

(21) PI 0906354-4 A2



(22) Data do Depósito: 20/01/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 17/12/2019

(54) Título: PARAMIXOVÍRUS ONCOLÍTICO ATENUADO QUE CODIFICA CITOCINAS AVIÁRIAS

(51) Int. Cl.: A61K 35/76.

(30) Prioridade Unionista: 29/01/2008 EP 08001643.9; 29/01/2008 US 61/024,333.

(71) Depositante(es): BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESellschaft.

(72) Inventor(es): RUDOLF BEIER; FLORIAN PUHLER.

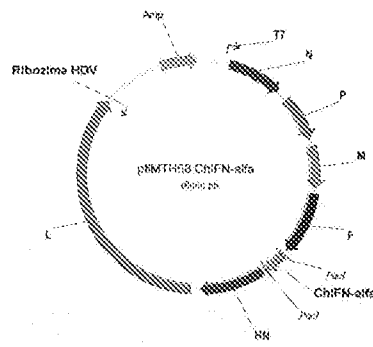
(86) Pedido PCT: PCT EP2009000308 de 20/01/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/095167 de 06/08/2009

(85) Data da Fase Nacional: 29/07/2010

(57) Resumo: PARAMIXOVÍRUS ONCOLÍTICO ATENUADO QUE CODIFICA CITOCINAS AVIÁRIAS A invenção refere-se a um vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico recombinante para o tratamento de uma doença proliferativa, compreendendo, pelo menos um, transgene codificando uma citocina de ave, em que o vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico recombinante é obtido de um vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico velo-gênico ou mesogênico. A expressão mediada por vírus da citocina nas células hospedeiras naturais leva a uma patogenicidade reduzida do vírus para espécies de aves. Além disso, o genoma viral pode codificar proteínas de ligação, enzimas conversoras de pró-fármaco e/ou proteases. A expressão seletiva dessas moléculas em células tumorais infectadas com vírus aumenta o efeito antitumoral do vírus.

Fig. 3:
Pictetide pPMTK88 CHFN-81a



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PARAMIXO-VÍRUS ONCOLÍTICO ATENUADO QUE CODIFICA CITOCINAS AVIÁRIAS**".

Introdução

5 A presente invenção refere-se a um vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico compreendendo, pelo menos um, transgene codificando uma citocina aviária, em que o vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico recombinante é obtível de um vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico velogênico ou mesogênico. A expressão mediada por vírus
10 da citocina nas células hospedeiras naturais leva a uma patogenicidade reduzida do vírus para as espécies de aves.

 O vírus na presente invenção é adequado para o tratamento de doenças, especialmente para o tratamento de tumores oncolíticos. Vírus recombinantes são produzidos que codificam uma citocina aviária, em que a
15 patogenicidade do vírus é reduzida para uma espécie de ave que leva a uma toxicidade ambiental diminuída do vírus. A atividade oncolítica do vírus não é prejudicada pelo método descrito de redução de patogenicidade. O genoma viral pode codificar transgenes terapêuticos adicionais, preferivelmente proteínas de ligação (anticorpos, moléculas de repetição de anquirina, peptí-
20 deos, etc.), enzimas conversoras de profármaco e/ou proteases. A atividade dessas proteínas de ligação, enzimas conversoras de profármaco e/ou proteases aumenta o efeito antitumoral do vírus. Além disso, a invenção descreve a produção e o uso de tais vírus modificados para o tratamento do câncer.

25 Descrição do Estado da Técnica

Vírus da Doença de Newcastle

 Os vírus oncolíticos em geral para o tratamento de tumores são revistos em Chiocca (2002). O Vírus da Doença de Newcastle (NDV) tem sido usado como agente terapêutico experimental por mais de 40 anos, e é
30 revisto por Sinkovics e Horvath (2000). O Vírus da Doença de Newcastle, em geral, é descrito no livro por Alexander (1988). A cepa de NDV PV701 está sendo desenvolvida como um tratamento anticâncer para glioblastoma (Lo-

rence *et al.*, 2003). A cepa de NDV MTH68 tem sido usada como um tratamento de câncer experimental e tem sido administrada a seres humanos por mais de 30 anos (Csatary *et al.*, 2004).

No ensaio de Stojdl *et al.* (2003), é descrito que na faixa de 80% de todas as linhagens celulares tumorais testadas, há um defeito na resposta do interferon após a infecção com o Vírus da Estomatite Vesicular (VSV). Pode se considerar que uma porcentagem similar de linhagens de células tumorais seja suscetível à infecção com NDV porque tanto VSV quanto NDV são membros da ordem dos mononegavirais. Também foi demonstrado que o mecanismo de replicação seletiva do NDV em células tumorais se baseia em um defeito na resposta do interferon celular contra o vírus (vide, por exemplo, US: 20030044384).

Paramixovírus contêm genomas de RNA de fita única de polaridade negativa com genomas de 15 a 19 Kb de comprimento (tipo selvagem) e os genomas contêm de 6 a 10 genes. O envelope viral é formado pelas glicoproteínas de superfície e uma parte da membrana derivada da célula hospedeira. As glicoproteínas de superfície (F e HN ou H ou G) medeiam a entrada e saída do vírus da célula hospedeira. O nucleocapsídeo está dentro do envelope e contém o genoma de RNA e a proteína do nucleocapsídeo (NP), fosfo (P) e grandes (L) proteínas responsáveis pela transcrição e replicação do vírus intercelular. A proteína da matriz (M) conecta o envelope viral e o nucleocapsídeo. Além desses genes que codificam proteínas estruturais, *Paramyxoviridae* pode conter genes "adjuvantes" os quais podem ser unidades de transcrição adicionais espaçadas com os genes mencionados acima. Os genes adjuvantes são na sua maioria ORFs que se sobrepõem com o gene P da unidade transcricional. Uma descrição abrangente de paramyxoviridae pode ser encontrada em (Lamb, 2001).

NDV é o membro prototípico do gênero Avulavirus na família *Paramyxoviridae* pertencente à ordem *Mononegavirales*. O genoma viral é um RNA de sentido negativo de fita única que codifica seis proteínas principais: a proteína nucleocapsídeo (NP), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M), proteína de fusão (F), proteína de hemaglutinina (HN) e a proteína poli-

merase (L). Através da edição do RNAm da proteína P, uma ou duas proteínas adicionais, V (e W) são traduzidas.

NDV é detalhadamente caracterizado em *Alexander (1988)* e *Lamb (2001)*.

5 Vírus da Doença de Newcastle como um Patógeno Aviário

Cepas NDV são classificadas em relação às suas patogenicidades para galinhas como cepas velogênicas (altamente virulentas) que levam a uma infecção letal aguda de galinhas de todas as idades, isolados mesogênicos (virulência intermediária) que são somente letais em pintinhos jovens, e cepas lentogênicas (não-virulentas), manifestadas em uma forma branda o não-aparente da doença. A classificação dos isolados NDV em velogênicos, mesogênicos ou lentogênicos é determinada pelo tempo de morte médio (MDT) do embrião de galinha em ovos embrionados de 9 dias de idade depois da inoculação com a dose letal mínima para matar o embrião. Um dos determinantes da virulência de NDV parece ser o sítio de clivagem da proteína F precursora.

A primeira eclosão de NDV foi observada no ano de 1926 em Newcastle- em Tyne, Inglaterra, e em Java, Indonésia. Três NDV panzoóticos foram descritos desde a primeira aparição da doença.

NDV é primariamente transmitido por aerossóis ou grandes gotículas que são inaladas por pássaros suscetíveis. Durante o curso da infecção, novas partículas de vírus infecciosas serão espalhadas do trato respiratório infectado ou excretadas nas fezes. Pela ingestão do material contendo vírus por pássaros saudáveis, novas infecções podem ser estabelecidas e o espalhamento viral de um pássaro para o outro pode ser mantido.

NDV como um patógeno aviário é descrito detalhadamente em *Alexander (1997)*, *Diseases of Poultry*.

Vacinação da Doença de Newcastle

NDV como uma ameaça para a criação de aves e a necessidade de vacinação já foram reconhecidos no início do século passado. Iyer e Dobson efetuaram estudos nos anos da década de 1930 sobre a atenuação de cepas NDV virulentas, levando ao desenvolvimento de algumas cepas de

vacina de NDV mesogênicas. O desenvolvimento de vacinas vivas se moveu em direção ao estabelecimento das cepas de vacinas lentogênicas Hitchner B1 e LaSota, as quais são atualmente as vacinas NDV mais amplamente usadas. Outras estratégias de vacinação incluem o uso de vacinas NDV inativadas (por exemplo, por formalina, β -propiolactona), administradas juntamente com um adjuvante veículo (hidróxido de alumínio, emulsão em óleo).

A história e o estado atual do desenvolvimento de vacinas NDV é demonstrado detalhadamente em *Alexander (1997) Diseases of Poultry*.

As próximas gerações de vacinas para uso veterinário à base de NDV recombinante geradas por tecnologia genética reversa são recapituladas em Huang *et al.* (2003), e vacinas NDV recombinantes são descritas nas patentes a seguir.

US 6.699.479 B1 descreve um mutante do vírus da doença de Newcastle (NDV) que expressa a sua proteína V em um nível reduzido e é usada para vacinação de embriões antes de chocar.

US 2004/0043035 se referem a um mutante de NDV recombinante que não é capaz de expressar um epítipo imunodominante da nucleoproteína (NP) e é adequado como uma cepa de vacina marcadora.

US 2003/0224017 descreve um sistema genético reverso para NDV para a produção de uma vacina de NDV recombinante. Este sistema permite a expressão de transgenes, por exemplo, citocinas aviárias (IL-2 de galinha, IL-4 de galinha) do genoma NDV para gerar cepas de vacina NDV.

EP 1 300 157 refere-se a uma cepa de vírus da doença de Newcastle mutante atenuada adequada para a vacinação *in ovo* de espécies aviárias compreendendo uma mutação nas sequências gênicas que codificam as glicoproteínas HN e/ou F.

US 6.719.979 refere-se a um processo para gerar vírus da doença de Newcastle (NDV) infecciosos totalmente a partir de DNAC de comprimento total clonado e para o uso de vacinas e ensaios de diagnóstico gerados com e derivados do processo.

WO 2007/025431 descreve um método para produzir uma cepa La Sota da doença de Newcastle atenuada recombinante e seu uso na pre-

paração de vacina para a prevenção das doenças causadas pelo vírus da Doença de Newcastle (NDV).

WO 2000/067786 envolve DNAs para fazer vírus da doença de Newcastle infecciosos e atenuados (NDV). Dentro do escopo da invenção
5 estão vacinas que compreendem NDV infecciosos, atenuados.

Paramyxovírus Recombinante

EP-A-0 702 085 refere-se aos mutantes de vírus de RNA de fita negativa não-segmentados replicantes infecciosos, compreendendo uma
10 inserção e/ou eliminação em uma estrutura de leitura aberta, uma região pseudôgena ou uma região intergênica do genoma viral.

WO 99/66045 refere-se aos vírus NDV geneticamente modificado obtidos a partir de moléculas de DNAc de comprimento total do genoma viral.

WO 00/62735 refere-se a um método de tratamento de tumor
15 compreendendo a administração de um vírus de RNA clonal competente para replicação e sensível ao interferon, por exemplo, NDV.

Em WO 01/20989 (PCT/US00/26116), um método de tratamento de pacientes com tumor com paramyxovírus oncolítico recombinante é descrito. O tumor é reduzido pela administração de um vírus *Paramyxoviridae*
20 competente para replicação. Vários métodos são descritos que podem ser usados para manipular o genoma viral para melhorar as propriedades oncolíticas.

WO 03/005964 refere-se ao VSV recombinante compreendendo um ácido nucleico codificando uma citocina.

25 US 2004/0170607 refere-se ao tratamento de melanoma pela administração de um vírus o qual não é um patógeno humano comum.

Manipulação Genética de NDV

NDV pode ser geneticamente manipulado usando a tecnologia genética reversa conforme descrito, por exemplo, em EP-A-0 702 085. Por
30 exemplo, sabe-se como fazer constructos de NDV recombinantes compreendendo ácidos nucleicos adicionais codificando fosfatase alcalina secretada (Zhao e Peeters, 2003), proteína verde fluorescente (Engel-Herbert *et al.*,

2003), proteína VP2 do vírus da doença infecciosa da bursa (Huang *et al.*, 2004), hemaglutinina do vírus influenza (Nakaya *et al.*, 2001) e clorafenicol acetil transferase (Huang *et al.*, 2001) (Krishnamurthy *et al.*, 2000). Nenhum desses NDV recombinantes foram construídos para uso no tratamento da

5 doença humana. Os NDVs recombinantes foram feitos para estudar ou a virologia básica do NDV o para desenvolver cepas de vacina para aves. Como cepas de vírus de origem serviram as cepas lentogênicas de NDV. Essas cepas não têm propriedades oncolíticas significativas.

Manipulação Genética dos Vírus

10 Métodos para manipular geneticamente vírus de RNA são bem conhecidos conforme estabelecido acima. Além disso, a manipulação genética dos vírus oncolíticos é recapitulada, por exemplo, em Bell *et al.* (2002). Os vírus de RNA como agentes de viroterapia são revistos em Russell (2002). O conteúdo de qualquer um desses documentos é aqui incorporado

15 por referência.

Citocinas Aviárias

Citocinas aviárias são recapituladas em Staeheli *et al.* (2001). Uma análise genômica das citocinas e quimiocinas de galinha foi descrita em Kaiser *et al.* (2005).

20 Resumo da Invenção

Cepas NDV oncolíticas têm sido estudadas desde o início dos anos 60 como terapias tumorais. A maioria das cepas de vírus usadas para terapia de tumor oncolítico pertencem à classe de vírus mesogênicos que são descritos como patógenos para aves. Para desenvolver um NDV oncolítico como um fármaco biológico antitumoral, a toxicidade ambientam existente potencial, especialmente a patogenicidade para aves deve ser reduzida.

25 Entretanto, NDVs atenuados para aves devem ter a capacidade prolongada de lisar células tumorais e manter o seu potencial oncolítico. Estratégias existentes para o desenvolvimento de vacinas podem não ser aplicado, uma vez que eles estão focados na estimulação do sistema imune do pássaro ou

30 pela aplicação de partículas virais completamente inativadas ou cepas de vírus lentogênicos apatogênicas. Ambos os tipos de vacina não são mais

capazes de se replicar em células cancerosas e subsequentemente perderam o potencial para lisar células tumorais.

Na presente invenção, a atenuação do NDV em aves sem diminuir a atividade oncolítica do vírus pode ser alcançada com a ajuda da tecnologia genética reversa. NDVs atenuados recombinantes são criados pela
5 inserção de transgenes que codificam citocinas, particularmente citocinas imunoestimuladoras ou antivirais.

Além disso, uma vacina NDV não é adequada para tal abordagem uma vez que o objetivo de uma vacina é induzir uma forte resposta imune com uma imunidade de longa duração para proteger o animal contra
10 uma infecção secundária. Na presente invenção, a atenuação descrita de NDV teve o objetivo principal de permitir que um animal controle a infecção primária (indesejada) e, deste modo, reduzir a toxicidade ambiental e aumentar a segurança do vírus quando aplicado em uma terapia de uma doença
15 proliferativa.

