(11) Número de Publicação: **PT 1486211 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 35/76 (2006.01) ***A61K 35/66*** (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01) ***A61K 38/19*** (2006.01)
A61K 39/155 (2006.01) ***A61K 39/17*** (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01) ***A61P 35/00*** (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01) ***C12Q 1/70*** (2006.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1994.04.29**

(30) Prioridade(s): **1993.04.30 US 55519**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.12.15**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.10.22**
022/2009

(73) Titular(es):
WELLSTAT BIOLOGICS CORPORATION
930 CLOPPER ROAD GAITHERSBURG, MD 20878 **US**

(72) Inventor(es):
ROBERT M. LORENCE **US**
KIRK W. REICHARD **US**

(74) Mandatário:
ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **COMPOSIÇÕES PARA TRATAMENTO DO CANCRO UTILIZANDO VÍRUS**

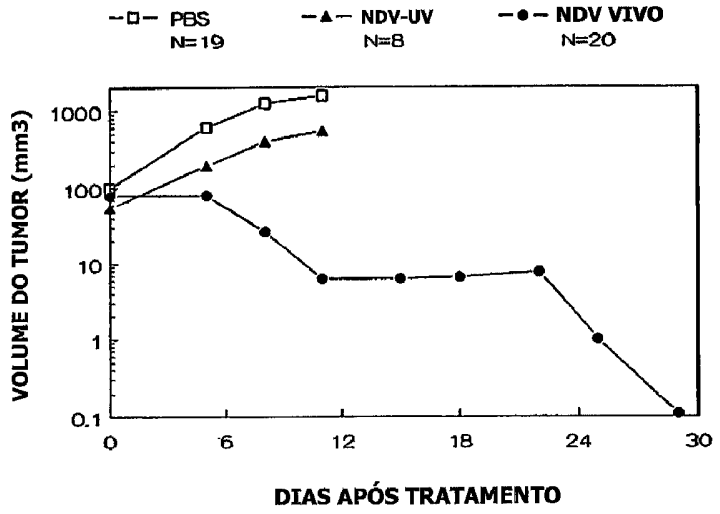
(57) Resumo:

RESUMO

"Composições para tratamento do cancro utilizando vírus"

O invento proporciona composições para tratamento do cancro num mamífero compreendendo uma quantidade eficaz de vírus, particularmente de Vírus da Doença de Newcastle ou de outro Paramixovírus. O invento proporciona também a utilização de Vírus da Doença de Newcastle no fabrico de medicamentos para o tratamento do cancro num mamífero com um tumor.

Fig. 1



DESCRIÇÃO

"Composições para tratamento do cancro utilizando vírus"

CAMPO DO INVENTO

O presente invento refere-se, em geral, à utilização de determinados vírus no fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro em mamíferos.

ANTECEDENTES DO INVENTO

1. Tratamento do Cancro

Apesar dos avanços recentes na quimioterapia e radiação, o cancro permanece a segunda doença mortal nos Estados Unidos. Haverá quase dois milhões de novos casos de cancro diagnosticados e espera-se que mais de 525000 pessoas morram de cancro em 1993. A sobrevivência global em cinco anos aproxima-se de cinquenta por cento para todos os doentes e o prognóstico permanece particularmente fraco para aqueles com tumores sólidos avançados.

2. Efeito dos Vírus no Cancro

Uma associação entre a exposição a vários vírus e a regressão do tumor tem sido o objecto de vários estudos clínicos prévios. A maioria dos vírus descritos nestes casos são patogénicos para o homem e incluem a papeira e o sarampo. O efeito dos outros vírus específicos em tipos particulares de células cancerígenas tem também sido descrito. Smith *et al.*, (1956) Cancer, 9, 1211 (efeito do vírus APC no carcinoma do cérvix); Holzaepfel *et al.*, (1957) Cancer, 10, 577 (efeito do vírus APC3 no tumor epitelial); Taylor *et al.*, (1970) J. Natl. Cancer Inst., 44, 515 (efeito do enterovírus-1 de bovino no Sarcoma-1); Shingu *et al.*, (1991) J. General Virology, 72, 2031 (efeito do enterovírus de bovino, MZ-468, em células de leucemia F-647a); Suskind *et al.*, (1957) PSEBM, 94, 309 (efeito do vírus Coxsackie B3 em células de tumor HeLa); Rukavishnikova *et al.*, (1976) Acta Virol., 20, 387 (efeito da estirpe influenza A em tumor de ascites).

As primeiras referências descreveram a regressão parcial de tumores em doentes tratados com a vacina de vírus atenuado vivo com o objectivo de os vacinar contra varíola ou raiva. Ver DePace, N.G. (1912) Ginecologia, 9, 82-88; Salmon, P. & Baix (1922) Compt. Rend. Soc. Biol., 86, 819-820. A regressão parcial dos tumores e a regressão das leucemias foi também observada durante as infecções por sarampo que ocorrem naturalmente. Ver Pasquinucci, J. (1971) Lancet, 1, 136; Gross, S. (1971) Lancet, 1, 397-398; Bluming, A.Z. e Ziegler, J.L. (1971) Lancet, 2, 105-106. Num estudo em 90 doentes com cancro intencionalmente infectados com vírus da papeira vivo, observou-se a regressão parcial de tumor em 79 casos. Ver Asada (1974) Cancer, 34, 1907-1928. No entanto, as sequelas graves da infecção com estes patogénios humanos são a principal preocupação. Além disso, o mecanismo de qualquer efeito anticanceroso não foi nunca completamente explorado pelos investigadores. Todos os efeitos observados após exposição àqueles vírus foram também temporários.

3. Efeito do NDV no Cancro

O Vírus da Doença de Newcastle ("NDV") é um membro da família Paramixovírus. Os hospedeiros naturais para o NDV são as galinhas e outros pássaros. O NDV liga-se tipicamente a certas moléculas na superfície de células hospedeiras animais, funde-se com a superfície das células e injecta o seu material genético no hospedeiro. Uma vez dentro, os genes virais dirigem as células hospedeiras para preparar cópias do vírus. Estas cópias de NDV são então libertadas para infectar outras células, que por seu lado destruem a célula hospedeira. Contrariamente a alguns vírus, o NDV não é conhecido por causar qualquer doença grave em humanos. Contrariamente a muitos outros tipos de vírus (por exemplo, herpes, hepatite, VIH), os Paramixovírus não interferem com os genes das células hospedeiras e não são reconhecidos como carcinogénicos.

A regressão temporária de tumores foi descrita num pequeno número de doentes expostos ao NDV, os quais sucumbiram eventualmente aos seus cancros. Ver, Csatary, L.K. (1971) Lancet, 2, 825. Csatary observou a regressão de um cancro gastrointestinal num avicultor durante uma epidemia de doença de Newcastle nas suas galinhas. Numa descrição anedótica

similar, Cassel, W.A. e Garret, R.E. (1965) Cancer, 18, 863-868, observaram a regressão do cancro cervical primário, que se tinha espalhado até aos nódulos linfáticos, num doente, após injecção de NDV no tumor cervical. Uma vez que o mecanismo da actividade tumoricida observada foi considerado ser imunológico, não foi realizado qualquer trabalho para dirigir a citotoxicidade directa do tumor do vírus. Em vez disso, os esforços focaram-se nos efeitos imunomoduladores do NDV. Ver, por exemplo, Murray, D.R., Cassel, W.A., Torbin, A.H., Olkowski, Z.L., & Moore, M.E (1977) Cancer, 40, 680; Cassel, W.A., Murray, D.R. & Phillips, H.S. (1983) Cancer, 52, 856; Bohle, W., Schlag, P., Liebrich, W., Hohenberger, P., Manasterski, M., Möller, P. e Schirrmacher, V. (1990) Cancer, 66, 1517-1523.

Em Derwent Abstract AN 1976-60708x descreve-se a utilização de NDV vivo para o tratamento do cancro.

Em CARPLUS Abstract AN 1992: 104333 descreve-se a injecção intramuscular de NDV atenuado para produzir interferões.

Em J. Surgical Research, Vol. 52 (1992), 448-453, descreve-se a administração subcutânea de células tumorais a ratinhos atímicos, seguida de injecção intralesional de NDV vivo ou morto por calor.

Em Surg. Forum, Vol. 43, 1992, 603-606, descreve-se a utilização do oncogene N-myc para aumentar a sensibilidade de neuroblastoma à morte por NDV.

O presente invento proporciona a utilização de Vírus da Doença de Newcastle (NDV) no fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro num mamífero com um tumor em que o medicamento é administrado intravenosamente em múltiplas doses ao referido mamífero numa quantidade suficiente para causar a regressão do tumor.

O invento proporciona uma utilização de NDV no fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro num mamífero, compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade eficaz de vírus num transportador farmaceuticamente aceitável.

O invento proporciona também o Paramixovírus em combinação com outro agente, sendo ambos administrados em quantidades suficientes para que a combinação seja eficaz contra o cancro.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 ilustra a regressão dos xenoenxertos de neuroblastoma humano IMR-32 em ratinhos atímicos após injecção intratumoral com NDV vivo (estirpe 73-T).

Figura 2 apresenta a regressão dos xenoenxertos de fibrossarcoma humano HT-1080 em ratinhos atímicos após injecção intratumoral com NDV vivo (estirpe 73-T).

Figura 3 apresenta a regressão dos xenoenxertos de carcinoma de pulmão de células grandes humanas NCI-H460 em ratinhos atímicos após injecção intratumoral com NDV vivo (estirpe 73-T).

Figura 4 apresenta a regressão dos xenoenxertos de neuroblastoma humano IMR-32 após injecções sistémicas (intraperitoneais) do NDV vivo (estirpe 73-T).

Figura 5 ilustra a eficácia da uma estirpe (M, Massa MK107) de NDV de virulência relativamente moderada com a de uma estirpe de virulência relativamente alta (73-T) para causar a regressão de tumor.

Figura 6 apresenta a regressão dos xenoenxertos de glioblastoma humano U87MG em ratinhos atímicos após injecções intratumorais com NDV vivo (estirpe 73-T).

Figura 7 apresenta a inibição do crescimento do carcinoma cervical humano KB8-5-11 em ratinhos atímicos após injecções intratumorais com NDV vivo (estirpe 73-T).

Figura 8 apresenta a regressão do carcinoma da próstata humano PC-3 em ratinhos atímicos após injecções intratumorais com NDV vivo (estirpe 73-T).

Figura 9 apresenta a inibição do crescimento do carcinoma do cólon humano HT29 em ratinhos atímicos após injecções intratumorais com NDV vivo (estirpe 73-T).

Figura 10 apresenta a inibição do crescimento do carcinoma da mama humano SK-BR-3 em ratinhos atímicos após injecções intratumorais com NDV vivo (estirpe 73-T).

Figura 11 apresenta a inibição do crescimento do carcinoma do cólon humano SW620 em ratinhos atímicos após injecções intratumorais com NDV vivo (estirpe 73-T).

