

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

(21) **PI0707654-1 A2**

(22) Data de Depósito: 09/02/2007
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 35/76
A61N 5/00
A61P 35/00

(54) Título: **MÉTODO PARA TRATAR OU MELHORAR UM TUMOR SÓLIDO EM UM INDIVÍDUO**

(30) Prioridade Unionista: 13/02/2006 US 60/773068,
03/04/2006 US 60/788898, 03/04/2006 US 60/788898

(73) Titular(es): Oncolytics Biotech Inc

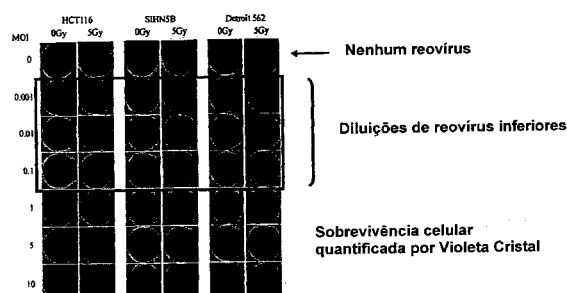
(72) Inventor(es): Bradley G. Thompson, Matthew C. Coffey

(74) Procurador(es): MOMSEN LEONARDOS & CIA

(86) Pedido Internacional: PCT CA2007000187 de 09/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007093036 de 23/08/2007

(57) Resumo: MÉTODO PARA TRATAR OU MELHORAR UM TUMOR SÓLIDO EM UM INDIVÍDUO. Aqui, são fornecidos métodos para tratar ou melhorar um tumor sólido em um indivíduo que compreende a administração de vírus oncolíticos e agentes imunossuppressores em ou próximo ao local do tumor.



“MÉTODO PARA TRATAR OU MELHORAR UM TUMOR SÓLIDO EM UM INDIVÍDUO”

REFERÊNCIA CRUZADA COM PEDIDOS RELACIONADOS

5 Este pedido reivindica a prioridade da U.S. Série Nº 60/773.068 depositado em 13 de fevereiro de 2006 e U.S. Série Nº 60/788.898 depositado em 3 de abril de 2006, que são incorporados por referência neste em sua totalidade.

CAMPO TÉCNICO

10 A presente invenção diz respeito ao uso de supressão imune local em um indivíduo que também recebe terapia viral oncolítica para intensificar a eficácia da terapia.

FUNDAMENTOS

15 O câncer é diagnosticado em mais do que 1 milhão de pessoas em cada ano apenas nos E.U.A. a despeito de numerosos avanços na pesquisa médica, o câncer permanece a segunda causa principal de morte nos Estados Unidos. Nas nações industrializadas, aproximadamente uma em cinco pessoas morrerá de câncer. Na pesquisa quanto a novas estratégias, a terapia viral oncolítica tem surgido recentemente como um método viável para matar especificamente as células tumorais. Diferente da terapia genética
20 convencional, esta usa vírus competentes na replicação que são capazes de se disseminar por todo o tecido tumoral em virtude da replicação viral e lise celular concomitante, fornecendo um tratamento alternativo contra o câncer. Os vírus tem sido projetados agora para se replicarem seletivamente e matar células cancerígenas.

25 Os vírus oncolíticos podem utilizar mecanismos múltiplos de ação para matar células cancerígenas-lise celular, apoptose celular, anti-angiogênese e necrose celular. O vírus infecta a célula tumoral e então começa a replicar. O vírus continua a replicar até a lise da membrana da célula hospedeira (rompimento) quando a célula tumoral não puder mais

conter o vírus. A célula tumoral é destruída e os vírus recentemente criados são disseminados próximos das células cancerígenas para continuar o ciclo. Os vírus oncolíticos são pretendidos replicar apenas nas células cancerígenas e passar através do tecido normal sem causar dano. Em consequência, uma vez que todas as células tumorais estejam erradicadas, o vírus oncolítico não tem mais a capacidade de replicar-se e o sistema imune o remove do corpo.

Durante alguns anos passados, novas compreensões sobre os mecanismos moleculares de citotoxicidade viral forneceram o a base lógica científica para projetar vírus oncolíticos mais eficazes. Avanços recentes na biologia molecular permitiram o projeto de diversos vírus geneticamente modificados, tais como adenovírus e vírus simples da herpes que replicam-se especificamente em e matam, células tumorais. Por outro lado, vírus com capacidade oncolítica intrínseca também estão sendo avaliados para propósitos terapêuticos. Embora a eficácia da terapia viral oncolítica, no geral, tenha sido demonstrada em estudos pré-clínicos, a eficácia terapêutica em ensaios clínicos ainda não é ótima. Portanto, são avaliadas estratégias e ainda podem intensificar o potencial terapêutico de vírus que replicam-se condicionalmente.

SUMÁRIO

São fornecidos métodos para tratar ou melhorar um tumor sólido em um indivíduo que compreende a administração de vírus oncolíticos e agentes imunossupressores em ou próximo ao local do tumor.

Os detalhes de uma ou mais formas de realização dos métodos fornecidos são apresentados nos desenhos anexos e relatório descritivo abaixo. Outras características, objetivos e vantagens estarão evidentes a partir do relatório descritivo e desenhos e a partir das reivindicações.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra que tão poucos quanto 5 grays (Gy) de radiação intensificam a citotoxicidade de reovírus.

A Figura 2 mostra que a administração de radiação e reovírus reduz o volume do tumor *in vivo* em modelos animais imunodeficientes e imunocompetentes.

5 A Figura 3 mostra que a radiação evita a indução da neutralização de anticorpos anti-tumor.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Os termos usados neste pedido são definidos como segue a não ser que indicados de outra maneira. Observe que os títulos usados neste são para os propósitos organizacionais apenas e não são pretendidos limitar o
10 relatório descritivo ou as reivindicações anexas a este.

Definições

Uma “célula neoplástica”, “célula tumoral” ou “célula com um distúrbio proliferativo” refere-se a uma célula que prolifera-se em uma taxa anormalmente alta. Um novo desenvolvimento que compreende célula
15 neoplásticas é um neoplasma, também conhecido como um “tumor”. Um tumor é um desenvolvimento de tecido anormal, no geral, formando uma massa distinta, que desenvolve-se pela proliferação celular mais rapidamente do que o desenvolvimento de tecido normal. Um tumor pode mostrar uma
20 perda total ou parcial da organização estrutural e coordenação funcional com o tecido normal. Como usado aqui, um tumor é pretendido abranger tumores hematopoiéticos bem como tumores sólidos.

Um tumor pode ser benigno (tumor benigno) ou maligno (tumor ou câncer maligno). Os tumores malignos podem ser amplamente classificados em três tipos principais. Os tumores malignos que originam-se
25 de estruturas epiteliais são denominados carcinomas; tumores malignos que originam-se de tecidos conectivos, tais como músculo, cartilagem, gordura ou osso são denominados sarcomas e tumores malignos que afetam estruturas hematopoiéticas (estruturas que pertencem à formação de células sangüíneas) incluindo componentes do sistema imune são denominados leucemias e

linfomas. Outros tumores incluem, mas não são limitados a, neurofibromatose.

Uma “lesão” é um dano, ferimento ou uma área que está estruturalmente anormal. No contexto de um indivíduo que carrega o tumor,
5 uma lesão é uma massa tumoral a não ser que descrito de outra maneira.

As “células neoplásticas ativadas por ras” ou “células neoplásticas mediadas por ras” refere-se a células que se proliferam em uma taxa anormalmente alta devido a, pelo menos em parte à ativação da via de ras. A via de ras pode ser ativado por meio da mutação de gene ras, o nível
10 elevado de expressão de gene de ras, estabilidade elevada da mensagem do gene ras ou qualquer mutação ou outro mecanismo que leva à ativação de ras ou um fator ou fatores a jusante ou a montante do ras na via de ras, desse modo, aumentando a atividade da via de ras. Por exemplo, a ativação de um receptor de EGF, receptor de PDGF ou SOS resulta na ativação da via de ras.
15 As células neoplásticas mediadas por ras incluem, mas não são limitados a, células cancerígenas mediadas por ras, que são células que proliferam-se de uma maneira maligna devido à ativação da via de ras.

A “Infecção por vírus” refere-se à entrada e replicação de vírus em uma célula. Similarmente, “infecção de um tumor por vírus” refere-se à
20 entrada e replicação de vírus nas células do tumor.

“Reovírus” refere-se a qualquer vírus classificado no gênero reovírus, de ocorrência natural, modificado ou recombinante. Os reovírus são vírus comum genoma de RNA segmentado de filamento duplo. Os virions medem de 60 a 80 nm de diâmetro e possuem duas cascas de capsídeo
25 concêntricas, cada um dos quais sendo icosaédricos. O genoma consiste de RNA de filamento duplo em 10 a 12 segmentos distintos com um tamanho de genoma total de 16 a 27 kbp. Os segmentos de RNA individuais variam em tamanho. Três tipos distintos mas relacionados de reovírus foram recuperados para muitas espécies. Todos os tipos dividem um antígeno fixador de

complemento comum.

O reovírus humano consiste de três sorotipos: tipo 1 (cepa Lang ou T1L), tipo 2 (cepa Jones, T2J) e tipo 3 (cepa Dearing ou cepa Abney, T3D). os três sorotipos são facilmente identificáveis na base da neutralização e ensaios de inibição de hemaglutina (ver, por exemplo, Fields, B. N. *et al.*, 1996).

O reovírus pode ser de ocorrência natural ou modificado. O reovírus é de “ocorrência natural” quando este pode ser isolado de uma fonte em estado natural e não foi intencionalmente modificado por humanos no laboratório. Por exemplo, o reovírus pode ser de uma “fonte de campo”, isto é, de um ser humano que foi infectado com o reovírus. O reovírus também pode ser selecionado ou submetido à mutagênese quanto à atividade oncolítica intensificada.