Um assunto da presente invenção é a lise das células tumorais por um vírus oncolítico. Uma indicação de tal abordagem de vírus oncolítico é a terapia do câncer em humanos. Ao contrário, uma vacina NDV para aves, conforme descrito em US 2003/0224017, é aplicada em animais e, deste modo, localizada no campo de cuidados com a saúde animal.
20

Deste modo, um objetivo da presente invenção é um vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico recombinante compreendendo, pelo menos um, transgene codificando uma citocina aviária, em que o vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico recombinante é obtível a partir
25 de um vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico velogênico ou mesogênico.

O vírus da presente invenção pode compreender pelo menos outro transgene com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada com vírus.

30 O, pelo menos um, transgene adicional é parcialmente alogene ou síngene no hospedeiro.

Em outro aspecto da presente invenção, o vírus da presente in-

venção pode ser um vírus atenuado.

"Atenuação" ou "Atenuado" inclui redução da patogenicidade do vírus para uma espécie de ave e a redução da patogenicidade em um sistema de ensaio biológico que é preditiva para espécies de aves (vide Exemplo 5).

Um outro aspecto da presente invenção é um vírus de RNA oncolítico recombinante atenuado para aves compreendendo um ácido nucleico compreendendo, pelo menos um, transgene codificando uma citocina. Particularmente o vírus é atenuado para galinhas. O "transgene codificando uma citocina" é particularmente o "transgene codificando uma citocina aviária", conforme aqui descrito.

Além disso, a invenção refere-se ao nucleocapsídeo do vírus recombinante da presente invenção compreendendo RNA viral complexado com proteínas de capsídeo. Além disso, a invenção refere-se a um RNA o qual é RNA do vírus da presente invenção. A invenção também refere-se a um RNA complementar ao RNA do vírus da presente invenção.

Além disso, a invenção refere-se a um DNA, por exemplo, um DNAc codificando o RNA da presente invenção e/ou um DNA complementar ao RNA da presente invenção. Além disso, a invenção refere-se à prevenção ou tratamento de doenças tumorais, câncer e/ou doenças proliferativas.

O RNA e/ou o DNA da presente invenção pode ser fornecido em uma forma isolada.

Na presente invenção, a citocina codificada pelo transgene conforme descrito aqui pode ser selecionada de uma célula de pássaro infectada pelo vírus da presente invenção e, depois de se ligar ao seu receptor de interferon apropriado na célula vizinha, pode induzir um estado antiviral na célula que carrega o receptor. Consequentemente, a replicação do vírus da presente invenção na célula de pássaro estimulada por interferon pode ser inibida pelo menos parcialmente. A similaridade entre os interferons de galinha tipo I e os interferons de mamífero tipo I é muito baixa (< de 25% de identidade em nível de aminoácido) (Staeheli *et al.* 2001). Por esta razão, uma citocina exibindo tal efeito antiviral em uma célula de ave não apresenta

essencialmente atividade biológica em uma célula humana e pode não ter essencialmente influência na replicação viral em células tumorais humanas. Além disso, essencialmente nenhum efeito adverso por essas citocinas são esperados no organismo humano.

- 5 A expressão do transgene que codifica uma citocina conforme aqui descrita leva a uma patogenicidade reduzida do vírus para espécies de aves, especialmente aves domésticas, especialmente galinhas e, deste modo, a uma toxicidade ambiental reduzida. A atividade do transgene que codifica uma citocina, conforme aqui descrito, não tem essencialmente efeito prejudicial no efeito terapêutico do vírus.

Descrição Detalhada das Modalidades Preferidas:

Vírus

- 15 A invenção refere-se de modo geral aos vírus de RNA, preferivelmente aos vírus de RNA de fita negativa, mais preferivelmente tais vírus que têm tanto propriedades oncolíticas e podem ser geneticamente manipulados. Tais vírus são:

- paramixovírus, preferivelmente vírus da doença de Newcastle (NDV), vírus do sarampo, vírus da caxumba, vírus Sendai;
- ortomixovírus, preferivelmente vírus influenza;
- 20 - rabdovírus, preferivelmente vírus da estomatite vesicular.

É preferível que o vírus da presente invenção seja um patógeno aviário, particularmente um patógeno de aves domésticas, mais particularmente um patógeno de galinha.

- 25 Também é preferível que o vírus da presente invenção seja um vírus de RNA de fita negativa. O vírus de RNA recombinante da presente invenção pode ser um paramixovírus, preferivelmente um vírus da Doença de Newcastle (NDV). O NDV pode ser uma cepa mesogênica ou velogênica. É preferível que o NDV seja um NDV mesogênico.

- 30 O vírus da presente invenção é obtível a partir de um vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico velogênico ou mesogênico, particularmente da cepa MTH68.

O vírus da presente invenção é preferivelmente competente para

replicação.

O vírus da presente invenção pode ter uma patogenicidade reduzida para uma espécie de ave, particularmente em relação ao vírus do qual o vírus recombinante é obtível.

5 É preferível que no vírus da presente invenção, a redução de patogenicidade seja uma capacidade do vírus de reduzir a lise celular de pássaros em cerca de 48 h depois da infecção com MOI 0,01 medido pelo aumento da viabilidade celular, por meio do que a viabilidade celular é au-
10 até cerca de 50%) de células sobreviventes, mais preferivelmente até pelo menos cerca de 50% (tal como pelo menos cerca de 50% até cerca de 75%) de células sobreviventes, e mais preferivelmente até pelo menos cerca de 75% (tal como pelo menos cerca de 75% até 100%) de células sobreviventes em relação ao vírus do qual o vírus recombinante é obtível.

15 Também é preferível que no vírus da presente invenção, a redução de patogenicidade seja uma extensão do tempo de sobrevivência dos embriões de galinha infectados com vírus em ovos embrionados com 11 dias de idade medido pela determinação do tempo de morte médio (MDT), por meio do que o MDT é estendido por pelo menos cerca de 15 h (como pelo
20 menos 15 h até cerca de 20 h), mais preferivelmente pelo menos cerca de 20 h (como pelo menos 20 h até cerca de 30 h, e mais preferivelmente por mais de 30 h em comparação ao vírus do qual o vírus recombinante é obtido.

25 Em ainda outra modalidade, a atividade oncolítica do vírus da presente invenção para células tumorais humanas é essencialmente não-reduzida.

30 É preferível que no vírus da presente invenção, a atividade oncolítica do vírus para células tumorais humanas medida pela viabilidade celular depois de 48 h depois da infecção não seja reduzida até mais de 50% em comparação ao vírus do qual o vírus recombinante é obtível e, mais preferivelmente, é essencialmente não-reduzida em relação ao vírus do qual o vírus recombinante é obtido.

Citocinas

A citocina codificada por pelo menos um transgene conforme aqui indicado pode ser uma citocina. Particularmente, a citocina pode ser uma citocina capaz de inibir pelo menos parcialmente a replicação viral em uma célula de pássaro, particularmente em células de aves domésticas, mais particularmente em células de galinha. É preferível que a replicação viral seja essencialmente completamente inibida.

A citocina pode ser uma citocina sem essencialmente atividade biológica em um mamífero, particularmente em um ser humano. Neste contexto, "atividade biológica" se refere, particularmente, à capacidade de uma citocina de inibir pelo menos parcialmente a replicação viral, particularmente a replicação de um vírus da presente invenção. "Atividade biológica" também refere-se a qualquer outra atividade que uma citocina pode exibir em uma célula de um não-mamífero e/ou em um não-mamífero.

A citocina pode ser uma citocina capaz de inibir pelo menos parcialmente a replicação viral em um pássaro, particularmente em uma ave doméstica, mais particularmente em galinhas, e que pode não ter essencialmente atividade biológica em um mamífero, particularmente em um ser humano.

A citocina pode ser selecionada a partir de citocinas aviárias, particularmente de citocinas de aves domésticas, mais particularmente de citocinas de galinha.

A citocina pode ser selecionada dentre interferons, particularmente de interferons de aves, mais particularmente de interferons de galinha, mais particularmente de interferons de galinha tipo I.

O interferon pode ser um interferon-beta ou um membro da família de interferon alfa.

Em uma modalidade preferida, o vírus de RNA oncolítico recombinante é um NDV compreendendo um ácido nucleico compreendendo um transgene que codifica um interferon-alfa de galinha e/ou um interferon-beta de galinha.

Transgenes

Um transgene é definido no contexto do genoma NDV como ácidos nucleicos adicionais que são introduzidos no genoma viral. Os ácidos nucleicos podem ser selecionados a partir de diferentes fontes genômicas (por exemplo, genoma NDV, classe de vírus diferente, fontes procarióticas ou eucarióticas, espécies de mamíferos e não-mamíferos). Também transgenes fundidos de duas ou mais fontes genômicas diferentes são possíveis. Também transgenes sintéticos baseados na síntese *de novo* de sequências de ácido nucleico podem ser construídos. Os ácidos nucleicos devem estar localizados em pelo menos um cassete de transcrição. Preferivelmente, o transgene é traduzido em uma proteína na célula infectada. Por esta razão, a sequência transgênica deve incluir um códon de início e um de parada de tradução.

O vírus oncolítico recombinante da presente invenção pode compreender um ácido nucleico codificando, pelo menos um, outro transgene independentemente selecionado dentre os transgenes que codificam proteínas de ligação, enzimas conversoras de promedicamentos e proteases.

O, pelo menos um, transgene adicional codifica preferivelmente uma proteína de ligação que tem atividade terapêutica quando expressa pela célula tumoral infectada por vírus.

Em outra modalidade preferida, o, pelo menos um, transgene adicional codifica uma enzima conversora de profármaco que tem atividade terapêutica quando expressa pela célula tumoral infectada com vírus.

Em ainda outra modalidade preferida, o, pelo menos um, transgene adicional codifica uma protease que tem atividade terapêutica quando expressa pela célula tumoral infectada por vírus.

Se não for indicado de outra forma, "transgene" ou "pelo menos um transgene", conforme aqui utilizado, refere-se a um transgene codificando uma citocina de ave, ou pelo menos um outro transgene com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada por vírus, ou uma combinação desses. Esta definição de "transgene" se aplica particularmente na posição de uma variedade de transgenes no genoma viral, conforme aqui descrito, se não for indicado de outra forma.

O vírus de RNA, o genoma, antígenoma, nucleocapsídeo e/ou molécula de DNA da presente invenção pode compreender o transgene, conforme descrito aqui, o qual pode estar localizado no cassete de transcrição, conforme descrito aqui.

5 O vírus oncolítico recombinante da presente invenção pode compreender pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro ou pelo menos cinco ácidos nucleicos, cada um compreendendo um transgene, conforme aqui descrito. O vírus oncolítico recombinante da presente invenção pode compreender no máximo cinco ácidos nucleico, cada um compreendendo um transgene conforme aqui descrito. Particularmente, vírus oncolíticos recombinantes da presente invenção compreendem um, dois, três, quatro ou cinco ácidos nucleicos, cada um compreendendo um transgene, conforme aqui descrito. Se o vírus recombinante da presente invenção compreender pelo menos dois transgenes, eles podem ser idênticos ou diferentes.

15 O ácido nucleico compreendendo, pelo menos um, transgene pode estar localizado em qualquer posição entre as estruturas de leitura dos genes virais. Particularmente, o ácido nucleico compreendendo, pelo menos um, transgene pode estar localizado 5' do N gene, entre o gene N e o P, entre o gene P e o M, entre o gene M e o F, entre o gene F e o NH, entre o gene HN e L e/ou a 3' do gene L. É preferível que o ácido nucleico esteja localizado em uma posição mais 5' do gene N, entre o gene N e o P e/ou entre o gene P e o M, uma vez que tal local leva a uma expressão melhorada em comparação com um local mais 3'.

25 Preferivelmente, o vírus da presente invenção exibe uma infecção tumor-seletiva que leva a uma expressão tumor-seletiva do transgene conforme aqui descrito.

O vírus de ARNA recombinante da presente invenção pode compreender no total até cinco transgenes, até quatro transgenes, ou até três transgenes.

30 Na presente invenção, o transgene que codifica uma citocina de ave, ou pelo menos um outro transgene com atividade terapêutica quando expressa por uma célula tumoral infectada por vírus, ou uma combinação

desses é preferivelmente heterólogo ao vírus de RNA oncolítico no qual o vírus de RNA recombinante da presente invenção é baseado. O termo "heterólogo", conforme aqui utilizado, refere-se ao gene completo ou a uma parte sua, a qual pode ser a região codificadora do gene ou uma parte sua.

5 O ácido nucleico heterólogo pode ser um ácido nucleico artificial ou pode ser obtido a partir de fontes naturais ou por recombinação de pelo menos dois ácidos nucleicos obtidos de fontes naturais e/ou ácidos nucleicos artificiais. "Fontes naturais" inclui animais como mamíferos, plantas, fungos e microorganismos como bactérias, protozoários e vírus, os quais podem ser diferentes dos vírus de RNA oncolíticos da presente invenção.

O transgene pode também codificar uma proteína de fusão.

Em outra modalidade da presente invenção, o transgene que codifica uma citocina de ave e pelo menos um transgene adicional com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada por vírus pode estar localizado em pelo menos duas unidades de transcrição separadas.

Pelo menos uma unidade de transcrição compreendendo o ácido nucleico compreendendo, pelo menos um, transgene codificando uma citocina de ave pode também ser transcrita em uma célula tumoral, conforme aqui descrito.

Pelo menos uma unidade de transcrição compreendendo o ácido nucleico compreendendo, pelo menos um, segundo transgene com atividade terapêutica quando expresso por um tumor infectado por vírus pode ser também transcrito em uma célula de pássaro, conforme aqui descrito.

25 Pelo menos cada uma das duas unidades de transcrição separadas podem ser transcritas em uma célula tumoral, conforme aqui descrito, e em uma célula de pássaro, conforme aqui descrito.

Em uma modalidade alternativa preferida, pelo menos um transgene codificando uma citocina de ave e pelo menos um outro transgene com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada por vírus são traduzidos em uma célula tumoral, conforme descrito aqui e em uma célula de pássaro, conforme aqui descrito.

Proteínas de Ligação

No vírus de RNA recombinante oncolítico da presente invenção, o, pelo menos um, transgene adicional com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada por vírus pode codificar uma proteína de ligação.

Consequentemente, o assunto da presente invenção é uma composição farmacêutica compreendendo um vírus oncolítico recombinante da presente invenção, um genoma viral da presente invenção, um antígeno viral da presente invenção e/ou uma molécula de DNA da presente invenção com um ingrediente ativo opcionalmente junto com veículos, diluentes e/ou adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis, cujo vírus, genoma viral, antígeno e/ou molécula de DNA compreende pelo menos um outro transgene com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral codificando uma proteína de ligação.

Proteínas de ligação são proteínas as quais, quando expressas em uma célula-alvo, são capazes de se ligar a um componente da referida célula e/ou uma célula vizinha. Preferivelmente, as proteínas de ligação são proteínas as quais se ligam aos componentes intracelulares.

Em uma modalidade preferida, uma proteína de ligação é selecionada do seguinte grupo consistindo de um ligante natural, um ligante geneticamente modificado, um domínio solúvel recombinante de um receptor natural e uma versão modificada sua, um ligante peptídico, um ligante polipeptídico, uma molécula de anticorpo e fragmentos e derivados seus, e uma molécula tipo anticorpo como uma proteína de repetição de anquirina e fragmentos e derivados seus.

Uma recapitulação incompleta de estruturas de ligação de alta afinidade é dada por Ladner e Ley (2001).

