechnology. According to a more preferred embodiment, the packaging cell is a cell line obtained by the process disclosed in patent application EP06360001.9.

According to another preferred embodiment, the packaging cell used in the process according to the invention is a chicken embryo fibroblast (CEF). The preparation and use of CEF for the production of viruses are well known to the one skilled in the art.

CEF are preferably extracted from Specific Pathogen Free (SPF) eggs. SPF eggs are commercially available, for example from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). Said eggs are preferably more than 9 days old, more preferably between, 10 and 14 days old and even more preferably are 12 days old.

Before the extraction of the embryo, the egg is preferably disinfected. Many methods and products dedicated to the disinfection of eggs are available in the prior art. Incubation in a formol solution (e.g. 2% formol, 1 min.) followed by a rinsing in 70% ethanol is particularly preferred.

The cells of the embryos are then dissociated and purified. According to a preferred embodiment of the invention, the cells are subjected to an enzymatic digestion step that allows the destruction of the intercellular matrix. For this purpose, the use of enzyme able to digest the intercellular matrix is particularly useful. Such enzyme can be selected from the group comprising but not limited to Trypsin, Collagenase, Pronase, Dispase, Hyaluronidase and Neuraminidase. This enzyme can be used alone or in combination. In a particularly preferred embodiment of the invention dispase and Trypsin (e.g. TrypLE select from Gibco™) are used in combination. The one skilled in the art is able to determine the enzyme

concentration, the temperature and the length of incubation allowing an efficient separation of the cells.

According to a preferred embodiment, the process according to the invention is free from animal products (except the packaging cell). With this respect, the enzyme(s) used for the preparation of CEF is (are) preferably of recombinant origin. As used herein, « animal products » means any compound or collection of compounds that was produced in or by an animal cell in a living organism.

The preparation of CEF can further includes a filtration step (and/or a centrifugation step in order to remove contaminants.

This primary CEF cell can either be used directly or after one further cell passage as secondary CEF cell.

The one skilled in the art is able to select the most appropriate cell for the production of a specific virus. According to a preferred embodiment, the process according to the invention comprises the use of CEF or a cell according to EP06360001.9 for the production of a MVA.

The packaging cell used in the process according to the invention is cultivated in an appropriate cell culture media. It is possible to use more than one culture medium in the process according to the invention. For example, a first culture medium can be used during the preparation of the packaging cell (i.e. during step a) and a second cell culture medium for the infection (i.e. during step c and/or step b).

According to a preferred embodiment, the cell culture media according to the invention is free from animal product.

Many media free from animal product has been already described and some of them are commercially available. For example 293 SFM II; 293-F Cells, SFM Adapted; 293-H Cells, SFM Adapted; 293fectin™ Transfection Reagent ;CD 293 AGT™; CD 293 Medium; FreeStyle™ 293 Expression System; FreeStyle™ 293 Medium; FreeStyle™ 293-F Cells, SFM Adapted; Adenovirus Expression Medium (AEM) Growth Medium for PER.C6® Cells; CD 293 AGT™; CD 293 Medium ; COS-7L Cells, SFM Adapted; EPISERF® Medium; OptiPro™ SFM; VP-SFM; VP-SFM AGT™. (all available from invitrogen) can be used as cell culture media in the process according to the invention.

When the packaging cell is a CEF, VP-SFM (invitrogen) for step a and Basal Medium Eagle (invitrogen) for step b and c are particularly preferred.

LS

In the specific embodiment where the packaging cells are CEF, the cell culture medium is seeded with between 0.5 to 1.5 and preferably between 1.1 and 1.3 and more preferably about 1.2 embryo/l of cell culture medium. In this embodiment, the CEF are preferably cultivated for between 1 and 5 days, more preferably between 1 and 2 days and even more preferably 2 days before infection.

In the specific embodiment where the poxvirus to produce is MVA, the virus is introduced in the cell culture vessel at a MOI which is preferably comprised between 0.001 and 0.1, more preferably between 0.03 and 0.07 and even more preferably about 0.05.

According to a preferred embodiment of the invention, during step c, the packaging cells are cultivated at a temperature which is lower than 37°C., preferably between 30°C and 36.5°C or between about 32°C and about 36°C, more preferably between 33°C and 35°C, most preferably at 34°C.

According to preferred embodiment of the invention, step c lasts between one and six days, more preferably between two and four days and most preferably about 72 hours.

After the infection step, the cell culture media used to cultivate the packaging cell is collected. Said cell culture media comprised the EEV particles shed by the infected packaging cell. According to a preferred embodiment, after the infection step, the cell culture media and the packaging cell are collected. The cell culture media and the packaging cells can be pooled or collected separately.

In order to recover the poxviruses present in the packaging cells, the process according to the invention may comprises a step allowing the disruption of the packaging cell membrane. This step leads to the liberation of the poxvirus from the packaging cell. The disruption of the packaging cell membrane can be induced by various techniques well known by the one skilled in the art. These techniques comprised but are not limited to sonication, freeze/thaw, hypotonic lysis and microfluidization.

According to a preferred embodiment of the invention, the packaging cell membrane is disrupted by using a high speed homogenizer. High speed homogenizers are commercially available from Silverson Machines Inc (East Longmeadow, USA) or Ika-Labortechnik (Staufen, Germany). According to particularly preferred embodiment, said High Speed homogeneizer is a SILVERSON L4R.

22

When the packaging cell and the cell culture media are pooled, the disruption of the packaging cell membrane is not induced by freeze/thaw as this technique leads to the destruction of the EEV particles (Ichihashi y. et al., 1996, virology, 217(2), 478-85).

According to a preferred embodiment, step d) further comprises a clarification step allowing the withdrawal of the cellular debris. According to a more preferred embodiment of the invention, said clarification step is a depth filtration step.

Depth filtration includes but are not limited to the use of one or more commercially available products: [CUNO Incorporated AP series depth filters (Examples include AP01), CUNO Incorporated CP series depth filters (Example include CP10, CP30, CP50, CP60, CP70, CP90), CUNO Incorporated HP series depth filters (Examples include HP10, HP30, HP50, HP60, HP70, HP90), CUNO Incorporated Calif. series depth filters (Examples include CA10, CA30, CA50, CA60, CA70, CA90), CUNO Incorporated SP series depth filters (Examples include SP10, SP30, SP50, SP60, SP70, SP90), CUNO Delipid and Delipid Plus filters, Millipore Corporation CE series depth filters (Examples include CE15, CE20, CE25, CE30, CE35, CE40, CE45, CE50, CE70, CE75), Millipore Corporation DE series depth filters (Examples include DE25, DE30, DE35, DE40, DE45, DE50, DE55, DE560, DE65, DE70, DE75), Millipore Corporation HC filters (Examples include A1HC, B1HC, COHC), CUNO Polynet Filters (An example include Polynet-PB), Millipore Clarigard and Polygard filters, CUNO Life Assure filters, ManCel Associates depth filters (Examples include but are not limited to PR 12 UP, PR12, PR 5 UP), and PALL or SeitzSchenk Incorporated filters. In order to improve the clarification capacity of the available depth filtration units, it can be useful to couple two or more units with decreasing pore sizes. In this embodiment, the mixture to be clarified passes through the first depth filtration unit where the biggest contaminants are retained and subsequently passes through the second depth filtration unit. According to an even more preferred embodiment of the invention, a sartopure© (sartorius) with a pore size of 8 µm coupled to a sartopure© with a pore size of 5µm is used for the depth filtration step.

According to a preferred embodiment, the process according to the invention further comprises a concentration step. More preferably, said concentration step

17

further allows the elimination of the proteins present in the mixture obtained from the previously described steps.

According to a more preferred embodiment of the invention, said concentration step is a microfiltration step. Microfiltration is a pressure driven membrane process that concentrates and purifies large molecules. More specifically, a solution is passed through a semi-permeable membrane whose pore sizes have been chosen to reject the large particles (viruses) in the retentate, and allow the small molecules (e.g. proteins) to pass through the membrane into the permeate. Microfiltration reduces the volume of the extraction solution.

According to a preferred embodiment of the invention, the microfiltration step is followed by a diafiltration step. These two steps can advantageously be done with the same filtration membranes. Diafiltration is an improvement of microfiltration and involves diluting the retentate with a solution to effect a reduction in the concentration of the impurities in the retentate. The dilution of the retentate allows washing out more of the impurities from the retentate. It is understood that the diafiltration may be carried out in a batch mode, semi-continuous mode, or a continuous mode. The diafiltration step can be advantageously used to change the buffer in which the virus is comprised. For example, it can be useful to exchange the buffer used in the purification process against a pharmaceutically acceptable buffer

Preferably, the filtration membranes used in the microfiltration and/or in the diafiltration step have a pore size comprised between 0.01 and 0.15 μm , and more preferably about 0.1 μm .

Nucleic acids may adhere to cell derived particles such as viruses. With this respect, the process according to the invention can optionally further comprises a step consisting in removing the contaminating nucleic acids present in the solution. For this purpose, nucleases can be utilized. Exemplary nucleases include Benzonase or any other DNase or RNase commonly used within the art, among them, Benzonase is particularly preferred.

Benzonase degrades nucleic acid and have no proteolytic activity. Benzonase rapidly disintegrates nucleic acid by hydrolyzing internal phosphodiester bonds between specific nucleotides. Upon complete digestion, all free nucleic acids present in solution are reduced to oligonucleotides 2 to 4 bases in length.

18

Benzonase can be used at a final concentration comprised between 50 and 400 U/ml, preferably between 100 and 300 U/ml and more preferably between 150 and 250 U/ml. The Benzonase treatment can last between 1 and 4 hours and even more preferably between 1.5 and 2.5 hours.

However, when the depth filtration, microfiltration and diafiltration previously described are used, the use of nucleases and more particularly, the use of benzonase is not necessary. With this respect, the present invention also relates to a process for the production of poxviruses wherein no nuclease and more particularly no benzonase is used.

At this stage, the poxvirus obtained by the process previously described is sufficiently purified. It can be desirable to change the buffer in which the virus is comprised. For example, it can be useful to exchange the buffer used in the purification process against a pharmaceutically acceptable buffer. Many methods usable to change the buffer are known to the one skilled in the art. Among them, tangential filtration is particularly preferred.

Tangential filtration is a filtration technique wherein the suspension to be filtered moves at a high speed along a direction which is parallel to filtrating surface in order to create a suspension turbulence which prevents the filtration cake formation as well as the frequent filter blocking.

While suspension flows at high speed parallel to filtering surface, solute passes through the filtering surface holes because of the pressure difference and is continuously removed. Filtering surface should be such as to mechanically resist to pressure difference between the retentate compartment (i.e. the suspension concentrating compartment) and the permeate compartment (clear filtered solution free from suspended particles).

The various steps comprised in the process according to the invention can be implemented in separated working places and/or in different time periods. For example, the infection of the packaging cell and the purification of the poxviruses can be made in different working places. As well, the packaging cell and/or the cell culture media can be stored (e.g at -80°C) as long as necessary, before being purified.

The present invention also relates to compositions obtained by the process previously described and to composition comprising the poxvirus of the invention.

Preferably, the composition of the invention comprises more than 1%, preferably more than 5%, even more preferably more than 10% and most preferably at least 20% of the poxviruses comprised in said composition are EEV.

According to a preferred embodiment, the composition according to the invention has a titer of at least 10^5 , preferably of at least 10^6 , more preferably of at least 10^7 , even more preferably of at least 10^8 pfu per ml.

According to another preferred embodiment, the composition according to the invention has a titer of at least 10^3 , preferably 10^4 and most preferably at least 3×10^5 pfu per μ g of protein.

The present invention also relates to pharmaceutical composition comprising the poxvirus obtained by the process of the invention, and/or composition according to the invention. As used herein, "pharmaceutical composition" refers to a composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

Such a carrier is preferably isotonic, hypotonic or weakly hypertonic and has a relatively low ionic strength, such as for example a sucrose solution. Moreover, such a carrier may contain any solvent, or aqueous or partially aqueous liquid such as nonpyrogenic sterile water. The pH of the pharmaceutical composition is, in addition, adjusted and buffered so as to meet the requirements of use *in vivo*. The pharmaceutical composition may also include a pharmaceutically acceptable diluent, adjuvant or excipient, as well as solubilizing, stabilizing and preserving agents. For injectable administration, a formulation in aqueous, nonaqueous or isotonic solution is preferred. It may be provided in a single dose or in a multidose in liquid or dry (powder, lyophilisate and the like) form which can be reconstituted at the time of use with an appropriate diluent.

The present invention also relates to the poxvirus and the composition obtained by the process according to the invention.

The present invention also relates to the use of a process according to the invention for the production of a virus, a composition and/or a pharmaceutical composition.

The present invention also relates to the use of a poxvirus, a composition and/or a pharmaceutical composition according to the invention for the preparation of a medicament.

According to a preferred embodiment the medicament according to the invention is for the therapeutic or prophylactic treatment of cancer.