O reovírus pode ser modificado, mas ainda capaz de infectar liticamente uma célula de mamífero tendo uma via de ras ativa. O reovírus pode ser química ou bioquimicamente pré-tratado (por exemplo, pelo tratamento com uma protease, tal como quimiotripsina ou tripsina) antes da administração às células proliferadoras. O pré-tratamento com uma protease remove o revestimento externo ou capsídeo do vírus e pode aumentar a infectividade do vírus. O reovírus pode ser revestido em uma lipossoma ou micelas (Chandran and Nibert, 1998). Por exemplo, o virion pode ser tratado com quimiotripsina na presença de concentrações formadoras de micelas de detergentes de sulfato de alquila para gerar uma nova partícula de subvirion infecciosa (ISVP).

O reovírus pode ser um reovírus recombinante que resulta da recombinação/reagrupamento de segmentos genômicos de dois ou mais reovírus geneticamente distintos. A Recombinação/reagrupamento de segmentos genômicos de reovírus podem ocorrer em estado natural seguindo a infecção de um organismo hospedeiro com pelo menos dois reovírus

geneticamente distintos. Os virions recombinantes também podem ser gerados em cultura celular, por exemplo, pela co-infecção de células hospedeiras permissivas com reovírus geneticamente distintos (Nibert et al. 1995).

Conseqüentemente, a invenção abrange o uso de um reovírus recombinante que resulta do reagrupamento de segmentos de genoma de dois ou mais reovírus geneticamente distintos, que incluem, mas não limitam-se a, reovírus humano, tal como o tipo 1 (por exemplo, cepa Lang), tipo 2 (por exemplo, cepa Jones) e tipo 3 (por exemplo, cepa Dearing ou cepa Abney); reovírus mamífero não humano ou reovírus aviários. A invenção ainda abrange o uso de reovírus recombinantes que resulta do reagrupamento de segmentos de genoma de dois ou mais reovírus geneticamente distintos em que pelo menos um vírus parental é geneticamente projetado, compreende um ou mais segmentos genômicos quimicamente sintetizados, foi tratado com mutagenes químicos ou físicos ou é, por si só, o resultado de um evento de recombinação. A invenção ainda abrange o uso do reovírus recombinante que sofreu recombinação na presença de mutagenes químicos, que incluem, mas não limitam-se a, sulfato de dimetila e brometo de etídio ou mutagenes físicos, que incluem, mas não limitam-se a, luz ultravioleta e outras formas de radiação.

A invenção ainda abrange o uso de reovírus recombinantes que compreendem anulações ou duplicações em um ou mais segmentos de genoma, que compreendem informação genética adicional como um resultado da recombinação com um genoma de célula hospedeira ou que compreende genes sintéticos.

O reovírus pode ser modificado pela incorporação de proteínas revestidas mutadas, tais como, por exemplo, no capsídeo externo do vírus. As proteínas podem ser mutadas por substituição, inserção ou anulação. A substituição inclui a inserção de aminoácidos no lugar de aminoácidos naturais. As inserções incluem a inserção de resíduos de aminoácido

adicionais na proteína em um ou mais locais. As anulações incluem a anulação de um ou mais resíduos de aminoácido na proteína. Tais mutações podem ser geradas pelos métodos conhecidos na técnica. por exemplo, a mutagênese direcionada ao local de oligonucleotídeo do gene que codifica
 5 quanto a um das proteínas de revestimento pode resultar na geração da proteína de revestimento mutante desejada. A expressão da proteína mutada nas células de mamífero infectadas por reovírus *in vitro*, tais como as células COS 1, resultará na incorporação da proteína mutada na partícula de virion de reovírus (Turner and Duncan, 1992; Duncan et al., 1991; Mah et al., 1990).

10 O reovírus é preferivelmente um reovírus modificado para reduzir ou eliminar uma reação imune ao reovírus. Um tal reovírus modificado é denominado “reovírus imunoprotegido”. Tais modificações podem incluir o empacotamento do reovírus em uma lipossoma, uma micela ou outro veículo para mascarar o reovírus do sistema imune.
 15 Alternativamente, o outro capsídeo da partícula de virion de reovírus pode ser removido visto que as proteínas presentes visto que as proteínas presentes no outro capsídeo são o determinante principal das respostas humorais e celulares do hospedeiro.

“Sensibilizar” a célula neoplástica à radiação, como usado
 20 aqui, refere-se à ação de intensificar a sensibilidade da célula neoplástica à radiação.

“Sensibilidade” da célula neoplástica à radiação é a suscetibilidade da célula neoplástica ao efeito inibidor da radiação. Por exemplo, a sensibilidade da célula neoplástica à radiação pode ser indicada
 25 pela redução na taxa de desenvolvimento da célula em resposta à radiação. A sensibilidade também pode ser demonstrada pela redução dos sintomas causados pelas células neoplásticas.

A célula neoplástica que é “resistente” à radiação é uma célula neoplástica não morta ou desenvolvida inibida pela radiação. Para determinar

se uma célula neoplástica é desenvolvida inibida, a taxa de desenvolvimento da célula na presença ou ausência de radiação pode ser determinada pelos métodos estabelecidos na técnica, tais como contagens celulares. A célula neoplástica não é desenvolvida inibida por radiação se a taxa de desenvolvimento não for significativamente diferente com ou sem radiação.

Um tumor que é “resistente” à radiação é um tumor cuja taxa de aumento de tamanho ou aumento de peso não muda na presença de radiação. Alternativamente, se o indivíduo que carrega o tumor apresentar sintomas ou indicadores similares do tumor se o indivíduo receber radiação ou não, o tumor é resistente à radiação. Por exemplo, a contagem de célula branca é comumente usada como um indicador de leucemia. Se a contagem de células brancas de um paciente com leucemia não mudar de maneira significativa após receber a radiação, a leucemia deste paciente é resistente à radiação.

A “Administração” de um vírus a um indivíduo refere-se à ação de administrar o vírus a um indivíduo de uma maneira que este contate as células neoplásticas alvos. A via pela qual o vírus é administrado, bem como a formulação, carregador ou veículo, dependerá da localização bem como do tipo das células alvo. Uma ampla variedade de vias de administração pode ser utilizada e é debatida abaixo em mais detalhes.

Um “vírus oncolítico” é um vírus que replica-se preferivelmente em, e mata, células neoplásticas. Um vírus oncolítico pode ser um vírus de ocorrência natural ou um vírus projetado. Os vírus oncolíticos também abrangem os vírus imunoprotégidos e reagrupadores como descrito em detalhes para reovírus. O vírus é de “ocorrência natural” quando este pode ser isolado de uma fonte em estado natural e não foi intencionalmente modificado por humanos no laboratório. Por exemplo, O vírus pode ser de uma “fonte de campo”, isto é, de um animal infectado. O vírus é “projetado” quando este foi modificado pela intervenção humana.

Um “tumor metastático” é um tumor que sofreu metástase a partir de um tumor localizado em um outro local no mesmo animal.

Uma “quantidade eficaz” é uma quantidade de um agente de irradiação ou reovírus que é suficiente para resultar no efeito pretendido. Para
5 um agente de irradiação usado para tratar ou melhorar um tumor, uma quantidade eficaz é uma quantidade do agente de irradiação suficiente para aliviar ou eliminar os sintomas do tumor ou diminuir o progresso do tumor.

Como usado aqui, os termos “tratamento”, “tratar”, “tratando” ou “melhora” refere-se a um método de reduzir os efeitos de uma doença,
10 condição ou sintoma da doença ou condição. Desta maneira, no método de tratamento divulgado pode-se referir a uma redução ou melhora de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ou 100% na gravidade de uma doença ou condição ou sintoma estabelecido da doença ou condição. Por exemplo, o método para tratar câncer é considerado ser um tratamento se houver uma
15 redução de 10% em um ou mais sintomas da doença em um indivíduo em comparação com o controle. Desta maneira, a redução pode ser uma redução de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% ou qualquer porcentagem de redução entre 10 e 100 em comparação com os níveis naturais ou de controle. É entendido que o tratamento não refere-se necessariamente a uma cura ou
20 separação completa da doença, condição ou sintomas da doença ou condição.

Como usado aqui, o termo “indivíduo” pode ser um vertebrado, mais especificamente um mamífero (por exemplo, um ser humano, cavalo, porco, coelho, cão, ovelha, cabra, primata não humano, vaca, gato, porquinho da índia ou roedor), um peixe, um pássaro ou um réptil ou um
25 anfíbio. O termo não indica uma idade ou sexo particular. Desta maneira, indivíduos adultos e recém-nascidos, bem como fetos, masculinos ou femininos, são pretendidos serem cobertos. Como usado aqui, paciente ou indivíduo pode ser usado de maneira intercambiável e pode referir-se a um indivíduo afligido com uma doença ou distúrbio. O termo paciente ou

indivíduo inclui indivíduos humano e veterinário.

A morte de células tumorais pela replicação de vírus oncolíticos deve fornecer uma fonte abundante de antígenos tumorais para a iniciação cruzada de células imunes. Entretanto, as respostas imunes anti-virais também são induzidas. Portanto, não está claro se a morte local de tumores por vírus oncolíticos serão de benefício imunoterapêutico ou impedimento, para a geração de imunidade anti-tumor eficaz.

