



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0712158-0 A2**

(22) Data de Depósito: 15/06/2007
(43) Data da Publicação: 17/01/2012
(RPI 2141)



(51) *Int.Cl.:*
C12N 15/863
A61K 48/00
C12N 7/02
C12N 5/06
A61K 35/76
A61K 39/00

(54) Título: VÍRUS DE VACÍNIA ANKARA MODIFICADO RECOMBINANTE, PROCESSO PARA PRODUZIR UM VÍRUS DA VARÍOLA DE TIPO SELVAGEM, UM VÍRUS DA VARÍOLA ATENUADO E/OU UM VÍRUS DA VARÍOLA RECOMBINANTE SEM ESPECIFICIDADE DE INFECÇÃO VISADA, COMPOSIÇÃO, E, USO DE UM VÍRUS DA VARÍOLA RECOMBINANTE OU DE UMA COMPOSIÇÃO

(30) Prioridade Unionista: 20/06/2006 EP 06360027.4, 29/11/2006 US 60/816452

(73) Titular(es): Transgêne S.A.

(72) Inventor(es): Claude Sene, Daniel Malarme, Yves Cordier

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & Cia.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007005302 de 15/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/147528 de 27/12/2007

(57) Resumo: VÍRUS DE VACÍNIA ANKARA MODIFICADO RECOMBINANTE, PROCESSO PARA PRODUZIR UM VÍRUS DA VARÍOLA DE TIPO SELVAGEM, UM VÍRUS DA VARÍOLA ATENUADO E/OU UM VÍRUS DA VARÍOLA RECOMBINANTE SEM ESPECIFICIDADE DE INFECÇÃO VISADA, COMPOSIÇÃO, E, USO DE UM VÍRUS DA VARÍOLA RECOMBINANTE OU DE UMA COMPOSIÇÃO A presente invenção refere-se às composições e as composições farmacêuticas compreendendo vírus da varíola e mais particularmente aos vírus envelopados extracelulares. A presente invenção também se refere a um processo para produzir vírus da varíola e aos vírus da varíola obtidos do mesmo. Ainda mais, a presente invenção também se refere ao uso de citados vírus da varíola e citada composição para preparação de um medicamento.

“VÍRUS DE VACÍNIA ANKARA MODIFICADO RECOMBINANTE, PROCESSO PARA PRODUZIR UM VÍRUS DA VARÍOLA DE TIPO SELVAGEM, UM VÍRUS DA VARÍOLA ATENUADO E/OU UM VÍRUS DA VARÍOLA RECOMBINANTE SEM ESPECIFICIDADE DE INFEÇÃO VISADA, COMPOSIÇÃO, E, USO DE UM VÍRUS DA VARÍOLA RECOMBINANTE OU DE UMA COMPOSIÇÃO”

A presente invenção refere-se às composições e às composições farmacêuticas compreendendo vírus da varíola e mais particularmente aos vírus envelopados extracelulares. A presente invenção também se refere a um processo para produzir vírus da varíola e aos vírus da varíola obtidos do mesmo. Ainda mais, a presente invenção também se refere ao uso de citados vírus da varíola e citada composição para preparação de um medicamento.

O surgimento de novas ameaças (gripe aviária, vírus do Nilo ocidental, antraz, etc...) bem como o desenvolvimento de terapia genética têm aumentado a necessidade de produção e de purificação de vírus da varíola para propósitos profiláticos ou terapêuticos. Isto é notavelmente o caso para o Vírus de Mamífero Ankara (MVA). Este vírus da varíola que foi inicialmente usado para vacinação de pacientes imunodeficientes contra Varíola, também é agora usado como um vetor para propósitos de terapia genética. Por exemplo, MVA é utilizado como um vetor para o gene *Muc1* para vacinação de pacientes contra tumor expressando *Muc1* (Scholl et al., 2003, J Biomed Biotechnol., 2003, 3, 194-201). MVA transportando o gene codificador de antígenos de HPV também é usado como um vetor para o tratamento terapêutico de carcinoma ovariano.

Vírus da varíola são um grupo de vírus envelopados complexos que distingue-os principalmente por sua morfologia incomum, seu genoma de DNA grande e seu sítio citoplásmico de replicação. Os genomas de vários membros de *poxviridae*, incluindo a cepa Copenhagen do vírus de

vacínia (VV) (Goebel et al., 1990, Virol. 179, 247-266 e 517-563; Johnson et al., 1993, Virol. 196, 381-401) e a cepa Ankara de vírus de vacínia modificado (MVA) (Antoine et al., 1998, Virol. 244, 365-396), têm sido mapeados e seqüenciados. VV possui um genoma de DNA de fita dupla de
 5 cerca de 192 kb codificador de cerca de 200 proteínas das quais aproximadamente 100 estão envolvidas em montagem de vírus. MVA é uma cepa de vírus de vacínia elevadamente atenuado gerada por mais de 500 passagens seriais da cepa Ankara de vírus de vacínia em fibroblastos de embrião de pinto (Mayr et al., 1975, Infection 3, 6-16). O vírus MVA foi
 10 depositado antes na Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) sob o número de depósito N602 1-721. Determinação da seqüência completa do genoma de MVA e comparação com o genoma de Copenhagen VV permite a identificação precisa das alterações que ocorreram no genoma viral e a definição de sete deleções (I a VII) e numerosas mutações
 15 acarretando ORFs (Matriz de Leitura Aberta) fragmentadas (Antoine et al., 1998, Virology 244, 365-396).

A rota natural para captação intracelular de vírus envelopados envolve uma série de etapas incluindo a ligação de um polipeptídeo viral exposto na superfície do vírus a um receptor celular e um mecanismo de fusão
 20 entre as membranas viral e celular resultando em liberação de genoma viral para dentro do citoplasma da célula infectada.

Contudo, em caso especial de vírus da varíola, a análise de rota de liberação exata é complicada pela existência de duas formas morfolologicamente distintas de vírus infeccioso, chamadas de vírus maduro
 25 intracelular (IMV) e vírus envelopado extracelular (EEV). A forma IMV é, dentre outras particularidades, caracterizada por um envelope monolipídico circundando o núcleo viral e está principalmente localizado no citoplasma das células infectadas, embora possa ser extracelularmente liberado após lise das células infectadas. Muitos dos polipeptídeos naturais expostos na superfície

do envelope lipídico de IMV têm sido identificados, tais como por exemplo as proteínas p14 kDa e p21 kDa, respectivamente codificadas pelo gene A27L (Rodriguez et al., 1985, J. Virol. 56, 482-488; Rodriguez et Estaban, 1987, J. Virol. 61, 3550-3554) pelo gene A17L, bem como as proteínas codificadas pelos genes L1R, A14L, DBL, A9L (Yeh et al., 2000, J. Virol. 74, 9701-9711), E10R (Senkevich et al., 2000, Virol. 5, 244-252) e H3L. Comparada com IMV, a forma EEV possui um envelope de membrana lipídica externa adicional (camada lipídica dupla) adquirida de trans-cisternas de rede de Golgi. Corresponde à forma viral liberada fora das células infectadas. O envelope de membrana superficial de EEV mostra cerca de 10 proteínas que estão ausentes na superfície de IMV, tais como por exemplo os produtos de gene de B5R, A34R e hemaglutinina (HA) codificados. A co-existência de formas IMV e EEV tem sido descrita para a maioria das cepas de vacínia (e.g. por exemplo cepas Copenhagen e MVA) bem como para outros vírus da varíola tais como os vírus da varíola de aves (Boulanger et al., 2000, J. Gen. Virol. 81, 675-687).

Visto que são mais estáveis no ambiente, IMVs desempenham um papel predominante em uma transmissão de hospedeiro para hospedeiro (Hooper et al. Virology, 2003, 306, 181-185). A respeito disto, partículas de IMV têm sido os vetores de escolha para propósitos de terapia genética. Por esta razão, os processos de purificação de vírus da varíola disponíveis apenas tratam o vírus presente nas células acondicionadoras (i.e. IMV), enquanto que as partículas de EEV que se disseminam para dentro de meios de cultura são descartadas. Por causa da presença em sua superfície de uma variedade maior de polipeptídeos do que sobre a superfície de IMV, o uso de EEVs recombinantes possuindo uma especificidade de infecção visada já tem sido proposto (US20050208074; Galmiche et al. J. Gen. Virol., 1997, 78, 3019-3027). Contudo, até mesmo para este uso específico, partículas de IMV são particularmente preferidas (US20050208074, página 4, capítulo 29).

Surpreendentemente, o requerente tem verificado que EEVs sem especificidade de infecção visada possuem uma eficácia terapêutica e/ou profilática maior comparados com IMV.

