



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 273 672**

(51) Int. Cl.:
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/662 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00911684 .9**
(86) Fecha de presentación : **01.03.2000**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1156827**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.11.2001**

(54) Título: **Uso de composiciones que comprenden CldC como radiosensibilizadores en el tratamiento de enfermedades neoplásicas.**

(30) Prioridad: **01.03.1999 US 122479 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2007

(73) Titular/es: **Halogenetics, Inc.**
3600 Mystic Pointe Drive, Suite 1809
Aventura, Florida 33180, US

(72) Inventor/es: **Greer, Sheldon, B.**

(74) Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de composiciones que comprenden CldC como radiosensibilizadores en el tratamiento de enfermedades neoplásticas.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a agentes útiles en el tratamiento de tumores por radiación mediante sensibilización de las células tumorales hacia la radiación. La invención se refiere también al uso de agentes de acuerdo con la reivindicación 1 para tratamiento de tumores por administración de los agentes antes y/o durante el curso de un tratamiento de radiación. Los agentes pueden efectuar la radiosensibilización selectiva de los tumores. Los agentes están involucrados también en la hipometilación dirigida al tumor. Los agentes de la invención incluyen 5-cloro-2'-desoxicitidina (Citoclor o CldC) administrada con un inhibidor de la citidina-desaminasa (Tetrahidrouridina (H₄U) o Zebularina (Zb), por ejemplo) o CldC administrado sin un inhibidor de citidina-desaminasa, cuando se combina con nuevas fuentes, nuevos protocolos de radiación, y/o nuevas categorías de tumores. Los agentes de la invención incluyen también 4-N-metilamino-5-fluoro-2'-desoxicitidina (4-N-metilamino-FdC), que puede coadministrarse con un inhibidor de la citidina-desaminasa.

Antecedentes de la invención

En estudios anteriores con tumores de roedores (1-3), el autor de la presente invención encontró que era necesario coadministrar N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA) y 5-fluoro-2'-desoxicitidina (FdC) más tetrahidrouridina (H₄U) o 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FdU) con 5-cloro-2'-desoxicitidina (Citoclor), CldC para conseguir una radiosensibilización clínicamente relevante. El autor de la invención expuso y publicó (1-3) que el protocolo no era susceptible de modificaciones, es decir que era necesario coadministrar tres fármacos con Citoclor para que tuviera lugar una radiosensibilización biológicamente significativa. Además, Pérez *et al.* (Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 10 (8): 1453-1458) describen el uso de 5-cloro-2'-desoxicitidina con tetrahidrouridina como un radiosensibilizador de tumores. Las condiciones óptimas para la radiosensibilización utilizando 5-cloro-2'-desoxicitidina con tetrahidrouridina podrían, sin embargo, obtenerse solamente cuando las células tumorales se preincubaban con inhibidores de la biosíntesis de las pirimidinas, es decir, N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA) y 5-fluoro-2'-desoxiuridina o 5-fluoro-2'-desoxicitidina + tetrahidrouridina.

Adicionalmente, el documento WO 85/01871 A describe el uso de 5-cloro-2'-desoxicitidina junto con tetrahidrouridina y/o 2'-desoxihidrouridina en un método para sensibilizar tejidos neoplásticos a la radiación.

Lawrence *et al.* (Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16(5): 1243-1246) describen el uso de las desoxicitidinas halogenadas 5-bromo-2'-desoxicitidina y 5-bromo-2'-desoxiuridina para radiosensibilización y citotoxicidad selectivas de las células del melanoma humano.

Además, Mundinger *et al.* (Acta Neurochirurgica 42(1-2): 73-77) y Wollner *et al.* (Proc. Am. Soc. Clin. Oncol. Annu. Meet. 5: 46) describen el uso de los radiosensibilizadores 5-bromo-2'-desoxiuridina y 5-bromo-2'-desoxicitidina en combinación con irradiación de iridio-192 e itrio-90 en el tratamiento del cáncer, v.g. glioblastomas multiformes.