Os experimentos foram realizados para investigar quando o equilíbrio entre a replicação viral, morte de célula tumoral e reatividade imune (tanto para tumor quanto antígenos virais) cai quando os tumores sofrem a viroterapia oncolítica eficaz. Usando-se um modelo em que direciona a injeção intratumoral de melanomas B16 estabilizados com 4 injeções de reovírus (5×10^8 pfu/injeção) cura cerca de 50% de camundongos imunocompetentes C57B1/6 ($n = 8$ a 10), resposta imunes anti-viral extensivas foram geradas. Entretanto, usando-se, ELISPOT, citocinas intracelulares e ensaios de proliferação de célula CFSE T *in vivo*, foi observado que a viroterapia intratumoral pode, de fato, preparar células T simples contra um antígeno tumoral definido. Além disso, os animais curados por viroterapia também desenvolveram memória imunológica de longo prazo contra o tumor. Estes dados sugerem que os métodos adicionais projetados para aumentar a frequência de células T ativadas contra o tumor deve aumentar a eficácia de viroterapia oncolítica. Portanto, a viroterapia oncolítica foi combinada com a depleção de células T reguladoras de CD4+CD25+ (Treg) ou com a transferência adotiva de células T ativadas específicas para um antígeno tumoral. Os resultados mostram eficácia terapêutica diminuída na ausência de Treg e uma liberação rápida de replicação de vírus no tumor tratado. Em contraste, a viroterapia local contínua aumenta a atração de células T ativadas ao local do tumor por 4 vezes relativas para controlar os tumores, traduzindo em melhora significativa na terapia na viroterapia ou

terapia de transferência de célula T adotiva apenas.

5 Desta maneira, as intervenções imunes que prolongam a replicação viral local e/ou intensifica as frequências de células T específicas tumorais, devem ter impacto terapêutico significativo tanto contra o tumor injetado local quanto contra a doença metastática sistêmica não acessível para
10 direccionar a injeção viral.

Conseqüentemente, um aspecto da presente invenção fornece um método para tratar ou melhorar um tumor sólido em um indivíduo, que compreende injetar uma quantidade eficaz de um vírus oncolítico em ou
15 próximo ao tumor sólido, em que o vírus oncolítico é capaz de matar seletivamente células do tumor sólido e suprimir as resposta imunes locais em ou próximo do local do tumor sólido. As etapas de administrar o vírus oncolítico e suprimir as respostas imunes locais podem ser repetidas quando desejado a fim de melhorar ou tratar o tumor sólido no indivíduo. Este método
20 melhora a atividade do vírus oncolítico dentro de um tumor sólido antagonizando as respostas imunes anti-virais. A capacidade de um vírus oncolítico mediar a destruição do tumor depende da capacidade do vírus replicar por toda a massa tumoral. A imunidade anti-viral na massa tumoral anula a eficácia da viroterapia oncolítica inibindo a disseminação do vírus
25 dentro do tumor. O equilíbrio entre 1) disseminação viral e lise celular e 2) respostas imunes anti-virais pode ser mudados para favorecer a replicação viral e suprimir as respostas imunes no tumor. As respostas imunes anti-virais podem ser suprimidas, por exemplo, pela irradiação do tumor sólido ou administração de agentes imunossupressores em ou próximo ao local do tumor. Preferivelmente, as respostas imunes anti-virais locais são suprimidas por radiação. O agente imunossupressor pode ser administrado sob condições que retenham substancialmente o agente imunossupressor no tumor sólido. O agente imunossupressor pode ser administrado em doses múltiplas. O agente imunossupressor pode ser um anticorpo de anti-antivírus. Preferivelmente, a

supressão imune é suficiente para reduzir a quantidade de infiltração de leucócito no tumor sólido sem comprometer o sistema imune do mamífero. Isto pode ser atingido, por exemplo, usando-se a dosagem apropriada de radiação ou agentes imunossupressores e/ou restringindo os agentes imunossupressores ao tumor sólido.

A radioterapia, também denominada terapia por radiação é o tratamento do câncer e de outras doenças com radiação, tipicamente, radiação ionizante. A radioterapia também pode ser usada para tratar tumores sólidos localizados, tais como cânceres de pele, língua, laringe, cérebro, mama ou colo do útero. Isto também pode ser usado para o tratamento de leucemia e linfoma.

A quantidade de radiação usada na terapia por radiação é medida em grays (Gy) e varia dependendo do tipo e estágio do câncer sendo tratado. Para casos curativos (radicais), a dose típica para um tumor epitelial sólido de 50 a 70 Gy, enquanto os tumores de linfoma são tratados com 20 a 40 Gy. As doses preventivas (adjuvantes) estão tipicamente em torno de 50 a 60 Gy em 2 frações de Gy. Usualmente, a radiação é fracionada durante o tempo. As listas de fracionamento típicas incluem, mas não são limitadas a, 1,5 a 2 Gy por dia.

Como descrito neste, as doses baixas de radiação foram suficientes para melhorar a atividade oncolítica viral dentro de um tumor sólido. Especificamente, tão pouco quanto 5 Gy de radiação foi suficiente para melhorar a atividade oncolítica viral dentro de um tumor sólido. As doses totais adequadas de radiação para o uso nos métodos fornecidos incluem, mas não são limitadas a, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 70 Gy de radiação ou qualquer dose de radiação entre 1 e 70 Gy. A dose de radiação pode ser administrada localmente em ou próximo ao local do tumor em uma dose ou pode ser fracionada durante o tempo.

Um tipo de terapia de radiação comumente usado envolve

fótons (energia eletromagnética). Os raios X foram a primeira forma de radiação de fóton a ser usada para tratar o câncer. Dependendo da quantidade de energia que estes possuem, os raios podem ser usados para destruir as células cancerígenas na superfície de ou mais fundo no corpo. Os aceleradores lineares e os bétatrons são máquinas que produzem raios X de energia aumentadamente maior. O uso de máquinas para focalizar radiação (tais como raios X) em um local de câncer é denominado “radioterapia de raio externo”.

Os raios gama são uma outra forma de fótons usada na radioterapia. Os raios gama são produzidos espontaneamente como certos elementos (tais como rádio, urânio e cobalto 60) que liberam radiação quando deterioram. Cada elemento deteriora em uma taxa específica e dá energia livre na forma de raios gama e outras partículas. Os raios X e os raios gama têm o mesmo efeito nas células cancerígenas.

Uma outra técnica para liberar a radiação para as células cancerígenas para colocar implantes radioativos diretamente em um tumor ou cavidade corporal. Isto é denominado “radioterapia interna” e braquiterapia, irradiação intersticial e irradiação intracavitárias são tipos de radioterapia interna. Neste tratamento, a dose de radiação é concentrada em uma área pequena. A radioterapia interna é freqüentemente usada contra cânceres da língua, útero e colo do útero.

Diversos novos métodos para a terapia por radiação estão sendo avaliados para determinar a sua eficácia no tratamento do câncer. Uma tal técnica é a irradiação intraoperativa, em que uma dose grande de radiação externa é direcionada no tumor e tecido circundante durante a cirurgia. Um outro método de investigação é a terapia de radiação de raio de partícula. Este tipo de terapia difere da radioterapia de fóton em que este envolve o uso de partículas sub-atômicas de movimento rápido para tratar os cânceres localizados. Uma máquina muito sofisticada é necessária para produzir e acelerar as partículas requeridas para este procedimento. Algumas partículas

(nêutrons, píons e íons pesados) depositam mais energia ao longo da via que estes tomam através do tecido do que os raios X ou raios gama, desta maneira, causando dano às células que estes acertam. Este tipo de radiação é freqüentemente referido como a radiação de transferência de energia linear alta (LET alta). Uma outra pesquisa de radioterapia recente focalizou no uso de anticorpos radiorrotulados para liberar doses de radiação diretamente ao local do câncer (radioimunoterapia).

Os métodos de aumentar a eficácia de terapia de radiação foram ativamente pesquisados. Dois tipos de medicamentos investigacionais estão sendo estudados quanto a seus efeitos nas células suportam radiação. Os radiosensibilizadores fazem com que as células tumorais sejam mais provavelmente danificadas e os radioprotetores protegem os tecidos normais a partir dos efeitos da radiação. A hipertermia, o uso de calor, também está sendo estudada quanto à sua eficácia na sensibilização de tecido com relação à radiação. É considerado que qualquer radiosensibilizador ou radioprotetor conhecido na técnica podem ser usados em conjunção com a presente invenção de uma maneira que é consistente com a presente invenção.

O agente de radiação útil na presente invenção podem ser qualquer agente de irradiação conhecido na técnica, que incluem, mas não limitam-se a raios X, raios gama (por exemplo, raios gama produzidos por rádio, urânio ou cobalto 60) e raios de partícula (por exemplo, elétrons, nêutrons, píons e íons pesados). A irradiação pode estar na forma de radioterapia externa ou radioterapia interna (incluindo braquiterapia, irradiação intersticial e irradiação intracavitária). Os agentes de irradiação podem estar ligados a um anticorpo, como na radioimunoterapia ou utilizado durante a cirurgia, como na radioterapia intraoperatória.

Os vírus oncolíticos que podem ser usados para praticar os métodos fornecidos incluem, mas não são limitados a, vírus oncolíticos que são um membro da família de myoviridae, siphoviridae, podpviridae,

teciviridae, corticoviridae, plasmaviridae, lipothrixviridae, fuselloviridae, poxyiridae, iridoviridae, phycodnaviridae, baculoviridae, herpesviridae, adnoviridae, papovaviridae, polydnaviridae, inoviridae, microviridae, geminiviridae, circoviridae, parvoviridae, hepadnaviridae, retroviridae, 5 cyctoviridae, reoviridae, birnaviridae, paramyxoviridae, rhabdoviridae, filoviridae, orthomyxoviridae, bunyaviridae, arenaviridae, leviviridae, picornaviridae, sequiviridae, comoviridae, potyviridae, caliciviridae, astroviridae, nodaviridae, tetraviridae, tombusviridae, coronaviridae, glaviviridae, togaviridae e barnaviridae. Os vírus imunoprottegidos ou vírus de 10 outros vírus oncolíticos também são abrangidos pelos métodos fornecidos. Além disso, uma combinação de pelo menos dois vírus oncolíticos também pode ser utilizado para a prática dos métodos fornecidos. Alguns vírus oncolíticos são debatidos abaixo e uma pessoa de habilidade comum na técnica pode praticar a presente invenção usando-se vírus oncolíticos 15 adicionais, bem como de acordo com divulgado neste e conhecimento disponível na técnica.