A respeito disto, a presente invenção refere-se a um vírus da
5 variola e preferivelmente a um vírus da variola recombinante, no qual o citado vírus da variola é um EEV sem especificidade de infecção visada. A presente invenção também se refere a uma composição e preferivelmente a uma
composição farmacêutica compreendendo EEV recombinante sem especificidade de infecção visada.

10 Como usados em todo o pedido, os termos "um" e "uma" são usados no sentido de que significam "pelo menos um(a)", "pelo menos um(a) primeiro(a)", "um(a) ou mais" ou "uma pluralidade" dos componentes ou etapas referidos(as), a não ser que o contexto dite claramente o contrário. Por exemplo, o termo "uma célula" inclui uma pluralidade de células, incluindo
15 suas misturas.

O termo "e/ou" sempre que aqui usado inclui o significado de "e", "ou" e "todos ou qualquer outra combinação dos elementos conectados pelo citado termo".

O termo "cerca de" ou "aproximadamente" como aqui usado
20 significa dentro de 20%, preferivelmente dentro de 10%, e mais preferivelmente dentro de 5% de um dado valor ou faixa.

Como aqui usado, o termo "compreendendo" é intencionado para significar que os produtos, composições e métodos incluem os componentes ou etapas referidos, mas não excluindo outros. "Consistindo
25 essencialmente de" quando usado para definir produtos, composições e métodos, deve significar exclusão de outros componentes ou etapas de qualquer significância essencial. Assim, uma composição consistindo essencialmente dos componentes citados não excluiria contaminantes traço e veículos farmacêuticamente aceitáveis. "Consistindo de" deve significar

exclusão de mais do que três elementos dos outros componentes ou etapas.

Família de vírus da varíola compreende vírus das subfamílias Chordopoxvírus e Entomopoxvírus. Dentre estes, o vírus da varíola de acordo com a invenção é preferivelmente escolhido do grupo consistindo de Orthopoxvírus, Parapoxvírus, Avipoxvírus, Capripoxvírus, Leporipoxvírus, Suipoxvírus, Molluscipoxvírus, Yatapoxvírus. De acordo com uma modalidade mais preferida, o vírus da varíola da invenção é um orthopoxvírus.

O Orthopoxvírus é preferivelmente um vírus de vacínia e mais preferivelmente um vírus de vacínia Ankara modificado (MVA) em particular MVA 575 (ECACC V00120707) e MVA-BN (ECACC V00083008).

Como previamente indicado, uma partícula de IMV compreende o núcleo viral incluindo o genoma viral circundado por um envelope lipídico de monocamada. O termo "EEV" refere-se a uma partícula de IMV circundada por um envelope lipídico de bicamada adicional expondo em sua superfície celular bem como polipeptídeos virais.

O termo "especificidade de infecção visada" como aqui usado refere-se a uma especificidade de infecção controlada, onde uma partícula de vírus da varíola é engenhada para exibir um tropismo novo ou intensificado na direção de células alvo, comparado com uma partícula de vírus da varíola não modificada relacionada. Como um resultado, uma partícula de vírus da varíola com uma especificidade de infecção visada mostra uma propensão para infectar as citadas células alvo diferentemente de sua partícula de vírus da varíola não modificada relacionada, o que significa que a partícula de vírus da varíola com uma especificidade de infecção visada infecta mais eficientemente ou mais rapidamente suas células alvo (exibindo em sua superfície o anti-ligante reconhecido pelo grupo ligante exibido na superfície da partícula de vírus da varíola da invenção) do que células não-alvo (que não exibem em sua superfície um tal anti-ligante, enquanto que uma partícula de

vírus da varíola relacionada sem especificidade de infecção visada infectará citadas células alvo com uma eficiência similar ou menor comparadas com as células não-alvo.

5 O termo "vírus recombinante" refere-se a um vírus compreendendo uma seqüência exógena inserida em seu genoma. Como aqui usado, uma seqüência exógena refere-se a um ácido nucleico que não está naturalmente presente no vírus parental.

10 Em uma modalidade, a seqüência exógena codifica uma molécula possuindo uma função direta ou indiretamente citotóxica. Por "direta ou indiretamente citotóxica", damos o significado de que a molécula codificada pela seqüência exógena pode ser ela mesma tóxica (por exemplo, ricina, fator de necrose tumoral, interleucina-2, interferon-gama, ribonuclease, desoxirribonuclease, exotoxina A de *Pseudomonas*) ou pode ser metabolizada para formar um produto tóxico, ou pode atuar sobre outra coisa para formar
15 um produto tóxico. A seqüência de cDNA de ricina é descrita em Lamb et al. (Eur. J. Biochem., 1985, 148, 265-270) aqui incorporada como referência.

Em uma modalidade preferida da invenção, a seqüência exógena é um gene suicida. Um gene suicida codifica uma proteína capaz de converter uma pró-droga relativamente não-tóxica em uma droga tóxica. Por
20 exemplo, a enzima citosina deaminase converte 5-fluorocitosina (5FC) em 5-fluorouracila (5FU) (Mullen et al. (1922) PNAS 89, 33); a enzima do herpes simples timidina quinase sensibiliza células para o tratamento com o agente antiviral ganciclovir (GCV) ou aciclovir (Moolten (1986) Cancer Res. 46, 5276; Ezzedine et al. (1991) New Biol 3, 608). A citosina deaminase de
25 qualquer organismo, por exemplo *E. coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*, pode ser usada.

Assim, em uma modalidade mais preferida da invenção, o gene codifica uma proteína possuindo uma atividade de citosina deaminase e ainda mais preferivelmente uma proteína como descrita em pedidos de patente

W02005007857 e W09954481.

Outros exemplos de combinações de pró-droga / enzima incluem aquelas descritas por Bagshawe et al. (W088/07378), a saber vários agentes de alquilação e a enzima CPG2 de *Pseudomonas spp.*, e aquelas descritas por Epenetos & Rowlinson-Busza (WO 91/11201), a saber pró-drogas cianogênicas (por exemplo amigdalina) e beta-glicosidases derivadas de planta.

Enzimas que são úteis nesta modalidade da invenção incluem, mas não são limitadas a, fosfatase alcalina útil para converter pró-drogas contendo fosfato em drogas livres; aril sulfatase útil para converter pró-drogas contendo sulfato em drogas livres; proteases, tais como serratia protease, termolisina, subtilisina, carbóxi-peptidases e catepsinas (tais como catepsinas B e L), que são úteis para converter pró-drogas contendo peptídeo em drogas livres; D-alanil-carbóxi-peptidases, úteis para converter pró-drogas que contêm substituintes de D-aminoácido; enzimas clivadoras de carboidrato tais como beta-galactosidase e neuraminidase úteis para converter pró-drogas glicosiladas em drogas livres; beta-lactamase úteis para converter drogas derivadas com beta-lactamas em drogas livres e penicilina amidases, tais como penicilina V amidase ou penicilina G amidase, úteis para converter drogas derivadas em seus nitrogênios de amina com grupos fenóxi-acetila ou fenil-acetila, respectivamente, em drogas livres. Alternativamente, anticorpos com atividade enzimática, também conhecidos na técnica como abzymas, podem ser usados para converter pró-drogas da invenção em drogas ativas livres (Massey R. et al., Nature, 1987, 328, 457-458).

Similarmente, pró-drogas incluem, mas não são limitadas a, pró-drogas listadas acima, e.g., pró-drogas contendo fosfato, pró-drogas contendo tiofosfato, pró-drogas contendo sulfato, pró-drogas contendo peptídeo, pró-drogas modificadas com D-aminoácido, pró-drogas glicosiladas, pró-drogas contendo beta-lactama, pró-drogas contendo fenóxi-

acetamida opcionalmente substituídas ou pró-drogas contendo fenil-acetamida opcionalmente substituídas, pró-drogas de 5-fluorocitosina e outras pró-drogas de 5-fluorouridina que podem ser convertidas. Exemplos de drogas citotóxicas que podem ser derivadas em uma forma de pró-droga para uso
5 nesta invenção incluem, mas não são limitados a, etoposida, teniposida, adriamicina, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, cis-platina e análogos de cis-platina, bleomicinas, esperamicina (veja por exemplo US4.675.187), 5-fluorouracila, melfalan e outras mostardas de nitrogênio relacionadas.

10 Em uma outra modalidade o gene exógeno codifica uma ribozima capaz de clivar RNA ou DNA selecionado. O RNA ou DNA selecionado para ser clivado pode ser RNA ou DNA que é essencial para a função da célula e sua clivagem resulta em morte da célula ou o RNA ou DNA a ser clivado pode ser RNA ou DNA que codifica uma proteína
15 indesejável, por exemplo um produto de oncogene, e clivagem deste RNA ou DNA pode prevenir que a célula se torne cancerosa.