Sin embargo, ninguno de estos documentos contiene una descripción o sugerencia relativa al uso de 5-cloro-2'-desoxicitidina en combinación con un inhibidor de la citidina-desaminasa y/o 4-N-metilamino-FdC para la fabricación de un medicamento para administración en terapia de radiación de tumores humanos asociados con hipermetilación.

Siguiendo su protocolo de utilización de PALA, FdC, H₄U y CldC en sus estudios con tumores humanos en ratones lampiños, el inventor ha encontrado sorprendente e inesperadamente que una radiosensibilización clínicamente relevante y biológicamente significativa tenía lugar con sólo CldC cuando se estudiaron tumores humanos asociados con hipermetilación.

Sumario de la invención

De modo sorprendente e inesperado, a la vista de la experiencia intensiva del inventor a lo largo de un periodo de 18 años con tumores de roedores, el inventor ha descubierto que, de manera imprevisible, tenía lugar una radiosensibilización clínicamente relevante y biológicamente significativa con sólo Citoclor (CldC) y otro fármaco, Tetrahidrouridina (H₄U) cuando se estudiaban tumores humanos. En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un agente de tratamiento de tumores que comprende:

- (a) 5-cloro-2'-desoxicitidina y un inhibidor de la citidina-desaminasa, en el cual el agente no contiene 5-fluoro-2'-desoxicitidina (FdC), 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FdU), y N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA),
- (b) 5-cloro-2'-desoxicitidina y 4-N-metilamino-FdC, o
- (c) 5-cloro-2'-desoxicitidina, 4-N-metilamino-FdC y un inhibidor de la citidina-desaminasa;

para la fabricación de un medicamento para administración en terapia de radiación de tumores humanos asociados con

hipermetilación seleccionados del grupo constituido por tumores humanos de mama, pulmón, cerebro, hígado, riñón, ovario, testículos, páncreas, tracto gastrointestinal, cabeza y cuello, nasofaringe, piel, próstata y región orofacial,

y en el cual el agente de tratamiento del tumor tiene por objeto ser administrado subsiguientemente a la exposición del individuo a una cantidad de radiación suficiente para inducir la actividad incrementada de desoxicitidina-quinasa (dCK) y/o actividad incrementada de timidina-quinasa (TK) en células diana del tumor o tumores humanos,

y en el cual dicho agente de tratamiento del tumor tiene por objeto ser administrado antes de la exposición ulterior del individuo a una cantidad de radiación eficaz para tratamiento del tumor.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de (A) un agente de tratamiento de tumores que comprende:

(a) 5-cloro-2'-desoxicitidina y un inhibidor de la citidina-desaminasa, en el cual el agente no contiene 5-fluoro-2'-desoxicitidina (FdC), 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FdU), y N-(fosfonacetil)-L-aspartato (PALA)

(b) 5-cloro-2'-desoxicitidina y 4-N-metilamino-FdC, o

(c) 5-cloro-2'-desoxicitidina, 4-N-metilamino-FdC y un inhibidor de la citidina-desaminasa;

y (B) bisulfito

para la fabricación de un medicamento para administración en terapia de radiación de tumores humanos asociados con hipermetilación seleccionados del grupo constituido por tumores humanos de mama, pulmón, cerebro, hígado, riñón, ovario, testículos, páncreas, tracto gastrointestinal, cabeza y cuello, nasofaringe, piel, próstata y región orofacial,

y en el cual el agente para el tratamiento del tumor tiene por objeto ser administrado antes de la exposición del individuo a una cantidad de radiación eficaz para el tratamiento del tumor.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de un agente de hipometilación de genes que comprende:

(a) 5-cloro-2'-desoxicitidina y un inhibidor de la citidina-desaminasa,

(b) 5-cloro-2'-desoxicitidina y 4-N-metilamino-FdC, o

(c) 5-cloro-2'-desoxicitidina, 4-N-metilamino-FdC y un inhibidor de la citidina-desaminasa;

para la fabricación de un medicamento para administración en terapia de radiación de un tumor humano resultante de al menos un gen hipermetilado seleccionado del grupo constituido por tumores humanos de mama, pulmón, cerebro, hígado, riñón, ovario, útero, testículos, páncreas, tracto gastrointestinal, cabeza y cuello, nasofaringe, piel, próstata y región orofacial, en una cantidad eficaz para hipometilizar dicho al menos un gen hipermetilado, y en el cual el agente de hipometilación de genes tiene por objeto ser administrado antes de la exposición del individuo a una cantidad de radiación eficaz para tratamiento del tumor.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende 5-cloro-2'-desoxicitidina y 4-N-metilamino-FdC.