Among the applications which may be envisaged, there may be mentioned cancers of the breast, of the uterus (in particular those induced by papilloma viruses), of the prostate, of the lungs, of the bladder, of the liver, of the colon, of the pancreas, of the stomach, of the esophagus, of the larynx, of the central nervous system (in particular glioma) and of the blood (lymphomas, leukemia and the like).

A composition according to the invention may be manufactured conventionally for administration by the local, parenteral or digestive route. The routes of administration which may be envisaged are many. There may be mentioned, for example, the intragastric, subcutaneous, intracardiac, intramuscular, intravenous, intraperitoneal, intratumor, intranasal, intrapulmonary or intratracheal route. For the latter three embodiments, administration by aerosol or instillation is advantageous. The administration may be made as a single dose or repeated once or several times after a certain time interval. The appropriate route of administration and dosage vary as a function of various parameters, for example, of the individual, of the disease to be treated or of the gene(s) of interest to be transferred.

According to a first possibility, the medicament may be administered directly *in vivo* (for example by intravenous injection, into an accessible tumor or at its periphery, subcutaneously for a therapeutic or prophylactic vaccination). It is also possible to adopt the *ex vivo* approach which consists in collecting cells from the patient (bone marrow stem cells, peripheral blood lymphocytes, muscle cells and the like), transfecting or infecting them *in vitro* according to prior art techniques and readministering them to the patient.

It is moreover possible to envisage, where appropriate and without departing from the scope of the present invention, carrying out simultaneous or successive administrations, by different routes, of the various components contained in the pharmaceutical composition or composition according to the invention.

According to an advantageous embodiment of the invention, the therapeutic use or the method of treatment is combined with a second treatment of the patient by surgery (partial or complete removal of the tumor), by radiotherapy or chemotherapy. In this particular case, the treatment according to the invention is applied prior to,

31

concomitantly with or subsequent to said second treatment. Preferably, this treatment will be applied subsequent to said second treatment.

According to another preferred embodiment the medicament according to the invention is for the therapeutic or prophylactic treatment of infectious diseases, in particular of viral origin, induced by hepatitis B or C viruses, HIV, herpes, retroviruses and the like

The examples which follow are intended to illustrate the various subjects of the present invention and are consequently not limiting in character.

Table 1: depicts the survival rate of C57BL/6 mice which as been implanted with TC1 cells expressing HPV 16 E6 and E7 and C-Ha-ras oncogene. The different groups of mice are treated with compositions comprising IMV and EEV encoding HPV antigens, IMV encoding the HPV antigens or IMV encoding no antigens.

Table 2: depicts percentage of C57BL/6 mice free from tumor after implantation with TC1 cells expressing HPV 16 E6 and E7 and C-Ha-ras oncogene. The different groups of mice are treated with compositions comprising IMV and EEV encoding HPV antigens, IMV encoding the HPV antigens or IMV expressing no antigens.

Table 3: depicts the survival rate of C57BL/6 mice which as been implanted with TC1 cells expressing MUC1. The different groups of mice are treated with compositions comprising IMV and EEV encoding MUC1 and IL2, IMV encoding MUC1 and IL2 or IMV expressing no antigens.

22

Examples

1. Preparation of compositions comprising IMV and EEV.

A. Preparation of CEF.

Sixty six SPF eggs are incubated in for 60s. in a 2% formol solution. After being rinsed with 70% ethanol, the eggs are open, the embryos are extracted and dissected. The obtained tissues are then digested at 36.5°C for 120 min by dispase (UI/ml) and triple select (UI/ml).

The mixture is filtrated to remove undigested tissues and the CEF are collected by centrifugation (2300 rpm, 15 min.)

B. CEF cultivation and infection.

The CEF are incubated in 55 l of VP-SFM (invitrogen) for 2 days at 36.5°C. The cell culture media is then discarded and the poxvirus (0.05 MOI) is added in 55 l of Basal Medium Eagle (invitrogen). The infected packaging cells are then incubated for three days.

C. Poxvirus purification.

The packaging cell and the cell culture media are collected. The mixture is then homogenised for 15 min. with a Silverson® L4R high speed homogeniser. The obtained mixture is then clarified by depth filtration on a sartopure 8µm (sartorius) coupled to a sartopure 5µm at a flow rate of 1l/min.

The mixture is further concentrated 18 times through a 0.1µm Prostack Microfiltration Module (ref: PSVVAG021, Millipore).

The poxviral composition is further diafiltrated on the same module against the desired pharmaceutically acceptable carrier.

2. Therapeutic efficiency comparison between a composition comprising EEV and IMV and a composition comprising IMV only.

A. Therapeutic treatment of mice bearing Tumor expressing HPV antigens.

Denomination and Brief description of each vector construction

TG4001: MVA vector carrying the coding sequences for HPV proteins, E6 and E7, (under the control of promoter p7.5) and IL2 (under the control of promoter pH5R). Two lots, one comprising IMV and EEV (prepared as previously disclosed) and one comprising only IMV were tested.

N33: empty vector MVA which expresses neither HPV proteins E6 and E7 nor IL2 was used as negative control.

Animal model

C57Bl/6 female mice aged 6 to 8 weeks were used throughout this study. These mice were obtained from Charles River (Rouen, France).

Specification: The animals were 6 week old on the arrival day. At the beginning of experimentation, they were less than 8 week old.

Environment: The animals were housed in a single, exclusive room air-conditioned to provide a minimum of 11 air changes per hour. The temperature and relative humidity ranges were within 18°C and 22°C and 40 to 70 % respectively. Lighting was controlled automatically to give a cycle of 12 hours of light and 12 hours of darkness.

Specific pathogen free status is checked by regular control of the environment.

Diet: Throughout the study the animals had access *ad libitum* to sterilized diet type D04 (UAR, Epinay sur Orge, France). Water was provided *ad libitum* via bottles.

Acclimatization and health procedures: All animals were given a clinical inspection for health on arrival. They were acclimatized in a specific pathogen free (SPF) animal facility between one and two weeks before the start of the experiment in order to ensure their suitability for the study.

Tumor cells characteristics and conditions of use:

The TC1 line has been derived from primary lung epithelial cells of C57Bl/6 mice co-transformed with HPV-16 E6 and E7 and c-Ha-ras oncogenes. These cells grow in DMEM with Glutamine (2mM), fetal calf serum (10%), non essential amino acids (0.1mM), Na Pyruvate (1mM), β mercapto-ethanol (36 μ M), Hygromycine (0.2mg/ml) and G418 (0.5mg/ml). After thawing, cells were amplified two times, the latest passage was performed two days before the cell injection.

Cells injection

The first day of the experiment, TC1 cells were injected subcutaneously in mice at a dose of 2.0×10^5 cells/mouse in the flank.

Viral injections

7 days after the cells injection, 5.0×10^5 pfu/50 μ l/mouse of tested lots (TG4001 IMV/EEV or IMV only) MVATGN33 (empty vector) were injected into mice. Twenty mice were used per tested lot.

Viral injections were performed subcutaneously in the same flank but at a distant site from the cells injection point and carried out 3 times at 7 day intervals.

Parameters of monitoring:

Tumor growth was monitored for 90 days after the cells injection, with a caliper. Mice were sacrificed for ethical reasons when the tumor size was superior to 25 mm in diameter or when they showed pain even if the tumor was smaller.

Surviving mice were recorded.

Results

All the groups treated with the MVA vector encoding HPV antigen showed a higher survival rate than the group treated with an empty MVA vector. The mice treated with the composition comprising EEV and IMV showed a higher survival rate than the mice treated by composition comprising IMV only. Moreover, 35 % of the mice treated by the composition comprising EEV and IMV were free from tumor 77 days after being injected compared to only 10 % of the mice treated by the composition comprising only IMV.

B. Therapeutic treatment of mice bearing Tumor expressing MUC1.

Denomination and Brief description of each vector construction

TG4010: MVA vector carrying the coding sequences for MUC1 proteins (under the control of promoter p7.5) and IL2 (under the control of promoter pH5R). Two lots, one comprising IMV and EEV and one comprising only IMV were tested.

An empty vector MVATGN33 which expresses neither MUC1, nor IL2 was used as negative control.

Mouse model and animal experiments system

Species, strain and supplier: C57Bl/6 female mice aged 6 to 8 weeks were used throughout this study. These mice were obtained from Charles River (Rouen, France).

Specification: The animals were 6-week old on the arrival day. At the beginning of experimentation, they were less than 8 week old.

Environment: The animals were housed in a single, exclusive room air-conditioned to provide a minimum of 11 air changes per hour. The temperature and relative humidity ranges were within 18°C and 22°C and 40 to 70% respectively.

Lighting was controlled automatically to give a cycle of 12 hours of light and 12 hours of darkness.

The animals were housed in-groups of 10 per cages of 43 X 27 X 15 cm, floor area 1161cm².

Diet: Throughout the study the animals had access *ad libidum* to sterilized diet type RM (SDS, Le Bord'Haut de Vigny, France).

Water was provided *ad libidum* via bottles.

No contaminants were present in diet or water at levels, which might have interfered with achieving the objectives of the study.

Acclimation and health procedures: All animals were given a clinical inspection for health on arrival. They were acclimatized in a Specific Pathogen Free (SPF) animal facility between one and two weeks before the start of the experiment in order to ensure their suitability for the study.

Tumor cells characteristics and conditions of use:

The RMA tumor line has been derived from a C57Bl/6 lymphoma. RMA-MUC1 cells were obtained after transfection with an expression plasmid containing the MUC1 gene a. These cells were grown in DMEM with Glutamine (2mM), fetal calf serum (10%), non essential amino acids (0.1mM), Na Pyruvate (1mM), β mercapto-ethanol (36 μ M) and Hygromycine (550 μ g/ml). After thawing, cells were amplified two times, the latest passage was performed the day before challenge.

Immunization

Mice were immunized with 1.0 10⁴ or 3.0 10⁴ pfu/mouse for TG4010 virus and with 3.0 10⁴ pfu/mouse for MVATGN33.

20 mice were used per tested lot.

Viral immunizations were performed subcutaneously in a flank and carried out 3 times at 14 day intervals.

Tumor challenge

Two weeks after the last immunization, mice were challenged subcutaneously in the same flank but at a distant site from the viral injections point, with 1.0 E+06 RMA-MUC1 viable cells/50 μ l/mouse.

Parameters of monitoring:

Tumor growth was monitored for 6 weeks after the tumor challenge, with a caliper. Mice were sacrificed for ethical reasons when the tumor size was superior to 25 mm in diameter or when they showed pain even if the tumor was smaller.

Surviving mice were recorded.

20 mice were used per dose.

Results.

All the groups treated with the MVA vector encoding the MUC1 antigen showed a lower tumor growth and a higher survival rate than the group treated with an empty MVA vector. The mice treated with the composition comprising EEV and IMV showed a lower tumor growth than the mice treated by composition comprising only IMV.

27

CLAIMS

1. A recombinant poxvirus, wherein said recombinant poxvirus is an EEV with no targeted infection specificity.

2. The recombinant poxvirus according to claim 1, wherein said poxvirus is chosen from the group comprising Orthopoxviruses, Parapoxviruses, Avipoxviruses, Capripoxviruses, Leporipoxviruses, Suipoxviruses, Molluscipoxviruses, Yatapoxviruses.

3. The recombinant poxvirus according to claim 2, wherein said poxvirus is an orthopoxvirus.

4. The recombinant poxvirus according to claim 3, wherein said orthopoxvirus is a Vaccinia Virus.

5. The recombinant poxvirus according to claim 3, wherein said Orthopoxvirus is a modified vaccinia virus Ankara.

6. The recombinant poxvirus according to one of claims 1 to 5, wherein said poxvirus comprises an exogenous sequence encoding a molecule having a directly or indirectly cytotoxic function.

7. The recombinant poxvirus according to claim 6, wherein said exogenous sequence is a suicide gene.

8. The recombinant poxvirus according to one of claims 1 to 5, wherein said poxvirus comprises an exogenous sequence encoding a Tumor Associated Antigen (TAA).

9. The recombinant poxvirus according to one of claims 1 to 5, wherein said poxvirus comprises an exogenous sequence encoding an antigen.

10. The recombinant poxvirus according to claim 9, wherein said antigen is derived from a virus.

11. The recombinant poxvirus according to one of claims 1 to 10, wherein said poxvirus comprises the elements necessary for the expression of the exogenous sequence.

12. A process for producing a wild type, an attenuated and/or a recombinant poxvirus with no targeted infection specificity comprising the steps of :

- a) preparing a culture of packaging cells,
- b) infecting said cell culture,

c) culturing said infected cells for an appropriate period of time,
d) recovering the poxviral particles produced from the culture supernatant and/or the packaging cells, and

13. The process according to claim 12, wherein said process is free from animal products.

14. The process according to claims 12 or 13, wherein said packaging cell is a CEF.

15. The process according to one of claims 12 to 14, wherein step c) last between two and four days.

16. The process according to one of claims 12 to 15, wherein step d comprises the disruption of the packaging cell by using a high speed homogenizer.

17. The process according to one of claims 12 to 16, wherein said process further comprises a clarification step, of the mixture obtained from step d, allowing the withdrawal of the cellular debris.