Em ainda outra modalidade o gene exógeno codifica um RNA de anti-senso.

Por "RNA de anti-senso" damos o significado de que é uma
20 molécula de RNA que hibridiza em, e interfere com a expressão de uma molécula de mRNA codificadora de uma proteína ou em outra molécula de RNA dentro da célula tal como pre-mRNA ou tRNA ou rRNA, ou hibridiza em, e interfere com a expressão de um gene.

Em outra modalidade da invenção, a seqüência exógena
25 substitui a função de um gene defeituoso na célula alvo. Há vários milhares de doenças genéticas herdadas de mamíferos, incluindo humanos, que são causadas por genes defeituosos. Exemplos de tais doenças genéticas incluem fibrose cística, onde é sabido que há uma mutação no gene CFTR; distrofia muscular de Duchenne, onde é sabido que há uma mutação no gene de

distrofina; doença de célula falciforme, onde é sabido que há uma mutação no gene HbA. Muitos tipos de câncer são causados por genes defeituosos, especialmente proto-oncogenes, e genes supressores de tumor que têm sofrido mutação.

5 Exemplos de proto-oncogenes são ras, src, bcl e assim por diante; exemplos de genes supressores de tumor são p53 e Rb.

Em uma outra modalidade da invenção, a sequência exógena codifica um Antígeno Associado a Tumor (TAA). TAA refere-se a uma molécula que é detectada em uma densidade ou frequência mais alta em
10 células de tumor do que em células de não-tumor do mesmo tipo de tecido. Exemplos de TAA incluem mas não são limitados a CEA, MART-1, MAGE-1, MAGE-3, GP-100, Muc1, MUC-2, oncogene ras pontualmente mutado, p53 normal ou pontualmente mutado p53, p53 sobre-expressado, CA-125, PSA, C-erb/B2, BRCA I, BRCA II, PSMA, tirosinase, TRP-1, TRP-2, NY-
15 ESO-1, TAG72, KSA, HER-2/neu, bcr-abl, pax3-fkhr, ews-fli-1, sobrevivente e LRP. De acordo com uma modalidade mais preferida o TAA é Muc1.

O vírus da varíola recombinante pode compreender mais do que uma sequência exógena e cada sequência exógena pode codificar mais do que uma molécula. Por exemplo, pode ser útil para associar em um mesmo
20 vírus da varíola recombinante, uma sequência exógena codificadora de um TAA com uma sequência exógena codificadora de uma citocina.

Em outra modalidade da invenção, o gene exógeno codifica um antígeno. Como aqui usado, "antígeno" refere-se a um ligante que pode ser ligado por um anticorpo; um antígeno não necessita ser propriamente
25 imunogênico.

Preferivelmente o antígeno é derivado de um vírus tal como por exemplo HIV-1, (tal como gp 120 ou gp 160), qualquer um de vírus da Imunodeficiência de Felino, vírus do herpes de animal ou de humano, tal como gD ou seus derivados ou proteína Precoce Imediata tal como ICP27 de

HSV1 ou HSV2, citomegalovírus (tal como gB ou seus derivados), Vírus de Varicela Zoster (tal como gpl, II ou III), ou de um vírus de hepatite tal como vírus de hepatite B por exemplo antígeno de Superfície de Hepatite B ou um seu derivado, vírus de hepatite A, vírus de hepatite C (preferivelmente
5 proteína não-estrutural de cepa já de genótipo 1b) e vírus de hepatite E, ou de outros patógenos virais, tais como Vírus Sincicial Respiratório, Vírus de Papiloma de Humano (preferivelmente as proteínas E6 e E7 de cepa HPV16) ou vírus da Influenza, ou derivado de patógenos bacterianos tais como *Salmonella*, *Neisseria*, *Borrelia* (por exemplo OspA ou OspB ou seus
10 derivados), ou *Chlamydia*, ou *Bordetella* por exemplo P.69, PT e FHA, ou derivado de parasitas tais como plasmídeo ou Toxoplasma.

Em uma modalidade particularmente preferida da invenção, o vírus da varíola recombinante codifica as mesmas proteínas que TG4010 (Rochlitz et al. J Gene Med. 2003 Aug;5(8):690-9) e TG4001 (Liu et al. Proc
15 Natl Acad Sci U S A. 2004 Oct 5;101 Suppl 2:14567-71). Em outra modalidade particularmente preferida da invenção, o vírus da varíola da invenção possui uma seqüência que é mais do que 90% homóloga à seqüência de TG4010 ou de TG4001.

Vantajosamente, o vírus da varíola recombinante
20 adicionalmente compreende os elementos necessários para a expressão da seqüência exógena. Os elementos necessários para a expressão compreendem o conjunto de elementos permitindo a transcrição de uma seqüência de nucleotídeos em RNA e a tradução de um mRNA em um polipeptídeo, em particular as seqüências de promotor e/ou as seqüências regulatórias que são
25 efetivas na célula a ser infectada pelo vírus da varíola recombinante da invenção, e opcionalmente as seqüências requeridas para permitir a excreção ou a expressão na superfície das células de citado polipeptídeo. Estes elementos podem ser induzíveis ou constitutivos. Claro que o promotor está adaptado para o vírus da varíola recombinante selecionado e para a célula

hospedeira. Podem ser mencionados, por meio de exemplo, os promotores do vírus de vacínia p7.5K pH5R, pK1L, p28, p11 ou uma combinação de citados promotores. A literatura proporciona uma grande quantidade de informação relacionada com tais seqüências de promotor.

5 Os elementos necessários podem, em adição, incluir elementos que melhoram a expressão da seqüência exógena ou sua manutenção na célula hospedeira. Podem ser mencionadas em particular as seqüências de íntron (WO 94/29471), seqüências de sinal de secreção, seqüências de localização nuclear, sítios internos para reiniciação de tradução de seqüências poli A, do
10 tipo IRES, para terminação de transcrição.

Processos de produção de vírus da varíola disponíveis compreenderam a replicação do vírus em uma linhagem celular (e.g. HelaS3), em ovos embrionados ou em Fibroblastos de Embrião de Pinto. Após a replicação do vírus, o meio de cultura é descartado, as células são lisadas e o
15 vírus da varíola liberado das células é purificado por centrifugação em almofada de sacarose (Kotwal e Abraham; "Poxvirus growth, Purification and titting in Vaccinia Virus and Poxvirology", 2004, 101-108, Humana Press Inc., Totowa; NJ; USA). Com estes processos, EEVs não estão presentes na composição purificada.

20 Contudo, os processos de produção de vírus disponíveis não são satisfatórios. Primeiro, compreendem o uso de compostos derivados de animais tais como soro e enzimas. O uso de compostos derivados de animais em processos de produção tem várias desvantagens. Por exemplo, a composição química destes compostos pode variar entre lotes, até mesmo de
25 uma única manufatura. Os compostos também podem estar contaminados com agentes infecciosos (e.g., micoplasma e vírus) que podem ser seriamente solapadores da saúde das células cultivadas quando estes suplementos contaminados são usados em formulações de meio de cultura celular. Além disso, o uso de suplementação de soro de meio de cultura pode complicar e

aumentar os custos da purificação das substâncias desejadas do meio de cultura devido à co-purificação não específica de proteínas de extrato ou soro. O mais importante, o uso de compostos indefinidos pode impedir a aprovação de agências médicas da composição farmacêutica obtida pelo processo.

5 A presente invenção adicionalmente proporciona um processo para produção de uma partícula de vírus da varíola de acordo com a invenção, compreendendo as etapas de:

- a) preparar uma cultura de células acondicionadoras,
- b) infectar a citada cultura de células,
- 10 c) cultivar as citadas células infectadas por um período de tempo apropriado,
- d) recuperar as partículas de vírus da varíola produzidas do sobrenadante de cultura e/ou as células acondicionadoras, e
- e) opcionalmente, purificar as partículas de vírus da varíola
- 15 recuperadas.

O processo de acordo com a invenção está preferivelmente livre de produtos animais.

O processo de acordo com a invenção também pode ser usado para a produção de um vírus da varíola de tipo selvagem e/ou atenuado.

20 Como aqui usado, o termo "vírus da varíola da atenuado" refere-se a qualquer vírus da varíola que tem sido modificado de modo que sua patogenicidade no indivíduo intencionado seja substancialmente reduzida. Preferivelmente, o vírus da varíola é atenuado até o ponto no qual ele é não patogênico de um ponto de vista clínico, i.e., que indivíduos expostos ao vírus

25 da varíola não exibem um nível aumentado estatisticamente significativamente de patologia em relação aos indivíduos de controle. De acordo com uma modalidade preferida da invenção, o vírus atenuado é um vírus de Vacínia atenuado tal como MVA.