Figura 12 apresenta a inibição do crescimento do carcinoma do cólon humano MM17387 em ratinhos atímicos após injecções intratumorais com NDV vivo (estirpe 73-T).

Figura 13 apresenta a regressão do sarcoma sinovial humano TH15145 em ratinhos atímicos após injecções intratumorais com NDV vivo (estirpe 73-T).

Figura 14 apresenta a regressão de um xenoenxerto de melanoma humano MEL330 em ratinhos atímicos após injecções intratumorais com NDV vivo (estirpe 73-T).

Nota: apenas a Figura 4 é ilustrativa do presente invento, sendo todas as outras figuras proporcionadas meramente para informação.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS CONCRETIZAÇÕES PRESENTEMENTE PREFERIDAS

O presente invento proporciona a utilização de determinados vírus no fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro. O vírus é um Paramixovírus, preferivelmente vírus citolíticos. No invento, o Paramixovírus é um Vírus da Doença de Newcastle ("NDV"). Como se utilizam no presente pedido de patente, os termos "vírus", "Paramixovírus" e "Vírus da Doença de Newcastle" são empregues num sentido lato e referem-se tanto aos vírus intactos como a fragmentos virais, assim como a vírus e fragmentos virais modificados genética, física ou quimicamente.

Os paramixovírus, incluindo as várias estirpes de NDV, quer citolíticas quer não citolíticas, estão publicamente disponíveis e podem ser obtidos a partir de vendedores tais como a American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD.

Os vírus empregues no invento podem ser preparados por uma variedade de métodos. Por exemplo, o NDV pode ser preparado em ovos de galinha com 8 a 10 dias de fertilização (obtidos a partir de SPAFAS, Inc., Roanoke, IL). Os métodos de isolamento do vírus são conhecidos na arte e são descritos, por exemplo, por Weiss, S.R. & Bratt, M.A. (1974) J. Virol., 13, 1220-1230. Este método é adicionalmente descrito no Exemplo #1 abaixo. O NDV pode ser obtido, utilizando-se este método de isolamento, com uma pureza de cerca de 90-95%.

Alternativamente, o vírus pode ser preparado numa cultura de células in vitro. De preferência, a cultura de células compreende células de mamíferos e, mais preferivelmente, células cancerígenas de mamíferos. Uma vantagem da utilização deste método de preparação dos vírus é a de que evita problemas associados às partículas estranhas residuais na preparação viral. As células de mamíferos contempladas por estes métodos incluem, mas não estão limitadas a, fibroblastos fetais humanos e linhas de células estabelecidas tais como fibrossarcoma humano HT1080 (publicamente disponível a partir de ATCC) ou células cancerígenas do próprio doente. As células podem ser dependentes de fixação ou independentes de fixação.

As técnicas de cultura de células que podem ser utilizadas na preparação de vírus são conhecidas na arte e podem incluir a utilização de balões de cultura estacionária com grandes áreas superficiais ou balões tipo rolo. O tipo de sistema de cultura seleccionado pode suportar, de preferência, um número relativamente grande de células.

Os meios de cultura de células que podem ser utilizados na produção de vírus são conhecidos daqueles peritos na arte. O meio inclui tipicamente uma fonte de nutrientes, antibiótico(s) e albumina ou uma fonte de soro que contém o(s) factor(es) de crescimento. Está no âmbito da arte seleccionar meios particulares e constituintes de meio adequados para as células empregues na cultura.

Um exemplo de um meio de cultura adequado para a cultura de NDV numa cultura de células in vitro é apresentado abaixo na Tabela 1:

Reagente	Fonte	Quantidade
Opti-MEM	Gibco BRL Grand Island, NY	500 ml
Soro de Bovino Fetal	Gibco BRL Grand Island, NY	50 ml
Aminoácidos Não Essenciais MEM (100x), 10mM	Gibco BRL Grand Island, NY	5 ml
Antibiótico-Antimicótico (100x), que contém 10 000 unidades de penicilina, 10 000 µg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B, por ml	Gibco BRL Grand Island, NY	5 ml
Glutamina, (100x), 200mM	Gibco BRL Grand Island, NY	5 ml

As condições de cultura incluem tipicamente a incubação a uma temperatura desejada (tal como 37°C), assim como a concentrações seleccionadas de oxigénio e dióxido de carbono. As condições de cultura particulares seleccionadas podem ser determinadas de acordo com as células empregues na cultura e a determinação de tais condições está incluída no âmbito da arte.

As células são colocadas no recipiente de cultura e deixadas incubar e crescer sob as condições de cultura seleccionadas. As células dependentes de fixação são deixadas crescer, de preferência, até à confluência ou crescimento máximo. O tempo necessário para o crescimento vai variar dependendo do tamanho do inóculo de células inicial adicionado ao recipiente de cultura e sendo utilizado o dobro do tempo da linha de células. De preferência, plaqueiam-se cerca de $3x10^3$ a cerca de $3x10^5$ células por cm^2 e deixam-se crescer durante um a cinco dias. Para a inoculação dos vírus da cultura de células, remove-se o meio das células (para células aderentes, por aspiração do meio de cultura; para células deixadas crescer em suspensão, por centrifugação da suspensão de células e aspiração do sobrenadante de células) e adiciona-se o vírus (após reconstituição) às células num volume mínimo de meio ou solução salina (tal como Solução Salina Equilibrada de Hank, Gibco) para prevenir a desidratação. Este volume alcança, de preferência, de cerca de 10 a cerca de 2500 microlitros por cm^2 de área superficial de recipiente de

cultura ou 10^5 células. A diluição preferida de inóculo de vírus alcança de cerca de 0,001 a cerca de 10 unidades infecciosas por célula, dependendo a relação óptima do vírus particular e da linha de células. O vírus é então deixado crescer durante cerca de 1 a 7 dias, sendo o período de tempo principalmente determinado pela sobrevivência residual da linha de células. Para o NDV, o tempo óptimo de colheita é de 1 a 5 dias após inoculação do vírus.

O vírus pode então ser colhido ou por remoção do sobrenadante e substituição deste por meio recente ou por meio recente com células recentes em intervalos de 12 a 48 horas ou por congelação-descongelação das células para libertar o vírus no sobrenadante. O sobrenadante pode então ser centrifugado e ultracentrifugado para recuperar o vírus numa forma relativamente pura. A pureza da preparação viral pode ser testada por determinação das proteínas e/ou por electroforese. O vírus pode então ser adicionado a um veículo farmaceuticamente aceitável, posteriormente descrito abaixo.

De acordo com o invento, é administrada uma quantidade eficaz de vírus ao mamífero. O termo “cancro” no presente invento é utilizado com um sentido lato e refere-se à condição fisiológica em mamíferos que é normalmente caracterizada por crescimento desregulado de células. Está contemplado que estes vírus possam ser utilizados para tratar uma variedade de cancros, incluindo, mas não limitados a, carcinoma dos pulmões, carcinoma da mama, carcinoma da próstata, adenocarcinoma do cólon, carcinoma cervical, carcinoma do endométrio, carcinoma dos ovários, carcinoma da bexiga, tumor de Wilm, fibrossarcoma, osteossarcoma, melanoma, sarcoma sinovial, neuroblastoma e glioblastoma. O vírus pode ser administrado ao mamífero em qualquer altura durante o decorrer da doença maligna quando se detecta o cancro, para reduzir a carga do tumor primário assim com o alastramento metastático. Alternativamente, o vírus pode administrado como medida profiláctica, antes do início ou detecção do cancro no mamífero. Está igualmente contemplado que o vírus possa ser administrado a um mamífero já tratado quanto ao cancro se aquele cancro não conseguir responder completamente ou recorrer. Preferivelmente, se um tumor for operável, o vírus é

administrado após a massa do tumor ter sido removida cirurgicamente.

Embora não completamente compreendido, pensa-se que o NDV tem actividade citolítica directa nas células cancerígenas. Pensa-se também que o NDV é capaz de diferenciar especificamente as células cancerígenas das células saudáveis, normais. Os resultados (não apresentados) indicam que os vários oncogenes (H-ras, N-ras e N-myc) que são conhecidos por conferir comportamento maligno às células cancerígenas, aumentam a susceptibilidade das células à morte por NDV. Ver, Lorence, R.M., Reichard, K.W., Cascino, C.J. *et al.*, (1992) Proc. Am. Assoc. Cancer Res., 33, 398; Reichard, K.W., Lorence, R.M., Cascino, C.J. *et al.* (1992) Surg. Forum, 43, 603-606. Adicionalmente, observou-se que o tratamento de células com ácido retinóico (vitamina A) aumenta também a lise das células cancerígenas pelo NDV. Reichard, K.W., Lorence, R.M., Katubig, B.B., *et al.* (1993) J. Pediatr. Surg., 28, 1221.

Pensa-se que a actividade citolítica por NDV seja o resultado da ligação directa do vírus à célula cancerígena. Identificou-se um componente da(s) molécula(s) da superfície celular que permite a ligação do NDV às células de galinha. Ver, Paulson, J.C., Sadler, J.E. & Hill, R.C. (1979) J. Biol. Chem., 254, 2120-2124. A molécula parece ser uma(s) glicoproteína(s) relativamente complexa(s) e/ou molécula(s) de glicolípido(s) na(s) qual(ais) os componentes de ácido siálico se arranjam numa configuração particular. É a presente convicção do Requerente que as variações nas glicoproteínas e/ou glicolípidos contendo ácido siálico na superfície das células cancerígenas possam mediar a especificidade e a actividade do NDV. Por exemplo, a sensibilidade das células cancerígenas ao NDV tem mostrado ser diminuída por pré-tratamento com neuraminidase que remove por clivagem os resíduos de ácido siálico. Ver, Reichard, K.W., Lorence, R.M., Katubig, B.B., *et al.* (1983) J. Pediatric. Surg., 28, 1221.

O vírus pode ser administrado ao mamífero num veículo farmaceuticamente aceitável. Os veículos farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos para as pessoas peritas na arte. Por exemplo, os veículos adequados para administração do vírus

podem incluir fluídos tais como água, solução salina, tampão e meio de cultura de células. Mais preferivelmente, utiliza-se uma solução salina como o veículo. Será evidente para o peritos na arte que certos veículos podem ser mais preferidos dependendo, por exemplo, da via de administração e da concentração de vírus que é administrada.