Normalmente, quando um vírus entra em uma célula, RNA quinase de filamento duplo (PKR) é ativado e bloqueia a síntese de proteína e o vírus não pode replicar nesta célula. Alguns vírus desenvolveram um 20 sistema para inibir PKR e facilitar a síntese da proteína viral bem como a replicação viral, por exemplo, o adenovírus fabrica uma grande quantidade de um RNA pequeno, VA1 RNA, VA1 RNA tem estruturas secundárias extensivas e liga-se ao PKR em competição com o RNA de filamento duplo (dsRNA) que normalmente ativa o PKR. Visto que este requer um 25 comprimento mínimo de dsRNA para ativar PKR, o VA1 RNA não ativa PKR. Em vez disso, este seqüestra PKR em virtude de sua grande quantidade. Conseqüentemente, a síntese de proteína não é bloqueada e adenovírus pode replicar na célula.

As célula neoplásticas ativadas por Ras não são submetidos à

inibição de síntese de proteína por PKR porque o PKR inativa ras. Portanto, estas células são suscetíveis à infecção viral mesmo se o vírus não tiver sistema inibidor de PKR. Conseqüentemente, se os inibidores de PKR em adenovírus, vírus da varíola, vírus do herpes simples ou vírus orf de parapoxvírus são mutados a fim de não bloquear a função de nunca mais, os vírus resultantes não infectam as células normais devido à inibição da síntese de proteína por PKR, mas estes replicam em célula neoplásticas ativadas por ras que precisam de atividades de PKR.

Conseqüentemente, um vírus que é modificado ou mutado tal que estes não inibam a função de PKR, replica-se seletivamente em células neoplásticas ativadas em ras são resistentes. Preferivelmente, o vírus é um adenovírus mutado na região VA1, um vírus da varíola mutado na região K3L e/ou E3L, um vírus orf de parapoxvírus no gene OV20.0L ou um vírus influenza mutado no gene NS-1. O vírus, preferivelmente, não é um vírus do herpes mutado no gene y134.5.

Os vírus podem ser modificados ou mutados de acordo com a relação estrutura-função conhecida dos inibidores PKR virais. Por exemplo, visto que a região de terminal amino da proteína E3 interage com o domínio da região de terminal carbóxi PKR, anulação ou mutação de ponto deste domínio evita a função anti-PKR (Chang et al., 1992, 1993, 1995; Sharp et al., 1998; Romano et al., 1998). O gene K3L do vírus da varíola codifica pK3, um pseudosubstrato de PKR. Existe uma mutação de perda de função dentro de K3L. Os truncamentos ou pontos de mutação dentro da porção de terminal C de proteína K3L que é homólogo aos resíduos de 79 a 83 em eIF-2 abole a atividade inibidora de PKR (Kawagishi-Kobayashi et al., 1997).

Um outro exemplo é o vírus Delta24 que é um adenovírus mutante que carrega uma anulação de 24 pares de base na região E1A (Fueyo et al., 2000). A região é responsável pela ligação ao supressor de tumor celular Rb e inibição da função Rb, desse modo permitindo que o mecanismo

proliferativo celular e, em consequência a replicação viral, proceda de uma maneira não controlada. O Delta24 tem uma anulação na região Rb e não liga-se ao Rb. Portanto, a replicação do vírus mutado é inibido pelo Rb em uma célula normal. Entretanto, se o Rb for inativado e a célula tornar-se

5 neoplástica, o Delta24 não é mais inibidor. Em vez disso, o vírus mutante replica-se de maneira eficiente e submete a célula deficiente em Rb à lise.

Além disso, o vírus da estomatite vesicular (VSV) mata seletivamente células neoplásticas (e interferon pode ser opcionalmente adicionado). Um vírus da herpes simples 1 (HSV-1) mutante que é defeituoso

10 na expressão de ribonucleotídeo redutase, hrR3, foi mostrado replicar em células de carcinoma do cólon mas não em células normais do fígado (Yoon et al., 2000). O Vírus da doença de Newcastle (NDV) replica-se preferivelmente em células malignas e a cepa mais comumente usada é a 73-T (Reichard et al., 1992; Zorn et al, 1994; Bar-Eli et al, 1996). O vírus da

15 varíola propagou-se em diversas linhas tumorais de célula maligna. O vírus da encefalite mostrou-se ter um efeito oncolítico em um tumor de sarcoma de camundongo, mas a atenuação pode ser requerida para reduzir sua infectividade em células normais. A regressão tumoral foi descrita em

20 pacientes com tumor infectados com herpes zóster, vírus da hepatite, influenza, varicela e vírus do sarampo (para uma revisão, ver Nemunaitis, 1999).

Os vírus sindbis (SIN) pode ser usado nos métodos descritos neste. O vírus sindbis é um membro do gênero alfavírus da família togaviridae. O genoma do vírus sindbis é um RNA de filamento duplo de

25 11703 nucleotídeos, cobertos no terminal 5' e poli-adenilado no terminal 3'. O genoma consiste de uma região não traduzida 49S (UT), as proteínas não estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 seguidas por um promotor. O promotor é seguido por um 26S UT, proteínas estruturais C, E3, E2, 6K e E1 e finalmente um 3' UT e um terminal poli-adenilado. O 49S RNA genômico é de sentido

positivo, é infeccioso e serve como mRNA na célula infectada.

Os vetores de sindbis sistêmica e especificamente infectam/detectam e matam tumores submetidos à metástase *in vivo*, levando à supressão significativa do desenvolvimento tumoral e sobrevivência intensificada (Hurtado et al., *Rejuvenation Res.* 9(1):36-44 (2006)). O vírus sindbis é conhecidos infectar células de mamíferos usando-se o receptor de laminina Mr 67,000, que é elevado em tumor versus células normais e a expressão sub-regulada de receptor de laminina com RNA de interferência pequena reduz significativamente a infectividade de vetores de Sindbis. A super-expressão tumoral do receptor de laminina pode explicar e especificidade e a eficácia que os vetores de Sindbis demonstram quanto às células tumorais *in vivo*. O Sindbis não sofre a manipulação genética para alvejar as células cancerígenas ou injetado diretamente nos tumores. O Sindbis pode ser injetado em qualquer lugar em um indivíduo e viajar através da corrente sanguínea para a área alvo (Tseng et al., *Cancer Res.* 64(18):6684-92 (2004)). O Sindbis também pode ser geneticamente projetado para carregar um ou mais genes que suprimem a resposta imune ao vírus e/ou genes que estimulam uma resposta imune contra o tumor, tal como, por exemplo, genes de citocina anti-tumor, tais como genes de interleucina-12 e interleucina-15.

O vírus oncolítico pode ser de ocorrência natural ou modificado. O vírus pode ser química ou biologicamente pré-tratado (por exemplo, pelo tratamento com uma protease, tal como quimiotripsina ou tripsina) antes da administração às células neoplásticas. O pré- tratamento com uma protease remove o revestimento externo ou capsídeo do vírus e pode aumentar a infectividade do vírus. O vírus pode ser revestido em uma lipossoma ou micela (Chandron and Nibert, 1998) para reduzir ou prevenir uma resposta imune de um mamífero que desenvolveu imunidade ao vírus, por exemplo, o virion pode ser tratado com quimiotripsina na presença de concentrações formadoras de micela de detergentes de sulfato de alquila para

gerar uma nova partícula de subvirion infecciosa. O vírus oncolítico pode ser um vírus reagrupador ou um ISVP.

É preferível que o vírus não seja um veículo para a liberação de um gene para o propósito de terapia genética, por exemplo, os vírus foram projetados para liberar o gene E1A adenoviral, o gene supressor de tumor p53, genes que codificam pró-medicação (Chmura et al., 1999; 2001) ou genes sob um promotor indutor de radiação. Estes vírus, de fato, usualmente não replicam preferivelmente em células neoplásticas e não são, em consequência, vírus oncolíticos. Também é preferível que o vírus não seja um adenovírus projetado ou vírus da herpes ou um vírus que expressa uma proteína E1A funcional.

Uma pessoa de habilidade comum na técnica pode praticar os presentes métodos usando-se quaisquer vírus oncolíticos de acordo com a divulgação neste e conhecimento disponível na técnica. O vírus oncolítico pode ser de ocorrência natural ou modificado. O vírus oncolítico é de “ocorrência natural” quando este pode ser isolado de uma fonte em estado natural e não foi intencionalmente modificado por humanos no laboratório, por exemplo, o vírus oncolítico pode ser de uma “fonte de campo”, isto é, de um ser humano que foi infectado com o vírus oncolítico.

O vírus oncolítico pode ser um vírus oncolítico recombinante que resulta da recombinação/reagrupamento de segmentos genômicos de dois ou mais vírus oncolíticos geneticamente distintos. A recombinação/reagrupamento de segmentos genômicos de vírus oncolíticos pode ocorrer em estado natural seguindo a infecção de um organismo hospedeiro com pelo menos dois vírus oncolíticos geneticamente distintos. Os virions recombinantes também podem ser gerados na cultura celular, por exemplo, pela co-infecção de células hospedeiras permissivas com vírus oncolíticos geneticamente distintos. A invenção ainda abrange o uso de vírus oncolítico recombinante que resulta do reagrupamento de segmentos de

genoma de dois ou mais vírus oncolíticos geneticamente distintos em que pelo menos um vírus parental é geneticamente projetado, compreende um ou mais segmentos genômicos quimicamente sintetizados, foi tratado com mutagenes químicos ou físicos ou é, por si só, o resultado de um evento de recombinação. A invenção ainda abrange o uso do vírus oncolítico recombinante que sofreu recombinação na presença de mutagenes químicos, que incluem, mas não limitam-se a sulfato de dimetila e brometo de etídio ou mutagenes físicos, que incluem, mas não limitam-se a luz ultravioleta e outras formas de radiação.