O termo "infecção" refere-se à transferência do ácido nucleico

viral para uma célula, na qual o ácido nucleico viral é replicado, proteínas virais são sintetizadas, ou partículas virais novas são montadas.

Como aqui usado, o termo "célula acondicionadora" refere-se a uma célula que pode ser infectada pelo vírus da varíola a ser produzido. A
5 célula acondicionadora pode ser uma célula primária, uma célula recombinante e/ou uma linhagem celular. Por exemplo, pode ser usada uma célula recombinante que contém os elementos necessários para a produção de um vírus recombinante que estão faltantes em um vetor viral recombinante.

10 Em uma modalidade da invenção, a célula acondicionadora é uma célula aviária imortal.

Em uma modalidade da invenção, a célula acondicionadora é uma célula DF1 (US5.879.924), que é uma linhagem de célula de ponto espontaneamente imortalizada derivada de ovos de Linhagem East Lansing (ELL-0) de 10 dias de idade.

15 Célula aviária imortal pode ser derivada de células-tronco embrionárias por separação progressiva de fatores de crescimento e de camada alimentadora, mantendo assim as características de crescimento e de tempo de vida infinito de tronco indiferenciado). Por exemplo, a linhagem de pinto Ebx (W02005007840) tem sido obtida por este processo.

20 De acordo com uma modalidade preferida, uma linhagem de célula de embrião de pato também pode ser usada. Por exemplo, a linhagem de célula, designada como DEC 99 (Ivanov et al. Experimental Pathology And Parasitology, 4/2000 Bulgarian Academy of Sciences) tem sido cultivada durante 140 passagens consecutivas e não é tumorigênica para aves. A
25 linhagem de célula DEC 99 é um sistema de cultura de célula padrão que tem sido usado para pesquisa e pode ser aplicado para as necessidades de biotecnologia . De acordo com uma modalidade mais preferida, a célula acondicionadora é uma linhagem de célula obtida pelo processo descrito em pedido de patente EP06360001.9.

De acordo com outra modalidade preferida, a célula acondicionadora usada no processo de acordo com a invenção é um fibroblasto de embrião de pinto (CEF). A preparação e o uso de CEF para a produção de vírus são bem conhecidos por uma pessoa experiente na técnica.

5 CEF são preferivelmente extraídas de ovos Livres de Patógeno Específico (SPF). Ovos SPF estão comercialmente disponíveis, por exemplo de Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). Citados ovos são preferivelmente de mais de 9 dias de idade, mais preferivelmente entre 10 e 14 dias de idade e ainda mais preferivelmente são de 12 dias de idade.

10 Antes da extração do embrião, o ovo é preferivelmente desinfetado. Muitos métodos e aparelhagens dedicados para a desinfecção de ovos estão disponíveis na técnica anterior. Incubação em uma solução de formol (e.g. formol 2%, 1 min.) seguida por uma lavagem em etanol 70% é particularmente preferida.

15 As células dos embriões são então dissociadas e purificadas. De acordo com a modalidade preferida da invenção, as células são submetidas a uma etapa de digestão enzimática que permite a destruição da matriz intercelular. Para este propósito, o uso de enzima capaz de digerir a matriz intercelular é particularmente útil. Tal enzima pode ser selecionada do grupo
20 compreendendo mas não limitado a Tripsina, Colagenase, Pronase, Dispase, Hialuronidase e Neuraminidase. Esta enzima pode ser usada sozinha ou em combinação. Em uma modalidade particularmente preferida da invenção dispase e Tripsina (e.g. TrypLE selecionada de GibcoTM) são usadas em combinação. Uma pessoa experiente na técnica é capaz de determinar a
25 concentração de enzima, a temperatura e o tempo de incubação permitindo uma separação eficiente das células.

De acordo com uma modalidade preferida, o processo de acordo com a invenção está livre de produtos animais (exceto a célula acondicionadora). Com respeito a isto, a(s) enzima(s) usada(s) para a

preparação de CEF é (são) preferivelmente de origem recombinante. Como aqui usado, «produtos animais» significam qualquer composto ou coleção de compostos que foi produzido em ou por uma célula de animal em um organismo vivo.

5 A preparação de CEF pode adicionalmente incluir uma etapa de filtração (e/ou uma etapa de centrifugação) com o objetivo de remover contaminantes.

Esta célula CEF primária pode ser usada quer diretamente quer após uma outra passagem de célula como célula CEF secundária.

10 A uma pessoa experiente na técnica é capaz de selecionar a célula mais apropriada para a produção de um vírus específico. De acordo com uma modalidade preferida, o processo de acordo com a invenção compreende o uso de CEF ou de uma célula de acordo com EP06360001.9 para a produção de um MVA.

15 A célula acondicionadora usada no processo de acordo com a invenção é cultivada em um meio de cultura de célula apropriado. É possível usar mais do que um meio de cultura no processo de acordo com a invenção. Por exemplo, um primeiro meio de cultura pode ser utilizado durante a preparação da célula acondicionadora (i.e. durante etapa a) e um segundo
20 meio de cultura para a infecção (i.e. durante etapa c e/ou etapa b).

De acordo com uma modalidade preferida, o meio de cultura de acordo com a invenção está livre de produto animal.

Muitos meios livres de produto animal já têm sido descritos e alguns deles estão comercialmente disponíveis. Por exemplo 293 SFM II; 25 293-F Cells, SFM Adapted; 293-H Cells, SFM Adapted; 293fectin™ Transfection Reagent ;CD 293 AGTTM; 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 AGTTM; CD 293 Medium ; COS-7L Cells, SFM

Adapted; EPISERF® Medium; OptiPro™ SFM; VP-SFM; VP-SFM AGT™. (todos disponíveis da Invitrogen) podem ser usados como meios de cultura de célula no processo de acordo com a invenção.

Quando a célula condicionadora é uma CEF, VP-SFM (Invitrogen) para etapa a e Meio Basal de Eagle (Invitrogen) para etapas b e c são particularmente preferidos.

Na modalidade específica onde as células condicionadoras são CEF, o meio de cultura de célula é semeado entre 0,5 e 1,5 e preferivelmente entre 1,1 e 1,3 e mais preferivelmente cerca de 1,2 embriões/l de meios de cultura de célula. Nesta modalidade, as CEF são preferivelmente cultivadas por entre 1 e 5 dias, mais preferivelmente entre 1 e 2 dias e ainda mais preferivelmente 2 dias antes da infecção.

Na modalidade específica onde o vírus da varíola para produzir é MVA, o vírus é introduzido no vaso de cultura de célula em um MOI que está preferivelmente compreendido entre 0,001 e 0.1, mais preferivelmente entre 0,03 e 0,07 e ainda mais preferivelmente cerca de 0,05.

De acordo com uma modalidade preferida da invenção, durante etapa c, as células condicionadoras são cultivadas em uma temperatura que é menor do que 37°C., preferivelmente está entre 30°C e 36.5°C ou entre cerca de 32°C e cerca de 36°C, mais preferivelmente entre 33°C e 35°C, muito mais preferivelmente a 34°C.

De acordo com a modalidade preferida da invenção, a etapa c demora entre um e seis dias, mais preferivelmente entre dois e quatro dias e muito mais preferivelmente cerca de 72 horas.

Após a etapa de infecção, o meio de cultura de célula usado para cultivar a célula condicionadora é colhido. O citado meio de cultura de célula compreendeu partículas de EEV disseminadas pela célula condicionadora infectada. De acordo com uma modalidade preferida, após a etapa de infecção, o meio de cultura de célula e a célula condicionadora são

colhidos. O meio de cultura de célula e as células acondicionadoras podem ser reunidos ou colhidos separadamente.

Com o propósito de recuperar o vírus da varíola presente nas células acondicionadoras, o processo de acordo com a invenção pode
5 compreende uma etapa de permitir o rompimento da membrana da célula acondicionadora. Esta etapa acarreta a liberação do vírus da varíola da célula acondicionadora. O rompimento da membrana da célula acondicionadora pode ser induzida por várias técnicas bem conhecidos por uma pessoa experiente na técnica. Estas técnicas compreenderam mas não são limitadas a
10 sonicação, congelamento / descongelamento, lise hipotônica e microfluidização.

De acordo com uma modalidade preferida da invenção, a membrana da célula acondicionadora é rompida pelo uso de um homogeneizador de velocidade alta. Homogeneizadores de velocidade alta
15 estão comercialmente disponíveis da Silverson Machines Inc (East Longmeadow, USA) ou Ika-Labortechnik (Staufen, Alemanha). De acordo com uma modalidade particularmente preferida, o citado homogeneizador de Velocidade Alta é um SILVERSON L4R.