O vírus é administrado ao mamífero por injecção (por exemplo, intravenosa, intraperitoneal). O vírus é administrado sistemicamente. As dosagens e horários eficazes para administração do vírus podem ser empiricamente determinados estando a execução de tais determinações no âmbito da arte. Os requerentes verificaram que as doses para tratamento local no intervalo de cerca de $4x10^{8}$ a cerca de $4x10^{10}$ UFP de NDV por quilograma de peso corporal do mamífero, são particularmente eficazes no tratamento de tumores. Para o tratamento sistémico, os Requerentes pensam que pode ser preferível no tratamento do cancro um intervalo de cerca de $4x10^{10}$ a cerca de $4x10^{12}$ UFP por quilograma. Os peritos na arte saberão que a dose de vírus que tem que ser administrada vai variar dependendo, por exemplo, do mamífero que vai receber o vírus, do tipo de cancro, da extensão de crescimento das células cancerígenas ou da metástase, do local biológico ou compartimento corporal do(s) tumor(es), da estirpe de vírus, da via de administração e da identidade de quaisquer outros fármacos ou do tratamento a ser administrado ao mamífero, tal como radiação, quimioterapia ou tratamento cirúrgico. O intervalo óptimo entre doses múltiplas de vírus pode ser determinado empiricamente e está no âmbito da arte. A administração do vírus deve ser contínua até ser restaurada a saúde do mamífero.

Uma quantidade eficaz de vírus pode ser administrada ao mamífero em combinação com um outro agente. O vírus pode ser administrado ao mamífero como descrito acima. O outro agente administrado em combinação com o vírus pode ser uma substância que ocorre naturalmente ou sintética e, de preferência, tem actividade anticancerosa, actividade imuno-intensificadora ou actividade intensificadora de vírus.

Numa concretização, o agente é um agente citotóxico ou citostático. O agente citotóxico ou citostático pode ser um

composto quimioterapêutico conhecido na arte. Os compostos quimioterapêuticos contemplados pelo presente invento incluem, mas não estão limitados a, Tiotepa, Busulfano, Ciclofosfamida, Metotrexato, Citarabina, Bleomicina, Cisplatina, Doxorrubicina, Melfalano, Mercaptopurina, Vinblastina, 5-Fluorouracilo, Taxol e Ácido Retinóico. Os agentes citotóxicos ou citostáticos funcionam, tipicamente, por destruição das células e/ou inibição da sua multiplicação sendo, por conseguinte, úteis no tratamento do cancro.

Numa outra concretização da utilização, o agente é um anticorpo. O anticorpo pode ser um anticorpo que ocorre naturalmente ou um anticorpo biológica, química, física ou geneticamente modificado utilizando-se métodos que estão no âmbito da arte. Tais anticorpos podem intensificar a actividade anticancerosa do vírus por ligação à célula de tumor ou ao vírus depois dele estar ligado à célula de tumor.

Numa outra concretização da utilização, o agente é um agente imuno-intensificador tal como um imunoadjuvante ou citoquina. Os imunoadjuvantes e citoquinas, também referidos como “modificadores da resposta biológica”, são conhecidos na arte. Em geral, tais moléculas são úteis na estimulação ou intensificação dos mecanismos de defesa do hospedeiro sendo, por conseguinte, úteis na terapêutica anticancerosa. Exemplos de imunoadjuvantes ou citoquinas que podem ser administrados incluem, mas não estão limitados a, interferão(ões), factor estimulante de colónias (CSF), factor de necrose do tumor (TNF), factores de crescimento e interleucinas tais como IL-1, IL-2 e IL-6.

Numa outra concretização da utilização, o agente é um agente imunossupressor. O agente imunossupressor é, de preferência, um composto farmacêutico conhecido na arte. Os agentes imunossupressores contemplados pelo presente invento incluem, mas não estão limitados a, Ciclosporina A, Azatiaprina e Leflunomida e várias preparações de corticosteróides. Pensa-se que os agentes imunossupressores funcionam por bloqueio da resposta imune (mediada por células, mediada por anticorpos e mediada por citoquinas) contra vírus que pode intensificar a actividade anticancerosa do vírus.

O agente preferencialmente é administrado num veículo farmaceuticamente aceitável tal como água, solução salina ou tampão. Os modos de administração do agente ao mamífero incluem mas não estão limitados à administração oral ou injecção (por exemplo, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular). Está no âmbito da arte determinar os veículos aceitáveis e os meios adequados de administração do agente. O paramixovírus e o agente podem ser administrados pelos mesmos meios ou por meios diferentes. Por exemplo, o vírus pode ser administrado ao mamífero por injecção intravenosa enquanto que o outro agente é oralmente administrado ao mamífero.

O vírus e o agente podem também ser encapsulados num lipossoma ou numa outra estrutura semelhante a saco farmaceuticamente aceitável. Alternativamente, o vírus e o agente podem ser acoplados por técnicas de conjugação ou ligação conhecidas na arte.

As dosagens e horários eficazes para administração do vírus estão descritos acima As dosagens e horários eficazes para administração do outro agente em combinação com o vírus podem ser empiricamente determinados estando a realização de tais determinações no âmbito da arte. Antes da administração do vírus e do outro agente, é preferível determinar os níveis de toxicidade de todos os componentes de modo a evitar efeitos indesejáveis. Dependendo do agente administrado, o vírus e o agente podem ter actividade aditiva ou sinérgica. Por exemplo, a administração do vírus pode reduzir a dosagem eficaz necessária do outro agente. Os peritos na arte saberão que a dose do outro agente administrado vai variar, dependendo, por exemplo, do animal a ser tratado, do tipo de cancro, da localização sistémica do cancro e da quantidade de vírus a ser administrado ao mamífero. É possível que tenham que ser administradas múltiplas doses do outro agente em combinação com o vírus. O agente pode ser administrado em intervalos de tempo diferentes da administração de vírus. Os intervalos da administração podem ser empiricamente determinados estando tal determinação no âmbito da arte. A administração do vírus e do agente deve continuar até ser restituída a saúde ao animal.

EXEMPLOS

Exemplo #1: Tratamento de tumores humanos em ratinhos atímicos com NDV intralesional (exemplo meramente informativo)

Os ratinhos Balb-c atímicos fêmea foram obtidos a partir da Life Sciences, Incorporated, St. Petersburg, FL e do Charles River Laboratories, Wilmington, MA. Eles foram alojados numa sala isolada em gaiolas filtradas, esterilizadas, sendo-lhes dada ração esterilizada por autoclavagem e água *ad libitum*. O tratamento destes animais e os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelos Institutional Animal Care Committees, Cook County Hospital e Rush-Presbyterian-St. Luke's Medical Center, Chicago, IL. Os ratinhos foram obtidos com aproximadamente quatro semanas de idade e deixados aclimatizar ao seu novo ambiente durante uma semana.

As linhas de células de tumores foram obtidas congeladas a partir da American Type Culture Collection, Rockville, MD e derivavam de tumores humanos. As linhas de células foram mantidas em Opti-MEM (Gibco-BRL, Grand Island, NY) contendo 2,4 g/l de bicarbonato de sódio, soro de vitelo fetal inactivado por calor a 10% e diluições a 1/100 das seguintes soluções a 100x: aminoácidos não essenciais MEM (número de catálogo Gibco BRL 320-1140AG); L-glutamina (número de catálogo Gibco BRL 320-5030AG); e antibiótico-antifúngico (número de catálogo Gibco BRL 600-5240AG). As células foram colocadas em balões de cultura de 225 mm^2 e incubadas a 37°C em CO_2 a 5% para permitir o crescimento celular adequado. As células foram então colhidas por tratamento rápido com tripsina a 0,25% (Gibco BRL, Grand Island, NY), lavadas em meio livre de soro e contadas. As células foram então colocadas em meio livre de soro, numa concentração de $1x10^7$ células/0,1 mililitro em preparação para injecção nos animais.

Sob condições de limpeza, as células de tumor foram então implantadas no espaço subcutâneo do dorso dos animais de experiência, por injecção de 0,1 ml de solução contendo $1x10^7$ células, com uma agulha de calibre 25. Os animais foram

então colocados de novo nas suas gaiolas e as células de tumor foram deixadas crescer nos animais.

Após aproximadamente 10 dias, obtiveram-se tumores de 6,5 mm de diâmetro ou maiores em cerca de 90% dos animais. Os animais portadores de tumores de, pelo menos, 6,5 mm de diâmetro maior, foram divididos ao acaso em três grupos, marcados e as dimensões dos tumores cuidadosamente registadas por um observador independente.

A estirpe de NDV 73-T foi obtida a partir de William A. Cassel, Atlanta, Georgia e preparada como se segue. Aproximadamente 1000 unidades formadoras de placa (UFP) de partículas de vírus vivo foram injectadas em embriões de pintainho com 10 dias de idade (SPAFAS, Inc., Roanoke, IL). Os ovos foram incubados durante 48 horas, tempo durante o qual o vírus replicou rapidamente, matando a maioria dos ovos. O fluído alantóico foi então colhido a partir dos embriões. Os eritrócitos, as membranas embrionárias e os detritos de casca de ovo contaminantes foram removidos do fluído alantóico por duas centrifugações a baixa velocidade, a 7520xg durante 15 minutos cada. O sobrenadante contendo o vírus foi então ultracentrifugado a 50 000xg, durante 18 horas. A pelota de vírus resultante foi então ressuspensa em Solução Salina Equilibrada com Hank (HBSS) (Gibco BRL, Grand Island, NY). Preparou-se um gradiente descontínuo de sacarose a concentrações de 20% e 55% e a suspensão de vírus foi colocada no gradiente e centrifugada durante 1 hora a 75 000xg. O lote de NDV purificado foi colhido a partir da interface a 20%-55% e armazenado a -80°C.

A dose de vírus é normalmente expressa em unidades formadoras de placa (UFP) ou no número de partículas de vírus infecciosos que são capazes de replicar nelas e lisar as células. As UFP foram medidas num teste de placa. As monocamadas de células de fibrossarcoma humano HT 1080 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) ou de células de embrião de pintainho (SPAFAS, Inc., Roanoke, IL) foram formadas em placas de cultura de tecidos de plástico de 50 mm, em meio de cultura de células MEM enriquecido com aminoácidos não essenciais, glutamina, antibiótico-antimicótico e soro de vitelo fetal inactivado por calor a

10%. Adicionaram-se às monocamadas, diluições em série de vírus em Solução Salina Equilibrada com Hank (HBSS) e as partículas de vírus foram deixadas adsorver durante 45 minutos à temperatura ambiente. Quando se utilizaram células de embriões de pintainho, as monocamadas foram então seladas com uma mistura de Bacto-Agar a 0,9% (Difco, Detroit, MI) em meio de cultura. Quando se utilizaram células HT 1080, apenas foi necessário meio de células. As monocamadas foram então incubadas a 37°C em CO_2 a 5%, durante 18 horas (para as células HT 1080) ou 2 dias (para as células de embrião de galinha). Todo o ágar foi removido e as células foram fixadas com metanol a 100% e coradas com violeta de cristal a 0,2%.

As áreas límpidas na monocamada, denominadas placas, representam o efeito lítico de uma partícula de vírus infeccioso após replicação na monocamada de células. O número de placas foi contado e a UFP/ml foi calculada com base no factor de diluição para aquela placa.