En la presente invención, CldC puede administrarse a una dosis constante durante el curso del periodo de tratamiento (el esquema de dosis constante de CldC), administrado con un aumento gradual, con el tiempo, en dosis (el esquema de escalación gradual de la dosis de CldC), o administrado con una dosis de carga alta seguida por una dosis de mantenimiento menor (el esquema de carga de CldC).

El experimento siguiente con el esquema de escalación gradual de la dosis de CldC demuestra que la coadministración de Citoclor y Tetrahidouridina proporciona una radiosensibilización clínicamente significativa (mayor que un aumento de la dosis de 3 a 4 veces sin toxicidad). Ratones lampiños que tenían un tumor compuesto de células humanas de tumor de próstata (PC-3) se sometieron a un curso de tratamiento de 8 semanas en el experimento. Se coadministraron a los ratones CldC y H₄U en las semanas 1-4 y 8, sin administración alguna de CldC y H₄U en las semanas 5-7 (las semanas secundarias). En el experimento, se utilizó un esquema de escalación gradual de la dosis de CldC, en el cual la dosis de CldC se incrementó 10% cada una de las semanas 2-4 administrándose la misma dosis de CldC en la semana 8 que en la semana 4, pero la dosis de H₄U se mantuvo constante en las semanas 1-4 y 8. La radiación a una dosis de 3,5 Gy se administró a los ratones al final de la tarde del miércoles, jueves y viernes de cada semana. La dosis total de radiación fue 52,5 Gy administrada en 15 fracciones. La escalación gradual de la dosis de CldC co-administrada exclusivamente con H₄U dio como resultado 3/5 curaciones de un tumor humano de próstata irradiado (PC-3) en los ratones lampiños, mientras que ocurrieron 2/6 curaciones por el Protocolo Estándar que utilizaba CldC y los tres biomoduladores. No se produjo curación alguna con los fármacos solos (0/4), o radiación sola (0/5).

Además del esquema de escalación gradual de CldC arriba descrito, puede utilizarse el esquema de carga de

CldC. En el esquema de carga de CldC, el tratamiento comienza inicialmente con dosis de carga de CldC seguidas por dosis de mantenimiento de CldC. Comparado con el esquema de escalación de la dosis de CldC, el esquema de carga de CldC puede alcanzar una frecuencia de curaciones mayor aún. La administración de CldC a dosis de carga relativamente altas no dio como resultado un aumento en la pérdida de peso en los individuos sometidos al ensayo, por lo que CldC administrado a dosis de carga no tiene efecto secundario alguno. Un estudio reciente de inhibición de tumores utilizando el tumor de próstata humano PC-3 demostró que dosis altas de carga de CldC seguidas por una dosis de mantenimiento inferior de CldC, en el cual se co-administra una dosis constante de H₄U con CldC, daba como resultado una eficacia espectacular que sobrepasa la eficacia obtenida con el esquema de escalación de la dosis de CldC, en el cual la dosis de CldC se incrementaba 10% cada semana durante las semanas 2-4 en un tratamiento de 8 semanas con la misma dosis de CldC utilizada en las semanas 4 y 8, en las cuales la dosis de H₄U co-administrada con CldC se mantenía constante.

Un estudio de toxicidad con coadministraciones de CldC y H₄U en ratones demuestra que CldC más H₄U no era tóxico a dosis extremadamente altas, muy superiores a cualquier dosis terapéutica razonable. Estudios intensivos que incluían histopatología y análisis hematológicos y bioquímicos demostraron la carencia de toxicidad de CldC más H₄U en ratones. Además, CldC más H₄U no era tóxico para perros y monos. En monos y ratones, H₄U aumentaba la semi-vida de CldC. Este es un indicador muy importante de la eficacia de CldC más H₄U en el tratamiento de enfermedades, en particular tumores en humanos. Este descubrimiento demuestra que pueden utilizarse dosis de carga alta seguidas por dosis de mantenimiento para alcanzar eficacia terapéutica.