Quando a célula acondicionadora e o meio de cultura de célula
20 são reunidos, o rompimento da membrana da célula acondicionadora não é induzido por congelamento / descongelamento porque esta técnica acarreta a destruição das partículas de EEV (Ichihashi y. et al., 1996, Virology, 217(2), 478-85).

De acordo com uma modalidade preferida, etapa d)
25 adicionalmente compreende uma etapa de clarificação permitindo a remoção dos fragmentos celulares. De acordo com uma modalidade mais preferida da invenção, a citada etapa de clarificação é uma etapa de filtração em profundidade.

A filtração em profundidade inclui mas não é limitada ao uso

de um ou mais produtos comercialmente disponíveis: filtros profundos da série CUNO Incorporated AP (Exemplos incluem AP01), filtros profundos da série CUNO Incorporated CP (Exemplo incluem CP10, CP30, CP50, CP60, CP70, CP90), filtros profundos da série CUNO Incorporated HP Exemplos
5 incluem HP10, HP30, HP50, HP60, HP70, HP90), filtros profundos da série CUNO Incorporated Calif. (Exemplos incluem CA10, CA30, CA50, CA60, CA70, CA90), filtros profundos da série CUNO Incorporated SP (Exemplos incluem SP10, SP30, SP50, SP60, SP70, SP90), filtros CUNO Delipid e Delipid Plus, filtros profundos da série Millipore Corporation CE (Exemplos
10 incluem CE15, CE20, CE25, CE30, CE35, CE40, CE45, CE50, CE70, CE75), filtros profundos da série Millipore Corporation DE (Exemplos incluem DE25, DE30, DE35, DE40, DE45, DE50, DE55, DE560, DE65, DE70, DE75), filtros Millipore Corporation HC (Exemplos incluem A1 HC, B1HC, COHC), Filtros CUNO Polynet (um exemplo inclui Polynet-PB), filtros
15 Millipore Clarigard e Polygard, filtros CUNO Life Assure, filtros profundos ManCel Associates (Exemplos incluem mas não são limitados a PR 12 UP, PR12, PR 5 UP), e filtros PALL ou SeitzSchenk Incorporated. Com o propósito de melhorar a capacidade de clarificação das unidades de filtração em profundidade disponíveis, pode ser útil acoplar duas ou mais unidades
20 com tamanhos de poros decrescentes. Nesta modalidade, a mistura a ser clarificada passa através de primeira unidade de filtração em profundidade onde contaminantes maiores são retidos e subsequenteiramente passa através da segunda unidade de filtração em profundidade. De acordo com uma modalidade ainda mais preferida da invenção, um sartopure© (sartorius) com
25 um tamanho de poro de 8 µm acoplado em um sartopure© com um tamanho de poro de 5µm é usado para a etapa de filtração em profundidade.

De acordo com uma modalidade preferida, o processo de acordo com a invenção adicionalmente compreende uma etapa de concentração. Mais preferivelmente, a citada etapa de concentração

adicionalmente permite a eliminação das proteínas presentes na mistura obtida das etapas previamente descritas.

De acordo com uma modalidade mais preferida da invenção, a citada etapa de concentração é uma etapa de microfiltração. Microfiltração é um processo de membrana acionado por pressão que concentra e purifica moléculas grandes. Mais especificamente, uma solução é passada através de uma membrana semi-permeável cujos tamanhos de poros têm sido escolhidos para rejeitarem as partículas (vírus) maiores no retido, e permitirem que moléculas pequenas (e.g. proteínas) passem através da membrana para dentro do permeato. Microfiltração reduz o volume da solução de extração.

De acordo com uma modalidade preferida da invenção, a etapa de microfiltração é seguida por uma etapa de diafiltração. Estas duas etapas pode ser vantajosamente realizadas com as mesmas membranas de filtração. Diafiltração é uma melhoria da microfiltração e envolve diluição do retido com uma solução para efetuar uma redução na concentração das impurezas no retido. A diluição do retido permite a remoção das impurezas do retido por lavagem. É entendido que a diafiltração pode ser realizada em um modo em batelada, modo semi-contínuo, ou um modo contínuo. A etapa de diafiltração pode ser vantajosamente usada para mudar o tampão no qual o vírus é empregado. Por exemplo, pode ser útil trocar o tampão usado no processo de purificação contra um tampão farmacêuticamente aceitável.

Preferivelmente, as membranas de filtração usadas na etapa de microfiltração e/ou na etapa de diafiltração possuem um tamanho de poro compreendido entre 0,01 e 0,15 μm , e mais preferivelmente é de cerca de 0,1 μm .

Ácidos nucleicos podem aderir nas partículas derivadas de célula tais como vírus. A respeito disto, o processo de acordo com a invenção pode opcionalmente adicionalmente compreender uma etapa consistindo na remoção de ácidos nucleicos contaminantes presentes na solução. Para este

propósito, nucleases podem ser utilizadas. Nucleases exemplares incluem Benzonase ou qualquer outra DNase ou RNase comumente usada na técnica, dentre elas, Benzonase é particularmente preferida.

5 Benzonase degrada ácido nucleico a e não possui atividade proteolítica. Benzonase rapidamente desintegra anc por hidrólise de ligações fosfodiéster internas entre nucleotídeos específicos. Sob digestão completa, todos os ácidos nucleicos livres presentes em solução são reduzidos a oligonucleotídeos de 2 a 4 bases em comprimento.

10 Benzonase pode ser usada em uma concentração final compreendida entre 50 e 400 U/ml, preferivelmente entre 100 e 300 U/ml e mais preferivelmente entre 150 e 250 U/ml. O tratamento com Benzonase pode demorar entre 1 e 4 horas e ainda mais preferivelmente entre 1,5 e 2,5 horas.

15 Contudo, quando as filtração em profundidade, microfiltração e diafiltração previamente descritas são usadas, o emprego de nucleases e mais particularmente, a utilização de benzonase não é necessária. Com respeito a isto, a presente invenção também se refere a um processo para a produção de vírus da varíola no qual nuclease e mais particularmente benzonase não são usadas.

20 Neste estágio, o vírus da varíola obtido pelo processo previamente descrito está suficientemente purificado. Pode ser desejável mudar o tampão no qual o vírus está compreendido. Por exemplo, pode ser útil trocar o tampão usado no processo de purificação contra um tampão farmacêuticamente aceitável. Muitos métodos utilizáveis para trocar o tampão
25 são conhecidos por uma pessoa experiente na técnica. Dentre eles, filtração tangencial é particularmente preferida.

Filtração tangencial é uma técnica de filtração na qual a suspensão a ser filtrada move-se em uma velocidade alta ao longo de uma direção que é paralela à superfície de filtração com o propósito de criar uma

turbulência na suspensão que previne a formação de bolo de filtração bem como o freqüente bloqueio do filtro.

Enquanto a suspensão flui em velocidade alta em paralelo à superfície de filtração, o soluto passa através dos orifícios da superfície de filtração por causa da diferença de pressão e é continuamente removido. A superfície de filtração deve ser tal que resista mecanicamente à diferença de pressão entre o compartimento de retido (i.e. o compartimento de concentração de suspensão) e o compartimento de permeato (solução filtrada límpida livre de partículas suspensas).

As várias etapas compreendidas no processo de acordo com a invenção podem ser implementadas em lugares de trabalho separados e/ou em períodos de tempo diferentes. Por exemplo, a infecção da célula acondicionadora e a purificação do vírus da varíola podem ser feitas em lugares de trabalho diferentes. Também, a célula acondicionadora e/ou o meio de cultura de célula podem ser armazenados (e.g a -80°C) desde que necessário, antes de serem purificados.

A presente invenção também se refere às composições obtidas pelo processo previamente descrito e à composição compreendendo o vírus da varíola da invenção.

Preferivelmente, a composição da invenção compreende mais do que 1%, preferivelmente mais do que 5%, ainda mais preferivelmente mais do que 10% e muito mais preferivelmente pelo menos 20% dos vírus da varíola compreendidos em citada composição são EEV.

De acordo com uma modalidade preferida, a composição de acordo com a invenção possui um título de pelo menos 10^5 , preferivelmente de pelo menos 10^6 , mais preferivelmente de pelo menos 10^7 , ainda mais preferivelmente de pelo menos 10^8 pfu por ml.

De acordo com outra modalidade preferida, a composição de acordo com a invenção possui um título de pelo menos 10^3 , preferivelmente

10⁴ e muito mais preferivelmente de pelo menos 3x10⁵ pfu por pg de proteína.