18. The process according to claim 17, wherein said clarification step is a depth filtration step.

19. The process according to claims 17 or 18, wherein said process further comprises a concentration step.

20. The process according to claim 19, wherein said concentration step is a microfiltration step.

21. The process according to claim 19, wherein said process further comprises a diafiltration step.

22. The process according to one of claims 12 to 21, wherein no nuclease and more particularly no benzonase is used.

23. A composition comprising the recombinant poxvirus according to one of claims 1 to 11 or obtained by a process according to one of claims 12 to 22.

24. The composition according to claim 23 wherein more than 1%, preferably more than 5%, even more preferably more than 10% and most preferably at least 20% of the poxviruses comprised in said composition are EEV.

25. The composition according to claims 23 or 24 having a titer of at least 10^5 , preferably of at least 10^6 , more preferably of at least 10^7 , even more preferably of at least 10^8 pfu per ml.

26. The composition according to one of claims 23 to 25 having a titer of at least 10^3 , preferably 10^4 and most preferably at least $3 \cdot 10^5$ pfu per μg of protein.

27. Use of a recombinant poxvirus according to one of claims 1 to 11, a composition according to one of claims 23 to 26 for the preparation of a medicament.

28. Use according to claim 27 for the therapeutic or prophylactic treatment of cancer.

29.. Use according to claim 27 for the therapeutic or prophylactic treatment of infectious diseases.

ABSTRACT

The present invention relates to compositions and pharmaceutical compositions comprising poxviruses and more particularly extracellular enveloped viruses. The present invention also relates to a process for producing poxviruses and poxviruses obtained thereof. Moreover, the present invention also relates to the use of said poxvirus and said composition for the preparation of a medicament.

31

Figure 1

Survival rate

		DOSES pfu / souris	days after tumoral challenge											
			9	13	20	27	34	41	49	56	63	70	77	
1	VIRUS	5,0 E+05 pfu	100	100	100	100	100	100	100	90	65	60	60	60
2	IMV	5,0E+05 pfu	100	100	100	100	95	95	60	40	35	30	20	
3	N33	5,0 E+05 pfu	100	100	100	100	100	90	70	25	10	5	5	

Figure 2

Percentage of tumor free Mices

	DOSES pfu/50µL / mice	days after tumoral challenge										
		9	13	20	27	34	41	49	56	63	70	77
VIRUS												
IMV/EEV	5,0 E+05 pfu	0	0	0	10	20	30	30	35	35	35	35
IMV	5,0 E+05 pfu	0	0	0	0	0	5	5	10	10	10	10
N33	5,0 E+05 pfu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

33

Figure 3

mice survival rates

Groupe	VIRUS	DOSE pfu/50µL / souris	days after tumoral challenge						
			9	15	20	23	27	30	38
1	IMV	1,0 E+04	100	100	100	95	75	60	55
2	IMV	3,0 E+04	100	100	100	100	90	60	55
3	IMV/EEV	1,0 E+04	100	100	100	95	85	75	70
4	IMV/EEV	3,0 E+04	100	100	100	100	100	80	75
5	Empty IMV	1,0 E+04	100	100	100	60	30	10	5

PROCESO PARA PRODUCIR POXVIRUS Y COMPOSICIONES DE POXVIRUS

La presente invención se relaciona con composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden poxvirus y más particularmente con virus extracelulares con envoltura. La presente invención también se relaciona con un proceso para producir poxvirus y poxvirus obtenidos de éstos. Más aún, la presente invención también se relaciona con el uso de dichos poxvirus y dicha composición para la preparación de un medicamento.

El surgimiento de nuevas amenazas (gripa aviar, virus del nilo occidental, ántrax, etc...) así como también el desarrollo de la terapia de genes ha incrementado la necesidad de producir y purificar poxvirus para propósitos profilácticos o terapéuticos. Este es notablemente el caso para el virus Ankara de mamífero (MVA). Este poxvirus que se utilizaba inicialmente para vacunar pacientes inmunodeficientes contra la Variola, ahora también es utilizado como un vector para propósitos de terapia de genes. Por ejemplo, el MVA se utiliza como un vector para el gen MUC 1 para vacunar pacientes contra MUC 1 que expresa tumor (Scholl et al., 2003, J Biomed Biotechnol., 2003, 3, 194-201). El MVA que lleva los antígenos HPV que codifican el gen también se utilizan como un vector para el tratamiento terapéutico del carcinoma de ovario.

Los poxvirus son un grupo de virus complejos con envoltura que se distinguen principalmente por su morfología no usual, su genoma de ADN grande y su sitio de replicación citoplásmico. Se ha mapeado y secuenciado el genoma de varios miembros de poxviridae, que incluyen la cepa del virus vaccinia Copenhagen (VV) (Goebel et al., 1990, Virol. 179, 247-266 and 517-563; Johnson

et al., 1993, Virol. 196, 381-401) y la cepa modificada del virus Ankara vaccinia (MVA) (Antoine et al., 1998, Virol. 244, 365-396). El VV tiene un genoma de ADN bicatenario de aproximadamente 192 kb que codifica aproximadamente 200 proteínas de las que aproximadamente 100 están involucradas en el ensamble del virus. El MVA es una cepa de virus vaccinia altamente atenuada generada por más de 500 pasajes en serie de la cepa Ankara del virus vaccinia en fibroblastos de embrión de pollo (Mayr et al., 1975, Infection 3, 6-16). El virus MVA se deposita ante el Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) bajo el número de depositante N⁶⁰² i-721. La determinación de la secuencia completa del genoma del MVA y la comparación con el genoma VV de Copenhagen permite la identificación precisa de las alteraciones que ocurren en el genoma viral y la definición de siete eliminaciones (I a VII) y numerosas mutaciones que conducen a ORF fragmentados (cuadros de lectura abiertos) (Antoine et al., 1998, Virology 244, 365-396).

La ruta natural para la toma intracelular de los virus con envoltura involucra una serie de etapas que incluyen la unión de un polipéptido vírico expuesto en la superficie del virus a un receptor celular y un mecanismo de fusión entre las membranas celulares y víricas que resultan en la liberación del genoma vírico dentro del citoplasma de la célula infectada.

Sin embargo, en los casos especiales del poxvirus, el análisis exacto de la ruta de suministro se complica por la existencia de dos formas morfológicamente distintas de virus infeccioso, denominado virus maduro intracelular (IMV) y virus extracelular con envoltura (EEV). La forma IMV entre otras particularidades, se caracteriza por una envoltura monolípida que rodea el núcleo vírico y se ubica principalmente en el citoplasma de las células infectadas, aunque esta se puede

liberar extracelularmente después de la lisis de las células infectadas. Muchos de los polipéptidos naturales expuestos en la superficie de la envoltura de lípido IMV se han identificado, tal como por ejemplo las proteínas p14 kDa y p21 kDa, codificadas respectivamente por el gen A27L (Rodriguez et al., 1985, J. Virol. 56, 482-488; Rodriguez et Estaban, 1987, J. Virol. 61, 3550-3554) y el gen A17L, así como también las proteínas codificadas L1R, A14L, D8L, A9L (Yeh et al., 2000, J. Virol. 74, 9701-9711), E10R (Senkevich et al., 2000, Virol. 5, 244-252) y los genes H3L. Comparado con el IMV, la forma EEV tiene una envoltura de membrana de lípido externa adicional (capa doble de lípido) adquirida de las cisternas de la red trans-Golgi. Esta corresponde a la forma vírica liberada al exterior de las células infectadas. La envoltura de la membrana de superficie EEV muestra aproximadamente 10 proteínas que están ausentes de la superficie IMV, tal como por ejemplo los productos de gen hemaglutinina (HA) B5R, y A34R. La co-existencia de dichas formas IMV y EEV se ha descrito para la mayoría de cepas vaccinia (por ejemplo las cepas Copenhagen y MVA) así como también para otros poxvirus tal como la poxvirus aviar (Boulanger et al., 2000, J. Gen. Virol. 81, 675-687).

Debido a que ellas son más estables en el medio ambiente, el IMV juega un papel predominante en una transmisión anfitrión a anfitrión (Hooper et al. Virology, 2003, 306, 181-185). A este respecto, las partículas IMV han sido los vectores de elección para los propósitos de terapia de gen. Por esta razón, los procesos de purificación de poxvirus disponibles solo tratan el virus presente en las células de empaque (es decir IMV), mientras que las partículas EEV vertidas en el medio de cultivo son descartadas. Debido a la presencia en su superficie de una mayor variedad de polipéptidos que sobre la superficie IMV, el uso de un EEV recombinante que tiene una especificidad de infección objetivada ya se ha

propuesto (US20050208074; Galmiche et al. J. Gen. Virol., 1997, 78, 3019-3027). Sin embargo, aún para este uso específico, las partículas IMV son particularmente preferidas (US20050208074, página 4, capítulo 29).

Sorprendentemente, el solicitante ha encontrado que el EEV sin especificidad de infección objetivada tiene una eficacia profiláctica y/o terapéutica mayor comparado con el IMV.

A este respecto, la presente invención se relaciona con un poxvirus y preferiblemente un poxvirus recombinante, en donde dicho poxvirus es un EEV sin especificidad de infección objetivada. La presente invención también se relaciona con una composición y preferiblemente con una composición farmacéutica que comprende EEV recombinante sin especificidad de infección objetivada.

Como se utiliza a lo largo de toda la solicitud, los términos "un" y "una" se utilizan en el sentido de que ellas significan "por lo menos una" "por lo menos un primer", "no o más", o "una pluralidad" de los componentes o etapas referenciados, a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por ejemplo, el término "una célula" incluye una pluralidad de células, que incluyen sus mezclas.

El término "y/o" en cualquier parte utilizado aquí incluye el significado de "y", "o" y "todas o cualquier otra combinación de los elementos relacionados por dicho término".

El término "aproximadamente" o "aproximado" como se utiliza aquí significa dentro del 20%, preferiblemente dentro del 10%, y más preferiblemente dentro del 5% de un rango o valor dado.

Como se utiliza aquí, el término "que comprende" está destinado a significar que los productos, las composiciones y los métodos incluyen los componentes o etapas referenciados, pero no excluyen otros. "Que consiste esencialmente de" cuando se utiliza para definir productos, composiciones y métodos, significará que excluye otros componentes o etapas de cualquier significancia esencial. Así, una composición que consiste esencialmente de los componentes mencionados no excluirá contaminantes de trazas y portadores farmacéuticamente aceptables. "Que consiste de" significará que excluye más de los elementos de traza de otros componentes o etapas.

La familia poxvirus comprende virus de las subfamilias Chordopoxvirus y Entomopoxvirus. Entre estos, el poxvirus de acuerdo con la invención se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de Ortopoxvirus, Parapoxvirus, Avipoxvirus, Capripoxvirus, Leporipoxvirus, Suipoxvirus, Moluscipoxvirus, Yatapoxvirus. De acuerdo con una modalidad más preferida, el poxvirus de la invención es un ortopoxvirus.

El Ortopoxvirus es preferiblemente un virus vaccinia y más preferiblemente un virus vaccinia Ankara modificado (MVA) en particular MVA 575 (ECACC V00120707) y MVA-BN (ECACC V00083008).

Como se indicó previamente, una partícula IMV comprende el núcleo viral que incluye el genoma viral rodeado por una envoltura de lípido monocapa. El

término "EEV" se refiere a una partícula IMV rodeada por una envoltura de lípido bicapa adicional que se expone en su superficie celular así como también los polipéptidos víricos.

El término "especificidad de infección objetivada" como se utiliza aquí se refiere a una especificidad de infección controlada, en donde una partícula poxvírica está diseñada por ingeniería para exhibir un nuevo tropismo o un tropismo mejorado hacia unas células objetivo, comparado con una partícula de poxvirus no modificada relacionada. Como un resultado, una partícula poxvírica con una especificidad de infección objetivada muestra una propensión a infectar dichas células objetivo, contrario a su partícula poxvírica no modificada relacionada, lo que significa que la partícula poxvírica con una especificidad de infección objetivada infecta más eficientemente o más rápidamente sus células objetivo (que muestra en su superficie el anti-ligando reconocido por el grupo funcional ligando exhibido en la superficie de la partícula poxvírica de la invención) que en células no-objetivo (que no exhiben en su superficie tal anti-ligando), mientras que una partícula poxvírica relacionada sin especificidad de infección objetivada infectará dichas células objetivo con una eficiencia menor o similar comparada con las células no objetivo.

El término "virus recombinante" se refiere a un virus que comprende una secuencia exógena insertada en su genoma. Como se utiliza aquí, una secuencia exógena se refiere a un ácido nucleico que no está presente de forma natural en el virus matriz.

En una modalidad, la secuencia exógena codifica una molécula que tiene una función directa o indirectamente citotóxica. Por "directa o indirectamente"

citotóxica, se entiende que la molécula codificada por la secuencia exógena puede en si misma ser tóxica (por ejemplo ricina, factor de necrosis de tumor, interleukina-2, interferón-gama, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, exotoxina *Pseudomonas A*) o estas se pueden metabolizar para formar un producto tóxico, o esta puede actuar también sobre algo para formar un producto tóxico. La secuencia del cADN de ricina se describe en Lamb et al (Eur. J. Biochem., 1985, 148, 265-270) incorporada aquí por referencia.