Los agentes de la invención incluyen

- (a) CldC más Tetrahidrouridina (H₄U),
- (b) CldC más Zebularina (Zb), (4, 5, 6)
- (c) 5-cloro-2'-desoxicitidina (CldC) más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U y Zb (es decir, un inhibidor *nuevo* de citidina-desaminasa), o
- (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa.

Los agentes de la presente invención deben combinarse con radiación para tratar los tumores. Los agentes pueden utilizarse también con nuevas fuentes o nuevos protocolos de radiación para tratar los tumores, que incluyen nuevas categorías de tumores no tratables con métodos de la técnica anterior. En lo sucesivo, a no ser que se especifique otra cosa, la frase "A+B" significa o bien que (a) la sustancia A y la sustancia B se administran a un individuo aproximadamente al mismo tiempo o (b) la sustancia A y la sustancia B se administran al individuo por separado con un intervalo de tiempo breve, en donde "un intervalo de tiempo breve" podría estar comprendido entre aproximadamente 0,1 minuto y aproximadamente 60 minutos, con preferencia desde aproximadamente 0,5 minutos a aproximadamente 30 minutos, y de modo más preferible desde aproximadamente 0,5 minutos a aproximadamente 10 minutos. Análogamente, a no ser que se especifique otra cosa, la frase "A ± B" significa que la sustancia A se administra con o sin la sustancia B y, si la sustancia A se administra con la sustancia B, la sustancia A y la sustancia B se administran al individuo o bien aproximadamente al mismo tiempo, o separadamente con un intervalo de tiempo breve, en donde "un intervalo de tiempo breve" es como se define anteriormente.

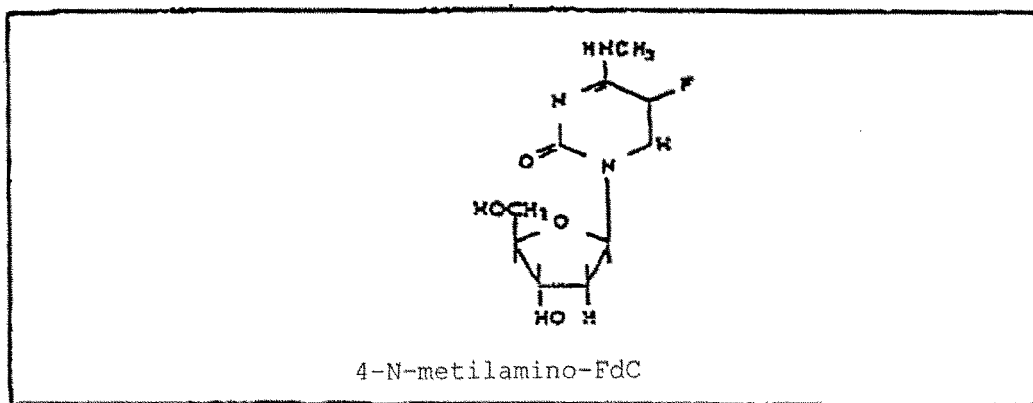
Nuevas categorías de tumores, especialmente tumores humanos, que son ejemplos de las dianas para los agentes de esta invención que incluyen

- (a) CldC más H₄U,
- (b) CldC más Zb,
- (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U y Zb, o
- (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa,