A presente invenção também se refere à composição farmacêutica compreendendo o vírus da varíola obtido pelo processo da invenção, e/ou composição de acordo com a invenção. Como aqui usado,
5 "composição farmacêutica" refere-se a uma composição compreendendo um veículo farmaceuticamente aceitável.

Um tal veículo é preferivelmente isotônico, hipotônico ou fracamente hipertônico e possui uma força iônica relativamente baixa, tal como por exemplo uma solução de sacarose. Além disso, um tal veículo pode
10 conter qualquer solvente, ou líquido aquoso ou parcialmente aquoso tal como água estéril não pirogênica. O pH da composição farmacêutica é, em adição, ajustado e tamponado de modo a atender aos requerimentos de uso in vivo. A composição farmacêutica também pode incluir um diluente, adjuvante ou excipiente farmaceuticamente aceitável, bem como agentes de solubilização,
15 estabilizante e conservante. Para administração injetável, uma formulação em solução aquosa, não-aquosa ou isotônica é preferida. Pode ser proporcionada em uma dose única ou em uma multidoses em forma líquida ou seca (pó, liofilizada e semelhante) que pode ser reconstituída no momento de uso com um diluente apropriado.

20 A presente invenção também se refere ao vírus da varíola e à composição obtida pelo processo de acordo com a invenção.

A presente invenção também se refere ao uso de um processo de acordo com a invenção para a produção de um vírus, uma composição e/ou uma composição farmacêutica.

25 A presente invenção também se refere ao uso de um vírus da varíola, uma composição e/ou uma composição farmacêutica de acordo com a invenção para a preparação de um medicamento.

De acordo com uma modalidade preferida o medicamento de acordo com a invenção é para o tratamento terapêutico ou profilático de

câncer.

Dentre as aplicações que podem ser consideradas, podem ser mencionados cânceres de mama, de útero (em particular aqueles induzidos por vírus do papiloma), de próstata, dos pulmões, da bexiga, do fígado, do cólon, do pâncreas, do estômago, do esôfago, do laringe, do sistema nervoso central (em particular glioma) e do sangue (linfomas, leucemia e semelhante).

A composição de acordo com a invenção pode ser manufaturada convencionalmente para administração pela rota local, parenteral ou digestiva. Podem ser mencionada as rotas intragástrica, subcutânea, intracardíaca, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, intranasal, intrapulmonar ou intratraqueal. Para as três últimas modalidades, administração por aerossol ou instilação é vantajosa. A administração pode ser feita como uma dose única ou repetida uma vez ou várias vezes após um certo intervalo de tempo. A rota de administração apropriada e a dosagem variam como uma função de vários parâmetros, por exemplo, do indivíduo, da doença a ser tratada ou do(s) gene(s) de interesse a ser transferido.

De acordo com uma primeira possibilidade, o medicamento pode ser administrado diretamente in vivo (por exemplo por injeção intravenosa, para dentro de um tumor acessível ou em sua periferia, subcutaneamente para uma vacinação terapêutica ou profilática). Também é possível adotar a abordagem ex vivo que consiste na colheita de células do paciente (células-tronco de medula óssea, linfócitos de sangue periférico, células musculares e semelhante), transfecção ou infecção delas in vitro de acordo com as técnicas da técnica anterior readministrando-as ao paciente.

Além disso é possível considerar, onde apropriado e sem se desviar do escopo da presente invenção, a realização de administrações simultâneas ou sucessivas, por rotas diferentes, dos vários componentes contidos na composição farmacêutica ou na composição de acordo com a

invenção.

De acordo com uma modalidade vantajosa da invenção, o uso terapêutico ou o método de tratamento é combinado com um segundo tratamento do paciente por cirurgia (remoção parcial ou completa do tumor), por radioterapia ou quimioterapia. Neste caso particular, o tratamento de acordo com a invenção é aplicado antes do, concomitante com o ou subsequente ao citado segundo tratamento. Preferivelmente, este tratamento será aplicado subsequente ao citado segundo tratamento.

De acordo com outra modalidade preferida o medicamento de acordo com a invenção é para o tratamento terapêutico ou profilático de doenças infecciosas, em particular de origem viral, induzidas por vírus de hepatite B ou C, HIV, herpes, retrovírus e semelhante. Os exemplos que seguem são intencionados para ilustrarem os vários temas da presente invenção e são conseqüentemente não limitantes em caráter.

Tabela 1: mostra a taxa de sobrevivência de camundongos C57BL/6 que têm sido implantados com células TC1 expressando oncogene C-Ha-ras, E6 e E7 de HPV 16. Os grupos diferentes de camundongos são tratados com composições compreendendo IMV e EEV codificadores de antígenos de HPV, IMV codificador de antígenos de HPV ou IMV não codificador de antígeno.

Tabela 2: mostra a percentagem de camundongos C57BL/6 livres de tumor após implantação com células TC1 expressando oncogene C-Ha-ras, E6 e E7 de HPV 16. os grupos diferentes de camundongos são tratados com composições compreendendo IMV e EEV codificadores de antígenos de HPV, IMV codificador de antígenos de HPV ou IMV não expressando antígenos.

Tabela 3: mostra a taxa de sobrevivência de camundongos C57BL/6 que têm sido implantados com células TC1 expressando Muc1. Os grupos diferentes de camundongos são tratados com composições

compreendendo IMV e EEV codificadores de Muc1 e IL2, IMV codificador de Muc1 e IL2 ou IMV não expressando antígenos.

Exemplos

1.Preparação de composições compreendendo IMV e EEV.

5 A. Preparação de CEF.

Sessenta e seis ovos SPF são incubados por 60 s em uma solução de formol a 2%. Após serem lavados com etanol 70%, os ovos são abertos, os embriões são extraídos e dissecados. Os tecidos obtidos são então digeridos a 36,5°C por 120 min por dispase (UI/ml) e *triple select* (UI/ml).

10 A mistura é filtrada para remover tecidos não digeridos e as CEF são colhidas por centrifugação (2300 rpm, 15 min.)

B. Cultivo e infecção de CEF.

15 As CEF são incubadas em 55 L de VP-SFM (Invitrogen) por 2 dias a 36,5°C. O meio de cultura de células é então descartado e o vírus da varíola (0,05 MOI) é adicionado em 55 L de Meio Basal de Eagle (Invitrogen). As células acondicionadoras infectadas são então incubadas por três dias.

C. Purificação de vírus da varíola.

20 A célula acondicionadora e o meio de cultura de células são colhidos. A mistura é então homogeneizada por 15 min. com um homogeneizador de velocidade alta Silverson© L4R. A mistura obtida é então clarificada por filtração em profundidade em um sartopure 8µm (sartorius) acoplado em um sartopure 5µm em uma vazão de fluxo de 1 L/min.

25 A mistura é depois concentrada 18 vezes através de um Módulo de Microfiltração Prostack de 0,1 µm (ref: PSVVAG021, Millipore).

A composição poxviral é depois diafiltrada no mesmo módulo contra o veículo farmacêuticamente aceitável desejado.

2. Comparação de eficácia terapêutica entre uma composição compreendendo EEV e IMV e uma composição compreendendo apenas IMV.

A. Tratamento terapêutico de camundongos possuindo tumor expressando antígenos de HPV.

Denominação e descrição breve de cada construção de vetor

5 Vetor TG4001: MVA transportando as seqüências codificadoras para as proteínas de HPV, E6 e E7, (sob o controle do promotor p7.5) e IL2 (sob o controle do promotor pH5R). Foram testados dois lotes, um compreendendo IMV e EEV (preparado como previamente descrito) e compreendendo apenas IMV.

10 Vetor N33: vazio MVA que não expressa as proteínas E6 e E7 de HPV nem IL2 foi usado como controle negativo.

Modelo animal

Camundongos fêmeas C5761/6 de idade de 6 a 8 semanas foram usados em todo este estudo. Estes camundongos foram obtidos de Charles River (Rouen, França).

15 *Especificação:* os animais eram de 6 semanas de idade no dia de chegada. No início da experimentação, eram de menos de 8 semanas de idade.

20 *Ambiente:* os animais foram alojados em uma sala única, exclusiva com ar condicionado para proporcionar um mínimo de 11 trocas de ar por hora. As faixas de temperatura e de umidade relativa estavam dentro de 18°C e 22°C e 40 a 70% respectivamente. Iluminação foi controlada automaticamente para dar um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Estado livre de patógeno específico é checado por controle regular do ambiente.

25 *Dieta:* em todo o estudo os animais tiveram acesso *ad libitum* à dieta esterilizada de tipo D04 (UAR, Epinay sur Orge, França).