En una modalidad preferida de la invención, la secuencia exógena es un gen suicida. Un gen suicida codifica una proteína capaz de convertir un profármaco relativamente no tóxico en un fármaco tóxico. Por ejemplo, la enzima citosina deaminasa convierte el 5-fluorocitosina (5FC) en 5-fluorouracilo (5FU) (Mullen et al (1922) PNAS 89, 33); la quinasa timidina de la enzima del herpes simplex sensibiliza las células para tratamiento con el agente antiviral ganciclovir (GCV) o aciclovir (Moolten (1986) Cancer Res. 46, 5276; Ezzedine et al (1991) New Biol 3, 608). Se puede utilizar la citosina deaminasa de cualquier organismo, por ejemplo *E. coli* o *Saccharomyces cerevisiae*.

Así, en una modalidad preferida de la invención, el gen codifica una proteína que tiene una actividad citosina deaminasa y aún más preferiblemente una proteína como se describe en la solicitudes de patentes WO2005007857 y WO9954481.

Otros ejemplos de combinación de profármacos/enzimas incluyen aquellas descritas por (WO88/07378), a saber varios agentes de alquilación y la enzima *Pseudomonas spp.* CPG2, y aquellas descritas por Epenetos & Rowlinson- Busza

(WO 91/11201), a saber profármacos cianogenico (por ejemplo amigdalina) y beta-glucosidasas derivadas de plantas.

Las enzimas que son útiles en esta modalidad de la invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfatos en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfatos en fármacos libres; proteasa, tal como proteasa serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tal como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; las D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de aminoácidos D; enzimas de separación de carbohidratos tal como beta-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; beta-lactamasa útiles para convertir fármacos derivados con beta-lactamas en fármacos libre; y penicilina amidasas, tal como amidasa penicilina V o amidasa penicilina G, útil para convertir fármacos derivados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como abzymas, se pueden utilizar para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (Massey R. et al., Nature, 1987, 328, 457-458).

De manera similar, los profármacos incluyen, pero no se limitan a, los profármacos listados anteriormente. Por ejemplo, profármacos que contienen fosfatos, profármacos que contienen tiofosfatos, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptido, profármacos modificados de aminoácidos D, profármacos glicosilados, profármacos que contienen beta-lactama, opcionalmente profármacos que contienen fenoxiacetamida sustituida o

profármacos que contienen fenilacetamida sustituida, profármacos de 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que se pueden convertir. Ejemplos de fármacos citotóxicos se pueden derivar en una forma de profármaco para uso en esta invención incluyen, pero no se limitan, a etoposida, teniposida, adriamicina, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, análogos de cis-platino y cis-platino, bleomicinas, esperamicinas (ver por ejemplo US4,675,187), 5-fluorouracilo, melfalan y otras mostazas de nitrógeno relacionadas.

En una modalidad adicional el gen exógeno codifica una ribozima capaz de dividir un ARN o ADN objetivada. El ARN o ADN objetivado a ser dividido puede ser ADN o ARN que es esencial para la función de la célula y su división resulta en la muerte celular o el ARN o ADN que ha ser dividido puede ser ARN o ADN que codifica una proteína indeseable, por ejemplo un producto de oncogén, y la división de este ARN o ADN puede evitar que la célula se vuelva cancerosa.

En una modalidad todavía adicional el gen exógeno codifica un ARN anticodificante.

Por "ARN anticodificante" se significa una molécula de ARN que hibrida a, e interfiere con la expresión de una molécula de mRNA que codifica una proteína o con otra molécula de ARN dentro de la célula tal como pre-mARN o tARN o rARN, o hibrida a, e interfiere con la expresión de un gen.

En otra modalidad de la invención, la secuencia exógena reemplaza la función de un gen defectuoso en la célula objetivo. Existen varias miles de

enfermedades genéticas heredadas de mamíferos, que incluyen humanos, que se originan por genes defectuosos. Ejemplos de tales enfermedades genéticas incluyen la fibrosis cística, donde se conoce que existe una mutación en el gen CFTR; distrofia muscular Duchenne, en donde se conoce que existe una mutación en el gen distrofina; anemia deprimocítica, que se conoce por ser una mutación en el gen HbA. Muchos tipos de cáncer se originan por genes defectuosos, especialmente protooncogenes, y genes supresores de tumor que han sufrido mutación.

Ejemplos de protooncogenes son ras, src, bcl y así sucesivamente; ejemplos de genes supresores de tumor son p53 y Rb.

En una modalidad adicional de la invención, la secuencia exógena codifica un Antígeno Asociado a Tumor (TAA). El TAA se refiere a una molécula que se detecta con una mayor frecuencia o densidad en células tumorales que en células no tumorales del mismo tipo de tejido. Ejemplos de TAA incluyen pero no se limitan a CEA, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GP-100, MUC-1, MUC-2, oncogén ras mutado señalado, p53 mutado de punto o normal, p53sobreexpresado, CA-125, PSA, C-erb/B2, BRCA I, BRCA II, PSMA, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, NY-ESO-1, TAG72, KSA, HER-2/neu, bcr-abl, pax3-fkhr, ews-fli-1, supervivencia y LRP. De acuerdo con una modalidad más preferida el TAA es MUC1.

El poxvirus recombinante puede comprender más de una secuencia exógena y cada secuencia exógena puede codificar más de una molécula. Por ejemplo, esta puede ser útil para asociar en un mismo poxvirus recombinante, un exógeno secuenciado que codifica un TAA con una secuencia exógena que codifica una citoquina.

En otra modalidad de la invención, el gen exógeno codifica un antígeno. Como se utiliza aquí, "antígeno" se refiere a un ligando que se puede unir mediante un anticuerpo; un antígeno no necesita en sí mismo ser inmunogénico.

Preferiblemente el antígeno se deriva de un virus tal como por ejemplo VIH-1, (tal como gp 120 o gp 160), cualquiera del virus de inmunodeficiencia Felina, virus herpes animal o humano, tal como gD o sus derivados o proteínas Inmediata Temprana tal como ICP27 de HSV1 o HSV2, citomegalovirus (tal como gB o sus derivados), virus Varicela Zoster (tal como gpl, II o III), o de un virus de la hepatitis tal como virus de la hepatitis B, por ejemplo, hepatitis B, antígeno de superficie o uno de sus derivados, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C (preferencialmente proteína no estructural del genotipo de la cepa 1b ja) y virus de la hepatitis E, o de otros patógenos víricos, tal como virus respiratorio sincitial, virus del Papiloma Humano (preferencialmente la proteína E6 y E7 se la cepa HPV16) o virus de la Influenza, o derivado de patógenos bacterianos tal como Salmonella, Neisseria, Borrelia (por ejemplo OspA o OspB o sus derivados), o Chlamydia, o Bordetella por ejemplo P.69, PT y FHA, o derivado de parásitos tal como Plasmodium o Toxoplasma.

En una modalidad particular preferida de la invención, el poxvirus recombinante codifica las mismas proteínas que el TG4010 (Rochlitz et al. J Gene Med. 2003 Aug; 5(8):690-9) y TG4001 (Liu et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 5; 101 Suppl 2:14567-71). En otra modalidad particularmente preferida de la invención, el poxvirus de la invención tiene una secuencia que es más del 90% homologa a la secuencia del TG4010 o del TG4001.

Ventajosamente, el poxvirus recombinante comprende adicionalmente los elementos necesarios para la expresión de la secuencia exógena. Los elementos necesarios para la expresión comprenden el conjunto de elementos que permitan la transcripción de la secuencia de nucleótido al ARN y la conversión de un mRNA a un polipéptido, en particular la secuencia promotora y/o secuencias reguladoras que son efectivas en la célula a ser infectada por el poxvirus recombinante de la invención, y opcionalmente las secuencias requeridas para permitir la excreción o la expresión en la superficie de la células de dicho polipéptido. Estos elementos pueden ser inductibles o constitutivos. Por supuesto, el promotor se adapta al poxvirus recombinante seleccionado y a la célula anfitriona. Se puede mencionar, por vía de ejemplo, los promotores del virus vaccinia p7.5K pH5R, pK1 L, p28, p11 o una combinación de dichos promotores. La literatura proporciona una gran cantidad de información que se relaciona con tales secuencias promotoras.

Los elementos necesarios pueden, en adición, incluir elementos adicionales que mejoran la expresión de la secuencia exógena o su mantenimiento en la célula anfitriona. Se puede mencionar en particular las secuencias intrón (WO 94/29471), la secuencia de señal de secreción, secuencias de localización nuclear, sitios internos para reiniciación de conversión del tipo IRES, secuencias poli A para terminación de transcripción.

Los procesos de producción de poxvirus disponibles comprenden la replicación del virus en una línea celular (por ejemplo HelaS3), en huevos embrionados o en Fibroblastos de Embrión de Pollo. Después de la replicación del virus, el medio de cultivo se desecha, las células presentan lisis y el poxvirus liberado de las células se purifica por centrifugación de almohadilla de sucrosa (Kotwal and Abraham; Poxvirus growth, Purification and titting in Vaccinia Virus

and Poxvirology, 2004, 101-108, Humana Press Inc., Totowa; NJ; USA). Con estos procesos, no está presente el EEV en la composición purificada.

Sin embargo, los procesos de producción de virus disponibles no son satisfactorios. En primer lugar, ellos comprenden el uso de compuestos que se derivan de animales tal como suero y enzimas. El uso de los compuestos que se derivan de los animales en los procesos de producción tiene varias desventajas. Por ejemplo, la composición química de estos compuestos puede variar entre lotes, aún de un único fabricante. Los compuestos también se pueden contaminar con agentes infecciosos (por ejemplo, micoplasma y virus) que pueden socavar seriamente la salud de las células cultivadas cuando se utilizan los complementos contaminados en formulaciones de medio de cultivo celular. Más aún, el uso de complemento de suero de medio de cultivo puede complicar e incrementar los costos de la purificación de las sustancias deseadas del medio de cultivo debido a la co- purificación no específica del suero o extracto de proteína. De manera más importante, el uso de compuestos no definidos puede ocultar la aprobación por las agencias médicas de las composiciones farmacéuticas obtenidas por el proceso.

La presente invención proporciona adicionalmente un proceso para producir una partícula poxvírica de acuerdo con la invención, que comprenden las etapas de: a) preparar un cultivo de células de empaque, b) infectar dicho cultivo celular, c) cultivar dichas células infectadas durante un periodo de tiempo apropiado, d) recuperar las partículas poxvíricas producidas del sobrenadante de cultivo y/o las células de empaque, y e) opcionalmente, purificar las partículas poxvíricas recuperadas.

El proceso de acuerdo con la invención está preferiblemente libre de productos animales. Los procesos de acuerdo con la invención también se pueden utilizar para la producción de un poxvirus intacto, y/o atenuado.

Como se utiliza aquí, el término "poxvirus atenuado" se refiere a cualquier poxvirus que se ha modificado de tal manera que su patogenicidad en el sujeto propuesto se reduce sustancialmente. Preferiblemente, el poxvirus se atenúa a tal punto que este no es patogénico desde un punto de vista clínico, es decir, que los sujetos expuestos al poxvirus no exhiben un nivel incrementado de patología estadísticamente significativo con relación a los sujetos de control. De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, el virus atenuado es un virus Vaccinia atenuado tal como MVA.

El término "infección" se refiere a la transferencia del ácido nucleico vírico a una célula en donde el ácido nucleico vírico se replica, las proteínas víricas se sintetizan, o se ensamblan nuevas partículas víricas.

Como se utiliza aquí, el término "célula de empaque" se refiere a una célula que se puede infectar por el poxvirus a ser producido. Las células de empaque pueden ser una célula primaria, una célula recombinante y/o una línea celular. Por ejemplo, una célula recombinante que contiene los elementos necesarios para la producción de un virus recombinante que le falta un vector vírico recombinante, puede ser usada.

En una modalidad de la invención, la célula de empaque es una célula aviar inmortal.

En una modalidad de la invención, la célula de empaque es un célula DF1 (US 5,879,924), que es una línea celular de pollo inmortalizada espontáneamente derivada de huevos de 10 días de línea Lansing Line (ELL-O).

Las células aviar inmortales se pueden derivar de células madre embrionicas mediante separación progresiva de los factores de crecimiento en la capa de alimentación, manteniendo así rasgos de crecimiento y características de vida útil infinita de células madre no diferenciadas). Por ejemplo, la línea celular de pollo Ebx (WO2005007840) se ha obtenido mediante este proceso.

De acuerdo con una modalidad preferida, también se puede utilizar una línea celular permanente de embriones de pato. Por ejemplo, la línea celular, designada como DEC 99 (Ivanov et al. Experimental Pathology And Parasitology, 4/2000 Bulgarian Academy of Sciences) se ha cultivado durante 140 pasajes consecutivos y no es tumorigénica para las aves. La línea celular DEC 99 es un sistema de cultivo celular estándar que se ha utilizado para investigación y se puede aplicar para las necesidades de biotecnología. De acuerdo con una modalidad más preferida, la línea de empaque es una línea celular obtenida por el proceso descrito en la solicitud de patente EP06360001.9.