O lote de NDV purificado foi diluído numa solução salina (por exemplo, solução salina tamponada com fosfato, PBS) a uma concentração de $1x10^7$ UFP/0,1 ml. A solução foi dividida em dois grupos sendo um tratado por exposição à luz ultravioleta para inactivar o genoma viral. Foi também preparada uma terceira alíquota de solução salina isolada. O vírus morto por UV e a solução salina completa serviram como controlos.

Os três grupos de animais foram tratados cada um, como se segue, com uma das três soluções acima descritas. O animal portador de tumor foi cuidadosamente limpo com álcool e a solução de tratamento foi uniformemente injectada no tumor utilizando-se uma agulha de calibre 25 e seringa de tuberculina. Os animais foram então colocados, de novo, nas suas gaiolas respectivas e observados. Os animais foram examinados de três em três dias, por um observador independente cego, que registou o tamanho do tumor de cada animal em cada grupo e calculou o volume do tumor $\{(\pi xLxHxW)/6\}$.

Os resultados destas experiências estão sumariados nas Figs. 1-3. Os animais tratados com NDV vivo experimentaram a regressão completa do tumor em 30 dias de tratamento, enquanto

que os animais tratados com vírus inactivado por UV ou solução salina isolada tinham um crescimento que não diminui dos seus tumores.

No caso do neuroblastoma (IMR-32) (Fig. 1) observou-se a regressão completa do tumor em 18 dos 20 ratinhos tratados uma vez com NDV vivo. Os tumores nos outros dois ratinhos regrediram, mas não completamente, requerendo um segundo tratamento 10 dias mais tarde para regressão completa. No 23° dia, um tumor que tinha desaparecido completamente recomeçou a crescer mas um segundo tratamento com vírus no 23° dia conduziu a uma regressão completa duradoura. Não se observou qualquer regressão do tumor em qualquer um dos 8 ratinhos tratados com NDV morto por UV ou em qualquer um dos 19 ratinhos tratados com solução salina [$P<0,001$ (por teste exacto de Fisher) comparado com o grupo tratado com NDV vivo].

A Fig. 2 apresenta a terapêutica intralesional de xenoenxertos de fibrossarcoma humano HT 1080 estabelecidos ($\geq 0,6$ cm) em ratinhos atímicos utilizando-se NDV (N=10, 10^7 UFP) ou controlo de solução salina (PBS, N=9). Após um único tratamento com NDV vivo, 8 dos 10 tumores regrediram completamente (os tamanhos médios destes 8 tumores são registados separadamente). Os outros dois tumores mantiveram os seus tamanhos entre os dias 2 e 24 (e os seus tamanhos médios são registados separadamente). O crescimento de tumor que não diminui foi observado em todos os nove ratinhos tratados com placebo [$P<0,005$ (por teste exacto de Fisher) para regressão do tumor comparada com o grupo que recebe NDV].

A Fig. 3 apresenta a terapêutica intralesional dos xenoenxertos de carcinoma de células grandes do pulmão humano NCI-H460 estabelecido em ratinhos atímicos utilizando-se NDV vivo (N=3, 10^7 UFP) ou controlo de solução salina (N=1). Os volumes de tumor são registados separadamente numa escala logarítmica para cada um destes quatro ratinhos em função do tumor após tratamento. A regressão completa do tumor ocorreu em 2 dos 3 ratinhos tratados com NDV vivo. O tumor no ratinho tratado com solução salina continuou a crescer sem diminuir.

Em resumo, estes exemplos mostram que uma dose de NDV, administrada intralesionalmente a ratinhos atímicos, causa a

erradicação completa e permanente de uma ampla variedade de tumores humanos, que crescem sem diminuir nos animais de controlo. O tratamento do NDV com uma curta exposição à radiação por UV, que danifica o material genético de modo a que o vírus não possa replicar mas possa ainda ligar-se, não foi mais eficaz para causar a regressão do tumor do que o tratamento com a solução salina isolada. Os animais tratados com NDV vivo foram seguidos durante o resto da sua vida natural tendo sido observadas muito poucas recorrências de tumores em qualquer um dos animais. No entanto, os tumores recorrentes, regrediram completamente após um segundo tratamento local de NDV. Adicionalmente, não foram observados quaisquer efeitos indesejáveis do tratamento do vírus em qualquer um dos animais.

Exemplo #2: Tratamento dos tumores humanos em ratinhos atímicos utilizando terapêutica sistémica com NDV.

Os ratinhos atímicos foram injectados com xenoenxertos de tumor humano como descrito no Exemplo #1. Quando se atingiram tumores superiores a 6 mm de diâmetro, os animais foram divididos em três grupos. O NDV foi preparado (ver Exemplo #1) em concentrações de $1x10^8$ UFP/0,3 ml ou $1x10^9$ UFP/0,3 ml de solução salina. A solução de controlo tinha um volume igual de solução salina isolada.

Os abdómens dos animais foram cuidadosamente lavados com álcool e o NDV foi intraperitonealmente injectado utilizando-se uma agulha de calibre 25. Um conjunto experimental de ratinhos (N=3) recebeu uma única injecção de NDV na dose mais elevada (10^9 UFP), enquanto que o outro conjunto de 4 ratinhos recebeu injecções de 10^8 UFP três vezes por semana. Os animais de controlo receberam injecções de solução salina. Os animais foram então observados e os tamanhos dos tumores foram seguidos como descrito para o Exemplo #1.

Os resultados estão sumariados na Fig. 4. Seis dos 7 animais tratados com NDV vivo intraperitoneal experimentaram a regressão completa dos seus tumores no 52° dia, enquanto que os animais tratados com solução salina isolada experimentaram um crescimento de tumor que não diminui. A regressão completa do tumor foi observada em todos os ratinhos tratados apenas

uma vez com 10^9 UFP de NDV (--●--) e em 3 dos 4 ratinhos tratados várias vezes com 10^8 UFP de NDV vivo (--■--). Os volumes de tumor para o único ratinho tratado várias vezes com 10^8 UFP de NDV que não apresentou uma regressão completa do tumor é registado separadamente (--♦--). Todos os tumores tratados com PBS (--o--) isolado apresentam uma progressão marcada do tumor ($P<0,0025$, teste exacto de Fisher).

Os resultados demonstram que o NDV é eficaz no tratamento do cancro quando sistemicamente administrado. Não foram observados quaisquer efeitos indesejáveis nos animais tratados com NDV vivo.

Exemplo #3: Tratamento de tumores humanos em ratinhos atímicos utilizando estirpes atenuadas de NDV (exemplo meramente informativo)

A estirpe de NDV 73-T foi obtida e preparada como descrito no Exemplo #1. A estirpe de NDV M (Massa - MK107) é uma estirpe menos virulenta do que a 73-T e foi obtida a partir de Dr. Mark Peeples, Rush-Presbyterian-St. Luke's Medical Center, Chicago, IL. A estirpe M foi replicada de uma forma similar à descrita no Exemplo #1 para a estirpe de NDV 73-T.

Os animais atímicos foram subcutaneamente injectados com células de tumor HT1080 humano, como acima descrito. Deixaram-se desenvolver tumores neles com, pelo menos, 6,5 mm de diâmetro altura em que foram divididos ao acaso em três grupos registando-se os tamanhos dos seus tumores.

Os animais de um grupo foram intralesionalmente injectados com $1,0x10^8$ UFP de estirpe de NDV 73-T em 0,1 ml de solução salina, como descrito no Exemplo #1. O segundo grupo foi intralesionalmente injectado com $1,0x10^8$ UFP de estirpe de NDV M em 0,1 ml de solução salina. O último grupo foi injectado com 0,1 ml de solução salina isolada. Os animais foram então observados registando-se independentemente os tamanhos dos seus tumores, de três em três dias, como descrito no Exemplo #1 acima.

Os resultados são apresentados na Fig. 5. Como no Exemplo #1, os tumores intralesionalmente tratados com a estirpe de NDV 73-T desapareceram completamente. Dois dos três tumores intralesionalmente tratados com a estirpe M desapareceram similarmente em menos de três semanas. Não ocorreu qualquer regressão nos ratinhos de controlo tratados com solução salina.

Exemplo #4: Testes *in vitro* que avaliam o efeito do NDV nas células cancerígenas humanas.

O NDV (estirpe 73-T, preparada como descrito no Exemplo #1) foi testado com as linhas de células cancerígenas humanas indicadas abaixo para determinar a sensibilidade de cada um dos tipos de células ao NDV.

KB-8-5-11 Carcinoma Cervical
SW626 Carcinoma dos Ovários
SK-OV-3 Carcinoma dos Ovários
A172 Glioblastoma (cancro cerebral)
HT1080 Sarcoma (fibrossarcoma)
KHOS Sarcoma (osteossarcoma)
IMR-32 Neuroblastoma
SW620 Carcinoma do cólon
HT29 Carcinoma do cólon
NCI-460 Carcinoma dos pulmões (células grandes)
NCI-H510A Carcinoma dos pulmões (células pequenas)
SK-MEL-3 Melanoma
SK-MEL-28 Melanoma
SCC25 Carcinoma das células escamosas da cabeça e pescoço
MDMBA468 Carcinoma da mama
MDMBA157 Carcinoma da mama
SKBR3 Carcinoma da mama
PC3 Carcinoma da próstata
G104 Tumor de Wilm

À excepção das linhas de células de Carcinoma Cervical KB-8-5-11 e Sarcoma (osteossarcoma) KHOS, todas as linhas de células foram obtidas a partir de ATCC, Rockville, Maryland. A linha de células de Carcinoma Cervical KB-8-5-11 foi obtida a partir de Dr. John Coon, Rush University, Chicago, Illinois, e a linha de células de Sarcoma (osteossarcoma) KHOS foi obtida

a partir de Dr. Warren Knudson, Rush University, Chicago, Illinois. As células e o NDV foram testados de acordo com o teste de placa descrito no Exemplo #1, com excepção para a utilização de maiores multiplicidades de infecção (alcançando de 0,01 a 10). Todos os testes foram realizados em paralelo com culturas de controlo tratadas com meio isolado.

Os resultados dos testes de placa mostram que todos os tipos de células cancerígenas eram susceptíveis à morte celular por NDV. A citólise foi observada 1 a 3 dias após inoculação do vírus e em todos os casos foi observada por microscopia de contraste de fases que consiste na desintegração da membrana celular e destacamento celular.

Exemplo #5: Tratamento dos tumores de células cancerígenas humanas em ratinhos atímicos utilizando terapêutica intralesional com NDV (exemplo meramente informativo).