Água foi proporcionada *ad libitum* via garrafas.

Procedimentos de aclimatização e saúde: todos os animais receberam inspeção clínica para saúde na chegada. Foram aclimatizados em

uma instalação de animal Livre de Patógeno Específico (SPF) entre uma e duas semanas antes do início do experimento com o propósito de garantir sua adequabilidade para o estudo.

Características de células de tumor e condições de uso:

5 Linhagem de TC1 tem sido derivada de células epiteliais pulmonares primárias de camundongos C5761/6 co-transformados com oncogenes c-Ha-ras, E6 e E7 de HPV-16. Estas células crescem em DMEM com Glutamina (2mM), soro fetal bovino (10%), aminoácidos não-essenciais (0,1mM), Piruvato de Na (1mM), 1-mercapto-etanol (36μM), Higromicina
10 (0,2mg/ml) e G418 (0,5mg/ml). Após descongelamento, as células foram amplificadas duas vezes, a última passagem foi realizada dois dias antes da injeção de células.

Injeção de células

15 No primeiro dia do experimento, as células TC1 foram injetadas subcutaneamente em camundongos em uma dose de 2,0 E+05 células/camundongo no flanco.

Injeções virais

20 7 dias após a injeção de células, 5,0 E+05 pfu/50μL/camundongo de lotes testados (TG4001 IMV/EEV ou IMV apenas) MVATGN33 (vetor vazio) foram injetados em camundongos. Vinte camundongos foram usados por lote testado.

Infecções virais foram realizadas subcutaneamente no mesmo flanco mas em um sítio distante do ponto de injeção de célula e realizadas 3 vezes em intervalos de 7 dias.

25 *Parâmetros de monitoração:*

Crescimento de tumor foi monitorado por 90 dias após a injeção de células, com um compasso de calibre. Os camundongos foram mortos por razões éticas quando o tamanho do tumor foi superior a 25 mm em diâmetro ou quando mostraram dor até mesmo se o tumor era menor.

Camundongos sobreviventes foram registrados.

Resultados

Todos os grupos tratados com o vetor MVA codificador de antígeno de HPV mostraram uma taxa de sobrevivência mais alta do que a do grupo tratado com um vetor MVA vazio. Os camundongos tratados com a composição compreendendo EEV e IMV mostraram uma taxa de sobrevivência mais alta do que a dos camundongos tratados pela composição compreendendo apenas IMV. Além disso, 35 % dos camundongos tratados pela composição compreendendo EEV e IMV ficaram livres de tumor 77 dias após serem injetados comparados com apenas 10 % dos camundongos tratados com a composição compreendendo apenas IMV.

B. Tratamento terapêutico de camundongos possuindo tumor expressando Muc1.

Denominação e descrição breve de cada construção de vetor

Vetor TG4010: MVA transportando as seqüências codificadoras de proteínas Muc1 (sob o controle do promotor p7.5) e 1L2 (sob o controle do promotor pH5R). Foram testados dois lotes, um compreendendo IMV e EEV e um compreendendo apenas IMV.

Um vetor vazio MVATGN33 que não expressa Muc1, nem 1L2 foi usado como controle negativo.

Modelo de camundongo e sistemas de experimento em animal

Espécies, cepa e fornecedor: camundongos fêmeas C57B1/6 de 6 a 8 semanas de idade foram usados em todo este estudo. Estes camundongos foram obtidos de Charles River (Rouen, França).

Especificação: os animais eram de 6 semanas de idade no dia de chegada. No início do experimento, eram menos de 8 semanas de idade.

Ambiente: os animais foram alojados em uma sala única, exclusiva com ar condicionado para proporcionar um mínimo de 11 trocas de ar por hora. As faixas de temperatura e de umidade relativa estavam dentro de

18°C e 22°C e 40 a 70% respectivamente. Iluminação foi controlada automaticamente para dar um ciclo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Os animais foram alojados em grupos de 10 por gaiola de 43 cm x 27 cm x 15 cm, área do piso de 1.161 cm².

5 *Dieta:* em todo o estudo os animais tiveram acesso *ad libitum* à dieta esterilizada de tipo RM (SDS, Le Bord'Haut de Vigny, França).

Água foi proporcionada *ad libitum* via garrafas.

Contaminantes não estavam presentes na dieta ou na água em níveis que poderia ter interferido com o alcance dos objetivos do estudo.

10 *Procedimentos de aclimatização e saúde:* todos os animais receberam inspeção clínica para saúde na chegada. Foram aclimatizados em uma instalação de animal Livre de Patógeno Específico (SPF) entre uma e duas semanas antes do início do experimento com o propósito de garantir sua adequabilidade para o estudo.

15 *Características de células de tumor e condições de uso:*

A linhagem de tumor RMA tem sido derivada de um linfoma C57BI/6. Células RMAMuc1 foram obtidas após transfecção com um plasmídeo de expressão contendo o gene Muc1 a. Estas células foram crescidas em DMEM com Glutamina (2mM), soro fetal bovino (10%), aminoácidos não-essenciais (0,1mM), Piruvato de Na (1mM), β-mercapto-etanol (36μM), Higromicina (550 μg/ml). Após descongelamento, as células foram amplificadas duas vezes, a última passagem foi realizada no dia antes do desafio.

Imunização

25 Os camundongos foram imunizados com $1,0 \times 10^4$ ou $3,0 \times 10^4$ pfu/camundongo para vírus TG4010 e com $3,0 \times 10^4$ pfu/camundongo MVATGN33.

20 Camundongos foram usados por lote testado.

Imunizações virais foram realizadas subcutaneamente em um

flanco e conduzidas 3 vezes em intervalos de 14 dias.

Desafio de tumor

5 Duas semanas após a última imunização, os camundongos foram desafiados subcutaneamente no mesmo flanco mas em um sítio distante do ponto de injeção viral, com $1,0 \times 10^6$ células viáveis RMAMuc1/50 μ L/camundongo.

Parâmetros de monitoração:

10 Crescimento de tumor foi monitorado por 6 semanas após o desafio de tumor, com um compasso de calibre. Os camundongos foram mortos por razões éticas quando o tamanho do tumor foi superior a 25 mm em diâmetro ou quando mostraram dor até mesmo se o tumor era menor.

Camundongos sobreviventes foram registrados.

20 Camundongos foram usados por dose.

Resultados.

15 Todos os grupos tratados com o vetor MVA codificador de antígeno Muc1 mostraram um crescimento de tumor mais lento e uma taxa de sobrevivência mais alta do que o grupo tratado com um vetor MVA vazio. Os camundongos tratados com a composição compreendendo EEV e IMV mostraram um crescimento de tumor mais lento do que os camundongos
20 tratados com a composição compreendendo apenas IMV.

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus da varíola recombinante, caracterizado pelo fato de que o citado vírus da varíola recombinante é um EEV sem especificidade de infecção visada.

5 2. Vírus da varíola recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o citado vírus da varíola é escolhido do grupo compreendendo Orthopoxvírus, Parapoxvírus, Avipoxvírus, Capripoxvírus, Leporipoxvírus, Suipoxvírus, Molluscipoxvírus, Yatapoxvírus.

10 3. Vírus da varíola recombinante de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o citado vírus da varíola é um orthopoxvírus.

 4. Vírus da varíola recombinante de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o citado orthopoxvírus é um
15 Vírus de Vacínia.

 5. Vírus da varíola recombinante de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o citado Orthopoxvírus é um vírus de vacínia Ankara modificado.

20 6. Vírus da varíola recombinante de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o citado vírus da varíola compreende uma sequência exógena codificadora de uma molécula possuindo uma função direta ou indiretamente citotóxica.

 7. Vírus da varíola recombinante de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo fato de que a citada sequência exógena é
25 um gene suicida.

 8. Vírus da varíola recombinante de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o citado vírus da varíola compreende uma sequência exógena codificadora de um Antígeno Associado a Tumor (TAA).

9. Vírus da varíola recombinante de acordo com uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado pelo fato de que o citado vírus da varíola compreende uma sequência exógena codificadora de um antígeno.

5 10. Vírus da varíola recombinante de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o citado antígeno é derivado de um vírus.

11. Vírus da varíola recombinante de acordo com uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o citado vírus da varíola compreende os elementos necessários para expressão da sequência exógena.

10 12. Processo para produzir um vírus da varíola de tipo selvagem, um vírus da varíola atenuado e/ou um vírus da varíola recombinante sem especificidade de infecção visada, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de :

- 15 a) preparar uma cultura de células acondicionadoras,
b) infectar a citada cultura de células,
c) cultivar as citadas células infectadas por um período de tempo apropriado,
d) recuperar as partículas de vírus da varíola produzidas do sobrenadante de cultura e/ou as células acondicionadoras, e

20 13. Processo de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o citado processo está livre de produtos animais.