De acuerdo con otra modalidad preferida, la célula de empaque utilizada en el proceso de acuerdo con la invención es un fibroblasto de embrión de pollo (CEF). La preparación y el uso del CEF para la producción de virus se conocen bien por el experto en la técnica.

El CEF se extrae preferiblemente de huevos libres de Patógenos Específicos (SPF). Los huevos de SPF están disponibles comercialmente, por

ejemplo de Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). Dichos huevos son preferiblemente de más de 9 días de edad, más preferiblemente entre 10 y 14 días de edad y aún más preferiblemente son de 12 días de edad.

Antes de la extracción del embrión, el huevo preferiblemente se desinfecta. Muchos métodos y productos dedicados a la desinfección de huevos están disponibles en la técnica anterior. La incubación en una solución de formol (por ejemplo, 2% formol, 1 min.) seguido por un enjuague en 70% de etanol es particularmente preferido.

Las células de los embriones se disocian luego y purifican. De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, las células se someten a una etapa de digestión enzimática que permite la destrucción de la matriz intercelular. Para este propósito, el uso de enzimas capaces de digerir la matriz intercelular es particularmente útil. Tales enzimas se pueden seleccionar del grupo que comprende pero no se limita a Tripsina, Colagenasa, Pronasa, Dispasa, Hialuronidasa y Neuraminidasa. Estas enzimas se pueden utilizar solas o en combinación. En una modalidad particularmente preferida de la invención la dispasa y la Trispsina (por ejemplo TrypLE seleccionado de Gibco™) se utiliza en combinación. El experto en la técnica es capaz de determinar la concentración de enzima, la temperatura y la duración de la incubación permitiendo una separación eficiente de las células.

De acuerdo con una modalidad preferida, el proceso de acuerdo con la invención es libre de productos animales (excepto de células de empaque). A este respecto, la enzima utilizada para la preparación de CEF es preferiblemente de origen recombinante. Como se utiliza aquí, "productos animales" significa cualquier

compuesto o recolección de compuestos que se produce en o por una célula animal en un organismo viviente.

La preparación de CEF puede incluir adicionalmente una etapa de filtración y/o una etapa de centrifugación con el fin de remover los contaminantes.

Esta célula CEF principal puede ser utilizada directamente o después de un pasaje de célula adicional como célula CEF secundaria.

El experto en la técnica es capaz de seleccionar la célula más apropiada para la producción de un virus específico. De acuerdo con una modalidad preferida, el proceso de acuerdo con la invención comprende el uso de CEF o una célula de acuerdo con la EP06360001.9 para la producción de MVA.

La célula de empaque utilizada en el proceso de acuerdo con la invención se cultiva en un medio de cultivo celular apropiado. Es posible utilizar más de un medio de cultivo en el proceso de acuerdo con la invención. Por ejemplo, se puede utilizar un primer medio de cultivo durante la preparación de la célula de empaque (es decir durante la etapa a) y un segundo medio de cultivo celular para la infección (es decir durante la etapa c y/o etapa b).

De acuerdo con una modalidad preferida, el medio de cultivo celular de acuerdo con la invención está libre de producto animal.

Muchos medios libres de producto animal ya se han descrito y algunos de ellos están disponibles comercialmente. Por ejemplo 293 SFM II; 293-F Cells, SFM Adapted; 293-H Cells, SFM Adapted; 293fectinTM Transfection Reagent; CD 293

AGT™; CD 293 Medium; FreeStyle™ 293 Expression System; FreeStyle™ 293 Medium; FreeStyle™ 293-F Cells, SFM Adapted; Adenovirus Expression Medium (AEM) Growth Medium for PER.C6® Cells; CD 293 AGT™; CD 293 Medium; COS-7L Cells, SFM Adapted; EPISERF® Medium; OptiPro™ SFM; VP-SFM; VP-SFM AGT™. (Todos disponibles de invitrogen) se pueden utilizar como medio de cultivo celular en los procesos de acuerdo con la invención.

Cuando la célula de empaque es un CEF, VP-SFM (invitrogen) para la etapa a y Basal Medium Eagle (Invitrogen) para la etapa b y c son particularmente preferidos.

En la modalidad específica donde las células de empaque son CEF, el medio de cultivo celular se siembra entre 0.5 a 1.5 y preferiblemente entre 1.1 y 1.3 y aún más preferiblemente aproximadamente 1.2 embriones/l de medio de cultivo celular. En esta modalidad, el CEF se cultiva preferiblemente entre 1 y 5 días, más preferiblemente entre 1 y 2 días, más preferiblemente entre 1 y 2 días y aún más preferiblemente 2 días antes de infección.

En la modalidad específica donde el poxvirus para producir es MVA, el virus se introduce en el vaso de cultivo celular en un MOI que comprende preferiblemente entre 0.001 y 0.1, más preferiblemente entre 0.03 y 0.07 y aún más preferiblemente aproximadamente 0.05.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, durante la etapa c, las células de empaque se cultivan a una temperatura que está por debajo de 37°C, preferiblemente entre 30° C y 36.5° C o entre aproximadamente 32°C y

52

aproximadamente 36°C, más preferiblemente entre 33°C y 35° C, más preferiblemente en 34°C.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, la etapa c dura entre uno y seis días, más preferiblemente entre dos y cuatro días y más preferiblemente aproximadamente 72 horas.

Después de la etapa de infección, se recolecta el medio de cultivo celular utilizado para cultivar la célula de empaque. Dicho medio de cultivo celular comprende las partículas EEV desprendidas por la célula de empaques infectados. De acuerdo con una modalidad preferida, después de la etapa de infección, el medio de cultivo celular y la célula de empaque se recolectan. El medio de cultivo celular y las células de empaque se pueden agrupar o recolectar de forma separada.

Con el fin de recuperar el poxvirus presente en la célula de empaque, los procesos de acuerdo con la invención pueden comprender una etapa que permite la afectación de la membrana de célula de empaque. Esta etapa conduce a la liberación del poxvirus de la célula de empaque. La afectación de la membrana de célula de empaque se puede inducir por varias técnicas bien conocidas por aquellos expertos en el arte. Estas técnicas comprenden pero no se limitan a sonicación, congelamiento/descongelamiento, lisis hipotónica y microfluidización.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, la membrana de célula de empaque se afecta al utilizar un homogenizador a alta velocidad. Los homogenizadores de alta velocidad están disponibles comercialmente de Silverson Machines Inc (East Longmeadow, USA) o Ika-Labortechnik (Staufen,

Alemania). De acuerdo con una modalidad particularmente preferida, dicho homogenizador de Alta velocidad es un SILVERSON L4R.

Cuando la célula de empaque y el medio de cultivo celular se agrupan, la interrupción de la membrana de célula de empaque no se induce por congelamiento/descongelamiento ya que esta técnica conduce a la destrucción de las partículas EEV (Ichihashi y. et al., 1996, Virology, 217(2), 478-85).

De acuerdo con una modalidad preferida, la etapa d) comprende adicionalmente una etapa de clarificación que permite el retiro de los residuos celulares. De acuerdo con una modalidad más preferida de la invención, dicha etapa de clarificación es una etapa de filtración profunda.

La filtración profunda incluye pero no se limita al uso de uno o más productos disponibles comercialmente: filtros de profundidad CUNO Incorporated AP series (ejemplos incluyen AP01), filtros de profundidad CUNO Incorporated CP series (ejemplo incluye CP10, CP30, CP50, CP60, CP70, CP90), filtros de profundidad CUNO Incorporated HP series (Ejemplo incluyen HP10, HP30, HP50, HP60, HP70, HP90), filtros de profundidad CUNO Incorporated Calif, series (ejemplos incluyen CA10, CA30, CA50, CA60, CA70, CA90), filtros de profundidad CUNO Incorporated SP series (ejemplos incluyen SP10, SP30, SP50, SP60, SP70, SP90), filtros de profundidad CUNO Delipid y Delipid Plus, filtros de profundidad Millipore Corporation CE series (ejemplos incluyen CE15, CE20, CE25, CE30, CE35, CE40, CE45, CE50, CE70, CE75), filtros de profundidad Millipore Corporation DE series (ejemplos incluyen DE25, DE30, DE35, DE40, DE45, DE50, DE55, DE560, DE65, DE70, DE75), filtros Millipore Corporation HC (ejemplos incluyen A1 HC, B1HC, COHC), filtros CUNO Polynet (un ejemplo

incluye Polynet-PB), filtros Millipore Clarigard y Polygard, filtros CUNO Life Assure, filtros de profundidad ManCel Associates (ejemplos incluyen pero no se limitan a PR 12 UP, PR12, PR 5 UP), y filtros PALL o SeitzSchenk Incorporated. Con el fin de mejorar la capacidad de clarificación de las unidades de filtración de profundidad disponibles, puede ser útil acoplar dos o más unidades con tamaños de poro reducidos. En esta modalidad, la mezcla para ser clarificada pasa a través de la primera unidad de filtración de profundidad en donde se retienen los mayores contaminantes y posteriormente pasa a través de la segunda unidad de filtración de profundidad. De acuerdo con una modalidad más preferida de la invención, se utiliza un sartopure© (sartorius) con un tamaño de poro de 8 μm acoplado a un sartopure© con un tamaño de poro 5 μm para la etapa de filtración de profundidad.

De acuerdo con una modalidad preferida, el proceso de acuerdo con la invención comprende adicionalmente una etapa de concentración. Más preferiblemente, dicha etapa de concentración permite adicionalmente la eliminación de las proteínas presentes en la mezcla obtenida de las etapas previamente descritas.

De acuerdo con una modalidad más preferida de la invención, dicha etapa de concentración es una etapa de microfiltración. La microfiltración es un proceso de membrana efectuado a presión que concentra y purifica moléculas grandes. Más específicamente, se pasa una solución a través de una membrana semipermeable cuyo tamaño de poros se ha seleccionado para rechazar partículas grandes (virus) en el retenido, y permite que las moléculas pequeñas (por ejemplo proteínas) pasen a través de la membrana dentro del permeado. La microfiltración reduce el volumen de la solución de extracción.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, la etapa de microfiltración está seguida por una etapa de diafiltración. Estas dos etapas se pueden hacer ventajosamente con las mismas membranas de filtración. La diafiltración es una mejora de la microfiltración e involucra diluir el retenido con una solución para efectuar una reducción en la concentración de las impurezas en el retenido. La dilución del retenido permite lavar más las impurezas del retenido. Se entiende que la diafiltración se puede llevar a cabo en un modo de tandas, modo semicontinuo o un modo continuo. La tapa de diafiltración se puede utilizar ventajosamente para cambiar el amortiguador en el que está comprendido el virus. Por ejemplo, este puede ser útil para intercambiar el amortiguador utilizado en el proceso de purificación contra un amortiguador farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, las membranas de filtración utilizadas en la microfiltración y/o en la etapa de diafiltración tienen un tamaño de poro comprendido entre 0.01 y 0.15 μm , y más preferiblemente aproximadamente 0.1 μm .

Los ácidos nucleicos se pueden adherir a las partículas derivadas de las células tal como virus. A este respecto, el proceso de acuerdo con la invención puede opcionalmente comprender además una etapa que consiste de remover los ácidos nucleicos contaminantes presentes en la solución. Para este propósito, se pueden utilizar nucleasas. Las nucleasas de ejemplo incluyen Benzonasa o cualquier otra DNasa o RNasa utilizadas comúnmente dentro de la técnica, entre ellas, se prefiere particularmente Benzinasa.

La Benzonasa degrada el ácido nucleico y no tiene actividad proteolítica. La Benzonasa desintegra rápidamente el ácido nucleico al hidrolizar los enlaces fosfodiéster internos entre nucleótidos específicos. Luego de la digestión

completa, todos los ácidos nucleicos libres presentes en la solución se reducen a oligonucleótidos de 2 a 4 bases de longitud.

La Benzonasa se puede utilizar en una concentración final comprendida entre 50 y 400 U/ml, preferiblemente entre 100 y 300 U/ml más preferiblemente entre 150 y 250 U/ml. El tratamiento de Benzonasa puede durar entre 1 y 4 horas y aún más preferiblemente entre 1.5 y 2.5 horas.

Sin embargo, cuando la filtración de profundidad, microfiltración y diafiltración previamente descritas se utilizan, el uso de nucleasas y más particularmente, el uso de benzonasa no es necesaria. A este respecto, la presente invención también se relaciona con un proceso para la preparación de poxvirus en donde no se utilizan ninguna nucleasa y más particularmente ninguna benzonasa.

En esta etapa, el poxvirus obtenido por el proceso previamente descrito se purifica suficientemente. Puede ser deseable cambiar el amortiguador en el que el virus está comprendido. Por ejemplo, puede ser útil intercambiar el amortiguador utilizado en el proceso de purificación contra un amortiguador farmacéuticamente aceptable. Muchos métodos que se pueden utilizar para cambiar el amortiguador se conocen por el experto en la técnica. Entre ellos, se prefiere particularmente la filtración tangencial.