As proteínas de ligação, conforme aqui descrito, podem ser de origem humana, murina ou intimamente relacionada, ou uma versão quimérica, isto é, uma proteína a qual pode ser uma proteína de fusão compreendendo sequências de diferentes espécies, por exemplo, humana e de murino.

As moléculas de ligação recombinantes com base na descrição acima podem ser monoméricas, diméricas, triméricas, tetraméricas ou multiméricas. As moléculas de ligação recombinantes com base na descrição acima podem ser monoespecíficas, biespecíficas ou multiespecíficas.

- 5 As proteínas de ligação preferidas são selecionadas dentre as proteínas de ligação com atividade terapêutica.

Um ligante natural, conforme aqui descrito, pode ser um fator de crescimento ou um peptídeo. Um ligante geneticamente modificado pode ser um análogo de um fator de crescimento de ocorrência natural ou peptídeo.

- 10 Domínios solúveis recombinantes de um receptor natural ou versões modificadas dele, conforme aqui descrito, são domínio extracelulares solúveis recombinantemente expressos de um receptor de superfície celular e/ou fragmentos dele, um domínio extracelular solúvel recombinantemente expresso de uma molécula de adesão celular e/ou de fragmentos seus.

- 15 Moléculas de anticorpo, conforme mencionado acima, podem ser anticorpos de imunoglobulina monoclonais de qualquer especificidade e isotipo conhecidos, fragmentos seus e/ou fragmentos seus fundidos com as proteínas efectoras. As moléculas de anticorpo podem ser anticorpos quiméricos, humanizado ou seres humanos. Fragmentos de anticorpo contêm pelo
20 menos um domínio de ligação a antígeno de um anticorpo. Fragmentos de anticorpo foram descritos extensivamente na literatura (recapitulado, por exemplo, em Allen (2002), aqui incorporado por referência). Exemplos preferidos são fragmentos Fv de cadeia única, fragmentos Fab, F(ab2'), versões eliminadas de domínio chamadas de minicorpos e outras porções imunoativas, fragmentos, segmentos e outras estruturas de anticorpo parcial meno-
25 res ou maiores, em que a última possui propriedades de direcionamento suficientes ou atividade imunológica estimulatória ou inibitória de modo a ser terapeuticamente útil nos métodos da presente invenção.

- Tais anticorpos podem ser derivados de experimentos de clona-
30 gem de hibridoma pelo uso de camundongos transgênicos ou de seleções de exibição de fagos, seleções de exibição de ribossomo ou varredura de filtro de colônia de bibliotecas de anticorpos contendo sequências de anti-

corpos humanas ou metodologias relacionadas.

Proteínas de ligação com propriedades tipo anticorpo conforme aqui descritas podem ser proteínas geneticamente modificadas ou domínios das quais, nas quais uma ou mais alças de peptídeos são aleatorizadas no nível dos aminoácidos de tal modo que moléculas de ligação de alta afinidade com alta especificidade podem ser enriquecidas contra qualquer antígeno das bibliotecas de tais moléculas por exibição de fago, exibição de ribossomo, varredura de filtro de colônia ou metodologias relacionadas. As proteínas seleccionadas geralmente têm elevada estabilidade térmica ou termodinâmica e são bem expressas em sistemas de expressão recombinantes como, por exemplo, sistemas de expressão de *E. coli*, levedura, inseto e mamífero. Exemplos para tais proteínas de ligação com propriedades tipo anticorpo são proteínas de repetição de anquirina conforme descrito em Binz *et al.* (2004), as lipocalinas conforme descrito em Skerra (2000), as gamacristalinas conforme descrito em DE 199 32 688.6, a estrutura da proteína A modificada (aficorpos) conforme descrito em Hogbom *et al.* (2003) ou Nord *et al.* (2000) ou a estrutura de fibronectina e outras. Moléculas tipo anticorpo podem ser moléculas monoméricas ou repetitivas, ou construídas como moléculas de cadeia única ou como moléculas com múltiplas cadeias, em que a molécula tipo anticorpo possui propriedades de direcionamento satisfatórias ou atividade imunológica estimulatória ou inibitória de modo a ser terapêuticamente útil nos métodos da presente invenção.

Outro assunto da presente invenção é um método para o tratamento de uma doença proliferativa, particularmente de uma doença hiperproliferativa, como um tumor ou câncer, compreendendo a administração em uma quantidade farmacologicamente eficaz a um indivíduo necessitado disso de um vírus oncolítico recombinante da presente invenção, um genoma viral da presente invenção, um antígenoma viral da presente invenção e/ou uma molécula de DNA da presente invenção que compreende pelo menos um outro transgene com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada por vírus que codifica uma proteína de ligação conforme aqui descrito.

Moléculas de Ligação com Função Adicional

A proteína de ligação pode ser uma proteína de fusão compreendendo, pelo menos um, domínio de ligação, por exemplo, de um anticorpo, e pelo menos um domínio heterólogo. "Heterólogo" tem o significado, conforme discutido acima, no contexto dos genes heterólogos.

As proteínas de ligação descritas acima são capazes de distribuir uma carga útil a um sítio específico da doença (por exemplo, um tumor) como o chamado intracampo o como uma proteína de ligação disponível extracelular. A carga útil fornecida pode ser um domínio heterólogo, por exemplo, uma toxina como a RNase humana (De Lorenzo *et al.*, 2004) (Zewe *et al.*, 1997), exotoxina de *Pseudomonas* (Chaudhary *et al.*, 1989) (Kreitman e Pastan, 1995) (Batra *et al.*, 1992), toxina diftérica (Kreitman *et al.*, 1993) (Chaudhary *et al.*, 1990) (Batra *et al.*, 1991) ou uma enzima como uma beta-galactosidase, beta-glicuronidase (Roffler *et al.*, 1991) (Wang *et al.*, 1992) (Bosslet *et al.*, 1992), beta-glicosidase (Rowlinson-Busza, 1992), carboxipeptidase (Antoniw *et al.*, 1990), (Bagshawe *et al.*, 1988), beta-lactamase com eficácia terapêutica ou uma proteína imunoestimulatória com atividade de citocina como IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN-beta ou GM-CSF (vide, por exemplo, a revisão de Allen (2002).

Em outro exemplo, as proteínas de ligação descritas acima têm por si só eficácia antagonística ou agonística, a qual é terapeuticamente útil. Exemplos para proteínas de ligação antagonísticas/de bloqueio são o anticorpo inibitório VEGF Avastina (Ferrara *et al.*, 2004), o anticorpo de bloqueio de receptor HER2/neu herceptina (Noonberg e Benz, 2000), ou o anticorpo de bloqueio de receptor EGF erbitux (Herbst e Langer, 2002). Proteínas de ligação agonísticas podem ser proteínas de ligação as quais incluem, por exemplo, apoptose (Georgakis *et al.*, 2005) ou que têm atividade regulatória no DNA, RNA ou proteínas (por exemplo, induzem a transcrição, estabilizam proteínas). A revisão de (Adams e Weiner, 2005) descreve vários anticorpos terapêuticos que também poderiam ser incorporados em um vírus oncolítico.

Enzimas Conversoras de Profármaco

No vírus de RNA recombinante oncolítico da presente invenção,

o, pelo menos um, outro transgene com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada por vírus pode codificar uma enzima conversora de profármaco.

5 Um profármaco é um derivado ou precursor de um composto terapêuticamente ativo, o qual pode ser enzimaticamente convertido no composto ativo. Enzimas conversoras de profármaco são enzimas capazes de converter um profármaco no fármaco terapêuticamente ativo.

Consequentemente, é assunto da presente invenção uma composição farmacêutica compreendendo um vírus oncolítico recombinante da presente invenção, um genoma viral da presente invenção, um antigenoma viral da presente invenção e/ou uma molécula de DNA da presente invenção como um ingrediente ativo opcionalmente junto com veículos, diluentes e/ou adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis, cujo vírus, genoma viral, antigenoma e/ou molécula de DNA compreende pelo menos um outro transgene com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada por vírus que codifica uma enzima conversora de profármaco.

A composição farmacêutica pode ainda compreender um profármaco o qual pode ser convertido em um composto terapêuticamente ativo pela enzima conversora de profármaco codificada pelo vírus, genoma viral, antigenoma e/ou molécula de DNA. A composição farmacêutica pode ser adequada para o tratamento e/ou alívio de um distúrbio proliferativo.

O profármaco pode ser formulado em uma única composição com o vírus oncolítico recombinante da presente invenção, um genoma viral da presente invenção, um antigenoma viral da presente invenção e/ou uma molécula de DNA da presente invenção como um ingrediente ativo, ou pode ser formulada em uma composição distinta da formulação de vírus oncolítico.

Se o vírus de RNA recombinante oncolítico da presente invenção codificar uma enzima conversora de profármaco, o vírus oncolítico da presente invenção causa a expressão seletiva da enzima conversora de profármaco em uma célula-alvo infectada por vírus (particularmente uma célula tumoral), a qual geralmente não expressa ou não expressa de modo sufici-

ente a enzima conversora de profármaco. Deste modo, durante o tratamento de um indivíduo necessitado disso, o profármaco é especificamente convertido no composto farmacêutico ativo em uma célula-alvo, particularmente em uma célula tumoral, porém pode essencialmente não ser convertido no composto terapêuticamente ativo em uma célula não-alvo, particularmente em uma célula saudável do indivíduo a ser tratado. Deste modo, os efeitos colaterais indesejados do composto terapêuticamente ativo são reduzidos em comparação ao tratamento do composto terapêuticamente ativo sozinho.

No contexto da presente invenção, o profármaco pode ser um derivado ou um precursor de um composto terapêuticamente ativo adequado para o tratamento e/ou alívio de um distúrbio proliferativo, tumor e/ou câncer, cujo profármaco pode ser convertido por uma enzima conversora de profármaco. O profármaco pode ser um composto conhecido por uma pessoa versada na técnica. Derivados e/ou precursores são conhecidos por uma pessoa versada na técnica.

É preferível que o profármaco seja essencialmente farmacêuticamente inativo e/ou não-tóxico.

Exemplos de enzimas conversoras de profármaco da presente invenção são beta-glicuronidase, bet-galactosidase, beta-glicosidase, carboxipeptidase, beta-lactamase, D-aminoácido oxidase. Outros exemplos são conhecidos por uma pessoa versada na técnica.

É preferível que a enzima conversora de profármaco seja essencialmente não-expressa em células não-tumorais.

A enzima conversora de profármaco pode ser obtida de um organismo selecionado dentre mamíferos, plantas, fungos e microorganismos como bactérias, protozoários e vírus.

Uma combinação mais preferida da enzima conversora de profármaco e um profármaco é uma beta-glicuronidase de *E. coli* e um profármaco o qual pode ser convertido pela beta-glicuronidase em um composto citotóxico ativo. Um exemplo é o HMR1826 (doxorubicina-glicuronídeo) o qual pode ser convertido em doxorubicina, o qual é um composto conhecido para o tratamento do câncer.

Outro assunto da presente invenção é um método para o tratamento de uma doença proliferativa, particularmente uma doença hiperproliferativa, como um tumor ou câncer, compreendendo a administração em uma quantidade farmacologicamente eficaz a um indivíduo necessitado disso de um vírus oncolítico recombinante da presente invenção, um genoma viral da presente invenção, um antígenoma viral da presente invenção e/ou uma molécula de DNA da presente invenção compreendendo, pelo menos um, outro transgene codificando uma enzima conversora de profármaco conforme aqui descrito.

Particularmente, é um assunto da presente invenção um método para o tratamento de uma doença proliferativa, particularmente uma doença hiperproliferativa, como um câncer, compreendendo a administração em uma quantidade farmacologicamente eficaz a um indivíduo necessitado disso.

(i) um vírus oncolítico recombinante da presente invenção, um genoma viral da presente invenção, um antígenoma viral da presente invenção e/ou uma molécula de DNA da presente invenção compreendendo, pelo menos um, transgene codificando uma enzima conversora de profármaco, e

(ii) um profármaco adequado para o tratamento da doença proliferativa, cujo profármaco pode ser convertido em um composto farmacologicamente ativo pela enzima conversora de profármaco de (i).

O método pode compreender a administração de uma única composição farmacêutica compreendendo ambos os componentes (i) e (ii), ou pode compreender a administração de duas composições farmacêuticas distintas, uma das quais compreendendo o componente (i) e a outra compreendendo (ii).

Proteases

No vírus de RNA recombinante oncolítico da presente invenção, pelo menos um outro transgene com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada por vírus pode codificar uma protease.

Deste modo, é assunto da presente invenção uma composição farmacêutica compreendendo um vírus oncolítico recombinante da presente invenção, um genoma viral da presente invenção, um antígenoma viral da

presente invenção e/ou uma molécula de DNA da presente invenção como um ingrediente ativo, opcionalmente junto com veículos, diluentes e/ou adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis, cujos vírus, genoma viral, antígeno e/ou molécula de DNA compreende pelo menos um outro transgene com
5 atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada por vírus que codifica uma protease. A composição farmacêutica pode ser adequada para o tratamento e/ou alívio de um distúrbio proliferativo.

Se o vírus de RNA recombinante oncolítico da presente invenção codificar uma protease, o vírus oncolítico da presente invenção pode
10 causar a expressão seletiva da protease em uma célula-alvo infectada por vírus (particularmente uma célula tumoral) a qual comumente não expressa ou não expressa suficientemente a protease. Deste modo, durante o tratamento de um indivíduo necessitado disso, a protease pode irreversivelmente clivar um polipeptídeo-alvo em uma célula-alvo, deste modo inibindo a proli-
15 feração e/ou crescimento da célula-alvo ou morte da célula-alvo, porém pode essencialmente não clivar a molécula-alvo em uma célula não-alvo, particularmente em uma célula saudável do indivíduo a ser tratado. Por esta estratégia, efeitos colaterais indesejados do tratamento com protease são reduzidos.

20 É preferível que a protease seja uma protease de sequência específica. Mais preferivelmente, é uma protease que cliva especificamente um polipeptídeo-alvo. A protease pode ser ou de origem natural e pode ser derivada de qualquer espécie, ou ela pode ser manipulada. Sequências de aminoácidos adequadas para uma clivagem específica de um polipeptídeo-alvo
25 predeterminado podem ser determinadas por uma pessoa versada na técnica, por exemplo, com base nos bancos de dados de sequências publicamente disponíveis. US 2005-0175581 e US 2004-0072276 descrevem a geração de proteases proteína-manipuladas com uma especificidade de substrato predeterminada. Esses dois documentos são aqui incluídos por referência.

30 A molécula-alvo da protease pode ser qualquer molécula-alvo conforme descrito abaixo para alvos de proteínas de ligação.

Outro assunto da presente invenção é um método para o trata-

mento de uma doença proliferativa, particularmente de uma doença hiperproliferativa, como um tumor ou câncer, compreendendo a administração em uma quantidade farmacologicamente eficaz a um indivíduo necessitado disso de um vírus oncolítico recombinante da presente invenção, um genoma viral da presente invenção, um antígenoma viral da presente invenção e/ou uma molécula de DNA da presente invenção compreendendo, pelo menos um, outro transgene com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada por vírus para uma protease.

O transgene da presente invenção pode codificar uma proteína de fusão de uma enzima conversora de profármaco conforme definido acima, uma molécula de ligação conforme definido acima e/ou uma protease, conforme definido acima. É especialmente preferida uma proteína de fusão de uma enzima conversora de profármaco e uma molécula de ligação ou uma proteína de fusão de uma protease e de uma molécula de ligação.