14. Processo de acordo com as reivindicações 12 ou 13, caracterizado pelo fato de que a citada célula acondicionadora é uma CEF.

25 15. Processo de acordo com uma das reivindicações 12 a 14, caracterizado pelo fato de que a etapa c) dura entre dois e quatro dias.

16. Processo de acordo com uma das reivindicações 12 a 15, caracterizado pelo fato de que a etapa d compreende o rompimento da célula acondicionadora pelo uso de um homogeneizador de velocidade alta.

17. Processo de acordo com uma das reivindicações 12 a 16,

caracterizado pelo fato de que o citado processo adicionalmente uma etapa de clarificação, da mistura obtida da etapa d, permitindo a remoção dos fragmentos celulares.

5 18. Processo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a citada etapa de clarificação é uma etapa de filtração em profundidade.

19. Processo de acordo com as reivindicações 17 ou 18, caracterizado pelo fato de que o citado processo compreende uma etapa de concentração.

10 20. Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que a citada etapa de concentração é uma etapa de microfiltração.

21. Processo de acordo com a reivindicação 19, caracterizado pelo fato de que o citado processo adicionalmente compreende uma etapa de diafiltração.

15 22. Processo de acordo com uma das reivindicações 12 a 21, caracterizado pelo fato de que não é usada nuclease e mais particularmente não é usada benzonase.

20 23. Composição, caracterizada pelo fato de compreender vírus da varíola recombinante como definido em uma das reivindicações 1 a 11 ou de ser obtida pelo processo como definido em uma das reivindicações 12 a 22.

25 24. Composição de acordo com a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que mais do que 1%, preferivelmente mais do que 5%, ainda mais preferivelmente mais do que 10% e muito mais preferivelmente pelo menos 20% de vírus da varíola compreendido em citada composição é EEV.

25 25. Composição de acordo com as reivindicações 23 ou 24, caracterizada pelo fato de possuir um título de pelo menos 10^5 , preferivelmente de pelo menos 10^6 , mais preferivelmente de pelo menos 10^7 , ainda mais preferivelmente de pelo menos 10^8 pfu por ml.

26. Composição de acordo com uma das reivindicações 23 a 25, caracterizada pelo fato de possuir um título de pelo menos 10^3 , preferivelmente 10^4 e muito mais preferivelmente de pelo menos 3×10^5 pfu por μg de proteína.

5 27. Uso de vírus da varíola recombinante como definido em uma das reivindicações 1 a 11, da composição como definida em uma das reivindicações 23 a 26, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento.

10 28. Uso de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento terapêutico ou profilático de câncer.

29. Uso de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento terapêutico ou profilático de doenças infecciosas.

Figura 1

Taxa de sobrevivência

Grupo	VÍRUS	DOSES pfu / camun- dongo	Dias após desafio tumoral										
			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

Porcentagem de camundongos livres de tumor

[illegible]

Figura 3

Taxas de sobrevivência de camundongos

Grupo	VÍRUS	DOSES pfu / 50uL/ camundongo	Dias após desafio 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

RESUMO

5 “VÍRUS DE VACÍNIA ANKARA MODIFICADO RECOMBINANTE, PROCESSO PARA PRODUZIR UM VÍRUS DA VARÍOLA DE TIPO SELVAGEM, UM VÍRUS DA VARÍOLA ATENUADO E/OU UM VÍRUS DA VARÍOLA RECOMBINANTE SEM ESPECIFICIDADE DE INFECÇÃO VISADA, COMPOSIÇÃO, E, USO DE UM VÍRUS DA VARÍOLA RECOMBINANTE OU DE UMA COMPOSIÇÃO”

10 A presente invenção refere-se às composições e às composições farmacêuticas compreendendo vírus da varíola e mais particularmente aos vírus envelopados extracelulares. A presente invenção também se refere a um processo para produzir vírus da varíola e aos vírus da varíola obtidos do mesmo. Ainda mais, a presente invenção também se refere ao uso de citados vírus da varíola e citada composição para preparação de um medicamento.

A requerente apresenta novas vias das reivindicações para melhor esclarecer e definir o presente pedido.

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus de vacínia Ankara modificado recombinante, caracterizado pelo fato de que o citado vírus de vacínia Ankara modificado recombinante é um EEV sem especificidade de infecção visada.

2. Vírus de vacínia Ankara modificado recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o citado vírus de vacínia Ankara modificado recombinante compreende uma seqüência exógena codificadora de uma molécula possuindo uma função direta ou indiretamente citotóxica.

3. Vírus de vacínia Ankara modificado recombinante de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a citada seqüência exógena é um gene suicida.

4. Vírus de vacínia Ankara modificado recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o citado vírus de vacínia Ankara modificado recombinante compreende uma seqüência exógena codificadora de um Antígeno Associado a Tumor (TAA).

5. Vírus de vacínia Ankara modificado recombinante de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o citado vírus de vacínia Ankara modificado recombinante compreende uma seqüência exógena codificadora de um antígeno.

6. Vírus de vacínia Ankara modificado recombinante de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o citado antígeno é derivado de um vírus.

7. Vírus de vacínia Ankara modificado recombinante de acordo com uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o citado vírus de vacínia Ankara modificado recombinante compreende os elementos necessários para expressão da seqüência exógena.

8. Processo para produzir um vírus da varíola de tipo selvagem, um vírus da varíola atenuado e/ou um vírus da varíola recombinante sem especificidade de infecção visada, caracterizado pelo fato

de compreender as etapas de :

- a) preparar uma cultura de células acondicionadoras,
- b) infectar a citada cultura de células,
- c) cultivar as citadas células infectadas por um período de
- 5 tempo apropriado,
- d) recuperar as partículas de vírus da varíola produzidas do sobrenadante de cultura e/ou as células acondicionadoras,
- e) uma etapa de clarificação da mistura obtida da etapa d), permitindo a remoção dos fragmentos celulares, em que a citada etapa de
- 10 clarificação é uma etapa de filtração em profundidade,
- f) uma etapa de concentração, em que a citada etapa de concentração é uma etapa de microfiltração, e
- g) uma etapa de diafiltração
- e, em que o citado processo está livre de produtos animais.
- 15 9. Processo de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a citada célula acondicionadora é uma CEF.
10. Processo de acordo com a reivindicação 8 ou 9, caracterizado pelo fato de que a etapa c) dura entre dois e quatro dias.
11. Processo de acordo com uma das reivindicações 8 a 10,
- 20 caracterizado pelo fato de que a etapa d) compreende o rompimento da célula acondicionadora pelo uso de um homogeneizador de velocidade alta.
12. Processo de acordo com uma das reivindicações 8 a 11, caracterizado pelo fato de que não é usada nuclease e mais particularmente não é usada benzonase.
- 25 13. Composição, caracterizada pelo fato de compreender o vírus de vacínia Ankara modificado recombinante como definido em uma das reivindicações 1 a 7 ou de ser obtida pelo processo como definido em uma das reivindicações 8 a 12.
14. Composição de acordo com a reivindicação 13,

caracterizada pelo fato de que mais do que 1%, preferivelmente mais do que 5%, ainda mais preferivelmente mais do que 10% e muito mais preferivelmente pelo menos 20% de vírus da varíola compreendido em citada composição é EEV.

5 15. Composição de acordo com as reivindicações 13 ou 14, caracterizada pelo fato de possuir um título de pelo menos 10^5 , preferivelmente de pelo menos 10^6 , mais preferivelmente de pelo menos 10^7 , ainda mais preferivelmente de pelo menos 10^8 pfu por ml.

10 16. Composição de acordo com uma das reivindicações 13 a 15, caracterizada pelo fato de possuir um título de pelo menos 10^3 , preferivelmente 10^4 e muito mais preferivelmente de pelo menos 3×10^5 pfu por μg de proteína.

17. Uso de um vírus da varíola recombinante ou de uma composição, em que

15 (i) o citado vírus da varíola recombinante é
 (a) um EEV sem especificidade de infecção visada; ou
 (b) um vírus de vacínia Ankara modificado recombinante como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 7; ou

20 (c) um vírus da varíola de tipo selvagem, um vírus da varíola atenuado e/ou um vírus da varíola recombinante obtido por um processo como definido em uma das reivindicações 8 a 12; ou

 (ii) a citada composição é como definida em uma das reivindicações 13 a 16

25 caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um medicamento.

18. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento terapêutico ou profilático de câncer.

19. Uso de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de ser para o tratamento terapêutico ou profilático de doenças infecciosas.