La filtración tangencial es una técnica de filtración en donde la suspensión a ser filtrada se mueve a una alta velocidad a lo largo de una dirección que es paralela para filtrar la superficie con el fin de crear una turbulencia en la

suspensión que evita la formación de torta de filtración así como también el bloqueo de filtro frecuente.

Cuando la suspensión fluye a una alta velocidad paralela a la superficie de filtro, el soluto pasa a través de los agujeros de la superficie de filtración debido a la diferencia de presión y se remueve continuamente. La superficie de filtración debe ser tal que resista mecánicamente la diferencia de presión entre el compartimiento de retenido (es decir el compartimiento que concentra la suspensión) y el compartimiento de permeado (solución filtrada clara libre de partículas suspendidas).

Las varias etapas comprendidas en el proceso de acuerdo con la invención se pueden implementar en sitios de trabajo separados y/o en diferentes periodos de tiempo. Por ejemplo, la infección de la célula de empaque y la purificación de los poxvirus se pueden hacer en diferentes lugares de trabajo. También, la célula de empaque y/o el medio de cultivo de las células se pueden almacenar (por ejemplo a menos 80°C) mientras sea necesario, antes de ser purificado.

La presente invención también se relaciona con composiciones obtenidas por los procesos previamente descritos y con composiciones que comprenden el poxvirus de la invención.

Preferiblemente, la composición de la invención comprende más del 1 %, preferiblemente más del 5%, aún más preferiblemente más del 10% más preferiblemente por lo menos 20% del poxvirus comprendido en dicha composición son EEV.

De acuerdo con una modalidad preferida, la composición de acuerdo con la invención tiene un título de por lo menos 10^5 , preferiblemente por lo menos 10^6 , más preferiblemente por lo menos 10^7 , aún más preferiblemente de por lo menos 10^8 pfu por ml.

De acuerdo con otra modalidad preferida, la composición de acuerdo con la invención tiene un título de por lo menos 10^3 , preferiblemente 10^4 y más preferiblemente por lo menos 3×10^5 pfu por μg de proteína.

La presente invención también se relaciona con composiciones farmacéuticas que comprenden el poxvirus obtenido por los procesos de la invención y/o composición de acuerdo con la invención. Como se utiliza aquí, la "composición farmacéutica" se refiere a composiciones que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable.

Tal un portador es preferiblemente isotónico, hipotónico o débilmente hipertónico y tiene una baja resistencia iónica relativa, tal como por ejemplo una solución de sacarosa. Más aún, tal un portador puede contener cualquier disolvente, o líquido acuoso o parcialmente acuoso tal como agua estéril no pirogénica. El pH de la composición farmacéutica es, en adición, ajustado y amortiguado con el fin de cumplir los requerimientos del uso in vivo. La composición farmacéutica también puede incluir un diluyente farmacéuticamente aceptable, adyuvante o excipiente, así como también agentes de solubilización, estabilización y conservación. Para la administración inyectable, se prefiere una formulación en solución acuosa, no acuosa o isotónica. Se puede proporcionar en una dosis única o en multidoses en forma líquida o seca (polvo, liofilisato y

similares) que se pueden reconstituir en el momento de uso con un diluyente apropiado.

La presente invención también se relaciona con el poxvirus y la composición obtenida por el proceso de acuerdo con la invención.

La presente invención también se relaciona con el uso de un proceso de acuerdo con la invención para la producción de un virus, una composición y/o una composición farmacéutica.

La presente invención también se relaciona con el uso de un poxvirus, una composición y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento.

De acuerdo con una modalidad preferida el medicamento de acuerdo con la invención es para el tratamiento terapéutico o profiláctico del cáncer.

Entre las aplicaciones que se pueden considerar, se pueden mencionar cáncer de mama, de útero (en particular aquellos inducidos por virus del papiloma), de próstata, broncopulmonar, de la vejiga, del hígado, del colon, del páncreas, del estomago, del esófago, de la laringe, del sistema nervioso central (en particular glioma) y de la sangre (linfomas, leucemia y similares).

Una composición de acuerdo con la invención se puede fabricar convencionalmente para administración por ruta local, parenteral o digestiva. Las rutas de administración que se pueden abarcar son muchas. Se pueden mencionar, por ejemplo, ruta intragástrica, subcutánea, intracardiaca,

intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intratumor, intranasal, intrapulmonar o intratraqueal. Para las tres últimas modalidades, la administración por aerosol o instilación es ventajosa. La administración se puede hacer como una dosis única o repetida una o varias veces después de un cierto intervalo de tiempo. La ruta apropiada de administración y la dosificación varía como una función de varios parámetros, por ejemplo, del individuo, de la enfermedad a ser tratado o del gen de interés a ser transferido.

De acuerdo con una primera posibilidad, el medicamento se puede administrar directamente in vivo (por ejemplo por inyección intravenosa, dentro de un tumor accesible o en su periferia, subcutáneamente para una vacunación terapéutica o profiláctica). También es posible adoptar el método ex vivo que consiste en recolectar celular del paciente (células madre en medula ósea, linfocitos de sangre periférica, células musculares y similares), transfectar e infectar las in Vitro de acuerdo con las técnicas del arte previo y readministrarlas al paciente.

Es más aún posible prever, cuando es apropiado y sin apartarse del alcance de la presente invención, llevar a cabo administraciones simultáneas o sucesivas, por diferentes rutas, de los varios componente contenidos en la composición farmacéutica o la composición de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una modalidad ventajosa de la invención, el uso terapéutico o el método de tratamiento se combina con un segundo tratamiento del paciente mediante cirugía (remoción parcial o completa del tumor), por radioterapia o quimioterapia. En este caso particular, el tratamiento de acuerdo con la invención se aplica antes de o concomitantemente con o posterior a dicho segundo

tratamiento. Preferiblemente, este tratamiento se aplicará posteriormente a dicho segundo tratamiento.

De acuerdo con otra modalidad preferida el medicamento de acuerdo con la invención es para el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades infecciosas, en particular de origen vírico, inducidos por la hepatitis B o virus C, VIH, herpes, retrovirus y similares.

Los ejemplos que siguen están destinados a ilustrar los varios objetos de la presente invención y por consiguiente no se limitan en carácter.

Tabla 1: describe la tasa de supervivencia de ratones C57BL/6 que se les ha implantado células TC1 que expresan HPV 16 E6 y E7 y oncogén C-Ha-ras. Los diferentes grupos de ratones se tratan con composiciones que comprenden IMV y EEV que codifican antígenos HPV, IMV que codifica los antígenos HPV o IMV que no codifica antígenos.

Tabla 2: describe porcentaje de ratones C57BL/6 libres de tumor después de la implantación con células TC1 que expresan HPV 16 E6 y E7 y oncogén C-Ha-ras. Los diferentes grupos de ratones se tratan con composiciones que comprenden IMV y EEV que codifica antígeno HPV, IMV que codifica los antígenos HPV o IMV que no expresa antígenos.

Tabla 3: describe la tasa de supervivencia de ratones C57BL/6 que se les ha implantado células TC1 que expresan MUC1. Los diferentes grupos de ratones se tratan con composiciones que comprende IMV y EEV que codifican MUC1 y IL2, IMV que codifica MUC1 y IL2 o IMV que no expresa antígenos.

Ejemplos

1. Preparación de composiciones que comprende IMV y EEV.

A. A. Preparación de CEF.

Se incuban sesenta y seis huevos SPF en 60s. en una solución de formol al 2%. Después de ser enjuagados con 70% etanol, los huevos se abren, se extraen los embriones y se disectan. Los tejidos obtenidos se digieren luego a 36.5°C durante 120 min por dispasa (UI/ml) y selección triple (UI/ml).

La mezcla se filtra y se remueven los tejidos no digeridos y se recolecta el CEF por centrifugación (2300 rpm, 15 min.).

B. Infección y Cultivo de CEF

El CEF se incuba en 55 I de VP-SFM (Invitrogen) durante 2 días a 36.5°C. El medio de cultivo celular se desecha luego y se agrega el poxvirus (0.05 MOI) en 55 I de Basal Medium Eagle (Invitrogen). Luego se incuban las células de empaque infectadas durante tres días.

C. C. Purificación de Poxvirus

Se recolectan las células de empaque y el medio de cultivo celular. La mezcla se homogeniza luego durante 15 min. Con un homogenizador Silverson® L4R de alta velocidad. La mezcla obtenida se depura luego por filtración profunda en un

63

sartopure 8 μ m (sartorius) acoplado a un sartopure 5 μ m a una velocidad de flujo de 1l/min.

La mezcla se concentra adicionalmente 18 veces a través de un modulo Prostat Microfiltration (ref: PSWAG021, Millipore) de 0.1 μ m.

La composición poxvímica se diafiltra adicionalmente en el mismo modulo contra el portador farmacéuticamente aceptable deseado.

2. La comparación de eficiencia terapéutica entre una composición que comprende EEV y IMV y una composición que solo comprende IMV.

A. Tratamiento terapéutico de ratones que tienen tumores que expresan antígenos HPV.

Denominación y Breve descripción de cada construcción de vector

El vector TG4001: MVA que lleva las secuencias de codificación para las proteínas HPV, E6 y E7, (bajo el control del promotor p7.5) y IL2 (bajo el control del promotor pH5R). Se prueban dos lotes, uno que comprende IMV y EEV (preparado como se describió anteriormente) y uno que solo comprende IMV.

El N33: vector vacío MVA que no expresa proteína HPV E6 y E7 ni IL2 se utiliza como control negativo

Modelo Animal

Ratones hembras C57Bl/6 de 6 a 8 semanas de edad se utilizan a lo largo de este estudio. Estos ratones se obtienen de Charles River (Rouen, France).

Especificación: los animales tienen 6 semanas de edad al momento de arribo al ensayo. Al comienzo de la experimentación, son menores de 8 semanas de edad.

Ambiente: Los animales se alojan en una sala exclusiva, sencilla, de aire acondicionado para proporcionar un mínimo de 11 cambios de aire por hora. Los rangos de temperatura y humedad relativa están dentro de 18°C y 22°C y 40 a 70 % respectivamente. La iluminación se controla automáticamente para dar un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Se revisa el estatus libre de patógenos específicos mediante control regular del ambiente.

Dieta: a lo largo del estudio los animales tienen acceso ad libitum a dieta esterilizada tipo D04 (UAR, Epinay sur Orge, Francia). Se proporciona agua ad libitum por vía de botellas.

Procedimientos de aclimatación y salud: se les da a todos los animales una inspección clínica de salud al momento de arribo. Ellos se climatizan en una instalación para animales libres de patógenos específicos (SPF) entre uno y dos semanas antes del inicio del experimento con el fin de asegurar su adecuabilidad para el estudio.

Características de Célula de Tumor y Condiciones de uso:

65

La línea TC1 se ha derivado de células principales epiteliales de pulmones de ratones C57Bl/6 co-transformadas con HPV-16 E6 y E7 y oncogenes c-Ha-ras. Estas células crecen en DMEM con Glutamina (2mM), suero fetal de becerro (10%), aminoácidos no esenciales (0.1mM), Piruvato Na (1 mM), β mercapto-etanol ($36\mu\text{M}$), Higromicina (0.2mg/ml) y G418 (0.5mg/ml). Después de descongelamiento, las células se amplifican dos veces, los últimos pasajes se desarrollan dos días antes de la inyección celular.

Inyección de Células

El primer día del experimento, se inyectan células TC1 subcutáneamente en ratones en una dosis de 2.0×10^5 células/ratón en el flanco.

Inyecciones Víricas

7 días después de la inyección de las células, 5.0×10^5 pfu/ $50\mu\text{l}$ /ratón de lotes de prueba (TG4001 IMV/EEV o solo IMV) MVATGN33 (vector vacío) se inyectan a los ratones. Se utilizan veinte ratones por lote probado.

Se practican inyecciones víricas subcutáneamente en el mismo flanco pero en sitios distantes del punto de inyección de las células y se lleva a cabo 3 veces en intervalos de 7 días.

Parámetros de Monitoreo:

Se monitorea el crecimiento de los tumores durante 90 días después de inyección de células, con un calibrador. Se sacrifican los ratones por razones

éticas cuando el tamaño del tumor es superior a 25 mm de diámetro o cuando ellos muestran dolor aún si el tumor es más pequeño.

Se registra la supervivencia de los ratones.

Resultados

Todos los grupos tratados con el vector MVA que codifica el antígeno HPV muestran una tasa de supervivencia mayor que el grupo tratado con un vector MVA vacío. Los ratones tratados con la composición que comprenden EEV e IMV muestran una tasa de supervivencia mayor que los ratones tratados por la composición que comprenden solo IMV. Más aún, el 35% de los ratones tratados por la composición que comprenden EEV e IMV están libres de tumor 77 días después de ser inyectados comparado con solo el 10% de los ratones tratados por la composición que solo comprende IMV.