A invenção ainda abrange o uso de vírus oncolíticos recombinantes que compreendem anulações ou duplicações em um ou mais segmentos de genoma, que compreende informação genética adicional como um resultado da recombinação com um genoma de célula hospedeira ou que compreende genes sintéticos, tais como, por exemplo, agentes que codificam genes que suprimem respostas imunes antivirais.

O vírus oncolítico pode ser modificado pela incorporação de proteínas revestidas mutadas, tais como, por exemplo, no capsídeo externo do vírus. As proteínas podem ser mutadas por substituição, inserção ou anulação. A substituição inclui a inserção de aminoácidos diferentes no lugar dos aminoácidos naturais. As inserções incluem a inserção de resíduos de aminoácido adicionais na proteína e em uma ou mais localizações. As anulações incluem anulações de um ou mais resíduos de aminoácidos na proteína. Tais mutações podem ser geradas pelos métodos conhecidos na técnica, por exemplo, mutagênese direcionada ao local de oligonucleotídeo do gene codificador quanto a uma das proteínas de revestimento pode resultar na geração da proteína de revestimento mutante desejada. A expressão da proteína mutada nas células de mamífero infectadas pelo vírus oncolítico *in vitro*, tal como células COS 1 pode resultar na incorporação da proteína mutada na partícula de virion de vírus oncolítico.

Nos métodos fornecidos, o vírus oncolítico é administrado de uma maneira de modo que este possa contatar ultimamente o tumor alvo ou as células tumorais. Em um aspecto, o vírus oncolítico não é administrado sistemicamente. A via pela qual o vírus oncolítico é administrado, bem como a formulação, carregador ou veículo, dependerá da localização bem como o tipo das células alvo. Uma ampla variedade de vias de administração pode ser utilizada. Por exemplo, para um tumor sólido, o vírus oncolítico pode ser administrado pela injeção direta ao tumor. Para um tumor hematopoiético, por exemplo, o vírus oncolítico pode ser administrado de maneira intravenosa ou intramuscular. Para tumores que não são facilmente acessíveis dentro do corpo, tal como metástases, o vírus oncolítico é administrado de uma maneira al que este possa ser transportado sistemicamente através do corpo do mamífero e, desse modo, atingir o tumor (por exemplo, de maneira intravenosa ou intramuscular). Alternativamente, o vírus oncolítico pode ser administrado diretamente a um tumor sólido simples, onde este é então realizado sistemicamente através do corpo para as metástases. O vírus oncolítico também pode ser administrado de maneira subcutânea, intraperitoneal, intratecal (por exemplo, para tumor cerebral), topicamente (por exemplo, para melanoma), oralmente (por exemplo, para câncer oral ou esofágico), retalmente (por exemplo, para câncer colo-retal), vaginalmente (por exemplo, para câncer cervical ou vaginal), nasalmente ou por pulverização para inalação (por exemplo, para câncer de pulmão).

Desta maneira, os vírus fornecidos aqui podem ser administrados *in vitro* ou *in vivo* em um carregador farmacêuticamente aceitável. Por farmacêuticamente aceitável é entendido um material que não é biologicamente ou de outra maneira indesejável, isto é, o material pode ser administrado a um indivíduo, sem causar qualquer efeitos biológicos indesejáveis ou que interage de uma maneira nociva com qualquer um dos outros componentes da composição farmacêutica em que este está contido. O

carregador deve ser naturalmente selecionado para minimizar qualquer degradação do ingrediente ativo e para minimizar quaisquer efeitos adversos no indivíduo, como deve ser conhecido por uma pessoa habilitada na técnica.

5 Desta maneira, a invenção também inclui composições farmacêuticas que contém vírus oncolíticos e/ou outros ingredientes ativos, tais como, por exemplo, um agente quimioterapêutico, como desejado. Na fabricação das composições farmacêuticas, os agentes são usualmente misturados com um excipiente, diluídos por um excipiente ou incluídos dentro de um tal carregador que pode estar na forma de uma cápsula, sachê, 10 papel ou outro recipiente. Quando o excipiente farmacêuticamente aceitável serve como um diluente, este pode ser um material, semi-sólido ou material líquido, que atua como um veículo, carregador ou meio para o ingrediente ativo. Desta maneira, as composições podem estar na forma de tabletes, pílulas, pós, losangos, sachês, selos, elixires, suspensões, emulsões, soluções, 15 xaropes, aerossóis (como um sólido ou em um meio líquido), ungüentos contendo, por exemplo, até 10% em peso do composto ativo, cápsulas de gelatina moles ou duras, supositórios, soluções injetáveis estéreis e pós embalados estéreis.

 Alguns exemplos de excipientes adequados incluem lactose, 20 dextrose, sacarose, sorbitol, manitol, amidos, goma acácia, fosfato de cálcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de cálcio, celulose microcristalina, polivinilpirrolidona, celulose, água estéril, xarope e metil celulose. As formulações podem, adicionalmente, incluir: agentes lubrificantes, tais como talco, estearato de magnésio e óleo mineral; agentes umectantes; 25 emulsificantes e de suspensão; os agentes conservantes, tais como metil- e propilidróxi-benzoatos; agentes adoçantes e agentes flavorizantes. As composições da invenção podem ser formulados a fim de fornecer liberação rápida, sustentada ou atrasada do ingrediente ativo após a administração ao indivíduo utilizando-se procedimentos conhecidos na técnica.

Para a preparação de composições sólidas, tais como tabletes, os ingredientes ativos são misturados com um excipiente farmacêutico para formar uma composição de pré-formulação sólida contendo uma mistura homogênea dos ingredientes ativos. Quando refere-se a estas composições de pré-formulação como homogêneas, é entendido que o ingrediente ativo é dispersado uniformemente por toda a composição de modo que a composição possa ser facilmente subdividida em formas de dosagem igualmente eficazes, tais como tabletes, pílulas e cápsulas.

Os tabletes e pílulas da presente invenção podem ser revestidas ou, de outra maneira, compostas para fornecer uma forma de dosagem que produz a vantagem de ação prolongada, por exemplo, o tablete ou pílula pode compreender um componente de dosagem interno ou de dosagem externo, o último estando na forma de um envelope sobre o formador. Os dois componentes podem ser separados por uma camada entérica que serve para resistir à desintegração no estômago e permite que componente interno passe intacto no duodeno ou seja atrasado na liberação. Uma variedade de materiais pode ser usada para tais camadas ou revestimentos entéricos, tais materiais incluindo diversos ácidos poliméricos e misturas de ácidos poliméricos com tais materiais como goma-laca, álcool cetílico e acetato de celulose.

As formas líquidas em que as composições podem ser incorporadas para a administração oral ou por injeção incluem soluções aquosas, xaropes adequadamente condimentados, suspensões aquosas ou oleosas e emulsões condimentadas com óleos comestíveis, tais como óleo de milho, óleo de semente de algodão, óleo de gergelim, óleo de coco ou óleo de amendoim, bem como elixires e veículos farmacêuticos similares.

As composições para a inalação ou insuflação incluem soluções e suspensões em solventes aquosos ou orgânicos farmacêuticamente aceitáveis ou misturas destes e pós. As composições líquidas ou sólidas podem conter excipientes farmacêuticamente aceitáveis como descrito neste.

Preferivelmente, as composições são administradas pela via respiratória oral ou nasal para efeito local ou sistêmico. As composições em solventes farmaceuticamente aceitáveis preferíveis podem ser nebulizadas pelo uso de gases inertes. As soluções nebulizadas podem ser inaladas diretamente a partir do dispositivo de nebulização ou o dispositivo de nebulização pode ser ligado a uma sonda de máscara facial ou máquina de respiração de pressão positiva intermitente. As composições de solução, suspensão ou pó, podem ser administradas, de maneira preferível, de maneira oral ou nasal a partir de dispositivos que liberam a formulação de uma maneira apropriada.

Uma outra formulação que pode ser utilizada nos métodos fornecidos neste utiliza dispositivos de liberação transdérmica (“emplastros”). Tais emplastros transdérmicos podem ser usados para a infusão contínua ou descontínua do reovírus da presente invenção em quantidades controladas. A construção e uso de emplastros transdérmicos para a liberação de agentes farmacêuticos é bem conhecido na técnica. Ver, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.023.252, incorporado neste por referência. Tais emplastros podem ser construídos para a liberação contínua pulsátil ou em demanda de agentes farmacêuticos.

Outras formulações adequadas para o uso na presente invenção podem ser observados em Remington's Pharmaceutical Sciences.

O vírus oncolítico pode ser embalado em kits convenientes fornecendo os materiais necessários embalados em recipientes adequados. É considerado que os kits também podem incluir agentes, que intensificam uma resposta imune a um tumor, agentes que suprimem a resposta imune local ao vírus oncolítico, agentes quimioterapêuticos e/ou outros agentes farmaceuticamente ativos quando desejado.