As experiências *in vivo* foram realizadas de acordo com os métodos e procedimentos descritos no Exemplo #1 com as seguintes excepções: (1) os ratinhos Balb-C atímicos macho obtidos a partir de Life Sciences foram utilizados como hospedeiros para as células de carcinoma da próstata PC3; os ratinhos fêmea foram utilizados como hospedeiros para todas as outras células cancerígenas testadas; (2) os tecidos de tumor identificados como carcinoma do cólon MM17387, sarcoma sinovial TH14145 e melanoma MEL 330 foram obtidos a partir de espécimes de patologia cirúrgica de doentes com cancro do Rush-Presbyterian-St. Luke's Medical Center e passados como explantes de tumores em ratinhos atímicos (Ver, Sharkey, *et al.*, (1978) The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research (Eds.: J. Fogh & B.P. Giovanella), Academic Press, New York, Volume 1, pgs. 187-214) e tratados com NDV ou solução salina de controlo na primeira ou segunda passagem. As células de carcinoma cervical KB-8-5-11 foram obtidas a partir de Dr. John Coon, Rush University, Chicago, Illinois. Todas as outras linhas de células de tumor descritas abaixo e nas Figs. 6-14 foram obtidas a partir de ATCC, Rockville, Maryland.

Os animais tratados com NDV vivo experimentaram a regressão do tumor ou a estabilização em 30 dias de tratamento, enquanto que os animais tratados com vírus

inactivado por UV ou solução salina isolada tinham um crescimento que não diminuiu dos seus tumores. Os resultados *in vivo* mostraram que uma única dose de NDV intralesionalmente administrada a ratinhos atímicos causou a regressão ou inibição do crescimento de uma ampla variedade de tumores de células cancerígenas e que aqueles tumores de células cancerígenas cresceram sem diminuírem em animais de controlo. Não se observaram quaisquer efeitos secundários do tratamento com vírus em qualquer um dos animais. Os resultados das experiências *in vivo* estão sumariados nas Figuras 6-14.

No caso do glioblastoma (U87MG) (Fig. 6), observou-se a regressão completa do tumor em 4 dos 4 ratinhos tratados uma vez com NDV vivo. Não se observou qualquer regressão do tumor num ratinho tratado com PBS.

A Fig. 7 apresenta a terapêutica intralesional de xenoenxertos de carcinoma cervical KB8-5-11 estabelecido que utiliza NDV vivo (N=12, 10^7 UFP), NDV morto por UV (N=12) ou controlo de solução salina (PBS, N=12). Após uma única injecção de NDV vivo, observou-se uma inibição marcada do crescimento em todos os 12 ratinhos. Observou-se um crescimento de tumor que não diminuiu em todos os 12 ratinhos tratados com solução salina. Observou-se uma ligeira inibição do crescimento no ratinho tratado com vírus morto por UV.

A Fig. 8 apresenta a regressão de quatro xenoenxertos de carcinoma da próstata humano NPC-3 após injecção intratumoral com NDV vivo. Os tumores nos ratinhos tratados com PBS continuaram a crescer sem diminuírem.

As Figs. 9, 10 e 11 apresentam a inibição do crescimento dos xenoenxertos do carcinoma do cólon HT29, carcinoma da mama SK-BR-3 e carcinoma do cólon SW620 após injecção com NDV vivo comparativamente ao controlo de solução salina.

A Fig. 12 apresenta a inibição do crescimento de três xenoenxertos de carcinoma do cólon MM17387 (na segunda passagem do doente) após injecção com NDV vivo comparativamente ao controlo de solução salina. Os três ratinhos intratumoralmente tratados com NDV morto por UV mostraram um menor grau de inibição de crescimento.

A Fig. 13 apresenta a terapêutica intralesional de xenoenxertos de sarcoma sinovial TH14145 humano de baixa passagem (passagem #1 ou 2) estabelecida em ratinhos atímicos. Observou-se uma regressão de tumor superior a 90% em seis dos 9 ratinhos tratados com NDV vivo. Não se observou qualquer regressão de tumor em qualquer um dos quatro ratinhos tratados com solução salina.

A Fig. 14 apresenta a regressão de um único xenoenxerto de melanoma humano MEL330 num ratinho atímico após injecção intratumoral com NDV. Observou-se a progressão de tumor no ratinho tratado com solução salina.

Lisboa, 2009-01-21

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de Vírus da Doença de Newcastle (NDV) no fabrico de um medicamento para o tratamento do cancro num mamífero com um tumor em que o medicamento é administrado intravenosamente em múltiplas doses ao referido mamífero numa quantidade suficiente para causar a regressão do tumor.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido tumor é seleccionado dos grupos que consistem em: carcinoma pulmonar, carcinoma da mama, carcinoma da próstata, adenocarcinoma do cólon, carcinoma cervical, carcinoma do endométrio, carcinoma dos ovários, carcinoma da bexiga, tumor de Wilm, fibrossarcoma, osteossarcoma, melanoma, sarcoma sinovial, neuroblastoma e glioblastoma.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o referido tumor é um adenocarcinoma do cólon.

4. Utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o referido tumor é um melanoma.

5. Utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o referido tumor é um neuroblastoma.

6. Utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o referido tumor é um glioblastoma.

7. Utilização de acordo com a reivindicação 2, em que o referido tumor é um carcinoma cervical.

8. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que referido tumor tem um diâmetro superior a 6 milímetros.

9. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou a reivindicação 2, em que o referido tumor é metastático.

10. Utilização de acordo com qualquer reivindicação antecedente, em que o referido Vírus da Doença de Newcastle é da estirpe Mass MK107.

11. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1-9, em que o referido Vírus da Doença de Newcastle é da estirpe 73-T.

12. Utilização de acordo com qualquer reivindicação antecedente, em que a quantidade de Vírus da Doença de Newcastle administrada sistemicamente é de cerca de 4×10^{10} a 4×10^{12} UFP/kg.

13. Utilização de acordo com qualquer reivindicação antecedente, em que o referido Vírus da Doença de Newcastle (NDV) é isolado de fluido alantóico.

14. Utilização de acordo com qualquer reivindicação precedente, em que o referido Vírus da Doença de Newcastle (NDV) é isolado do meio de cultura.

15. Utilização de acordo com qualquer reivindicação antecedente em que o referido medicamento é administrado em combinação com um agente quimioterapêutico.

16. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1-14 em que o referido medicamento é administrado em combinação com uma citoquina.

17. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1-14 em que o referido medicamento é administrado em combinação com um agente imunossupressor.

18. Utilização de acordo com qualquer reivindicação antecedente, em que o referido NDV está numa forma purificada.

Lisboa, 2009-01-21

Fig. 1

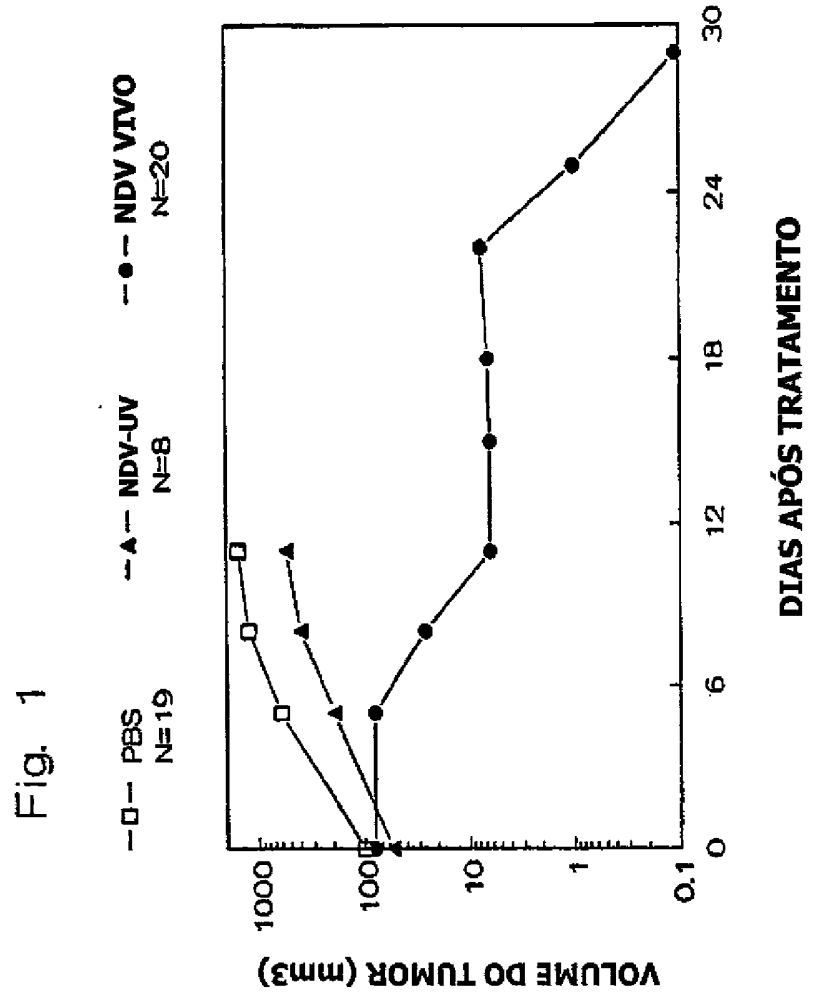

PBS N=19
NDV-UV N=8
NDV VIVO N=20
VOLUME DO TUMOR (mm3)
1000
100
10
1
0.1
0
6
12
18
24
30
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 2

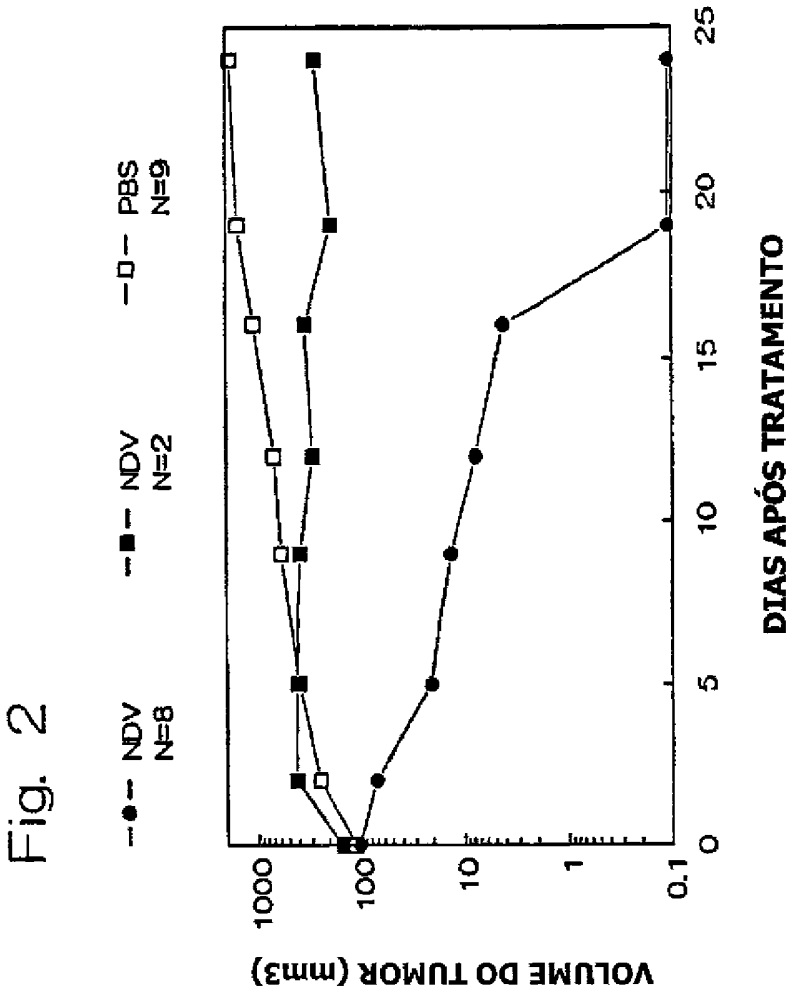

NDV N=8
NDV N=2
PBS N=9
VOLUME DO TUMOR (mm3)
1000
100
10
1
0.1
0
5
10
15
20
25
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 3