15 Aplicações Terapêuticas

A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica a qual compreende como um ingrediente ativo um vírus, conforme descrito aqui, um nucleocapsídeo do vírus, um genoma do vírus ou uma molécula de DNA codificando o genoma e/ou um antígenoma do vírus, opcionalmente juntamente com veículos, diluentes e/ou adjuvantes farmacologicamente aceitáveis.

A composição farmacêutica pode ser fornecida como uma solução, suspensão, um liofilisado ou em qualquer outra forma adequada. Além do ingrediente ativo, a composição pode compreender veículos, tampões, tensoativos e/ou adjuvantes, conforme é conhecido na técnica. A composição pode ser administrada, por exemplo, oralmente, topicamente, nasalmente, pulmonarmente ou por injeção localmente ou intravenosamente. A composição farmacêutica é administrada em uma quantidade farmacologicamente eficaz dependendo do tipo de distúrbio, da condição e peso do paciente, da via de administração, etc. Preferivelmente de 10^9 a 10^{12} partículas virais, de 10^8 a 10^{11} , 10^7 a 10^{10} , ou 10^6 a 10^9 partículas virais são administradas por aplicação. A terapia oncolítica pode ser opcionalmente combinada com ou-

tras terapias tumorais como cirurgia, radiação e/ou quimioterapia como tratamento com ciclofosfamida e/ou tratamento com hipertermia.

É ainda outro aspecto um método para o tratamento de uma doença proliferativa e/ou câncer, compreendendo a administração em uma quantidade farmacologicamente eficaz a um indivíduo necessitado disso de um vírus oncolítico recombinante compreendido conforme aqui descrito, um nucleocapsídeo do vírus, um genoma do vírus ou uma molécula de DNA codificando o genoma e/ou um antígenoma do vírus, opcionalmente juntamente com veículos, diluentes e/ou adjuvantes farmacologicamente aceitáveis.

De acordo com a presente invenção, um paramixovírus oncolítico recombinante pode expressar uma proteína de ligação solúvel, uma enzima conversora de profármaco e/ou uma protease que pode permanecer ou na célula infectada ou pode ser secretado, como um anticorpo, um fragmento de anticorpo, uma proteína de repetição de anquirina ou outra molécula de ligação conforme especificado abaixo.

Como um NDV exemplar, a cepa MTH68 foi escolhida na presente aplicação porque ela tem uma propriedade oncolítica inerente com dados promissores a partir de tratamentos clínicos experimentais dos pacientes (Sinkovics e Horvath, 2000). Entretanto, a princípio, a maioria das cepas NDV com sítios de clivagem de proteína de fusão multibásica pode ser usada como agentes oncolíticos para o tratamento de tumores. A tecnologia genética reversa é aplicável a todas as cepas.

Proteínas de ligação, conforme aqui descritas, foram demonstradas como sendo de alto potencial terapêutico.

A combinação de NDV oncolítico com as proteínas de ligação terapêuticas, enzimas conversoras de profármaco e/ou proteases das propriedades descritas acima terá uma eficácia adicional ou até mesmo sinérgica de dois princípios terapêuticos. O vírus autorreplicante oncolítico almeja o fármaco da proteína de ligação, a enzima conversora de profármaco e/ou a protease ao sítio preferido de ação, onde ele é expresso *in situ* em altas concentrações locais. Espera-se que tal expressão de proteína seja muito seletiva e a proteína de ligação, a enzima conversora de profármaco

e/ou a protease com o seu respectivo modo de ação seja adicionada à atividade oncolítica terapêutica intrínseca do NDV. Com base na natureza competente de replicação do vírus usado e da replicação seletiva em células tumorais, espera-se que a quantidade de transgene expresso [proteína de ligação, a enzima conversora de profármaco e/ou protease] seja aproximadamente proporcional à massa tumoral.

Moléculas de anticorpo ou moléculas tipo anticorpo ou derivados seus são proteínas de ligação ideais a serem usadas com o sistema NDV. Moléculas de anticorpo foram o assunto de pesquisa intensiva e tecnologias são atualmente disponíveis para gerar moléculas de anticorpo, as quais são não-imunogênicas, muito seletivas e de alta afinidade. A expressão local das moléculas de anticorpo em altas concentrações leva a uma eficácia agonística ou antagonística muito significativa ou ao direcionamento eficiente das moléculas efetoras com perfil de toxicidade reduzido em comparação com a terapia padrão.

Espera-se que o uso de moléculas tipo anticorpo no sistema NDV seja ainda maior. Essas moléculas são manipuladas para ligação de alta afinidade seletiva com estabilidade térmica e rendimento muito altos em comparação a anticorpos normais. No caso de moléculas tipo anticorpo com base em anquirina, a natureza repetitiva da molécula pode ser ajustada de acordo com o respectivo alvo para direcionamento, ligação, inibição ou ativação otimizada. Também diferentes especificidades de ligação podem ser combinadas com uma molécula de anquirina, explorando a possibilidade de unir em uma molécula de repetição de anquirina várias unidades com diferentes especificidades de ligação. Esta estrutura modular permite a ligação multivalente de superfícies proteicas maiores do que é possível para os anticorpos, o que pode ser extremamente importante no bloqueio das interações proteína-proteína. A estrutura modular pode ser também explorada para bloquear vários efetores com somente uma única proteína bloqueadora de repetição de anquirina.

Tendo em vista que as moléculas de repetição de anquirina são extremamente estáveis mesmo sob condições redutoras, essas moléculas

podem ser manipuladas para tratar proteínas dentro da célula ("intracampo").

É também possível o uso de bibliotecas de sequências codificadoras de proteínas de ligação com NDV para a identificação do alvo *in vivo*.

- Alvos possíveis para as moléculas de ligação e/ou proteases
- 5 podem ser todas as estruturas de uma célula-alvo ou da matriz extracelular ao redor da célula-alvo, as quais podem ser reconhecidas pelas proteínas e/ou proteases de ligação descritas e as quais são relevantes para um certo tipo de fenótipo patológico. Essas podem ser proteínas estruturais, enzimas, fatores de crescimento, receptores do fator de crescimento, integrinas, fatores de transcrição, etc.
- 10

Até mesmo alvos que não são afetados com medicamentos por moléculas pequenas (interações proteína-proteína, ligação de DNA, etc.) podem ser endereçados por esta invenção.

- A combinação do NDV oncolítico e das proteínas de ligação terapêuticas, enzimas conversoras de profármaco e/ou proteases, conforme aqui descrito, é considerada para o tratamento de doenças inflamatórias, por exemplo, de artrite reumatoide e de câncer.
- 15

- Para o tratamento do câncer, todas as vias as quais contribuem para o desenvolvimento do câncer podem ser direcionadas. Essas vias são: autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibitórios de crescimento (anticrescimento), evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e invasão e metástase tecidual. Um resumo dessas vias é dado em (Hanahan e Weinberg, 2000). As vias de sinalização que são envolvidas no processo de tumorigênese e podem ser direcionadas pela abordagem descrita são a via do receptor da tirosina quinase (RTK), via RB e p53, via da apoptose, via APC, via HIF1, via GLI, via PI3K e a via SMAD. Uma descrição detalhada dessas vias de sinalização são dadas em Vogelstein e Kinzler (2004).
- 20
- 25

- Outras via de sinalização onde as proteínas de ligação descritas poderiam interferir são as vias ras, Wnt e Hedgehog onde, por exemplo, interações proteína-proteína podem ser bloqueadas.
- 30

Exemplos de proteínas de ligação que intervêm benéficamente

nas vias descritas acima em células cancerosas são:

- proteínas de bloqueio de receptores do fator de crescimento ativo autônomo (por exemplo, EGFR, Met)
 - ligantes competitivos para fatores de crescimento (antagonistas)
 - proteínas de bloqueio para Rb-fosforilação
 - proteínas de bloqueio para a transcrição dependente de E2F
 - estabilizadores para p53
 - ligantes antagonistas para proteínas antiapoptóticas (por exemplo, Bcl-2)
 - ligantes antagonísticos para ciclinas
 - ligantes antagonísticos para efetores Ras (por exemplo, GEFs)
 - ligantes antagonísticos para proteínas indutoras de hipóxia (por exemplo, HIF1 α)
 - inibidores dos fatores de transcrição que interferem com a dimerização, ligação do DNA e/ou ligação do cofator (por exemplo, Myc/Max)
 - indutores de diferenciação
 - inibidores de sinalização/translocação smad
 - inibidores de interações de adesão celular (caderinas, integrinas, por exemplo, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$)
 - inibidores de enzimas que degradam a matriz extracelular (por exemplo, MMPs)
 - ligantes antagonísticos para ligantes pró-angiogênicos (por exemplo, VEGF-R solúvel)
 - inibidores de quinases mitóticas (por exemplo, Plk-1)
 - ligantes antagonísticos para receptores pró-angiogênicos
 - inibidores de formação do complexo de estrutura (por exemplo, KSR/Ras)
 - inibidores da iniciação de tradução (eIF4E, EIF2a)
- A protease da presente invenção, a enzima conversora de fármaco e/ou os compostos terapeuticamente ativos derivados dos promedicamentos da presente invenção pela enzima conversora de profármaco po-

dem também intervir benéficamente nas vias descritas acima das células cancerosas.

Vírus Recombinante

5 Vírus recombinante significa um vírus que tem uma alteração definida manipulada na sua sequência de RNA genômica. Esta alteração pode ser uma ou mais inserções, eliminações, mutações pontuais ou combinações suas.

10 Um vírus de RNA recombinante da presente invenção pode compreender a sequência genômica total de um vírus de RNA natural (não-modificado) ou uma sequência derivada dela e pode adicionalmente compreender pelo menos um cassete de transcrição recombinante. O, pelo menos um, cassete de transcrição pode estar localizado entre dois genes (unidades de transcrição) do genoma viral. Neste caso, o, pelo menos um, cassete de transcrição é flanqueado pelas sequências de início e parada de transcrição. O, pelo menos um, cassete de transcrição pode também estar
15 localizado em uma unidade de transcrição do genoma viral. Neste caso, nenhuma sequência de início ou parada de transcrição adicional é necessária.

20 O, pelo menos um, cassete de transcrição pode compreender sítio de restrição, como *PacI* e/ou *Ascl*, o qual pode ser único. Se dois cassetes de transcrição estiverem presentes, eles podem compreender diferentes sítios de restrição.

 É preferível que o vírus de RNA da presente invenção compreenda um o dois cassetes de transcrição recombinantes.

25 Em, pelo menos um, cassete de transcrição da presente invenção, existe um transgene localizado, o qual pode codificar uma proteína de ligação, uma enzima conversora de profármaco e/ou uma protease, conforme aqui descrito.

30 Qualquer região intergênica entre cada um dos dois genes (unidades de transcrição) do genoma viral é adequada para introduzir pelo menos um cassete de transcrição recombinante. Se mais de um cassete de transcrição recombinante estiver presente, eles podem estar localizados na mesma ou em diferentes regiões intergênicas. É preferível que pelo menos

um cassete de transcrição recombinante esteja localizado entre os genes F e HN virais, particularmente se o vírus de RNA da presente invenção for um vírus da doença de Newcastle recombinante.

5 Não e conhece limite superior para o tamanho do genoma e Paramixoviridae. Consequentemente, não há limite superior para a quantidade e tamanho dos transgenes introduzidos no vírus de RNA recombinante da presente invenção. É preferível que o transgene (transgene codificando uma citocina de ave, ou pelo menos um outro transgene com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada por vírus, ou uma
10 combinação desses, conforme aqui descrito) tenha independentemente um tamanho de até cerca de 10 Kb, mais preferivelmente de até cerca de 5 Kb, mais preferivelmente de até cerca de 2 Kb.

Na expressão (incluindo a transcrição do RNA viral em RNAm e a tradução do RNAm) do transgene, conforme aqui descrito, as sequências
15 de controle de expressão como as sequências de início e parada de transcrição e as sequências que controlam a tradução são usadas. As sequências de controle de expressão de um vírus de RNA podem ser usadas, as quais podem ter o vírus de RNA, no qual o vírus de RNA recombinante da presente invenção está baseado. Particularmente, as sequências de início e de pa-
20 rada de transcrição podem ser obtidas de um vírus de RNA. As sequências de controle de expressão podem também ser obtidas de uma célula-alvo, particularmente de sequências que controlam a tradução e/ou transporte de proteína.

Devido ao mecanismo de replicação de Paramixoviridae, os
25 RNAs genômicos ou antigenômicos geralmente não aparecem como RNAs nus. Os RNAs genômicos e antigenômicos são montados com a nucleoproteína. Consequentemente, um outro objetivo da presente invenção é um nucleocapsídeo de um vírus de RNA oncolítico recombinante da presente invenção. O nucleocapsídeo compreende a molécula de RNA que codifica o
30 genoma e/ou o antigenoma do vírus de RNA e a proteína do nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo pode também compreender a proteína L polimerase e/ou a fosfoproteína P.

É também assunto da presente invenção o antigenoma do genoma da presente invenção, conforme aqui descrito.

É um outro aspecto da presente invenção uma molécula de DNA que codifica o genoma e/ou o antigenoma de um vírus de RNA oncolítico recombinate da presente invenção. A molécula de DNA pode ser um plasmídeo. A molécula de DNA da presente invenção pode ser usada para manipular geneticamente o vírus de RNA da presente invenção. Além disso, a molécula de DNA pode ser usada para produzir o vírus de RNA da presente invenção. Deste modo, a molécula de DNA pode ser operativamente ligada a uma sequência de controle de transcrição, por exemplo, uma sequência de controle de transcrição procariótica ou eucariótica.

É outro aspecto da presente invenção um método para a produção de um vírus de RNA oncolítico recombinate expresso de uma molécula de DNA codificando o genoma e/ou o antigenoma de um vírus oncolítico recombinate da presente invenção, particularmente o NDV oncolítico recombinate da presente invenção.

É outro aspecto da presente invenção uma célula compreendendo o vírus oncolítico recombinate da presente invenção, um genoma viral da presente invenção, um antigenoma viral da presente invenção e/ou uma molécula de DNA da presente invenção. A célula pode ser uma célula procariótica ou uma célula eucariótica. A célula pode ser uma linhagem celular, particularmente uma linhagem de célula de mamífero mais particularmente uma linhagem celular humana ou murina. A célula pode ser usada no método da presente invenção para produzir o vírus de RNA da presente invenção. Sistemas adequados para transcrever uma molécula de DNA são conhecidos por uma pessoa versada na técnica, por exemplo, em sistemas procarióticos como, por exemplo, *E. coli* ou sistemas eucarióticos, com HeLa ou CHO.