incluyen 1) tumores que no son inmunógenos debido a la hipermetilación de un gen que expresa un antígeno de la superficie tumoral, 2) tumores que se han originado como resultado de la hipermetilación de un gen supresor de tumores, 3) tumores que son metastásicos debido a que el gen que codifica E-cadherina y otras glicoproteínas de adhesión están hipermetilados, 4) tumores que han progresado debido a la pérdida de receptores de estrógenos consiguiente a la hipermetilación de genes receptores de estrógenos, 5) tumores que se han originado debido a la hipermetilación del gen codificante de la glutatión-S-transferasa, una enzima que desactiva los radicales libres cancerígenos, lo que da lugar a su vez a subclones del tumor que son más agresivos, metastásicos y resistentes a la terapia, 6) tumores que han surgido debido a la silenciación del gen para O⁶-metilguanina-metiltransferasa, una enzima que repara el deterioro químico del DNA celular, 7) tumores que han surgido debido a la silenciación del gen para un inhibidor tisular de la metaloproteína-3, 8) tumores que son inestables debido a la metilación inadecuada de la citosina, por lo que crean puntos calientes de mutación que dan como resultado transiciones de C a T las cuales, a su vez, dan lugar a subclones del tumor que son más agresivos, metastásicos y resistentes a la terapia, y 9) tumores, que pertenecen específicamente a las categorías 1 a 8 debido al aumento de la enzima 5-metilcitosina-DNA-transferasa, una enzima que se encuentra

en proporciones elevadas en muchos tumores humanos malignos y que es responsable de la hipermetilación de genes críticos, silenciando con ello los mismos.

Una de las realizaciones de la presente invención es la hipometilación de un gen durante la terapia de radiación por administración de un biomodulador, 4NCH₃-amino-5-fluoro-2-desoxicitidina o 4-N-metilamino-FdC, con una nueva función. 4-N-metilamino-FdC es un inhibidor de una nueva enzima diana: 5-metilcitoxina-DNA-transferasa. La estructura de este análogo con una función nueva se muestra a continuación:



Este análogo (4-N-metilamino-FdC) puede servir para desempeñar una función nueva inesperada como agente de hipometilación dirigido a tumores, reactivando genes que están desactivados por la hipermetilación de dinucleótidos CG en la región promotora (controladora) del DNA. Aunque 4-N-metilamino-FdC fue sintetizado junto con otros derivados de FdC cuando fue sintetizado por primera vez FdC en Sloan Kettering en 1961 (7), 4N-metilamino-FdC fue abandonado inmediatamente como agente antitumoral. La razón principal para abandonar el mismo fue la percepción de que no era diferente de 5-fluorouracilo o 5-fluorodesoxiuridina en su modo de acción. Evidentemente, su utilidad como agente de hipometilación no se visualizó debido a que la observación de la hipermetilación de genes críticos en tumores es un avance reciente.

Muchos tumores humanos poseen niveles altos de des-oxicitidina-quinasa (dC-quinasa), una enzima involucrada en la recuperación tanto de purinas como de pirimidinas. Los tumores que poseen niveles altos de dC-quinasa e hipermetilación de genes críticos en tumores serían más sensibles a este enfoque que utiliza el radiosensibilizador CldC ± el agente de hipometilación, 4-N-metilamino-FdC, ± un inhibidor de la citidina-desaminasa debido a que el primer paso en la activación (anabolismo) de estos análogos es la fosforilación por dC-quinasa.

4-N-metilamino-FdC es un sustrato moderado para citidina-desaminasa. Cuando se administra sin un inhibidor de la citidina-desaminasa, tiene el potencial de formar los antimetabolitos dirigidos al tumor, 5-fluorouracilo, 5-fluoro-2'-dUMP, y 5-fluoro-UMP y anabolitos superiores de DNA y RNA dirigidos al tumor, así como el agente de hipometilación 4-N-metilamino-5-fluoro-dCTP de una manera equilibrada de tal modo que el conjunto de derivados sobrepase la eficacia de FdC cuando se coadminstra con H₄U.