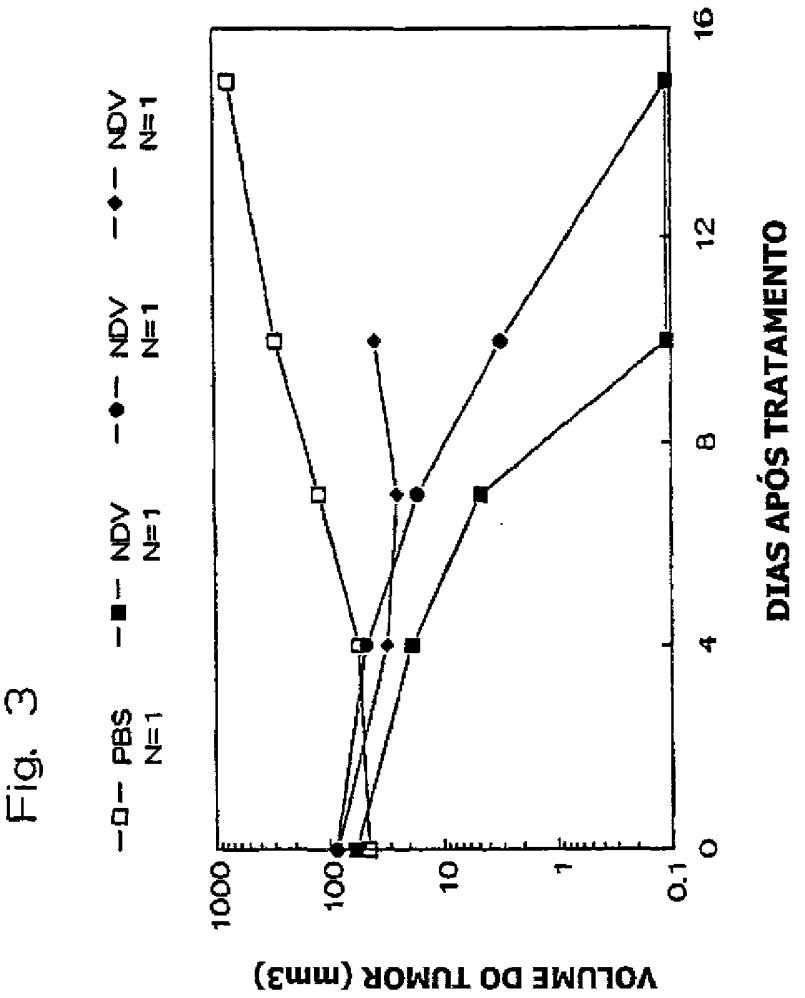

PBS N=1
NDV N=1
NDV N=1
NDV N=1
VOLUME DO TUMOR (mm3)
1000
100
10
1
0.1
0
4
8
12
16
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 4

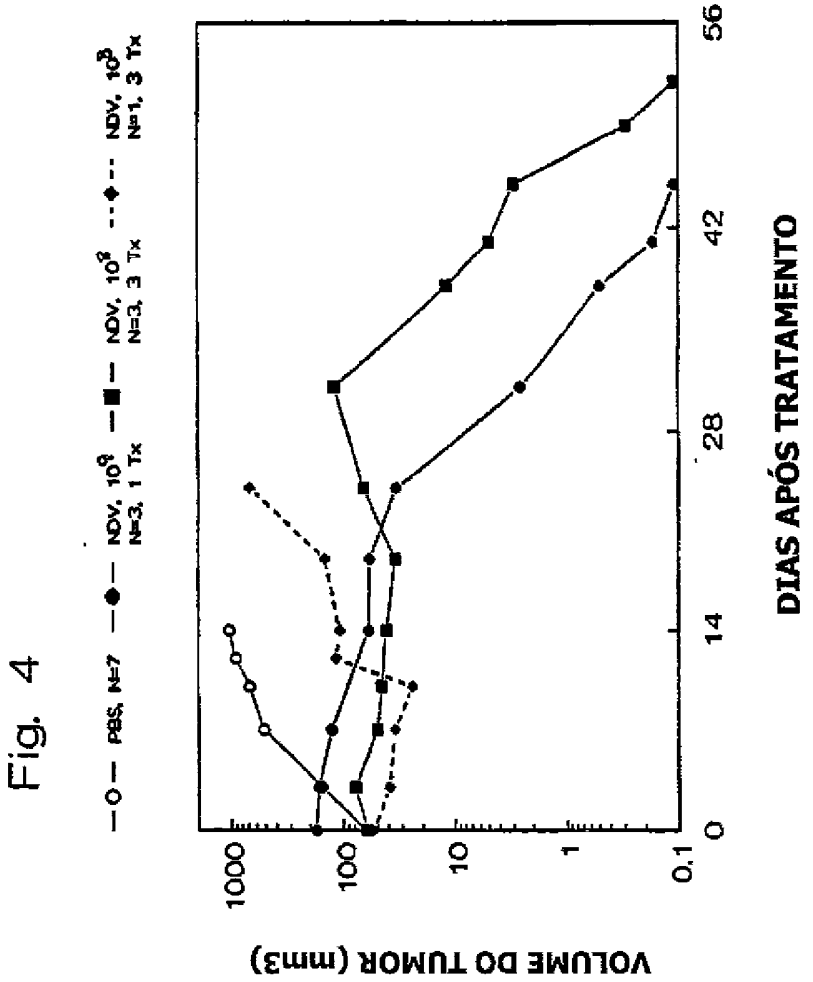

—O— PBS, N=7
—●— NDV, 10^9 N=3, 1 Tx
—■— NDV, 10^8 N=3, 3 Tx
--◆-- NDV, 10^8 N=1, 3 Tx
VOLUME DO TUMOR (mm3)
1000
100
10
1
0,1
0
14
28
42
56
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 5

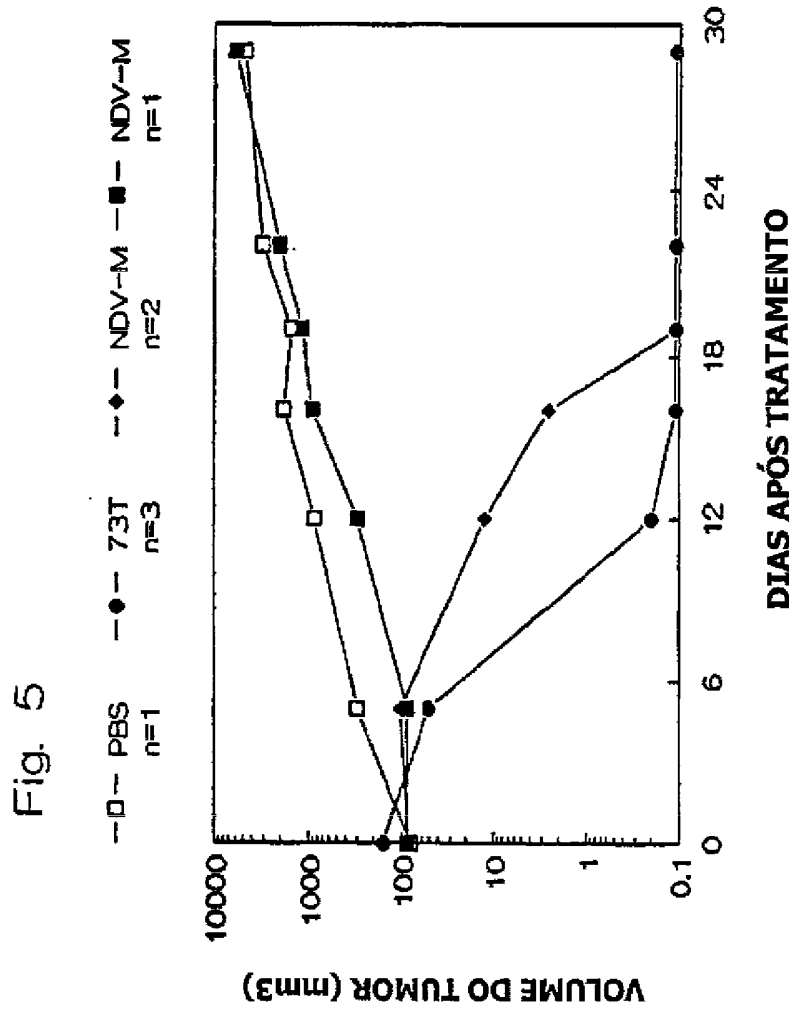

PBS n=1
73T n=3
NDV-M n=2
NDV-M n=1
VOLUME DO TUMOR (mm3)
10000
1000
100
10
1
0.1
0
6
12
18
24
30
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 6

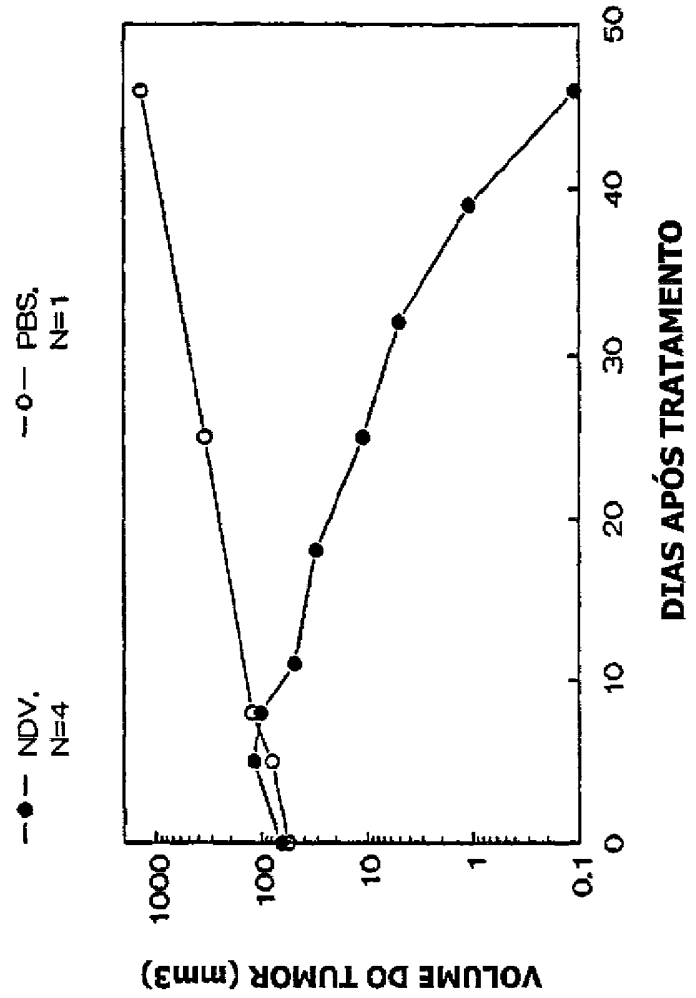

—●— NDV, N=4
—o— PBS, N=1
VOLUME DO TUMOR (mm3)
1000
100
10
1
0.1
0
10
20
30
40
50
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 7