Em ainda outro aspecto está um vírus de RNA oncolítico, um genoma o antigenoma seu o uma molécula de DNA compreendendo o grupo total de genes de Paramixoviridae ou um grupo de genes de Paramixoviridae no qual pelo menos um gene ou região intergênica é geneticamente modifi-

cada, e ainda compreendendo, pelo menos um, cassete de transcrição re-combinante conforme aqui descrito. Tal vírus, genoma ou antígenoma ou molécula de DNA pode ser usada para a produção de um medicamento e/ou tratamento de câncer. Tal vírus de RNA, genoma, antígenoma ou molécula de DNA é adequada para construir um vírus Paramixoviridae recombinante, particularmente um vírus da doença de Newcastle recombinante por técnicas de engenharia genética para introduzir uma sequência recombinante no cassete de transcrição. Para este fim, pelo menos um cassete de transcrição pode compreender um sítio de restrição. Se mais de um cassete de transcri-
 5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 380
 385
 390
 395
 400
 405
 410
 415
 420
 425
 430
 435
 440
 445
 450
 455
 460
 465
 470
 475
 480
 485
 490
 495
 500
 505
 510
 515
 520
 525
 530
 535
 540
 545
 550
 555
 560
 565
 570
 575
 580
 585
 590
 595
 600
 605
 610
 615
 620
 625
 630
 635
 640
 645
 650
 655
 660
 665
 670
 675
 680
 685
 690
 695
 700
 705
 710
 715
 720
 725
 730
 735
 740
 745
 750
 755
 760
 765
 770
 775
 780
 785
 790
 795
 800
 805
 810
 815
 820
 825
 830
 835
 840
 845
 850
 855
 860
 865
 870
 875
 880
 885
 890
 895
 900
 905
 910
 915
 920
 925
 930
 935
 940
 945
 950
 955
 960
 965
 970
 975
 980
 985
 990
 995

Relevância Terapêutica

O tratamento de câncer e/ou de um tumor inclui a inibição do crescimento tumoral, preferivelmente da morte das células tumorais ou do bloqueio ou proliferação em um intervalo de tempo por infecção. NDV se replica seletivamente em células tumorais.

O vírus da presente invenção pode ser usado para tratar distúrbios proliferativos, particularmente distúrbios hiperproliferativos. Preferivelmente neoplasmas podem ser tratados com o vírus descrito, preferivelmente cânceres do grupo consistindo de câncer de pulmão, cólon, próstata, mama e cérebro podem ser tratados.

Mais preferivelmente, um tumor sólido pode ser tratado.

Mais preferivelmente, um tumor com baixa taxa de proliferação pode ser tratado. Exemplos de tumores com baixa taxa de proliferação são câncer de próstata ou câncer de mama.

Mais preferivelmente, um tumor cerebral pode ser tratado.

Mais preferivelmente, um glioblastoma pode ser tratado.

Mamíferos incluem seres humano, camundongos e ratos.

Produção do vírus de RNA recombinante

O vírus de RNA recombinante da presente invenção, particularmente do NDV recombinante, pode ser construído conforme descrito em Romer-Oberdorfer *et al.* (1999). A construção das novas sequências de ácido nucleico está no nível do DNAc, o qual é então traduzido em RNA na célula eucariótica usando os seguintes plasmídeos de início: pCITE P, pCITE N, pCITE L, pX88T flNDV.

NDV pode ser qualquer cepa do vírus da doença de Newcastle, mais preferivelmente uma cepa que é oncolítica na sua forma tipo selvagem.

O plasmídeo pX88T é descrito na EP 0 702 085 (Conzelmann KK).

O vírus de RNA recombinante da presente invenção, particularmente o NDV recombinante, pode ser recuperado inicialmente de células expressando a T7 polimerase, por exemplo, células BHK T7 ou temporariamente com células CHO transfectadas T7 polimerase. Ele pode ser amplificado em células tipo 293, CEC32, HT29 ou A431. Ele também pode ser amplificado em fluido alantoico de ovos de galinha embrionados.

O vírus de RNA recombinante, particularmente o NDV recombinante, é armazenado sob as seguintes condições: O vírus de RNA recombinante, particularmente NDV, é estável em D-manitol 5%/L-lisina 1% (p/v)/pH 8,0 ou em meio de cultura de células-padrão.

A - 20°C por até um mês.

A -80°C por até 10 anos.

O vírus de RNA recombinante da presente invenção pode ser produzido usando um vírus tipo selvagem ou um vírus recombinante como material de partida. Também um ácido nucleico, tal com DNA, incluindo tal sequência tipo selvagem ou recombinante, pode ser usado. Por exemplo, o vírus de RNA e/ou a molécula de DNA recombinante, conforme descrito no WO 2006/050984, pode ser utilizado como material de partida. Um exemplo é o plasmídeo pfIMTH68_Asc_Pac da figura 1 do WO 2006/050984. Outro exemplo é a IgG EDB de murino pfIMTH68 da figura 2 do WO 2006/050984. A descoberta do WO 2006/050984 está aqui incluída por referência. Particu-

larmente, a descoberta do WO 2006/050984 sobre os vírus de RNA oncolíticos recombinantes e a sua construção é incluída aqui por referência.

Uso de NDV Recombinante como um Medicamento

5 O vírus de RNA recombinante da presente invenção, particularmente o NDV recombinante purificado de acordo com a invenção, pode ser usado como medicamento, uma vez que apresenta efeitos farmacológicos.

O vírus de RNA recombinante, particularmente o NDV da invenção, o genoma viral, antígenoma, nucleocapsídeo e/ou molécula de DNA da presente invenção pode ser usado para a produção de um medicamento
10 especialmente para prevenção, alívio e/ou tratamento do câncer, um tumor e/ou uma doença proliferativa, especialmente para prevenção, alívio e/ou tratamento de câncer, como câncer de pulmão, câncer de próstata, câncer de cérebro, câncer de cólon, câncer de mama.

A composição farmacêutica da presente invenção opcionalmente
15 compreende veículo e diluentes farmacêuticamente aceitáveis. Tal veículo e diluentes são descritos em Remington's Pharmaceutical Science, 15ª ed. Mack Publishing Company, Easton Pennsylvania (1980). Os títulos virais usados na composição farmacêutica e/ou aplicados no método de tratamento da presente invenção podem estar na faixa de 10^9 a 10^{12} ufp (unidade formadora de placa) por dose, em uma faixa de 10^8 a 10^{11} ufp, em uma faixa
20 de 10^7 a 10^{10} ufp ou em uma faixa de 10^6 a 10^9 ufp dependendo da indicação do tratamento.

A composição farmacêutica da presente invenção pode ser usada para a prevenção e/ou tratamento de um distúrbio proliferativo, como
25 câncer.

A composição farmacêutica da presente invenção pode compreender uma emulsão do vírus de RNA oncolítico recombinante da presente invenção, particularmente o NDV da invenção, e pode ser administrada por inalação, infusão intravenosa, injeção subcutânea, injeção intraperitoneal ou
30 injeção intratumoral.

No método da presente invenção para a prevenção e/ou tratamento de um distúrbio proliferativo, particularmente câncer, uma quantidade

farmaceuticamente eficaz é um título do vírus de RNA oncolítico da presente invenção, particularmente o NDV da presente invenção, o genoma viral da presente invenção ou a molécula de DNA da presente invenção a qual previne, alivia e/ou suprime a doença.

5 Para efeito terapêutico, a dose aceitável pode depender, por exemplo, do constructo, do paciente, das vias de administração e do tipo de câncer.

 É preferível que o indivíduo (o paciente) seja um mamífero, mais preferivelmente um paciente humano.

10 A presente invenção é ainda ilustrada pela seguintes Figuras e Exemplos.

Legendas da Figura

 Figura 1 descreve o plasmídeo pflMTH68 ChIFN-alfa que compreende o genoma total de NDV e um cassete de transcrição que compreende o transgene de interferon-alfa de galinha (ChIFN-alfa).

15 Figura 2 descreve o plasmídeo pflMTH68 ChIFN-beta que compreende o genoma total de NDV e um cassete de transcrição que compreende o transgene de interferon-beta de galinha (ChIFN-beta).

 Figura 3a demonstra que a linhagem celular CEC-32 de ave é
20 parcialmente protegida da lise 48 h depois da infecção com NDV-ChIFN-alfa e fortemente protegida depois da infecção com NDV-ChIFN-beta. Infecção com um NDV que expressa GFP completamente destrói com a monocamada CEC-32. Ao contrário, nenhuma diferença no efeito lítico entre os três vírus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa e NDV-ChIFN-beta é observada depois da
25 infecção da linhagem celular Hela tumorgênica. Independentemente do vírus usado, a monocamada de células Hela é 48 h depois da infecção completamente destruída.

 Figura 3b mostra uma quantificação da sobrevivência celular de células CEC-32 e de Hela 48 h após a infecção com o vírus NDV-GFP, NDV-
30 ChIFN-alfa e NDV-ChIFN-beta. Depois da infecção com NDV-GFP, a morte quase completa das células CEC-32 é observada, somente 3% das células são viáveis. A infecção das células de codorniz com NDV-ChIFN-alfa man-

têm 26% das células infectadas vivas. A melhor proteção é observada depois da infecção com o vírus NDV-ChIFN-beta, 96% das células CEC-32 são viáveis. Ao contrário, 48 h depois da injeção, a viabilidade das células Hela tumorigênicas é reduzida para menos de 10% independentemente do NDV recombinante usado.

Figura 4 mostra que uma grande janela terapêutica existe depois da injeção do tumor e de células de fibroblasto com NDV-ChIFN-alfa e NDV-ChIFN-beta. A inibição de proliferação dos vírus oncolíticos NDV-ChIFN-alfa e NDV-ChIFN-beta é muito forte em células tumorais e, ao contrário, quase nenhuma inibição e crescimento é observada depois da injeção das células de fibroblasto primárias, especialmente em baixas MOIs como 0,1 e MOI 0,01.

Figura 5a demonstra as curvas de crescimento de ovo de galinha embrionados infectado com NDV com os quatro vírus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa, NDV-ChIFN-beta e a cepa apatogênica LaSota. Embriões de galinha infectados com NDV-ChIFN-alfa ou NDV-ChIFN-beta sobrevivem por mais tempo do que os embriões infectados com NDV-GFP. As curvas são modificadas claramente na direção da curva de sobrevivência da cepa LaSota de NDV lentogênica.

Figura 5b a partir dos resultados das curvas de sobrevivência, o MDT (tempo de morte médio) é calculado para cada grupo de infecção. O MDT aumenta para o vírus NDV-ChIFN-alfa e NDV-ChIFN-beta em comparação com NDV-GFP. O MDT mais alto foi observado com a cepa apatogênica LaSota.

Exemplo 1:

Geração de um NDV recombinante com um transgene derivado de ave que leva à expressão de uma citocina de galinha

A cepa oncolítica MTH68 de NDV foi usada para obter RNA viral. Usando RT-PCR, vários fragmentos de DNAc foram obtidos e, em um procedimento de clonagem de múltiplas etapas eles foram montados em um DNAc de genoma total que foi clonado no vetor pX85T (Schnell *et al.*, 1994) produzindo o plasmídeo pIMTH68. Este vetor pode ser usado para transfec-

ção para resgatar o vírus recombinante de uma linhagem celular expressando a T7-polimerase.

Um cassete transcricional adicional foi clonado no plasmídeo genômico de comprimento total de NDV MTH68 (pflMTH68) entre os genes codificando a proteína F e a proteína HN no único sítio e restrição SfiI. Os

dois oligonucleotídeos de DNA SfiI normal (5'-aggcctaattaacgacaaactaagaaaaataacgggtagaacggcctgag-3', SEQ. ID. NO: 1) e SfiI reverso (5'-aggccgttctacccgtatttttcttaagttgtcggtaattaaggcctctc-3', SEQ. ID. NO: 2) foram anelado e subsequentemente ligados no sítio SfiI de pflMTH68.

Os dois transgenes de DNA que codificam o ChIFN-alfa (NM_205427) e o ChIFN-beta (NM_001024836) foram amplificados por P-CR. Como moldes para a reação em cadeia da polimerase, os constructos de expressão de ChIFN-alfa e ChIFN-beta descritos em Schultz *et al*, 1995 e em Sick *et al*, 1996 foram usados. Para a amplificação do transgene ChIFN-alfa, o seguinte par de iniciador: ChIFN-alfa normal

(5'-cctaattaagccacatggctgtgcctgcaagccc-3' SEQ. ID NO:3) e ChIFN-alfa-reverso (5'-cctaattaactaagtgccggtgtgcctgtg-3' SEQ. ID NO:4) foi usado e para a amplificação da sequência codificadora de ChIFN-beta os dois iniciadores PacI ChIFN-beta normal (5'-cctaattaacgcacatgactgcaaaccatcagttccagg-3' SEQ. ID NO:5) e ChIFN-beta-reverso (5'-cctaattaatcactgggtgtgagacgtttggatg-3' SEQ. ID NO:6) foram usados.

Dois transgenes chIFN foram clonados no sítio PacI do plasmídeo pflMTH68Pac, respectivamente. O comprimento total do genoma foi ajustado para ser um múltiplo de 6 para seguir a "regra dos seis" para o comprimento do genoma viral. A identidade de sequência da inserção de ChIFN-beta foi confirmada pelo sequenciamento de nucleotídeo. Na inserção de ChIFN-alfa de uma troca de nucleotídeo G para A na posição 89 em comparação com a sequência NM_205427 foi detectada. O vírus recombinante foi resgatado das células expressando T7 transfectadas com o plasmídeo genômico virais de comprimento total contendo os genes para ChIFN-alfa (figura 1) ou ChIFN-beta (figura 2) por uma técnica de resgate de vírus padrão. O

vírus expressado o ChIFN-alfa resultante foi designado NDV-ChIFN-alfa e o ChIFN-beta expressando NDV foi nomeado NDV-ChIFN-beta. Os vírus foram cultivados ou em cultura tecidual ou no fluido alantoico de ovos de galinha para produzir elevados títulos.

5 Exemplo 2:

ChIFN-alfa e ChIFN-beta expressos de um NDV recombinante é biologicamente ativo.

Materiais e Métodos:

Células CEC-32 (linhagem celular de codorniz aviária) ou células
10 Hela (linhagem celular de câncer cervical) foram semeadas em uma placa de 6 poços a 1×10^5 células/poço. Depois de se tornar aderentes, as células foram infectadas usando um MOI de 0,01 com o vírus de controle de expressão NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa, NDV-ChIFN-beta ou MOCK. Depois de 64 h, os sobrenadantes foram coletados e partículas virais infecciosas foram
15 inativadas por irradiação por UV.

Para demonstrar a atividade biológica de ChIFN-alfa ou ChIFN-beta no sobrenadante das células infectadas por vírus, um bioensaio específico de interferon de galinha foi usado (Schwarz *et al*, JICR, 2005). O ensaio está baseado na linhagem de célula de codorniz transfectada estável CEC-
20 511 carregando um gene da luciferase controlado pelo promotor Mx de galinha responsivo ao IFN. A atividade da luciferase é induzida quando as células indicadoras CEC-511 foram incubadas com ChIFN-alfa ou ChIFN-beta. Para efetuar este ensaio, 15.000 células CEC-511 foram semeadas na placa de 96 poços. 24 h depois da semeadura, as células foram tratadas com o
25 sobrenadante tratado com UV das células Hela ou CEC-32 infectadas por vírus. As células foram incubadas com 75 μ L de uma diluição 1:100 do respectivos sobrenadantes. Como controles positivos, as células foram incubadas com uma diluição 1:1000 do sobrenadante das células 293-T transfectadas com um plasmídeo de expressão para ChIFN-alfa ou ChIFN-beta (Sick
30 *et al*, 1996) ou somente meio. Depois do tempo de incubação de 6 h, o ensaio de luciferase Steady-Glo® (Promega) foi efetuado, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Para determinar valores médios, cada ponto de

dado foi medido em triplicata.

Resultados:

64 h após a injeção, os sobrenadantes das células CEC-32 e HeLa infectadas com NDV-ChIFN-alfa e NDV-ChIFN-beta têm forte atividade indutora de luciferase nas células CEC-511 indicando a expressão mediada por vírus de ChIFN-alfa e ChIFN-beta nas células infectadas. Ao contrário, o sobrenadante das células infectadas com MOCK ou infectadas com um vírus de controle expressando GFP não mostram atividade indutora de luciferase na linhagem celular indicadora de CEC-511. Uma diluição de 1:1000 do sobrenadante contendo o ChIFN-alfa ou ChIFN-beta recombinante também demonstra uma atividade indutora do promotor Mx dependente de ChIFN.