Más de la mitad de los genes supresores de tumores que se sabe están involucrados en formas heredadas de cáncer humano como resultado de mutaciones en la línea germinal están actualmente bien caracterizados por ser silenciados transcripcionalmente en asociación con la metilación aberrante de la región promotora. En estos cánceres humanos se incluyen el gen supresor de tumores controlador del retinoblastoma, el cáncer letal que afecta a los niños, VHL, un supresor de los tumores de riñón humanos, y p16, un supresor de una diversidad de tumores humanos, que incluyen glioblastoma y linfoma maligno del cerebro. Estos tumores cerebrales humanos han eludido el control por radiación. La desactivación asociada a hipermetilación del supresor de tumores p15 1NK43 ha sido demostrada también en el glioblastoma. El cáncer de vejiga humano muestra también evidencia de hipermetilación del gen supresor p16. De hecho, se ha detectado una metilación aberrante de p16 en el plasma y el suero de pacientes con cáncer de hígado. El 60% de los individuos con cáncer de pulmón de células no pequeñas demostraron hipermetilación aberrante en al menos uno de los genes siguientes: p16, la proteína-quinasa del gen supresor de metástasis "asociada a la muerte", el gen de detoxificación, la glutatión-S-transferasa, y el gen reparador del DNA, O⁶-metil-guanina-DNA-metiltransferasa. El tejido pulmonar apareado normal no demostraba aberración alguna. El 73% de las muestras tenían DNA metilado de modo aberrante en muestras de suero coincidentes. MLH-1, cuando está silenciado por metilación, da como resultado una inestabilidad de microsatélites en los cánceres de colon, gástricos y endometriales. Esto da como resultado inestabilidad genética del tumor que conduce a progresión del tumor, metástasis, agresividad y resistencia a la terapia. De importancia extrema para esta invención es que este gen supresor de tumores, MLH-1, codifica la reparación de los desapareamientos. Cuando se silencia este gen, el tumor es resistente al tratamiento con fármacos, radiación y radiosensibilización. La hipometilación de este gen por los materiales de esta invención mejorará la radiosensibilización por CldC.

BRCA1, un gen supresor del tumor de mama humano, y el gen supresor Peutz Jegher son silenciados por la actividad elevada de 5-metilcitosina-DNA-transferasa en tumores humanos. La pérdida de la expresión del gen β receptor del ácido retinoico en tumores de mama y tejidos adyacentes parecen ser debida a hipermetilación. La pérdida de la expresión del gen Fhit es frecuente en el cáncer de pulmón de células no pequeñas en pacientes que son fumadores crónicos; la hipermetilación parece estar implicada. La elevación de la actividad de 5-metilcitosina-DNA-transferasa es un marcador precoz para la progresión del tumor de pulmón humano. La desactivación de CACNAIG, un gen de canales de calcio de tipo T, está metilada de modo aberrante en su isla 5-CpG en muchos tumores humanos. La expresión de KAI se pierde por hipermetilación en la progresión del cáncer colorrectal humano. El gen APC supresor de tumores humanos suprime la formación de pólipos adenomatosos múltiples del colon y el recto. Se ha encontrado que aquél se desactiva por metilación en pacientes cuyos pólipos han progresado a cáncer colorrectal. De hecho, la regulación anormal de la expresión de 5-metilcitosina-DNA-transferasa ocurre durante la carcinogénesis química colorrectal experimental en los ratones. La metilación del gen supresor de las metástasis CD44 ocurre en el cáncer de próstata humano. La metilación de la isla CpG del gen del receptor β endotelial es común en el cáncer de próstata humano. En el cáncer humano de ovario, el gen CPC-3 está silenciado frecuentemente.

El sumario anterior lleva forzosamente a considerar los méritos de una combinación de un radiosensibilizador, v.g., CldC, con un agente de hipometilación dirigido al tumor, v.g. 4-N-metilamino-FdC, como nueva vía para controlar muchos tipos de cáncer humano.

Muchos tumores de la infancia y la edad adulta, tales como el hepatoblastoma y el rabdomiosarcoma son debidos a la pérdida de impronta. 4-N-metilamino-FdC, en virtud de su acción hipometiladora, tiene el potencial de invertir esta pérdida de impronta.

Otra ventaja inesperada de la actividad de hipermetilación de los agentes de la invención es que la misma permite la intervención de enfoques más eficaces para reactivar los genes supresores de tumores silenciados. Se ha demostrado que inhibidores de la histona-desacetilasa (tales como tricotatina, butirato de fenilo y hexametileno-bisacetamida) no son activos en la restauración de la expresión génica a no ser que se haya producido primeramente desmetilación de la actividad promotora del gen. La desmetilación por CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa con 4-N-metilamino-FdC $\pm$ H₄U u otro inhibidor de la citidina-desaminasa en combinación con inhibidores de la histona-desacetilasa despliega nuevos métodos de terapia del cáncer en mamíferos tales como humanos en particular.