B. B. tratamiento terapéutico de ratones que tienen tumor que expresa MUC1.

Denominación y Breve descripción de cada Construcción de Vector

El vector TG4010: MVA que lleva las secuencias de codificación para las proteínas MUC1 (bajo el control del promotor p7.5) y IL2 (bajo el control del promotor pH5R). Dos lotes, uno que comprende IMV y EEV y uno que solo comprende IMV se prueban.

Un vector vacío MVATGN33 que no expresa MUC1, ni IL2 se utilizan como control negativo.

Sistema de Experimentos Animales y Modelo de Ratón

Especies, cepas y proveedores: ratones hembra C57Bl/6 de 6 a 8 semanas de edad se utilizan a lo largo de este estudio. Estos ratones se obtienen de Charles River (Rouen, Francia).

Especificación: Los animales son de 6 semanas de edad al día momento de arribo. Al comienzo de la experimentación, ellos son de menos de 8 semanas de edad.

Medio Ambiente: Los animales se alojan en una sala única exclusiva con aire acondicionado para proporcionar un mínimo de 11 cambios de aire por hora. Los rangos de temperatura y humedad relativa están dentro de 18°C y 22°C y 40 a 70% respectivamente. La iluminación se controla automáticamente para dar un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Los animales se alojas en grupos de 10 por jaula de 43 X 27 X 15 cm, área del piso 1161cm².

Dieta: A través del estudio los animales tienen acceso ad libitum a dieta esterilizada tipo RM (SDS, Le Bord'Haut de Vigny, Francia). Se proporciona agua ad libitum por vía de botellas.

No hay contaminantes presentes en la dieta o agua en niveles que puedan tener interferencia con el logro de los objetivos del estudio.

Procedimiento de Salud y Aclimatización: A los animales se les da una inspección clínica por salud al momento de arribo. Ellos se aclimatizan en una instalación para animales libres de Patógenos Específicos (SPF) entre uno y dos semanas antes del inicio del experimento con el fin de asegurar su adecuabilidad para el estudio.

Características de las Células de Tumor y Condiciones de uso:

La línea de tumor RMA se ha derivado de un linfoma C57Bl/6. Las células RMA-MUC1 se obtienen después de transfección con un plasmido de expresión que contiene el gen MUC1 a. Las células crecen en DMEM con Glutamina (2mM), suero fetal de becerro (10%), aminoácidos no esenciales (0.1mM), Piruvato Na (1mM), β mercapto-etanol (36 μ M) y Higromicina (550 μ g/ml). Después de descongelar, las células se amplifican dos veces, los últimos pasajes se desarrollan el día antes de la exposición.

Inmunización

Se inmunizan ratones con 1.0×10^4 o 3.0×10^4 pfu/ratón para virus TG4010 y con 3.0×10^4 pfu/ratón para MVATGN33.

Se utilizan 20 ratones por lote probado.

Se desarrollan inmunizaciones víricas subcutáneamente en un flanco y se llevan a cabo 3 veces en intervalos de 14 días.

Exposición de Tumor

Dos semanas después de la última inmunización, se exponen los ratones subcutáneamente en el mismo flanco pero en sitios distante del punto de inyección vírico, 1.0×10^6 RMA-MUC1 células viables/50 μ l/ratón.

Parámetros de Monitoreo:

Se monitorea el crecimiento de los tumores durante 6 semanas después de la exposición de tumor, con un calibrador. Se sacrifican los ratones por razones éticas cuando el tamaño del tumor es superior a 25 mm de diámetro o cuando ellos muestran dolor aún si el tumor es más pequeño.

Se registra la supervivencia de los ratones.

Se utilizan 20 ratones por dosis.

Resultados

Todos los grupos tratados con el vector MVA que codifica el antígeno MUC1 muestran un menor crecimiento de tumor y una mayor tasa de supervivencia que el grupo tratado con un vector MVA vacío. Los ratones tratados con la composición que comprenden EEV e IMV muestran un menor crecimiento de tumor que los ratones tratados por la composición que solo comprenden IMV.

REIVINDICACIONES

1. Un poxvirus recombinante, en donde dicho poxvirus recombinante es un EEV sin especificidad de infección objetivada.
2. El poxvirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho poxvirus se selecciona del grupo que comprende Ortopoxvirus, Parapoxvirus, Avipoxvirus, Capripoxvirus, Leporipoxvirus, Suipoxvirus, Moluscipoxvirus, Yatapoxvirus.
3. El poxvirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho poxvirus es un ortopoxvirus.
4. El poxvirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho ortopoxvirus es un virus Vaccinia.
5. El poxvirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho Ortopoxvirus es un virus vaccinia Ankara modificado.
6. El poxvirus recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho poxvirus comprende una secuencia exógena que codifica una molécula que tienen directa o indirectamente una función citotóxica
7. El poxvirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha secuencia exógena es un gen suicida.

8. El poxvirus recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho poxvirus comprende una secuencia exógena que codifica un antígeno asociado a tumor (TAA).
9. El poxvirus recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho poxvirus comprende una secuencia exógena que codifica un antígeno.
10. El poxvirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho antígeno se deriva de un virus.
11. El poxvirus recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho poxvirus comprende los elementos necesarios para la expresión de la secuencia exógena.
12. Un proceso para producir un poxvirus intacto, atenuado y/o recombinante sin especificidad de infección objetivada que comprende las etapas de:
 - a) a) Preparar un cultivo de células de empaque,
 - b) b) Infectar dicho cultivo celular,
 - c) c) Cultivar dichas células infectadas durante un periodo de tiempo apropiado,
 - d) Recuperar las partículas poxvíricas producidas del sobrenadante de cultivo y/o las células de empaque, y



13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho proceso está libre de productos animales.
14. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13, en donde dicha célula de empaque es un CEF.
15. El proceso de acuerdo con una las reivindicaciones 12 a 14, en donde la etapa c) dura entre dos y cuatro días.
16. El proceso de acuerdo con una las reivindicaciones 12 a 15, en donde la etapa d comprende la interrupción de la célula de empaque al utilizar un homogenizador a alta velocidad.
17. El proceso de acuerdo con una las reivindicaciones 12 a 16, en donde dicho proceso comprende adicionalmente una capa de clarificación, de la mezcla obtenida de la etapa d, permitiendo el retiro de los residuos celulares.
18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha etapa de clarificación es una etapa de filtración profunda.
19. El proceso de acuerdo con una las reivindicaciones 17 o 18, en donde dicho proceso comprende adicionalmente una etapa de concentración.
20. El proceso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha etapa de concentración es una etapa de microfiltración.

fb

21. El proceso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicho proceso comprende adicionalmente una etapa de diafiltración.
22. El proceso de acuerdo con una las reivindicaciones 12 a 21, en donde no se utiliza nucleasa y más particularmente benzonasa.
23. Una composición que comprende el poxvirus recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11 u obtenido mediante un proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 12 a 22.
24. La composición de acuerdo con la reivindicación 23 en donde más del 1%, preferiblemente más de 5%, aún más preferiblemente más del 10% y más preferiblemente por lo menos 20% del poxvirus comprendido en dicha composición es EEV.
25. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 23 o 24 que tiene un título de por lo menos 10^5 , preferiblemente por lo menos 10^6 , más preferiblemente de por lo menos 10^7 , aún más preferiblemente de por lo menos 10^8 pfu por ml.
26. La composición de acuerdo con una de las reivindicaciones 23 a 25 que tiene un título de por lo menos 10^3 , preferiblemente 10^4 y más preferiblemente por lo menos 3×10^5 pfu por μg de proteína.
27. Uso de un poxvirus recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11, una composición de acuerdo con una de las reivindicación 23 a 26 para la preparación de un medicamento.

74

28. Uso de acuerdo con la reivindicación 27 para el tratamiento terapéutico o profiláctico del cáncer.
29. Uso de acuerdo con la reivindicación 27 para el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades infecciosas.

RESUMEN

La presente invención se relaciona con composiciones y composiciones farmacéuticas que comprenden poxvirus y más particularmente virus extracelular con envoltura. La presente invención también se relaciona con un proceso para producir poxvirus y poxvirus obtenidos de éstos. Más aún la presente invención también se relaciona con el uso de dichos poxvirus y dicha composición para la preparación de un medicamento.

96

FIGURA 1

Tasa de supervivencia

			Días de exposición tumoral											
Grupo	VIRUS	DOSIS pfu / souris	9	13	20	27	34	41	49	56	63	70	77	
1	IMV/EEV	5,0 E+05 pfu	100	100	100	100	100	100	90	65	60	60	60	
2	IMV	5,0E+05 pfu	100	100	100	100	95	95	60	40	35	30	20	
3	N33	5,0 E+05 pfu	100	100	100	100	100	90	70	25	10	5	5	

ff

FIGURA 2

Porcentaje de Ratones libres de tumor												
DOSIS pfu/50µL / ratón		Días de exposición tumoral										
		9	13	20	27	34	41	49	56	63	70	77
VIRUS												
IMV/IEEV	5,0 E+05 pfu	0	0	0	10	20	30	30	35	35	35	35
IMV	5,0 E+05 pfu	0	0	0	0	0	5	5	10	10	10	10
N33	5,0 E+05 pfu	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

78

FIGURA 3

Grupo		Dosis pfu/50µL / souris	Días de exposición tumoral						
			9	15	20	23	27	30	38
1	IMV	1,0 E+04	100	100	100	95	75	60	55
2	IMV	3,0 E+04	100	100	100	100	90	60	55
3	IMV/EEV	1,0 E+04	100	100	100	95	85	75	70
4	IMV/EEV	3,0 E+04	100	100	100	100	100	80	75
5	Empty IMV	1,0 E+04	100	100	100	60	30	10	5

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference N2205 PCT S3	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2007/005302	International filing date (day/month/year) 15/06/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 20/06/2006
Applicant TRANSGENE S.A.		

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

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

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

1. Basis of the report

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

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(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/EP2007/005302

80

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N15/863 A61K48/00 C12N7/02 C12N5/06 A61K35/76
A61K39/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A61K

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, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KATZ EHUD ET AL: "The cytoplasmic and transmembrane domains of the vaccinia virus B5R protein target a chimeric human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein to the outer envelope of nascent vaccinia virions" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 71, no. 4, 1997, pages 3178-3187, ✓ XP002454249 ✓ ISSN: 0022-538X right-hand column, last paragraph - page 3179 page 3180, right-hand column - page 3182, left-hand column; figure 7 page 3183 - page 3186 ----- -/--	1-4, 9-12, 15-17, 19,22-26 5-8,13, 14,18, 20,21, 27-29

☒ 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

19 October 2007

Date of mailing of the international search report

05/11/2007

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

Esen, Josée

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2007/005302

81

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GALMICHE MARIE C ET AL: "Expression of a functional single chain antibody on the surface of extracellular enveloped vaccinia virus as a step towards selective tumour cell targeting" JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, SOCIETY FOR GENERAL MICROBIOLOGY, SPENCERS WOOD, GB, vol. 78, no. 11, November 1997 (1997-11), pages 3019-3027, XP002173264 ✓ ISSN: 0022-1317 ✓ cited in the application	1-4, 9-12, 15-17, 19,22-26
Y	the whole document	5-8,13, 14,18, 20,21, 27-29
Y	US 2005/208074 A1 (BALLOUL JEAN M [FR] ET AL) 22 September 2005 (2005-09-22) cited in the application paragraphs [0011], [0068], [0074], [0095], [0131] - [0163] -----	5-8,13, 14,18, 20,21, 27-29
Y	SUTTER G ET AL: "NONREPLICATING VACCINIA VECTOR EFFICIENTLY EXPRESSES RECOMBINANT GENES" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 89, November 1992 (1992-11), pages 10847-10851, XP001036843 ✓ ISSN: 0027-8424 the whole document	5-8,13, 14,18, 20,21, 27-29
A	SMITH GEOFFREY L ET AL: "The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus." JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 83, no. 12, December 2002 (2002-12), pages 2915-2931, XP002454250 ✓ ISSN: 0022-1317 page 2923, left-hand column - page 2926; figures 1,3,4 -----	
A	MCINTOSH A A G & SMITH G L: "Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 70, no. 1, January 1996 (1996-01), pages 272-281, XP002409051 ✓ ISSN: 0022-538X ----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No
 PCT/EP2007/005302