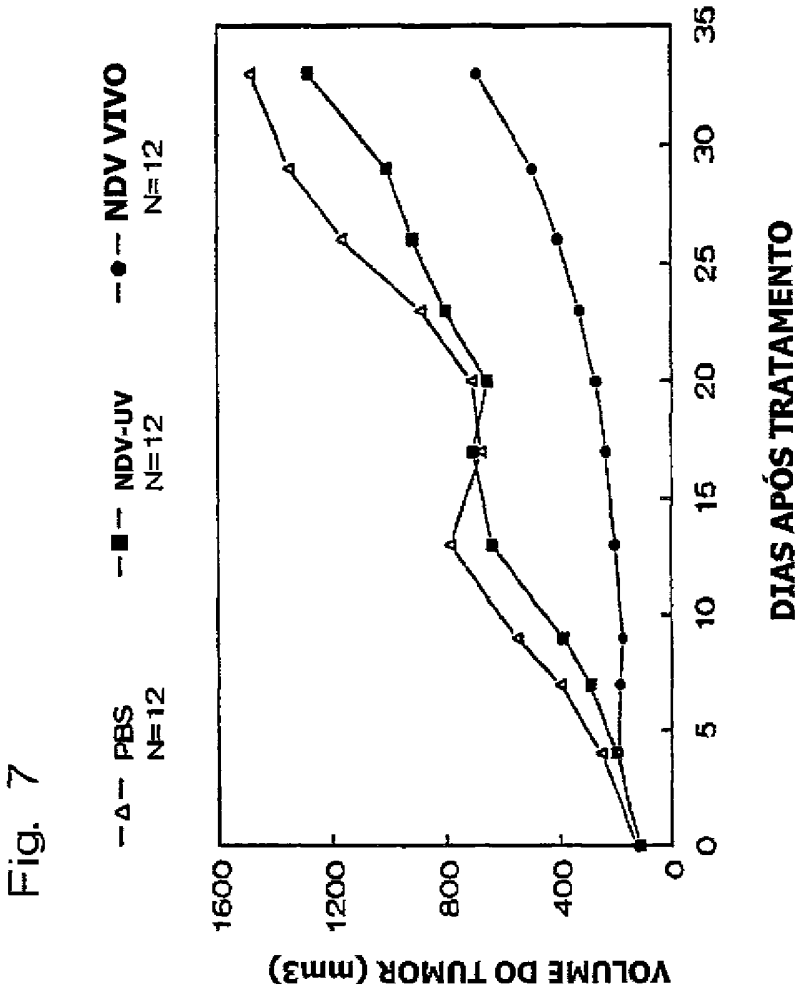

PBS N=12
NDV-UV N=12
NDV VIVO N=12
VOLUME DO TUMOR (mm3)
1600
1200
800
400
0
0
5
10
15
20
25
30
35
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 8

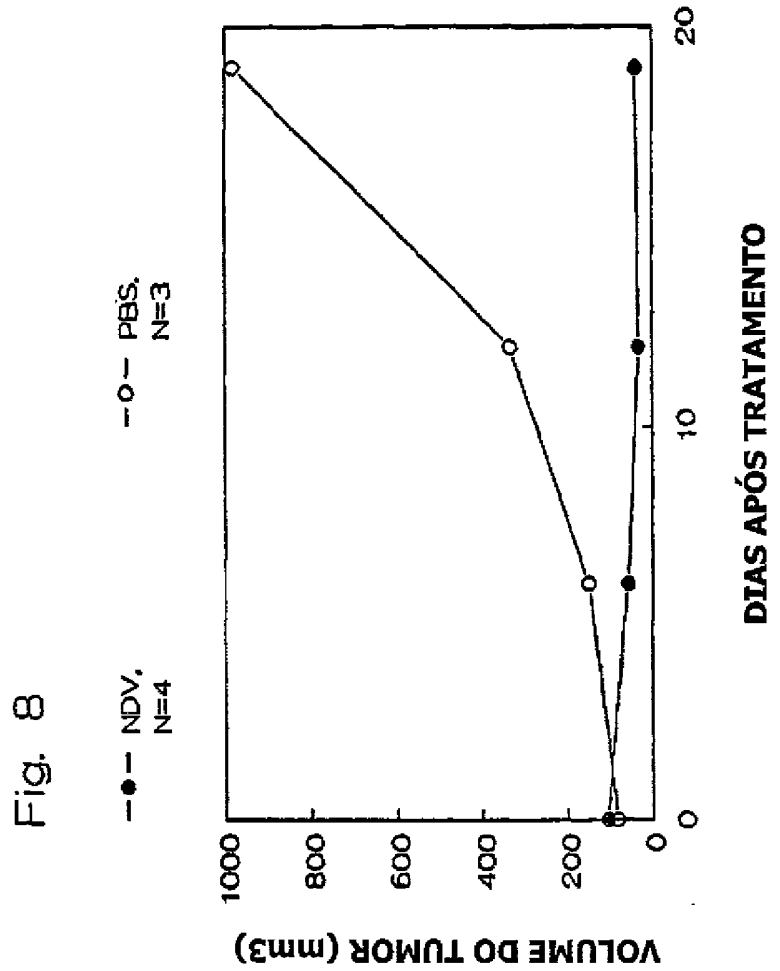

-●- NDV, N=4
-o- PBS, N=3
VOLUME DO TUMOR (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 9

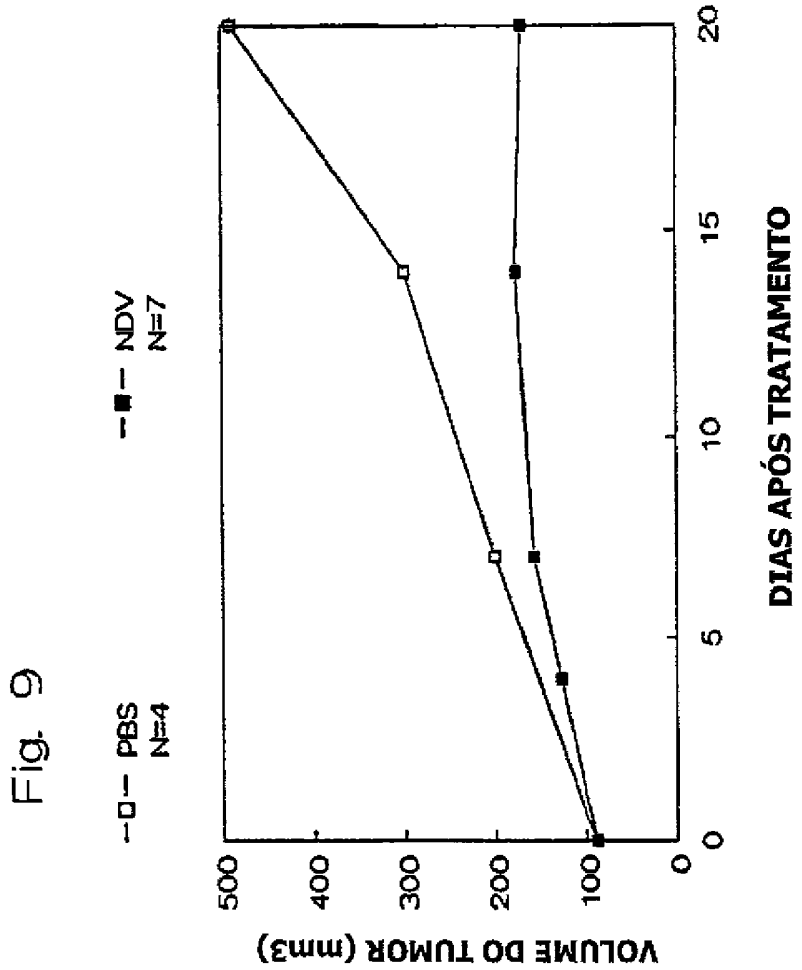

--□-- PBS N=4
--■-- NDV N=7
VOLUME DO TUMOR (mm3)
500
400
300
200
100
0
0
5
10
15
20
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 10

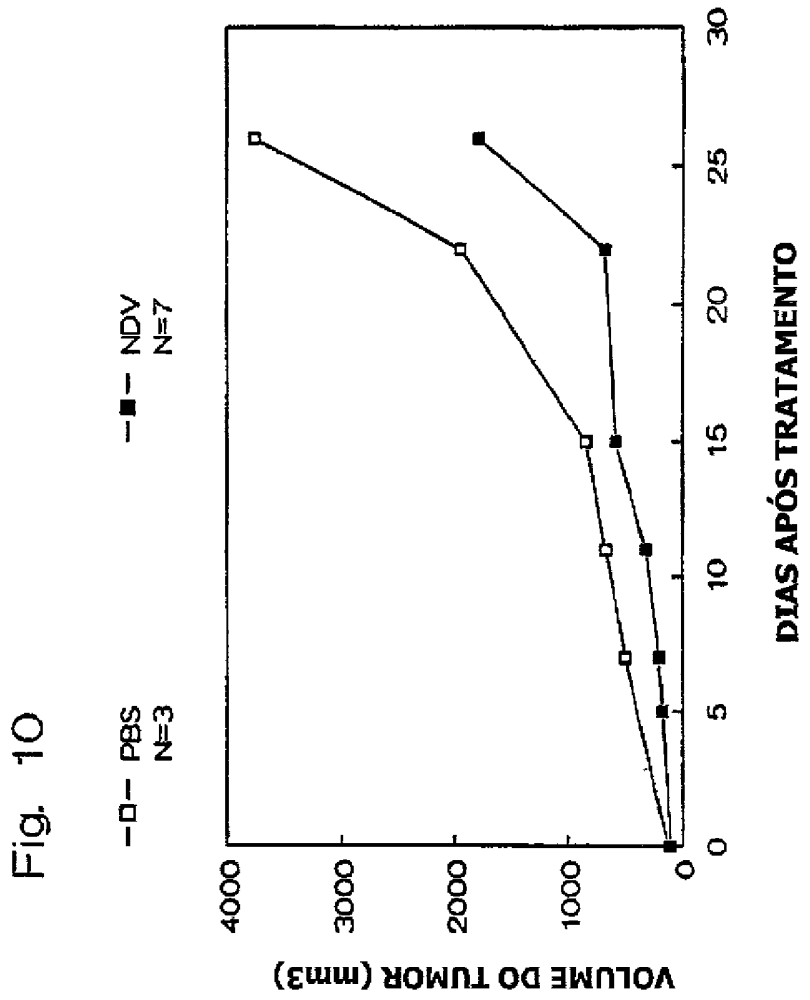

-□- PBS N=3
-■- NDV N=7
VOLUME DO TUMOR (mm3)
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
30
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 11