O vírus oncolítico é administrado em uma quantidade que é suficiente para o tratamento do tumor ou neoplasma (por exemplo, uma “quantidade eficaz”). Isto pode resultar em uma redução no tamanho do

neoplasma ou em uma eliminação completa do neoplasma. A redução no tamanho do neoplasma ou eliminação do neoplasma, é, no geral, causada pela lise das células neoplásticas (“oncólise”) pelo vírus oncolítico. Preferivelmente, a quantidade eficaz é de cerca de 1,0 pfu/kg de peso corporal a cerca de 10^{15} pfu/kg de peso corporal, mais preferivelmente de cerca de 10^2 pfu/kg de peso corporal a cerca de 10^{13} pfu/kg de peso corporal, por exemplo, para o tratamento de um indivíduo, aproximadamente 10^2 a 10^{17} unidades formadoras de placa (PFU) de vírus podem ser usadas, dependendo do tipo, tamanho e número de tumores presentes. A quantidade eficaz será determinada em uma base individuais e pode ser fundamentada, pelo menos em parte, na consideração do tipo de vírus oncolítico; a via de administração escolhida; o tamanho individual, idade, sexo; a gravidade dos sintomas do indivíduo; o tamanho e outras características do neoplasma e outros;. O curso da terapia pode durar de vários dias a vários meses ou até a diminuição da doença ser atingida.

O vírus oncolítico pode ser administrado em uma dose única ou doses múltiplas (isto é, mais do que uma dose). As doses múltiplas podem ser administradas concorrentemente ou consecutivamente (por exemplo, por um período de dias ou semanas). O vírus oncolítico também pode ser administrado a mais do que um neoplasma no mesmo indivíduo. O vírus oncolítico pode ser administrado antes de, junto com ou após o imunossupressor. O vírus oncolítico pode ser liberado por vias diferentes de administração, por exemplo, IV, IP, etc., (seqüencialmente ou concomitantemente). Um curso de vírus e/ou imunossupressor pode ser administrado uma ou mais vezes.

O vírus oncolítico é preferivelmente é formulado em uma forma de dosagem única, cada dosagem contendo de cerca de 10^2 pfus a cerca de 10^{17} pfus do reovírus. O termo “formas de dosagem única” refere-se à unidades fisicamente distintas adequadas como dosagens unitárias para

indivíduos, cada unidade contendo uma quantidade pré-determinada de vírus oncolítico calculado para a produção do efeito terapêutico desejado, m associação com um excipiente farmacêutico adequado.

5 As dosagens eficazes de composições depende de uma variedade de fatores e pode, desta maneira variar algumas de indivíduo para indivíduo. As dosagens eficazes e as tabelas para administração das composições podem ser determinadas empiricamente e a realização de tais determinações está dentro da habilidade técnica. A quantidade exata requerida variará de indivíduo para indivíduo, dependendo das espécies, idade, peso e
10 condição geral do indivíduo, da gravidade da doença sendo tratada, do vírus particular ou vetor usado e seu modo de administração. Desta maneira, não é possível especificar uma quantidade exata para cada composição. Entretanto, uma quantidade pode ser determinada por uma pessoa de habilidade comum na técnica usando-se apenas experimentação de rotina dando a orientação
15 fornecida neste.

As faixas de dosagem para a administração de composições são aquelas grandes embora produzam o efeito desejado que os sintomas da doença são afetados. a dosagem não deve ser tão grande a fim de causar efeitos colaterais, tais como reações cruzadas indesejadas e reações
20 anafiláticas. A dosagem pode ser ajustada pelo médico individual no evento de quaisquer contra indicações.

Os vírus oncolíticos descritos neste podem ser usados para uma variedade de propósitos. Estes podem ser usados nos métodos para tratar distúrbios proliferativos mediados por rasem um mamífero. Os vírus podem
25 ser usados para reduzir ou inibir neoplasmas. Estes podem ser usados em métodos para tratar metástases.

É considerado que os métodos fornecidos podem ser combinados com outras terapias combinadas com outras terapias contra tumor tais como quimioterapia, radioterapia, cirurgia, terapia hormonal e/ou

imunoterapia. Desta maneira, o vírus oncolítico pode ser administrado em conjunção com cirurgia ou remoção do neoplasma. Portanto, com este, são fornecidos métodos para o tratamento de um neoplasma sólido que compreende a remoção cirúrgica do neoplasma e administração de um vírus oncolítico em ou próximo ao local do neoplasma.

Também é considerado que o vírus oncolítico pode ser administrado em conjunção com ou em adição aos compostos anticâncer ou agentes quimioterapêuticos conhecidos. Os agentes quimioterapêuticos conhecidos são compostos que podem inibir o desenvolvimento de tumores.

Tais agentes incluem, mas não são limitados a, 5-fluorouracila, mitomicina C, metotrexato, hidroxiuréia, ciclofosfamida, dacarbazina, mitoxantrona, antraciclinas (Epirubicina e Doxurubicina), anticorpos para o receptor, tais como herceptina, etopsida, pregnasoma, compostos de platina, tais como carboplatina e cisplatina, taxanos, tais como taxol e taxotero, terapias hormonais, tais como tamoxifeno e anti-estrogênios, interferons, inibidores de aromatase, agentes progestacionais e análogos de LHRH.

Diversas formas de realização da invenção foram descritas. entretanto, será entendido que várias modificações podem ser feitas sem divergir do espírito e do escopo da invenção. Outras características, objetivos e vantagens da invenção estarão evidentes a partir do relatório descritivo e reivindicações.

Exemplos

Exemplo 1. Radiação Intensifica Citotoxicidade de Reovírus *in vitro* e *in vivo*

A via sinalizador de Ras determina a radiosensibilidade da célula tumoral. A ativação de Ras promove a sobrevivência de células tumorais seguindo a exposição por radiação. A ativação de Ras está associada com a resistência à radiação aumentada *in vitro* e *in vivo*. Para determinar se o vírus intensifica a citotoxicidade de reovírus *in vitro*, as células foram

colocadas em placas e então tratadas com 5 Gray ou Mock tratado. Quatro horas depois o reovírus de serotipo 3 (cepa de Dearing) foi administrado às células. A sobrevivência da célula foi quantificada por Crystal Violet. A Figura 1 mostra que tão pouco quanto 5 Gy de radiação intensifica a citotoxicidade de reovírus.

Para determinar os efeitos de radiação e de reovírus *in vivo*, a radioterapia fracionada e o reovírus (administração intratecal) foram administrados aos tumores de xenoenxerto HCT116 (Figura 2A) ou tumores singeneicos B16 (Figura 2B) em camundongos. A Figura 2 mostra que a administração de radiação e de reovírus reduz o volume do tumor *in vivo* em modelos animais imunodeficientes e imunocompetentes melhor do que o reovírus ou radiação apenas.

Estes resultados demonstram que o reovírus não é inativado por doses clinicamente relevantes de irradiação gama e que a radiação intensifica a citotoxicidade de reovírus. Estes resultados também demonstram que a citotoxicidade intensificada observada não é dependente do ritmo da radiação. Reovírus e radiação, individualmente induzem à detenção do ciclo celular em G2/M e juntos causam níveis aumentados de apoptose.

Exemplo 2. Efeitos de Reovírus e Terapia de Radiação em Humanos

O projeto de estudo para projetar os efeitos de reovírus e terapia de radiação em humanos é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Projeto de Estudo

Fase	Pacientes x Cohor	Dose de Reolisina	RT (Gy)	Dose de Vírus	Dias de Administração de Vírus
Ia	3	1×10^8	20 Gy em 5F	2	2,4
Ia	3	1×10^9	20 Gy em 5F	2	2,4.

Os pacientes foram incluídos com bas em uma lesão mensurável (lesão alvo), indicativo de Rt paliativo, PS (ECOG) < 2, função hematológica, renal e hepática adequadas. Os pacientes com lesões previamente irradiadas ou pacientes em terapia imunossupressora ou com

infecção por HIV, Hep B ou C foram excluídos.

A quantidade de reolisina dependeram do volume alvo da lesão. O volume do tumor foi calculado medindo-se três diâmetros ortogonais (D1, D2 e D3) e aplicando-se a fórmula $V = \pi/6 \times D1 \times D2 \times D3$. Os tumores receberam volumes de injeção entre 2 e 10 ml.

A radiação foi liberada com elétrons raios X de ortovoltagem com base em volume de tumor bruto. O volume de tumor bruto foi delineado em 3 dimensões por exame clínico e/ou radiológico. Uma margem circunferencial de 1 cm foi adicionada para o planejamento do volume alvo.

A toxicidade limitante de dose (DLT) foi determinada como segue: ANC $< 0,5 \times 10^9$ durando por mais do que 5 dias ou ANC $< 0,5 \times 10^9$ com sepse; contagem de plaqueta $< 25 \times 10^9/L$; neurotoxicidade ou cardiotoxicidade de grau 2 ou qualquer outra toxicidade de grau não hematológico liberado por medicamento, com as exceções de sintomas semelhantes à gripe, náusea vômitos, se apropriado, as medidas profiláticas ou terapêuticas não foram administradas.

O resumo do paciente é mostrado abaixo na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo do paciente

Tipo do tumor	Idade	Sexo	Lesão alvo	Dose de reovírus	Dose de radiação
Esofágico	56	M	linfonodo supraclavicular	1×10^8	20 Gy
Melanoma	58	M	Nódulo na virilha	1×10^8	20 Gy
Pâncreas	67	F	Massa na parede abdominal	1×10^8	20 Gy
Ovariano*	58	F	Nódulo nas costas	1×10^9	20 Gy
Célula primária escamosa desconhecida	41	M	Nódulo na clavícula	1×10^9	20 Gy
Célula escamosa do escalpo	71	M	Parótida esquerda	1×10^9	20 Gy
Câncer pulmonar de célula pequena	70		Nódulo no braço	1×10^9	20 Gy

Para medir a secreção de reovírus, as amostras dos indivíduos foram retiradas pré- e pós-tratamento. O RNA foi extraído do sangue, urina, fezes e expectoração. A análise de RT-PCR mostrou que nenhum

derramamento foi detectado nestes indivíduos em qualquer nível de dose.