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TRANSGENE: "Transgene announces positive phase II results for its HPV therapeutic vaccine in precancerous cervical lesions" INTERNET CITATION, [Online] 25 April 2006 (2006-04-25), XP002454251 Retrieved from the Internet: URL: http://www.transgene.fr/us/pdf/communique_presse/communiqués_divers_2006/CP-US%20Eurogin%2025-04-06.pdf [retrieved on 2007-10-08] abstract -& WO 98/04705 A (TRANSGENE SA [FR]; BALLOUL JEAN MARC [FR]; BIZOUARNE NADINE [FR]; KIEN) 5 February 1998 (1998-02-05) the whole document	5-8, 13, 14, 18, 20, 21, 27-29
Y	TRANSGENE (SQUIBAN P): "Transgene's therapeutic vaccine MVA- U41 IL2 at ASCO" INTERNET CITATION, [Online] 17 May 2005 (2005-05-17), XP002454252 Retrieved from the Internet: URL: http://www.transgene.com/us/pdf/communique_presse/communiqués_divers_2005/PR-US_17-05-2005_ASCO_POUMON.pdf [retrieved on 2007-10-08] abstract -& TREVOR K T ET AL: "Transduction of human dendritic cells with a recombinant modified vaccinia Ankara virus encoding MUC1 and IL-2" CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY, BERLIN, DE, vol. 50, no. 8, 22 August 2001 (2001-08-22), pages 397-407, XP002403442 ISSN: 0340-7004 the whole document	5-8, 13, 14, 18, 20, 21, 27-29
Y	WO 2004/022729 A1 (BAVARIAN NORDIC AS [DK]; RAETHE INGMAR [DE]; LUDWIG EVA [DE]; HELLER K) 18 March 2004 (2004-03-18) the whole document	12-22
Y	WO 2006/045438 A (BAXTER INT [US]; BAXTER HEALTHCARE SA [CH]; GRILLBERGER LEOPOLD [AT];) 4 May 2006 (2006-05-04) the whole document	12-22
Y	WO 2005/007840 A (VIVALIS [FR]; GUEHENNEUX FABIENNE [FR]; PAIN BERTRAND [FR]) 27 January 2005 (2005-01-27) the whole document	12-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2007/005302

82

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
<i>Transgene</i> US 2005208074	A1	22-09-2005	NONE
WO 9804705	A	05-02-1998	AT 265535 T 15-05-2004
<i>Transgene</i>			AT 205881 T 15-10-2001
			AU 736720 B2 02-08-2001
			AU 3855297 A 20-02-1998
			CA 2234263 A1 05-02-1998
			DE 69706825 D1 25-10-2001
			DE 69706825 T2 02-05-2002
			DE 69728914 D1 03-06-2004
			DE 69728914 T2 07-04-2005
			DK 1149910 T3 02-08-2004
			DK 862634 T3 21-01-2002
			EP 0862634 A1 09-09-1998
			ES 2215805 T3 16-10-2004
			ES 2163795 T3 01-02-2002
			FR 2751879 A1 06-02-1998
			HK 1043809 A1 03-12-2004
			JP 2000500662 T 25-01-2000
			PT 1149910 T 30-09-2004
			PT 862634 T 28-03-2002
WO 2004022729	A1	18-03-2004	AU 2003264144 A1 29-03-2004
			BR 0313559 A 12-07-2005
			CA 2494379 A1 18-03-2004
			CN 1692156 A 02-11-2005
			EP 1434858 A1 07-07-2004
			JP 2005537793 T 15-12-2005
			KR 20050037551 A 22-04-2005
			MX PA04012966 A 16-05-2005
			NZ 538575 A 30-03-2007
WO 2006045438	A	04-05-2006	AU 2005299040 A1 04-05-2006
			CA 2585518 A1 04-05-2006
			EP 1805298 A1 11-07-2007
			KR 20070073930 A 10-07-2007
			US 2006094104 A1 04-05-2006
WO 2005007840	A	27-01-2005	AU 2004257939 A1 27-01-2005
			CA 2531565 A1 27-01-2005
			JP 2006527995 T 14-12-2006
			KR 20060057577 A 26-05-2006
			US 2006233834 A1 19-10-2006

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference N2205 PCT S3	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/EP2007/005302	International filing date (day/month/year) 15.06.2007	Priority date (day/month/year) 20.06.2006	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C12N15/863			
Applicant TRANSGENE S.A.			
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 <u>6</u> 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 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 2007-12-12		Date of completion of this report 16.06.2008	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Espen, Josée Telephone No. +49 89 2399-0	



**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/EP2007/005302

85

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

1-23 as originally filed

Claims, Numbers

1-29 as originally filed

Drawings, Sheets

1/3-3/3 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.
- ☐ 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*):

5. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 70.2 (e)).

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/EP2007/005302

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	<u>5-8,13-14,18,20,21,27-29</u>
	No: Claims	<u>1-4,9-12,15-17,19,22-26</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-29</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-29</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

87

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/005302

Re Item V

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

Reference is made to the following documents:

- D1: KATZ EHUD ET AL: "The cytoplasmic and transmembrane domains of the vaccinia virus B5R protein target a chimeric human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein to the outer envelope of nascent vaccinia virions"
JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 71, no. 4, 1997, pages 3178-3187,
XP002454249 ISSN: 0022-538X
- D2: US 2005/208074 A1 (BALLOUL JEAN M [FR] ET AL) 22 September 2005
(2005-09-22) cited in the application
- D3: TREVO KATRINA ET AL: "Transduction of human dendritic cells with a recombinant modified vaccinia Ankara virus encoding MUC1 and IL-2"
CANCER IMMUNOL IMMUNOTHER., vol. 50, 2001, pages 397-407,
XP002403442
- D4: TRANSGENE (SQUIBAN P): "Transgene's therapeutic vaccine MVA-UV1-IL2 at ASCO" INTERNET CITATION, [Online] 17 May 2005 (2005-05-17),
XP002454252 Retrieved from the Internet:
URL: http://www.transgene.com/us/pdf/communique_presse/communiqués_divers_2005/PR-US_17-05-2005_ASCO_POUMON.pdf [retrieved on 2007-10-08]
- D5: WO 2004/022729 A1 (BAVARIAN NORDIC AS [DK]; RAETHE INGMAR [DE]; LUDWIG EVA [DE]; HELLER K) 18 March 2004 (2004-03-18)

D1 relates to a recombinant vaccinia virus, wherein said recombinant vaccinia virus is an EEV (extracellular enveloped virus) with apparently no targeted infection specificity (said vaccinia virus does not comprise a heterologous ligand moiety which is localized at the surface of the virus particle and which is capable of binding an anti-ligand molecule localized at the surface of a target cell; e.g. see claim 1 of D2), wherein said vaccinia virus comprises an exogenous sequence encoding a chimeric B5R-HIV protein.

88

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/005302

Moreover, D1 discloses a method for producing a wild type, an attenuated and/or a recombinant vaccinia virus with no targeted infection specificity comprising the steps of:

- infecting CV-1 cells with the vaccinia virus,
- culturing the infected cells for 48 hours,
- recovering the vaccinia particles from the culture supernatant for EEV purification and/or from the packaging cells for IMV purification. For IMV purification a Dounce homogenizer was used. For EEV purification, particles were collected by centrifugation of clarified culture medium.

The virus suspensions were concentrated by CsCl density centrifugation.

Additionally, having regard to **D2** the following has to be considered:

"... vaccinia virus displays a very broad host range and can infect most vertebrates cells. ... this absence of infection selectivity ... " (D2, [0011]).

In consequence, every vaccinia virus not comprising said heterologous ligand moiety has to be considered as a vaccinia virus with no targeted infection specificity.

Furthermore, having regard to the above comments, it should be noted that the culture supernatant of vaccinia virus infected/transduced cells comprises the EEV fraction of vaccinia virus.

Moreover, D2 [0131]-[0144] relates to a process for producing a poxviral particle according to the invention (i.e. a particle having targeted infection specificity). However, the steps of said process described in D2 are identical to the steps of the process claimed in claim 12. In addition, the cells to be infected are most preferably primary chicken embryo fibroblasts (CEF). Furthermore, said process of D2 can be used to produce both IMV and EEV poxviral particles (D2, [0149]).

D3 relates to a recombinant modified vaccinia Ankara virus (MVA-MUC1-IL2) for use in cancer immunotherapy.

Moreover, said virus appears of not having a targeted infection specificity since it does not comprise said heterologous ligand moiety.

Furthermore, in view of **D4** the clinical tests (phase II) carried out with said Ankara virus described in D3 seem to be very positive. It should be noted that in a particularly preferred embodiment of the invention, the poxvirus of the invention has a sequence

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/EP2007/005302

which is more than 90% homologous to the sequence of TG4010 (description, p. 7).

Document **D5** describes a method for the amplification and isolation of modified vaccinia Ankara (MVA) virus comprising:

- infection of CEF cells with said virus
- cell culture in serum free medium (SFM)
- recovering of said virus

The resulting virus was used for the preparation of a medicament or vaccine.

1). Having regard to the above comments, D1 is novelty destroying for claims 1-4,9-12,15-17,19,22-26 (Art. 33 (2) PCT).

2). The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 5-8,13,14,20,21, and 27-29 does not involve an inventive step in the sense of Article 33(3) PCT.

In view of documents D1-D5 (see above), it would have been obvious for the skilled person to put into practice the claimed matter.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 22) Fecha de solicitud: (30) Prioridad (31) Prioridad (32) Fecha (33) País 06360027.4 20/06/2006 EP 60/861,452 29/11/2006 US		(51) Int Cl: C12N 015/863 (71) Solicitante(s) TRANSGENE S.A. (72) Inventor(es) DANIEL MALARME Y OTROS (74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 20/01/2009 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 15/06/2007 No. de solicitud PCT/EP2007/005302		(87) Publicación internacional Fecha: 27/12/2007 N° publicación: WO 2007/147528 A1	
(54) Título: PROCESO PARA PRODUCIR POXVIRUS Y COMPOSICIONES DE POXVIRUS			

Reivindicación(es):

1. Un poxvirus recombinante, en donde dicho poxvirus recombinante es un EEV sin especificidad de infección objetivada.

2. El poxvirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho poxvirus se selecciona del grupo que comprende Ortopoxvirus, Parapoxvirus, Avipoxvirus, Capripoxvirus, Leporipoxvirus, Suipoxvirus, Moluscipoxvirus, Yatapoxvirus.

3. El poxvirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho poxvirus es un ortopoxvirus.

4. El poxvirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho ortopoxvirus es un virus Vaccinia.

5. El poxvirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 3, en donde dicho Ortopoxvirus es un virus vaccinia Ankara modificado.

6. El poxvirus recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho poxvirus comprende una secuencia exógena que codifica una molécula que tienen directa o indirectamente una función citotóxica

7. El poxvirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha secuencia exógena es un gen suicida.

8. El poxvirus recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho poxvirus comprende una secuencia exógena que codifica un antígeno asociado a tumor (TAA).

9. El poxvirus recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho poxvirus comprende una secuencia exógena que codifica un antígeno.

10. El poxvirus recombinante de acuerdo con la reivindicación 9, en donde dicho antígeno se deriva de un virus.

11. El poxvirus recombinante de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho poxvirus comprende los elementos necesarios para la expresión de la secuencia exógena.

12. Un proceso para producir un poxvirus intacto, atenuado y/o recombinante sin especificidad de infección objetivada que comprende las etapas de:

- a) Preparar un cultivo de células de empaque,
- b) Infectar dicho cultivo celular,
- c) Cultivar dichas células infectadas durante un periodo de tiempo apropiado,
- d) Recuperar las partículas poxvíricas producidas del sobrenadante de cultivo y/o las células de empaque, y

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho proceso está libre de productos animales.

14. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 12 o 13, en donde dicha célula de empaque es un CEF.

15. El proceso de acuerdo con una las reivindicaciones 12 a 14, en donde la etapa c) dura entre dos y cuatro días.

16. El proceso de acuerdo con una las reivindicaciones 12 a 15, en donde la etapa d comprende la interrupción de la célula de empaque al utilizar un homogenizador a alta velocidad.

17. El proceso de acuerdo con una las reivindicaciones 12 a 16, en donde dicho proceso comprende adicionalmente una capa de clarificación, de la mezcla obtenida de la etapa d, permitiendo el retiro de los residuos celulares.

18. El proceso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicha etapa de clarificación es una etapa de filtración profunda.

19. El proceso de acuerdo con una las reivindicaciones 17 o 18, en donde dicho proceso comprende adicionalmente una etapa de concentración.

20. El proceso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde dicha etapa de concentración es una etapa de microfiltración.

91

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 91,662
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-133446- -00000-0000

Fecha. 2008-12-16 16:16:13 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 91

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	10528372	24/11/2008	43,905,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

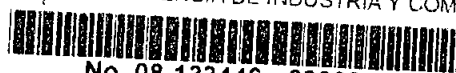
SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Bo 16779-841.00/2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-133446-00000-0000

Fecha: 2008-12-16 16:16:13

Dep. 2020 NUECREACION

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 379 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 91

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 ☐

Sandra Rodríguez
Firma Responsable

Fecha Dic - 18 - 08

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

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

REFERENCIA	Radicación No.	8 133446
	Solicitud internacional	PCT/EP2007/005302
	Fecha inicio fase nacional	20/01/2009
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	1036

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 el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. 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, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

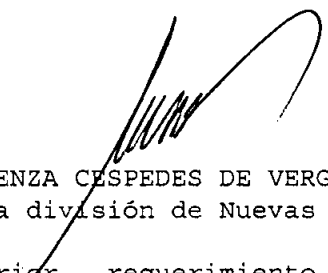
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud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

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 8 133446



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

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

30 ENE. 2009