Tabela 1: Atividade do interferon no sobrenadante das células CEC-32 e HeLa infectadas com NDVs recombinantes expressando ChIFN-alfa ou ChIFN-beta. A resposta de IFN é medida nas células indicadoras que carregam um gene repórter de luciferase controlado pelo promotor Mx. Os valores medidos são dados em contagens de luciferase relativas.

	CEC-32			
	NDV-GFP	NDV-ChIFN-alfa	NDV-ChIFN-beta	MOCK
Valor médio	308	11991	8033	246
Desvio padrão	86	283	423	27

	Hela			
	NDV-GFP	NDV-ChIFN-alfa	NDV-ChIFN-beta	MOCK
Valor médio	237	11739	5095	290
Desvio padrão	19	1835	78	39

	ChIFN-alfa	ChIFN-beta	Meio
Valor médio	4849	2128	237
Desvio padrão	107	15	21

Exemplo 3:

Células de aves, porém sem células tumorais infectadas com NDVs recombinantes expressando ChIFN-alfa ou ChIFN-beta são protegidas da lise viral

Materiais e Métodos:

3 a.) Células CEC-32 (linhagem de célula de codorniz aviária) ou células Hela (linhagem de célula de câncer cervical) foram semeados em uma placa de 6 poços em 1×10^5 células/poço. Depois de se tornarem aderentes, as células foram infectadas com MOI de 0,01 com o vírus de controle NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa, NDV-ChIFN-beta ou MOCK. Depois de 48 h, as células foram fixadas com solução de formaldeído 4% e marcadas com solução de Giemsa. A subsequente fotodocumentação foi efetuada com um sistema de visualização Zeiss Axiophot.

3 b.) Células CEC-32 (linhagem de célula de codorniz aviária) ou células Hela (linhagem de célula de câncer cervical) foram semeados em uma placa de 96 poços em 15.000 células/poço. Depois de se tornarem aderentes, as células foram infectadas com MOI de 0,01 com o vírus de controle NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa, NDV-ChIFN-beta ou MOCK (= não-infectadas). Depois de 48 h de tempo de incubação, o ensaio de luciferase CellTiter-Glo® (Promega) foi efetuado para medir a viabilidade celular, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Para determinar os valores médios, cada ponto de dado foi gerado a partir de seus valores independentes.

Resultados:

Figura 3. a.) Depois de 48 h, as células CEC-32 de aves são lisadas pelo NDV expressando GFP (NDV-GFP). Ao contrário, as células infectadas com o vírus que expressa ChIFN-alfa são parcialmente protegidas da lise. A monocamada de CEC-32 infectada com NDV-ChIFN-alfa é de 25 a 50% intacta. Uma proteção ainda mais forte é observada com NDV expressando ChIFN-beta. Depois de 48 h, quase 90 a 100% da monocamada de CEC-32 está intacta e protegida da lise viral. A densidade desta monocamada é comparável com a monocamada das células CEC-32 infectadas MOCK.

Infecção com os três vírus na linhagem celular Hela tumorigênica mostra uma atividade oncolítica comparável entre os vírus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa e NDV-ChIFN-beta. Depois de 48 h, a monocamada de células Hela infectadas com NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa ou NDV-ChIFN-beta é quase completamente destruída. A monocamada de células de células Hela in-

fectadas MOCK é intacta, indicado pela cor azul das células marcadas com Giemsa.

Figura 3. b) Em um segundo experimento, a viabilidade celular foi quantificada 48 h depois da infecção com NDVs expressando ChIFN. As células CEC-32 aviárias infectadas com NDV-GFP apresentaram somente 3% de viabilidade celular remanescente. Nas células CEC-32 infectadas com NDV-ChIFN-alfa, 26% das células remanescentes estão intactas. 48 h depois da infecção por NDV-ChIFN-beta da linhagem celular de codorniz CEC-32 94% das células são viáveis e protegidas contra a lise viral.

Ao contrário, quase qualquer diferença na destruição celular pode ser observada depois da infecção com os três vírus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa ou NDV-ChIFN-beta na linhagem de células Hela tumorgênicas. Depois de 48 h, o valor para as células viáveis é para todos os três vírus entre 3% e 9%, indicando aproximadamente uma completa destruição de células tumorais.

Exemplo 4:

Oncólise seletiva das células tumorais, porém não das células primárias por NDV recombinante expressando ChIFN-alfa ou ChIFN-beta.

Materiais e Métodos:

5000 células de fibroblasto primário ou 3000 células Hela foram semeadas em cada poço de uma placa de 96 poços. 16 h depois da semeadura, as diluições virais de NDV-GFP (NDV-GFP), NDV-ChIFN-alfa (NDV-ChIFN-alfa) e NDV-ChIFN-beta (NDV-ChIFN-beta) foram preparadas. Células de fibroblasto foram infectadas com as concentrações virais indicadas. Como controle negativo, as células de fibroblasto foram MOCK infectadas. Depois de 1 h o inóculo foi removido, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 200 µL de meio de cultura de células por 4 dias no incubador de cultura celular. Depois disso, as células remanescentes foram fixadas com solução de formaldeído 4% e marcadas com cristal violeta. A mancha foi solubilizada com ácido acético glacial 10% e a absorvância de cada poço foi medida a 595 nm em um leitor de ELISA.

Resultados:

Quatro dias depois da injeção, os fibroblastos primários infectados com os três vírus NDV-GFP, NDV-ChIFN-alfa e NDV-ChIFN-beta usando MOIs entre MOI 0,001 até MOI 0,1 quase não mostram a inibição da proliferação (figura 4). Os primeiros sinais de inibição da proliferação são somente observados em MOIs onde de 1 ou 10 partículas virais por célula foram usadas para a infecção. Ao contrário, células Hela tumorgênicas infectadas com MOIs entre MOI 0,001 e MOI 10 mostram uma inibição de proliferação muito forte. Estes resultados indicam que os NDVs recombinantes têm uma janela terapêutica muito boa, especialmente em MOIs baixos como MOI 0,1 e MOI 0,001, onde quase nenhum efeito lítico é medido nas células primárias, e um efeito inibitório de crescimento muito forte é medido nas células Hela tumorgênicas. Nenhuma diferença no formato da curva de morte nas células tumorais e primárias é observada entre o vírus de controle NDV-GFP e os vírus NDV-ChIFN-alfa e NDV-ChIFN-beta expressando ChIFN.

15 Exemplo 5:

Tempo de sobrevivência prolongado dos embriões de galinha infectados com NDV recombinante expressando ChIFN-alfa ou ChIFN-beta

Materiais e Métodos:

Grupos de quinze ovos de galinha embrionados com 11 d de idade foram infectados com NDV-ChIFN-alfa, NDV-ChIFN-beta, NDV-GFP ou a cepa NDV LaSota não-patogênica, respectivamente. Como material infeccioso, o vírus desenvolvido em ovo no fluido alantoico diluído com PBS estéril foi usado. Uma dose infecciosa de 4000 PFU em um volume total de 200 μ L foi usada. O inóculo foi injetado na cavidade alantoica. Depois da injeção, os ovos foram incubados a 37°C e 50% a 60% de umidade em um *brooder* de ovos. Os ovos foram examinados à luz de vela duas vezes por dia nos pontos de tempo indicados (figura 5) e os embriões foram averiguados para sinais de vitalidade. Este ensaio permite comparar a patogenicidade de diferentes cepas NDV pela comparação do tempo de sobrevivência dos embriões infectados. O método é baseado na determinação do "Tempo de Morte Médio da Dose Letal Mínima (MDT/MLD)" descrita em R.P. Hanson (1980). O protocolo foi modificado naquela forma que nenhuma diluição em

série do estoque viral foi inoculada nos ovos, ao invés de uma injeção de dose viral definida com uma concentração mais alta do que a dose letal mínima. Por motivos éticos, esta modificação de ensaio reduz a quantidade de embriões usados para o teste. O MDT é determinado pela seguinte fórmula:

$$5 \quad MDT = ((\text{quantidade de mortes em } X \text{ h}) \times (X \text{ hr}) + (\text{quantidade de mortes em } Y \text{ h}) \times (Y \text{ h}) \text{ etc.}) / \text{quantidade de mortes total}$$

Resultados:

A sobrevivência dos embriões de galinha infectados com NDV-ChIFN-alfa e NDV-ChIFN-beta é melhorado em comparação com os embriões infectados por NDV-GFP. Os ovos embrionados infectados por NDV-GFP perdem os sinais de vitalidade entre 24 h e 62 h, levando a um MDT (Tempo de Morte Médio) de 50 h. Os embriões infectados com NDV-ChIFN-beta estão sobrevivendo até 96 h com uma MDT calculada de 69 h. Um tempo de sobrevivência comparável com MDT de 74 h é medido nos embriões infectados com NDV-ChIFN-beta. A maior parte dos embriões infectados por NDV-ChIFN-beta morre entre 48 h e 96 h. A sensibilidade do ensaio é indicada pelo uso da cepa apatogênica ou lentogênica LaSota. Até mesmos os ovos embrionados inoculados com a cepa NDV LaSota morrem entre 62 h a 115 h com um MDT calculado de 85 h. Estes experimentos mostra que o

10 MDT do NDV MTH68 lentogênico muda para a cepa NDV lentogênica.

Referências

- Adams, G.P. e Weiner, L.M. (2005) Monoclonal antibody therapy of cancer. Nat Biotechnol, 23, 1147-1157.
- Alexander, D.J. (1988) Newcastle disease. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.
- Allen, T.M. (2002) Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. Nat Rev Cancer, 2, 750-763.
- Amstutz, P., Binz, H.K., Parizek, P., Stumpp, M.T., Kohl, A., Grutter, M.G., Forrer, P. e Pluckthun, A. (2005) Intracellular kinase inhibitors selected from combinatorial libraries of designed ankyrin repeat proteins. J Biol Chem, 280, 24715-24722.
- Antoniw, P., Springer, C.J., Bagshawe, K.D., Searle, F., Melton, R.G.,

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

394-397.

- Chiocca, E.A. (2002) Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer*, 2, 938-950.
- Csatary, L.K., Gosztonyi, G., Szeberenyi, J., Fabian, Z., Liska, V., Bodey, B.
e Csatary, C.M. (2004) MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-
5 grade gliomas. *J Neurooncol*, 67, 83-93.
- De Lorenzo, C., Arciello, A., Cozzolino, R., Palmer, D.B., Laccetti, P., Piccoli,
R. e D'Alessio, G. (2004) A fully human antitumor immunoRNase selective
for ErbB-2-positive carcinomas. *Cancer Res*, 64, 4870-4874.
- Engel-Herbert, I., Werner, O., Teifke, J.P., Mebatsion, T., Mettenleiter, T.C. e
10 Romer-Oberdorfer, A. (2003) Characterization of a recombinant Newcas-
tle disease virus expressing the green fluorescent protein. *J Virol Meth-
ods*, 108, 19-28.
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P. e Novotny, W. (2004) Discovery and
development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer.
15 *Nat Rev Drug Discov*, 3, 391-400.
- Ford, K.G., Souberbielle, B.E., Darling, D. e Farzaneh, F. (2001) Protein
transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene Ther*, 8, 1-4.
- Georgakis, G.V., Li, Y., Humphreys, R., Andreeff, M., O'Brien, S., Younes,
M., Carbone, A., Albert, V. and Younes, A. (2005) Activity of selective fully
20 human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and
TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apop-
tosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib-induced cell
death. *Br J Haematol*, 130, 501-510.
- Gerber, H.P. e Ferrara, N. (2005) Pharmacology and pharmacodynamics of
25 bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in
preclinical studies. *Cancer Res*, 65, 671-680.
- Hanahan, D. e Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100, 57-
70.
- Hanson, R.P. (1980) Newcastle Disease. In Hitchner, S. B. (ed.), Isolation
30 and identification of avian pathogens. College Station, Tex: American As-
sociation of Avian Pathologists.
- Herbst, R.S. e Langer, C.J. (2002) Epidermal growth factor receptors as a

- target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. *Semin Oncol*, 29, 27-36.
- Hogbom, M., Eklund, M., Nygren, P.A. e Nordlund, P. (2003) Structural basis for recognition by an in vitro evolved affibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3191-3196.
- 5 Huang, Z., Elankumaran, S., Panda, A. e Samal, S.K. (2003) Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *Poult Sci*, 82, 899-906.
- Huang, Z., Elankumaran, S., Yunus, A.S. e Samal, S.K. (2004) A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *J Virol*, 78, 10054-10063.
- 10 Huang, Z., Krishnamurthy, S., Panda, A. e Samal, S.K. (2001) High-level expression of a foreign gene from the most 3'-proximal locus of a recombinant Newcastle disease virus. *J Gen Virol*, 82, 1729-1736.
- 15 Kreitman, R.J., Chaudhary, V.K., Waldmann, T.A., Hanchard, B., Cranston, B., FitzGerald, D.J. e Pastan, I. (1993) Cytotoxic activities of recombinant immunotoxins composed of *Pseudomonas* toxin or diphtheria toxin toward lymphocytes from patients with adult T-cell leukemia. *Leukemia*, 7, 553-562.
- 20 Kaiser, P., Poh, T.Y., Rothwell, L., Avery, S., Balu, S., Pathania, U.S., Hughes, S., Goodchild, M., Morrell, S., Watson, M., Bumstead, N., Kaufman, J. e Young, J.R. (2005) A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *J Interferon Cytokine Res*, 25: 467-484.
- Kreitman, R.J e Pastan, I. (1995) Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of *Pseudomonas* exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. *Biochem J*, 307 (Pt 1), 29-37.
- 25 Krishnamurthy, S., Huang, Z. e Samal, S.K. (2000) Recovery of a virulent strain of newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. *Virology*, 278, 168-182.
- 30 Kuan, S.F., Byrd, J.C., Basbaum, C.B. e Kim, Y.S. (1987) Characterization

- of quantitative mucin variants from a human colon cancer cell line. *Cancer Res*, 47, 5715-5724.
- Ladner, R.C. e Ley, A.C. (2001) Novel frameworks as a source of high-affinity ligands. *Curr Opin Biotechnol*, 12, 406-410.
- 5 Lamb, R.A., Kolakofsky, D. (2001) *Paramyxoviridae: The Viruses And Their Replication*. In Fields, B.N. (ed.), *Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1305-1485.
- Lorence, R.M., Pecora, A.L., Major, P.P., Hotte, S.J., Laurie, S.A., Roberts, M.S., Groene, W.S. e Bamat, M.K. (2003) Overview of phase I studies of
10 intravenous administration of PV701, an oncolytic virus. *Curr Opin Mol Ther*, 5, 618-624.
- Mizukami, Y., Jo, W.S., Duerr, E.M., Gala, M., Li, J., Zhang, X., Zimmer, M.A., Iliopoulos, O., Zukerberg, L.R., Kohgo, Y., Lynch, M.P., Rueda, B.R. e Chung, D.C. (2005) Induction of interleukin-8 preserves the angiogenic
15 response in HIF-1 α -deficient colon cancer cells. *Nat Med*, 11, 992-997.
- Nakaya, T., Cros, J., Park, M.S., Nakaya, Y., Zheng, H., Sagrera, A., Villar, E., Garcia-Sastre, A. e Palese, P. (2001) Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J Virol*, 75, 11868-11873.
- 20 Noonberg, S.B. e Benz, C.C. (2000) Tyrosine kinase inhibitors targeted to the epidermal growth factor receptor subfamily: role as anticancer agents. *Drugs*, 59, 753-767.
- Nord, K., Gunneriusson, E., Uhl inverted question mark, M. e Nygren, P.A. (2000) Ligands selected from combinatorial libraries of protein A for use in
25 affinity capture of apolipoprotein A-1M and taq DNA polymerase. *J Biotechnol*, 80, 45-54.
- Roffler, S.R., Wang, S.M., Chern, J.W., Yeh, M.Y. e Tung, E. (1991) Anti-neoplastic glucuronide prodrug treatment of human tumor cells targeted with a monoclonal antibody-enzyme conjugate. *Biochem Pharmacol*, 42,
30 2062-2065.
- Romer-Oberdorfer, A., Mundt, E., Mebatsion, T., Buchholz, U.J. e Mettenleiter, T.C. (1999) Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease

- virus from cDNA. *J Gen Virol*, 80 (Pt 11), 2987-2995.
- Rowlinson-Busza, G., Bamias, A., Krausz, T. e Epenetos, A.A. (1992) Antibody guided enzyme nitrile therapy (Agent): in vitro cytotoxicity and in vivo tumor localisation. In Epenetos, a. (ed.), *Monoclonal Antibodies 2. Applications in Clinical Oncology*. Chapman and Hall, London, pp. 111-118.
- 5 Russell, S.J. (2002) RNA viruses as virotherapy agents. *Cancer Gene Ther*, 9, 961-966.
- Salgaller, M.L. (2003) Technology evaluation: bevacizumab, Genentech/Roche. *Curr Opin Mol Ther*, 5, 657-667.
- 10 Schnell, M.J., Mebatsion, T. e Conzelmann, K.K. (1994) Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *Embo J*, 13, 4195-4203.
- Schultz, U., Rinderle, C., Sekellick, M.J., Marcus, P.I. e Staeheli, P. (1995) Recombinant chicken interferon from *Escherichia coli* and transfected COS cells is biologically active. *Eur J Biochem*, 229:73-76.
- 15 Schwarz, H., Harlin, O., Ohnemus, A., Kaspers, B. e Staeheli, P. (2004) Synthesis of IFN-beta by virus-infected chicken embryo cells demonstrated with specific antisera and a new bioassay. *J Interferon Cytokine Res*, 24:179-184.
- Sick, C., Schultz, U. e Staeheli, P. (1996) A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. *J Biol Chem*, 271, 7635-7639.
- 20 Sinkovics, J.G. e Horvath, J.C. (2000) Newcastle disease virus (NDV): brief history of its oncolytic strains. *J Clin Virol*, 16, 1-15.
- Skerra, A. (2000) Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta*, 1482, 337-350.
- 25 Staeheli, P., Puehler, F., Schneider, K., Gobel, T.W. e Kaspers, B. (2001) Cytokines of birds: conserved functions—a largely different look. *J Interferon Cytokine Res*, 2001 21:993-1010.
- Stojdl, D.F., Lichty, B.D., tenOever, B.R., Paterson, J.M., Power, A.T., Knowles, S., Marius, R., Reynard, J., Poliquin, L., Atkins, H., Brown, E.G., Durbin, R.K., Durbin, J.E., Hiscott, J. e Bell, J.C. (2003) VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell*, 4, 263-275.
- 30

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

REIVINDICAÇÕES

1. Vírus da doença de Newcastle de RNA oncolítico recombinante compreendendo, pelo menos um, transgene codificando uma citocina de ave, em que o vírus da doença de Newcastle de RNA oncolítico recombinante é obtido de um vírus da doença de Newcastle de RNA oncolítico velogênico ou mesogênico.
5
2. Vírus, de acordo com a reivindicação 1, compreendendo pelo menos m outro transgene com atividade terapêutica quando expresso por uma célula tumoral infectada por vírus.
- 10 3. Vírus, de acordo com a reivindicação 2, em que pelo menos um outro transgene é parcialmente alogene ou singene para o hospedeiro.
4. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, em que a patogenicidade do vírus é reduzida para uma espécie de ave.
5. Vírus, de acordo com a reivindicação 4, em que a patogenicidade do vírus é reduzida para uma espécie de ave em relação ao vírus do qual o vírus recombinante é obtido.
15
6. Vírus, de acordo com a reivindicação 4 ou 5, em que a espécie de ave é selecionada de aves domésticas.
7. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 6, em que a espécie de ave é galinha.
20
8. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, o qual é um patógeno de aves, particularmente um patógeno de aves domésticas, mais particularmente um patógeno de galinha.
9. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, obtido da cepa mesogênica MTH68.
25
10. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que pelo menos um outro transgene codifica uma proteína de ligação que tem uma atividade terapêutica quando expressa pela célula tumoral infectada por vírus.
- 30 11. Vírus, de acordo com a reivindicação 10, em que a proteína de ligação é selecionada do seguinte grupo consistindo de um ligante natural, um ligante geneticamente modificado, um domínio solúvel recombinante

de um receptor natural e uma versão modificada sua, um ligante de peptídeo, um ligante de polipeptídeo, uma molécula de anticorpo e fragmentos e derivados seus, e uma molécula tipo anticorpo como uma proteína de repetição de anquirina e fragmentos e derivados seus.

5 12. Vírus, de acordo com a reivindicação 10 ou 11, em que a proteína de ligação é de um mamífero, por exemplo, uma proteína humana, de murino ou de origem estritamente relacionada ou quimérica.

10 13. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 12, em que a proteína de ligação é uma proteína monomérica, dimerica, trimérica, tetramérica ou multimérica.

14. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 13, em que a proteína de ligação é monoespecífica, biespecífica ou multiespecífica.

15 15. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 14, em que a proteína de ligação é uma proteína de fusão compreendendo, pelo menos um, domínio de ligação e pelo menos um domínio heterólogo.

20 16. Vírus, de acordo com a reivindicação 15, em que a proteína de ligação é uma proteína de fusão compreendendo uma toxina como uma RNase humana (exotoxina de pseudomonas, toxina diftérica), ou uma proteína de fusão compreendendo uma enzima tipo beta-glicuronidase, beta-galactosidase, beta-glicosidase, carboxipeptidase, beta-lactamase ou uma proteína de fusão compreendendo uma proteína imune estimulatória com atividade de citocina tipo IL-2, IL-12, TNF-alfa, IFN-beta ou GM-CSF.

25 17. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 10 a 16, em que a proteína de ligação é selecionada do grupo consistindo de proteínas de bloqueio dos receptores do fator de crescimento ativo autônomo (por exemplo, EGFR, Met), ligantes competitivos para fatores de crescimento (antagonistas), proteínas de bloqueio para a Rb fosforilação, proteínas de bloqueio para a transcrição dependente de E2F/ estabilizadores para p53;
30 ligantes antagonísticos para proteínas antiapoptóticas (por exemplo, Bcl-2); ligantes antagonísticos para ciclinas; ligantes antagonísticos para efetores Ras (por exemplo, GEFs); ligantes antagonísticos para proteínas indutoras

de hipóxia (por exemplo, HIF1 α); inibidores dos fatores de transcrição que interferem com a dimerização, ligação de DNA e/ou ligação do cofator (por exemplo, Myc/Max); indutores de diferenciação; inibidores de sinalização/translocação smad; inibidores de interações de adesão celular (caderinas, integrinas, por exemplo, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 3$); inibidores das enzimas que degradam a matriz extracelular (por exemplo, MMPs); ligantes antagonísticos para os ligantes pró-angiogênicos (por exemplo, VEGF-R solúvel); ligantes antagonísticos aos receptores pró-angiogênicos; inibidores de formação do complexo estrutural (por exemplo, KSR/Ras); inibidores de iniciação de tradução (por exemplo, eIF4E, EIF2a); e inibidores das quinases mitóticas (por exemplo, Plk-1).

18. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que pelo menos um outro transgene codifica uma enzima conversora de profármaco que tem atividade terapêutica quando expresso pela célula tumoral infectada por vírus.

19. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, em que pelo menos um outro transgene codifica uma protease que tem atividade terapêutica quando expresso pela célula tumoral infectada por vírus.

20. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, em que pelo menos um transgene codificando uma citocina de ave é selecionada dos interferons de galinha.

21. Vírus, de acordo com a reivindicação 20, em que pelo menos um transgene codificando uma citocina de ave é selecionada dos interferon de galinha tipo I.

22. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 21, em que a redução de patogenicidade é a capacidade do vírus de reduzir a lise de células de pássaros em cerca de 48 h depois da infecção com MOI 0,01 medido pelo aumento da viabilidade celular, por meio do que a viabilidade celular é aumentada até pelo menos cerca de 25% até cerca de 50% das células sobreviventes, mais preferivelmente até pelo menos cerca de 50% até cerca de 75% de células sobreviventes e mais preferivelmente até pelo menos cerca de 75% até 100% das células sobreviventes em relação

ao vírus do qual o vírus recombinante é obtível.

23. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 5 a 21, em que a redução de patogenicidade é uma extensão do tempo de sobrevivência dos embriões de galinha infectados com vírus em ovos embrioados com 11 dias de idade medido pela determinação do tempo de morte médio (MDT), por meio do que o MDT é prolongado em pelo menos cerca de 15 h até cerca de 20 h, mais preferivelmente pelo menos cerca de 20 h até cerca de 30 h, e mais preferivelmente mais de 30 h em comparação ao vírus do qual o vírus recombinante é obtido.

24. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, em que a atividade oncolítica do vírus para as células tumorais humanas é essencialmente não-reduzida.

25. Vírus, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, em que a atividade oncolítica do vírus para as células tumorais humanas medida pela viabilidade celular depois de 48 h após a infecção não é reduzida em mais de 50% em comparação ao vírus do qual o vírus recombinante é obtido e, mais preferivelmente, é essencialmente não reduzida em relação ao vírus do qual o vírus recombinante é obtido.

26. Nucleocapsídeo de um vírus de RNHA oncolítico recombinante como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25.

27. Genoma de um vírus de RNA oncolítico recombinante como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25.

28. Molécula de DNA codificando o genoma e/ou antígeno de um vírus de RNA oncolítico recombinante, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25.

29. Molécula de DNA, de acordo com a reivindicação 27, operativamente ligado a uma sequência de controle de transcrição.

30. Célula compreendendo um vírus oncolítico recombinante como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, um genoma viral da reivindicação 27 e/ou uma molécula de DNA como definida na reivindicação 28 ou 29.

31. Composição farmacêutica, compreendendo um vírus oncolítico

tico recombinante como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, um genoma viral como definido na reivindicação 27 e/ou uma molécula de DNA como definido na reivindicação 28 ou 29, como um ingrediente ativo opcionalmente junto com veículo, diluentes e/ou adjuvantes farmacêuticamente aceitáveis.

32. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 31, compreendendo ainda um profármaco o qual pode ser convertido em um composto terapeuticamente ativo pela enzima conversora de profármaco codificada pelo menos por um transgene adicional.

33. Método para o tratamento de uma doença proliferativa, compreendendo a administração em uma quantidade farmacêuticamente eficaz a um indivíduo necessitado disso de um vírus oncolítico recombinante como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, um genoma viral como definido na reivindicação 27 e/ou uma molécula de DNA como definido na reivindicação 28 ou 29.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, compreendendo a administração em uma quantidade farmacêuticamente eficaz a um indivíduo necessitado disso de

(i) um vírus oncolítico recombinante como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 25, um genoma viral como definido na reivindicação 27 e/ou uma molécula de DNA como definido na reivindicação 28 ou 29, compreendendo, pelo menos um, transgene codificando uma enzima conversora de profármaco, e

(ii) um profármaco adequado para o tratamento da doença proliferativa juntamente com o vírus, cujo profármaco pode ser convertido em um composto farmacêuticamente ativo pela enzima conversora de profármaco de (i).

35. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 33 a 34, em que o indivíduo é um paciente humano.

36. Vírus de RNA oncolítico recombinante para aves domésticas, compreendendo um ácido nucleico compreendendo, pelo menos um, transgene que codifica uma citocina.

37. Vírus, de acordo com a reivindicação 36, o qual é atenuado para galinha.

Fig. 1:

Plasmídeo pflMTH68 ChIFN-alfa

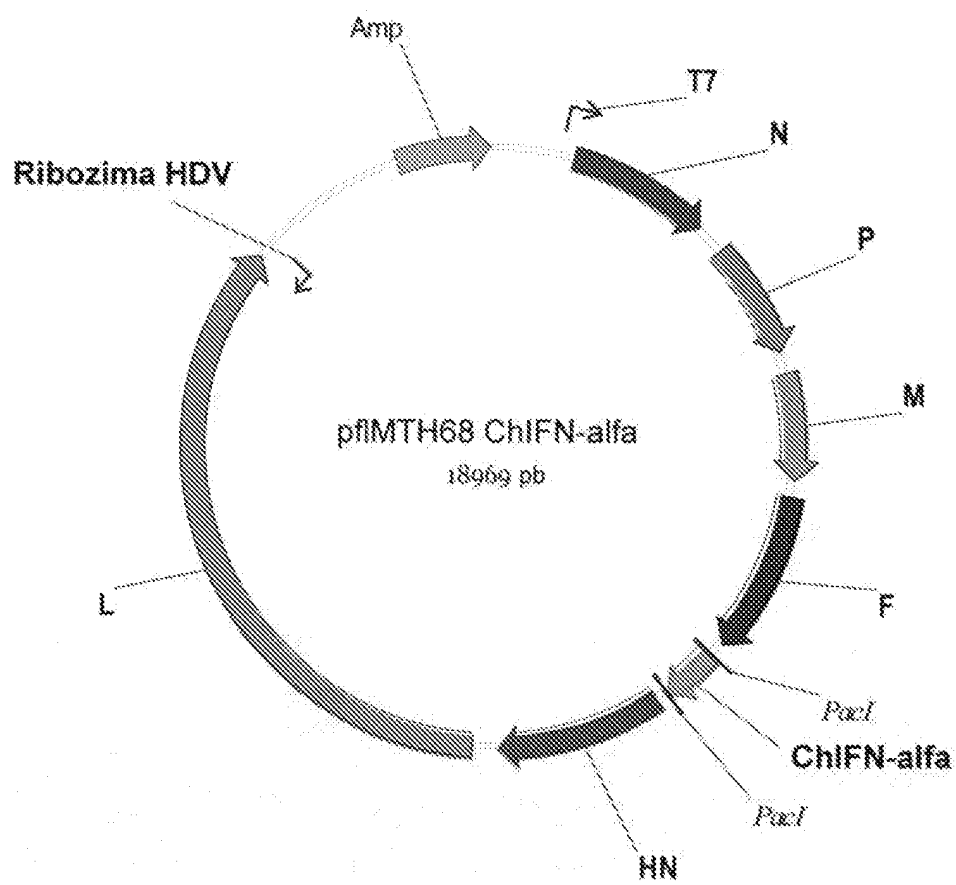


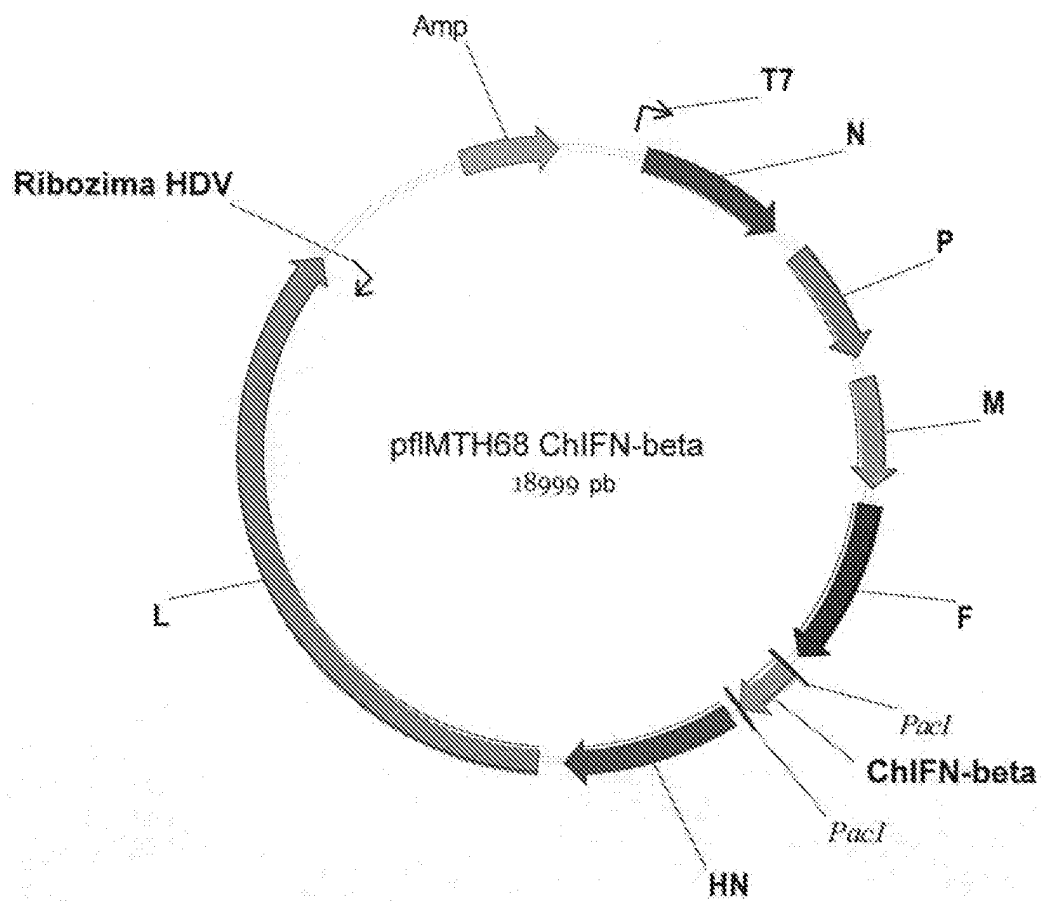
Fig. 2:**Plasmideo pflMTH68 ChIFN-beta**

Fig. 3a

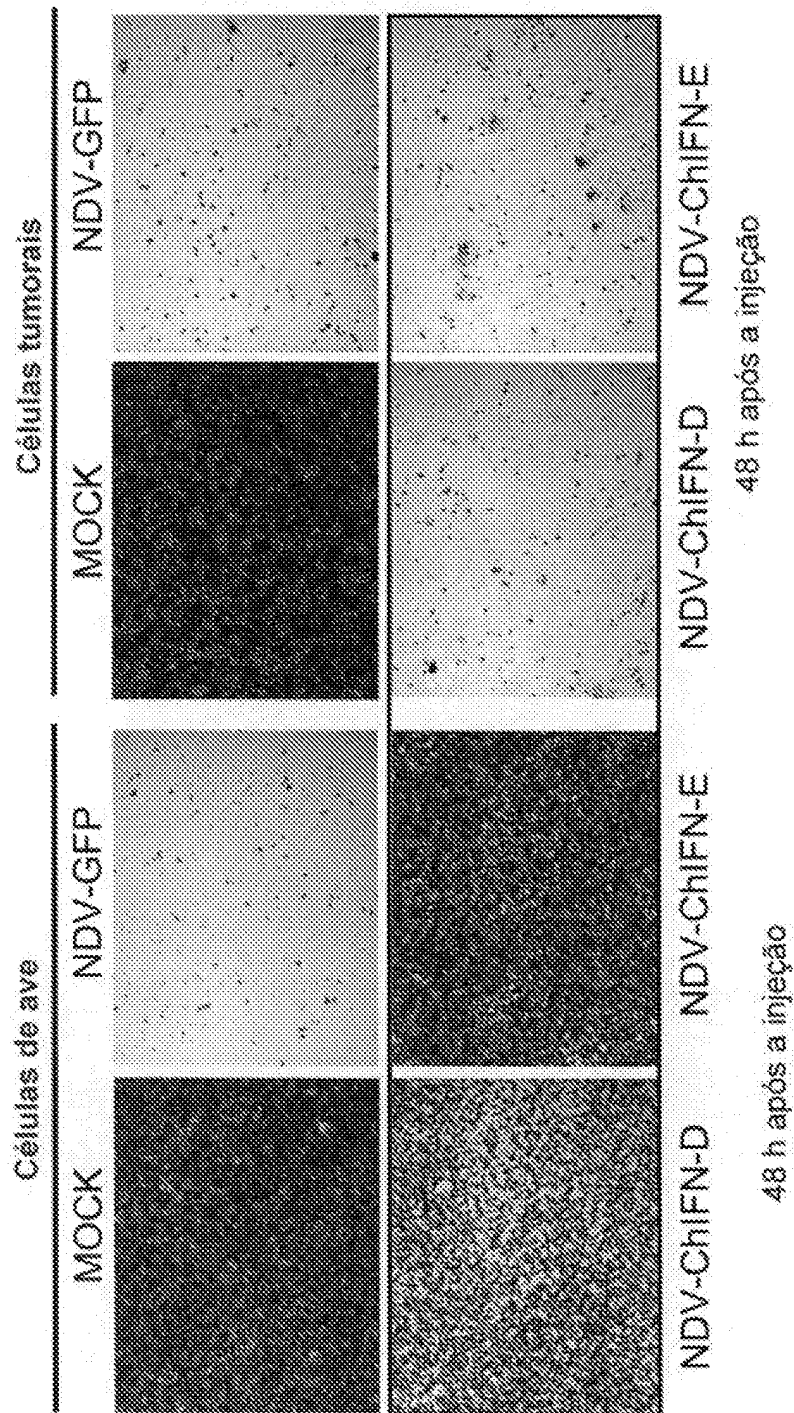


Fig. 3b

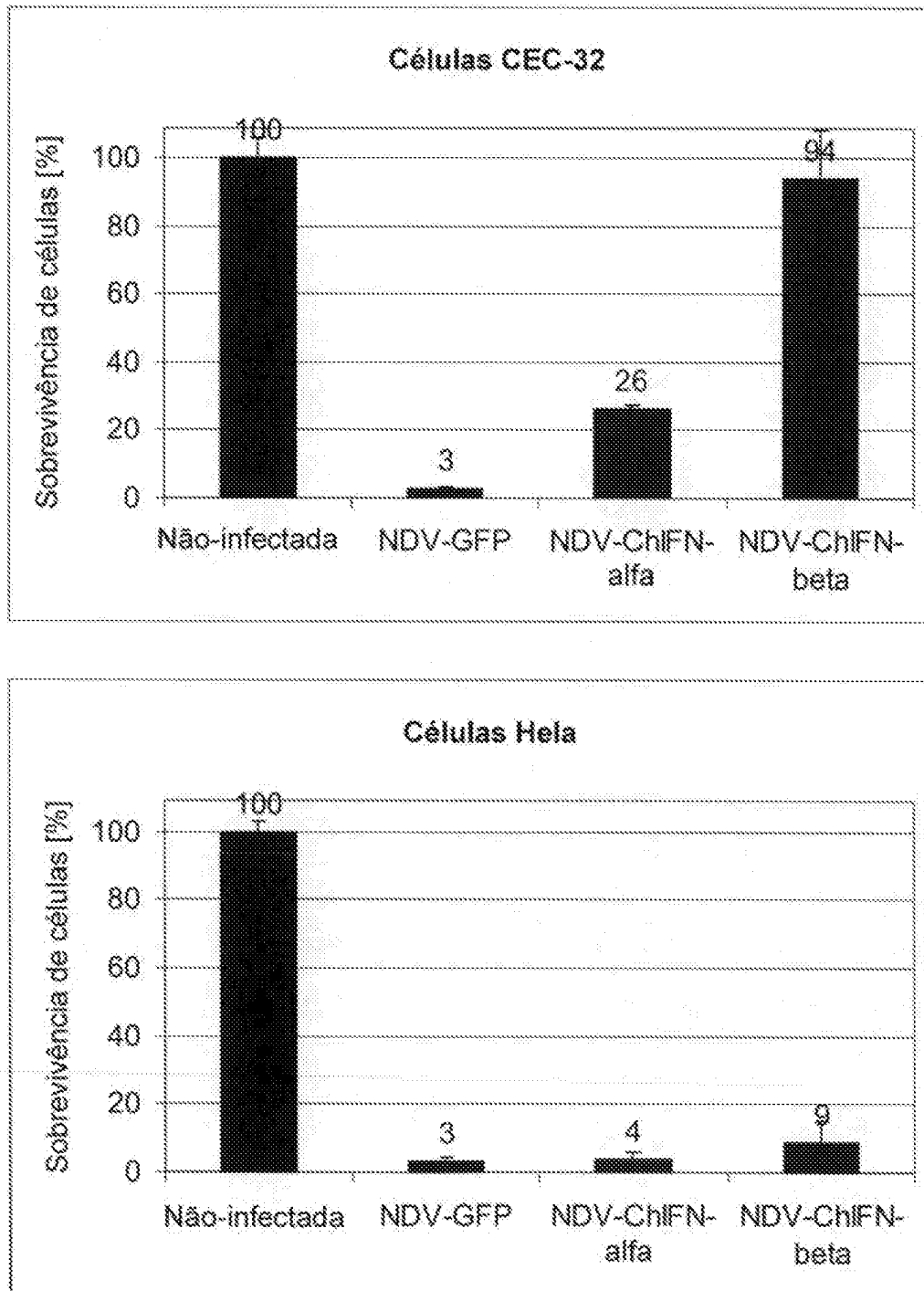


Fig. 5a

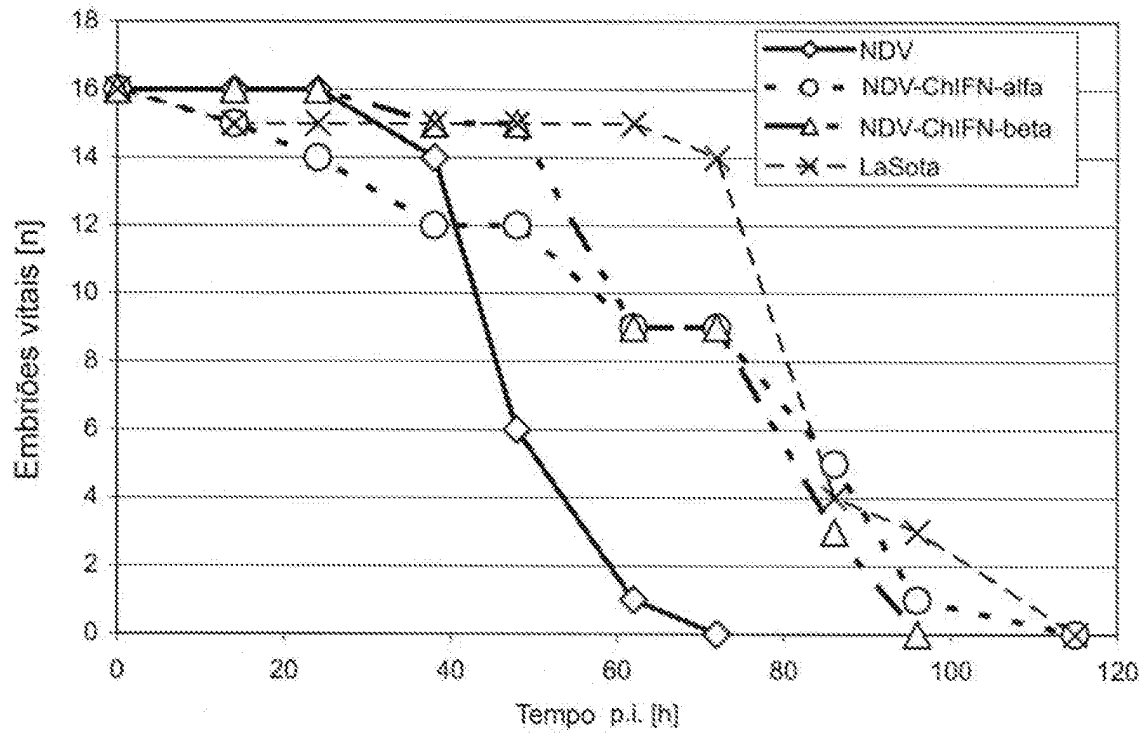
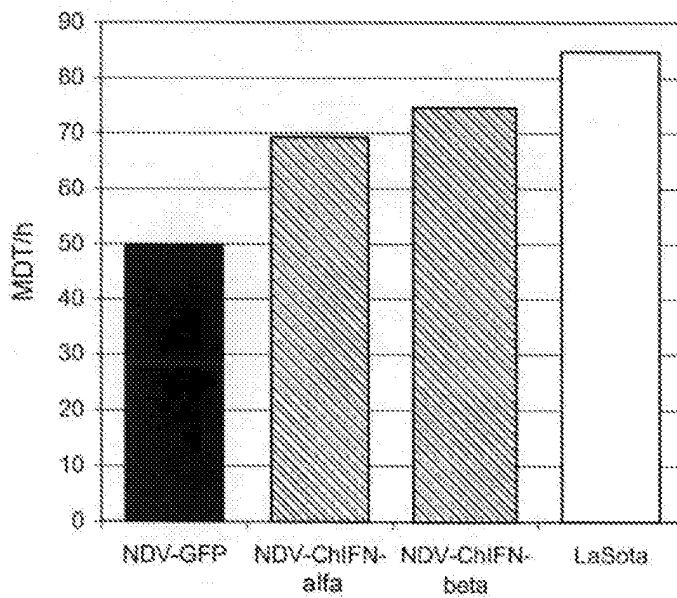


Fig. 5b



RESUMO

Patente de Invenção: **"PARAMIXOVÍRUS ONCOLÍTICO ATENUADO QUE CODIFICA CITOCINAS AVIÁRIAS".**

A invenção refere-se a um vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico recombinante para o tratamento de uma doença proliferativa, compreendendo, pelo menos um, transgene codificando uma citocina de ave, em que o vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico recombinante é obtido de um vírus da Doença de Newcastle de RNA oncolítico velogênico ou mesogênico. A expressão mediada por vírus da citocina nas células hospedeiras naturais leva a uma patogenicidade reduzida do vírus para espécies de aves. Além disso, o genoma viral pode codificar proteínas de ligação, enzimas conversoras de profármaco e/ou proteases. A expressão seletiva dessas moléculas em células tumorais infectadas com vírus aumenta o efeito antitumoral do vírus.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



42F9F7F40484C338

Campo 2



1E9A08D342C13303

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P167984.TXT
- Data de Geração do Código: 03-08-2010
- Hora de Geração do Código: 14:36:51
- Código de Controle:
 - Campo 1: 42F9F7F40484C338
 - Campo 2: 1E9A08D342C13303