Para determinar se a radiação suprime os níveis de respostas imunes de anti-corpo de anti-vírus neutralizador foram examinados. A Figura 3 mostra que a radiação evita a indução de anti-corpos anti-tumor neutralizadores.

A tabela 3 mostra a atividade anti-tumor de reovírus e radiação na lesão alvo.

Tabela 3. Atividade Anti-Tumor na Lesão Alvo

Tipo do tumor	Lesão alvo	Resposta 1 mês	Resposta 2 meses	Resposta 3 meses
Esofágico	linfonodo supraclavicular	PR	PR	PR
Melanoma	Nódulo na virilha	SD	-	-
Pâncreas	Massa na parede abdominal	PD	-	-
Célula primária escamosa desconhecida	Nódulo na clavícula	PR	PR	PR
Célula escamosa do escalpo	Parótida esquerda	SD	SD	pPR

PR-resposta parcial; SD-doença estável SD; PD-doença progressiva; pPR-resposta parcial patológica

Estes resultados mostram que a combinação de reovírus intratumoral e radiação são bem tolerados. Além disso, nenhum DLT, derramamento viral ou indução da neutralização de anticorpos de antireovírus foi observado.

Referências

Patente U.S. N° 6.136.307.

Patente U.S. N° 6.100.243.

Publicação de Pedido de Patente U.S. N° 20020037576.

Bar-Eli, N., et al., "Preferential cytotoxic effect of Newcastle disease virus on lymphoma cells", J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 409-415 (1996).

Chandran and Nibert, "Protease cleavage of reovirus capsid protein μ 1 and μ 1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infection subviral particle",

- J. of Virology 72(1):467-75 (1998).
- Chang et al., PNAS 89:4825-4829 (1992).
- Chang, H. W. et al., Virology 194:537-547 (1993).
- Chang et al., J. Virol. 69:6605-6608 (1995).
- 5 Chmura et al., "Strategies for enhancing viral-based gene therapy using ionizing radiation", Radiation oncology Investigations 7:261-269 (1999).
- Chmura et al., "Prospects for viral-based strategies enhancing the anti-tumor effects of ionizing radiation", Seminars in Radiation Oncology 11(4):338-345 (2001).
- 10 Cuff et al., "Enteric reovirus infection as a probe to study immunotoxicity of the gastrointestinal tract", Toxicological Sciences 42(2):99-108 (1998).
- Duncan et al., "Conformational and functional analysis of the C-terminal globular head of the reovirus cell attachment protein", Virology 182(2):810-9 (1991).
- 15 Fields, B. N. et al., Fundamental Virology, 3^a. Edição, Lippincott-Raven (1996).
- Fueyo, J., et al., "A Mutant Oncolytic Adenovirus Targeting the Rb Pathway Produces Anti-Glioma Effect *in vivo*", Oncogene 19(1):2-12 (2000).
- Harlow et al., "Antibodies. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor
- 20 Laboratory, New York, 1988.
- Kawagishi-Kobayashi, M., et al., Mot. Cell. Biology 17:4146-4158 (1997).
- Mah et al., "The N-terminal quarter of reovirus cell attachment protein sigma 1 possesses intrinsic virion-anchoring function", Virology 179(1):95-103 (1990).
- 25 Nemunaitis, J., Invest. New Drugs 17:375-386 (1999).
- Nibert, M. L., Schiff, L. A., and Fields, B. N., "Reoviruses and their replication", pp. 557-96 in Fundamental Virology (Fields et al., 3^a Edição), Lippincott-Raven Press, 1996.
- Reichard, K. W., et al., "Newcastle disease virus selectively kills human cells

tumors”, J. of Surgical Research 52:448-453 (1992).

Romano et al., Mol. and Cell. Bio. 18:7304-7316 (1998).

Sharp et al., Virol. 250:301-315 (1998).

5 Turner and Duncan, “Site directed mutagenesis of the C-terminal portion of reovirus protein sigma1: evidence for a conformation-dependent receptor binding domain”, Virology 186(1):219-27 (1992).

Yoon, S. S., et al., “An oncolytic herpes simplex virus type I selectively destroys diffuse liver metastases from colon carcinoma”, FASEB J. 14:301-311(2000).

10 Zorn, U. et al., “Induction of cytokines and cytotoxicity against tumor cells by Newcastle disease virus”, Cancer Biotherapy 9(3):22-235 (1994).

Todas as publicações, patentes e pedidos de patente citados acima ou em qualquer lugar neste pedido são incorporados neste por referência em sua totalidade até certo ponto como se a divulgação de cada
15 publicação, pedido de patente ou patente individuais foi específica e individualmente indicada ser incorporada por referência em sua totalidade.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para tratar ou melhorar um tumor sólido em um indivíduo, caracterizado pelo fato de que compreende:

5 (a) injetar uma quantidade eficaz de um vírus oncolítico em ou próximo ao tumor sólido, em que o vírus oncolítico é capaz de matar seletivamente células do tumor e

(b) suprimir as respostas imunes locais em ou próximo ao tumor sólido.

10 2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) é realizada pela irradiação do tumor sólido com uma quantidade eficaz de agente de irradiação.

3. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que o agente de irradiação é selecionado do grupo que consiste de elétrons, raio X e raio gama.

15 4. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a quantidade do agente de irradiação é de 50 Gy ou menos.

5. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a quantidade do agente de irradiação é 30 Gy ou menos.

20 6. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a quantidade do agente de irradiação é de cerca de 1 Gy a cerca de 30 Gy.

7. Método de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a quantidade do agente de irradiação é de 5 Gy.

25 8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 7, caracterizado pelo fato de que o agente de irradiação é administrado em doses múltiplas.

9. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) é realizada pela administração de um agente imunossupressor em ou próximo do tumor sólido.

10. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o agente imunossupressor é administrado em doses múltiplas.

11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o vírus oncolítico é selecionado do grupo que consiste de reovírus, vírus sindbis, vírus que tem mutações ou anulações a fim de inibir a proteína quinase ativada por RNA de filamento duplo (PKR), Delta24, vírus de estomatite vesicular (VSV), vírus da doença de Newcastle (NDV), vírus da varíola, vírus da encefalite, vírus do herpes zóster, vírus da hepatite, vírus influenza, vírus da varicela e vírus do sarampo.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o reovírus é um reovírus de mamífero ou um reovírus humano.

13. Método de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o reovírus humano é selecionado do grupo que consiste de reovírus do serotipo 1, reovírus do serotipo 2 e reovírus do serotipo 3.

14. Método de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o reovírus humano é o reovírus do serotipo 3.

15. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que o indivíduo é selecionado do grupo que consiste de cães, gatos, roedores, ovelhas, cabras, gado, cavalos, porcos humanos e primatas não humanos.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 15, caracterizado pelo fato de que o vírus oncolítico não é administrado sistemicamente.

17. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 16, caracterizado pelo fato de que a etapa (a) é realizada antes da etapa (b).

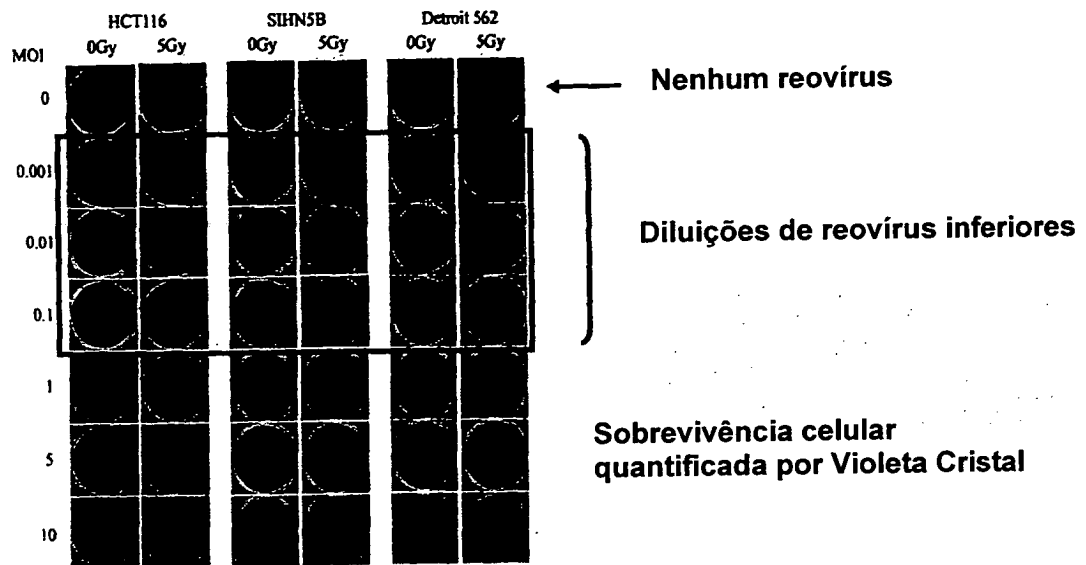


FIG. 1

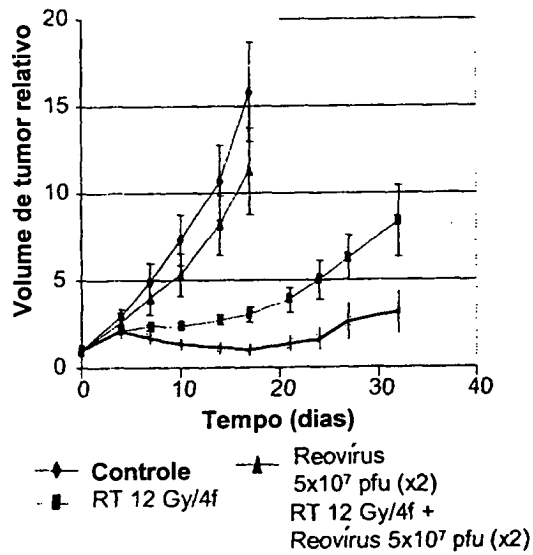
Radioterapia fracionada mais reovirus i.t.:
tumores de xenoinxerto HCT116