Dentro del alcance de la presente invención se encuentra el tratamiento de un tumor con radiación en el cual ciertos genes del tumor están silenciados dando como resultado la formación del tumor o dando como resultado 1) tumor más agresivo, 2) tumor metastásico, 3) tumor genéticamente inestable que da lugar a subclones agresivos del tumor, o 4) tumor resistente al tratamiento con fármacos o la radiación. La actividad de CldC o 4-N-metilamino-FdC en la no-silenciación de estos genes por hipometilación puede establecer por tanto la actividad de los genes que codifican a) enzimas reparadoras, b) enzimas que destruyen radicales libres, c) inhibidores de la angiogénesis, d) glicoproteínas que previenen la migración de las células tumorales (metástasis), e) receptores celulares para hormonas o análogos de hormonas, f) antígenos de la superficie tumoral cuya pérdida da como resultado que el tumor escape del sistema inmunitario del paciente. En la presente invención, la hipometilación del DNA tumoral restablecerá la estabilidad genética por eliminación de los puntos calientes de mutación mediante inhibición de la enzima diana, 5-metilcitosina-DNA-transferasa.

La presente invención incluye la protección selectiva de los tejidos normales, especialmente en el control del cáncer de próstata por radiación.

La nueva tecnología de la presente invención da como resultado una mejora espectacular de la dosis de radiación de tal modo que una dosis de 70 Gy será tan eficaz como una dosis de 210 o 280 Gy contra los tumores, en particular tumores humanos, sin deterioro del tejido subyacente normal. Alternativamente, el oncólogo experto en radiación puede proporcionar una dosis de radiación mucho menor tal como 23,3 Gy y obtener una destrucción del tumor alcanzada normalmente con 70 Gy o 93 Gy (una dosis altamente peligrosa), evitando con ello el deterioro de los tejidos normales.

La presente invención ofrece una nueva vía de protección de los tejidos normales cuando se irradian tumores tales como tumores urogenitales, con inclusión de tumores de próstata, por administración de bisulfito con o sin cisteína inmediatamente antes del tratamiento de radiación.

Breves descripciones de los dibujos

Las Figuras 1a-e resumen gráficamente los datos arriba descritos en forma tabular. Fig. 1a-d presentan datos procedentes de estudios de inhibición de tumores, mientras que Fig. 1e presenta datos de pérdida de peso. El triángulo lleno en Fig. 1a-e representa el último día de tratamiento.

1a. El efecto de dosis altas de 5-yodo-2'-desoxiuridina (ensayada a su dosis máxima tolerada).

1b. Resultados con el Protocolo Estándar con CldC, H₄U, FdC y PALA.

1c. Resultados con dosis de escalación de CldC con una dosis constante de H₄U como se muestra en la Tabla 3.

1d. Resultados con rayos X exclusivamente.

1e. Datos de pérdida y recuperación de peso. Obsérvese que las dosis de escalación de CldC eran bien toleradas y la pérdida de peso no era mayor que con los rayos X exclusivamente.

Descripción detallada de la invención

I. Simplificación de un Protocolo Complejo

CldC y un solo inhibidor coadministrado de la citidina-desaminasa, tal como Tetrahidrouridina (H₄U) o Zebularina (Zb), son sorprendente e inesperadamente suficientes para proporcionar una radiosensibilización sustancial de los tumores, con inclusión de tumores humanos, en tanto que no se conseguían radiosensibilización y selectividad y niveles de tamaño suficientes de la agrupación de CldU e incorporación de CldU en DNA tumoral con varios (cinco) tumores de roedores (la totalidad de los estudiados) a no ser que se administraran la totalidad de los cuatro fármacos (CldC, H₄U, FdC y PALA) (Santos 1990; Greer 1990, Greer 1995). Así pues, esta simplificación del protocolo de cuatro fármacos a dos fármacos es inesperada.