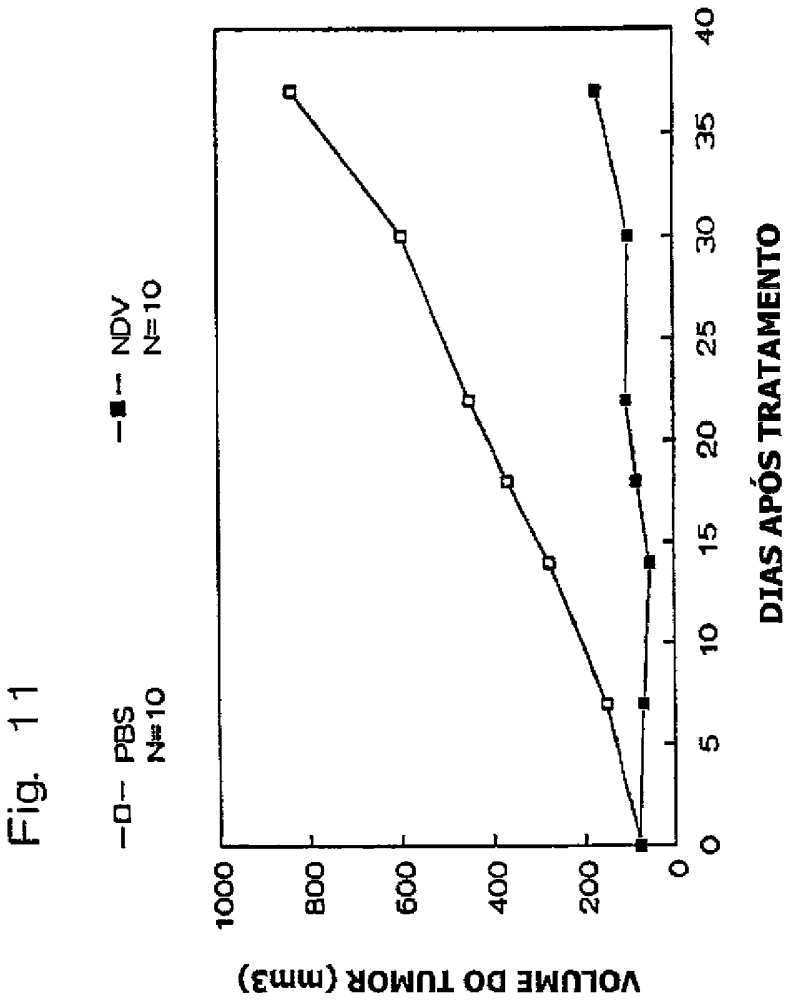

—□— PBS N=10
—■— NDV N=10
VOLUME DO TUMOR (mm3)
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 12

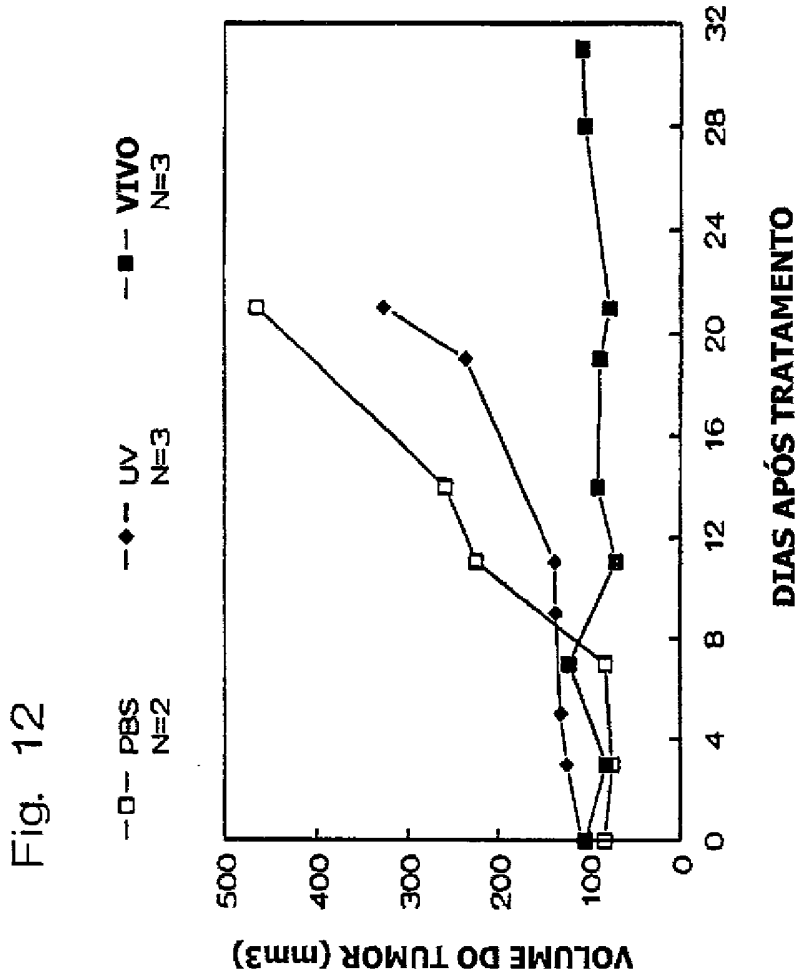

PBS N=2
UV N=3
VIVO N=3
VOLUME DO TUMOR (mm3)
500
400
300
200
100
0
0
4
8
12
16
20
24
28
32
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 13

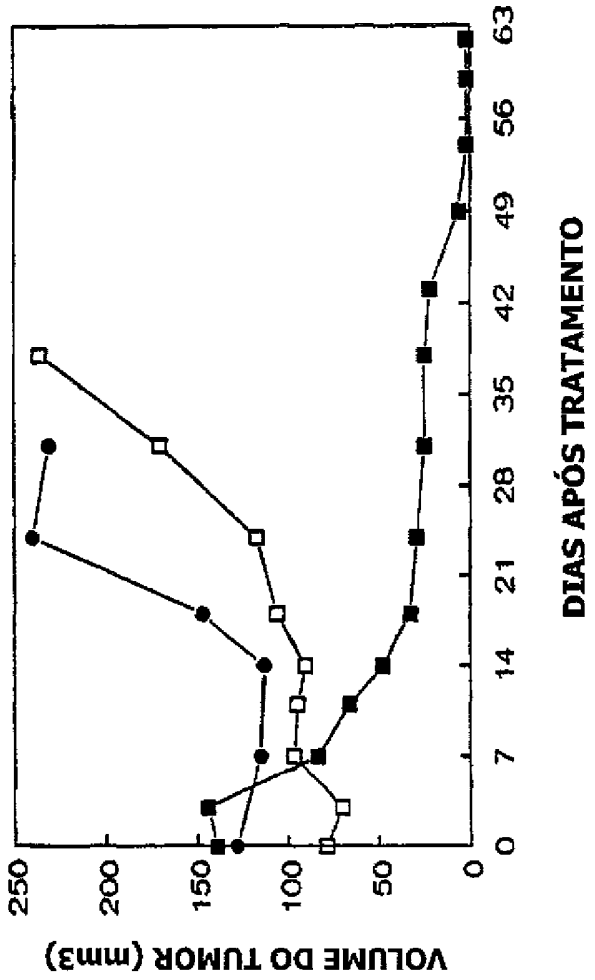
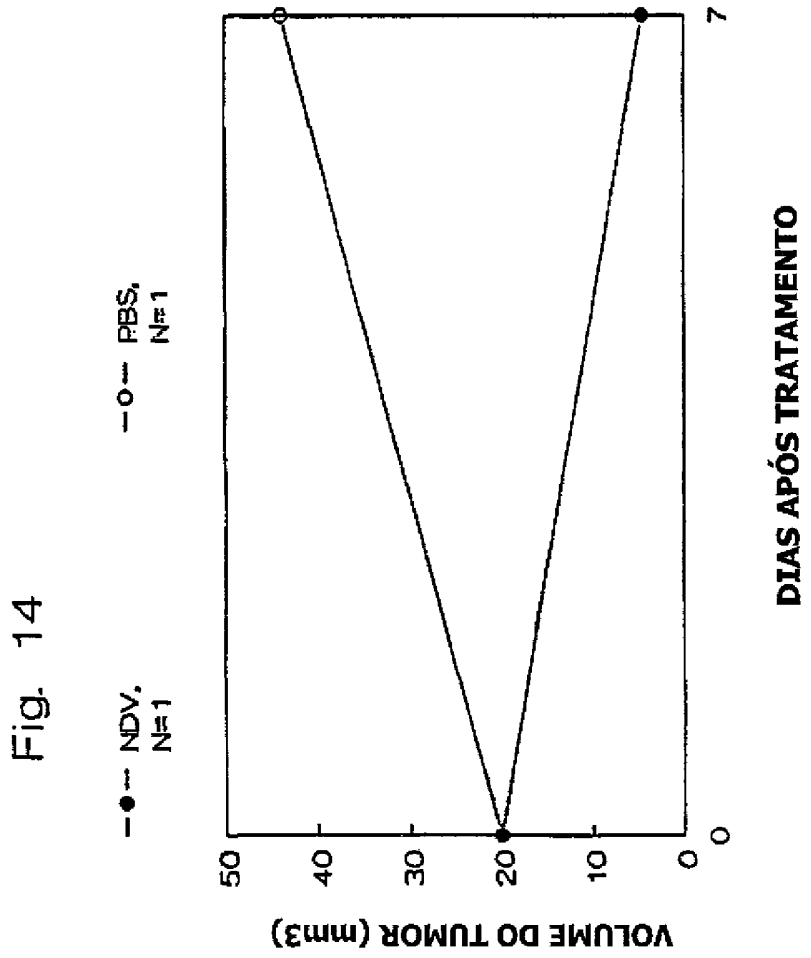

NDV N=6
NDV N=3
PBS N=4
VOLUME DO TUMOR (mm3)
250
200
150
100
50
0
0
7
14
21
28
35
42
49
56
63
DIAS APÓS TRATAMENTO

Fig. 14


—●— NDV, N=1
—o— PBS, N=1
VOLUME DO TUMOR (mm3)
0
10
20
30
40
50
0
7
DIAS APÓS TRATAMENTO