FIG. 2A

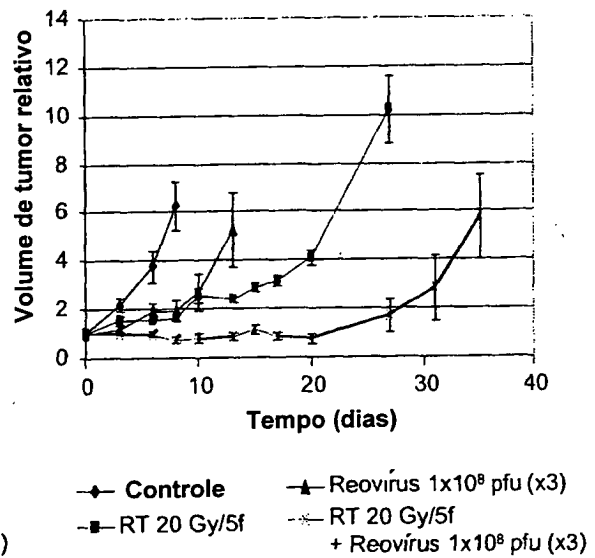
Radioterapia fracionada mais reovirus i.t.:
tumores de singenicos B16 em camundongos C57BL6

FIG. 2B

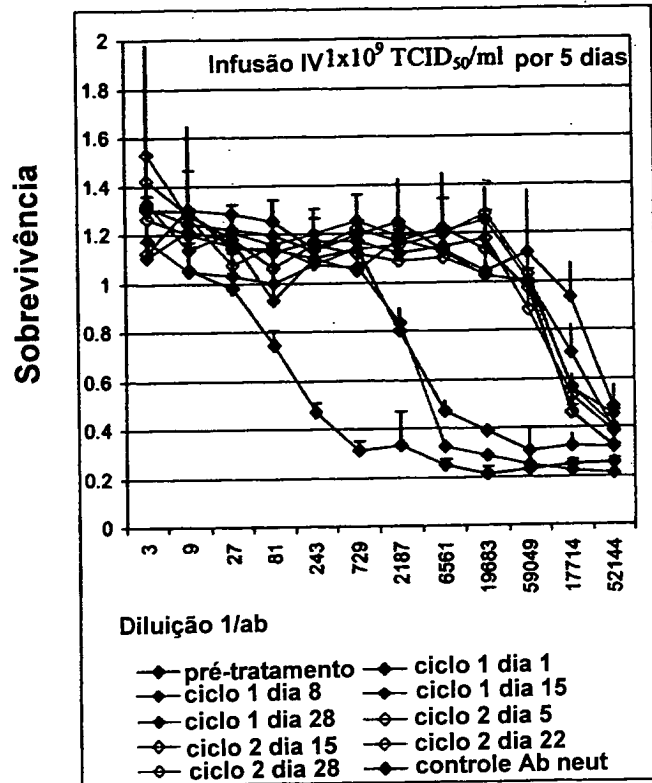


FIG. 3A

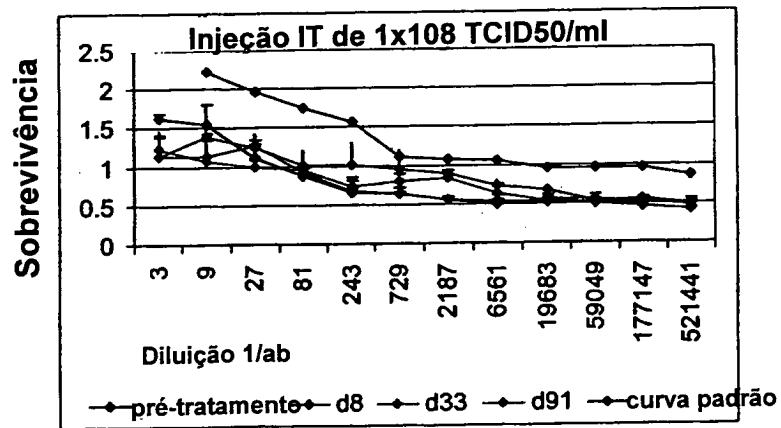


FIG. 3B

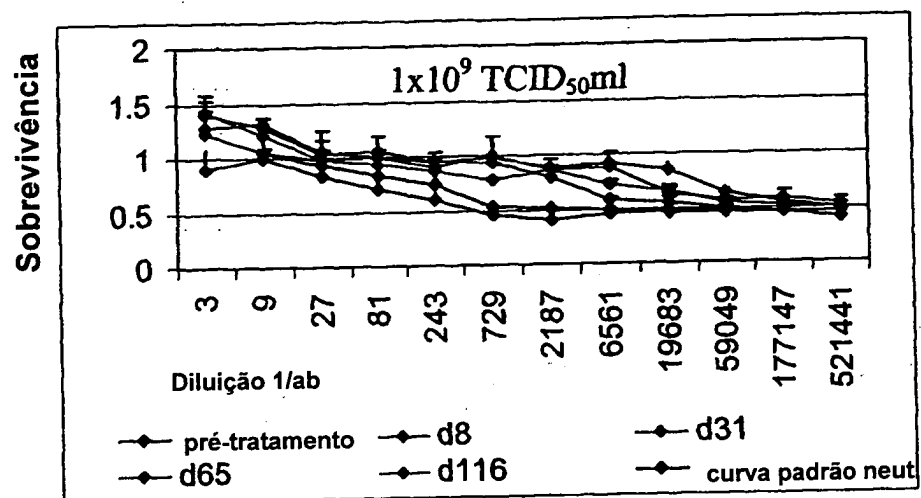


FIG. 3C

RESUMO

“MÉTODO PARA TRATAR OU MELHORAR UM TUMOR SÓLIDO EM UM INDIVÍDUO”

5 Aqui, são fornecidos métodos para tratar ou melhorar um tumor sólido em um indivíduo que compreende a administração de vírus oncolíticos e agentes imunossupressores em ou próximo ao local do tumor.

A requerente apresenta novas vias das páginas 3 e 30 do relatório descritivo para melhor esclarecer e definir o presente pedido.

A Figura 2 mostra que a administração de radiação e reovírus reduz o volume do tumor *in vivo* em modelos animais imunodeficientes e imunocompetentes.

A Figura 3 mostra que a radiação evita a indução da neutralização de anticorpos anti-vírus.

DESCRIÇÃO DETALHADA

Os termos usados neste pedido são definidos como segue a não ser que indicados de outra maneira. Observe que os títulos usados neste são para os propósitos organizacionais apenas e não são pretendidos limitar o relatório descritivo ou as reivindicações anexas a este.

Definições

Uma “célula neoplástica”, “célula tumoral” ou “célula com um distúrbio proliferativo” refere-se a uma célula que prolifera-se em uma taxa anormalmente alta. Um novo desenvolvimento que compreende célula neoplásticas é um neoplasma, também conhecido como um “tumor”. Um tumor é um desenvolvimento de tecido anormal, no geral, formando uma massa distinta, que desenvolve-se pela proliferação celular mais rapidamente do que o desenvolvimento de tecido normal. Um tumor pode mostrar uma perda total ou parcial da organização estrutural e coordenação funcional com o tecido normal. Como usado aqui, um tumor é pretendido abranger tumores hematopoiéticos bem como tumores sólidos.

Um tumor pode ser benigno (tumor benigno) ou maligno (tumor ou câncer maligno). Os tumores malignos podem ser amplamente classificados em três tipos principais. Os tumores malignos que originam-se de estruturas epiteliais são denominados carcinomas; tumores malignos que originam-se de tecidos conectivos, tais como músculo, cartilagem, gordura ou osso são denominados sarcomas e tumores malignos que afetam estruturas hematopoiéticas (estruturas que pertencem à formação de células sangüíneas) incluindo componentes do sistema imune são denominados leucemias e

derramamento foi detectado nestes indivíduos em qualquer nível de dose.

Para determinar se a radiação suprime os níveis de respostas imunes de anti-corpo de anti-vírus neutralizador foram examinados. A Figura 3 mostra que a radiação evita a indução de anti-corpos anti-vírus neutralizadores.

A tabela 3 mostra a atividade anti-tumor de reovírus e radiação na lesão alvo.

Tabela 3. Atividade Anti-tumor na Lesão Alvo

Tipo do tumor	Lesão alvo	Resposta 1 mês	Resposta 2 meses	Resposta 3 meses
Esofágico	linfonodo supraclavicular	PR	PR	PR
Melanoma	Nódulo na virilha	SD	-	-
Pâncreas	Massa na parede abdominal	PD	-	-
Célula primária escamosa desconhecida	Nódulo na clavícula	PR	PR	PR
Célula escamosa do escalpo	Parótida esquerda	SD	SD	pPR

PR-resposta parcial; SD-doença estável SD; PD-doença progressiva; pPR-resposta parcial patológica

Estes resultados mostram que a combinação de reovírus intratumoral e radiação são bem tolerados. Além disso, nenhum DLT, derramamento viral ou indução da neutralização de anticorpos de antireovírus foi observado.

Referências

Patente U.S. N° 6.136.307.

Patente U.S. N° 6.100.243.

Publicação de Pedido de Patente U.S. N° 20020037576.

Bar-Eli, N., et al., "Preferential cytotoxic effect of Newcastle disease virus on lymphoma cells", J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122: 409-415 (1996).

Chandran and Nibert, "Protease cleavage of reovirus capsid protein μ 1 and μ 1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infection subviral particle",