Un estudio (8) que estaba basado en y seguía los descubrimientos del inventor y se contrató para expandir los descubrimientos del inventor con CldC como radiosensibilizador, utilizó tumores de roedor (un fibrosarcoma inducido por radiación, RIF-1). Los investigadores demostraron que CldC ± H₄U, a dosis equimolares, era muy inferior a 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU) como radiosensibilizador. Sólo cuando se utilizaron dosis tóxicas de CldC se producía una radiosensibilización marginal (una relación de mejora de la dosis de 1,6 con relevancia clínica dudosa, especialmente a la vista de la toxicidad encontrada). El sistema utilizaba irradiación *in vitro* de suspensiones de células tumorales de ratón después que los ratones se sometieron a infusión con CldC ± H₄U o BrdU durante 72 horas. En contraste, en estudios realizados por el inventor, los tumores se irradian con dosis fraccionadas mientras se están desarrollando los tumores en los ratones - análogamente al tratamiento de los tumores humanos en la clínica.

Estos resultados con tumores de roedor (8) que indican una mejora marginal de la dosis combinados con la complejidad del protocolo que requiere cuatro fármacos para conseguir una mejora de la dosis de 3 a 4 veces con tumores de roedor permitieron llegar a la conclusión por un oncólogo especialista en radiación de que la tecnología que utiliza CldC no lograba pasar a la fase de pruebas clínicas debido a resultados conflictivos y marginales como se expuso en una publicación del laboratorio del oncólogo en 1994 (9). Las consideraciones anteriores ponen de manifiesto la importancia de la eficacia de la simplificación recién desarrollada del protocolo en la presente invención, demostrada en los estudios recientes del inventor con tumores humanos en ratones lampiños, en lugar de hacerlo con tumores de roedor en ratones convencionales, lo cual permite ahora el desarrollo de la tecnología para tratar tumores humanos en pacientes con cáncer.

La Tabla 1 muestra el esquema general del protocolo de administración de fármacos que se seguía en el pasado con los tumores de roedor y con los tumores humanos antes del descubrimiento inesperado de que podían eliminarse dos de los moduladores N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA) y 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FdC) (+H₄U).

La tabla superior de la Tabla 2 resume los resultados de experimentos con el Protocolo Estándar utilizando CldC, H₄U, FdC y PALA contra cinco tumores humanos implantados en ratones lampiños. En esta tabla se incluyen los resultados del experimento en el que se modificaron los protocolos. La tabla inferior de la Tabla 2 resume los resultados de un experimento que incluía el uso de dosis de escalación de CldC más una dosis constante de H₄U; no se coadministraron PALA y FdC.

La Tabla 3 indica de qué modo se escaló la dosis de CldC en las semanas I a IV.

La dosis total de radiación era 52,5 Gy suministrada en fracciones de 153,5 Gy. Los tumores se irradian a última hora de la tarde de miércoles, jueves y viernes. Obsérvese que ocurrieron 3/5 curaciones con dosis de escalación de CldC, en tanto que ocurrieron 2/6 curaciones con el protocolo completo. Un examen de los datos de pérdida de peso indica que la escalación de la dosis de CldC hasta conseguir el control del tumor no da como resultado morbilidad o efectos secundarios. La pérdida de peso es igual a la obtenida con radiación sola y es totalmente recuperable.

Cuando se utiliza CldC inicialmente a dosis altas (dosis de carga seguidas por dosis de mantenimiento) o cuando se utiliza con dosis de escalación o dosis altas constantes, con H₄U o Zb u otro inhibidor de la citidina-desaminasa, es un radiosensibilizador eficaz de tumores, especialmente de tumores humanos. Comparado con el protocolo estándar utilizado en la técnica anterior, el nuevo protocolo es más sencillo, por consiguiente, haciendo más factible la aplicación clínica de CldC.

Sin quedar ligados por el mecanismo de acción propuesto en esta memoria, el autor de la presente invención cree que la eficacia de CldC está basada, en parte, en el aumento esperado de dC-quinasa y dCMP-desaminasa en los tumores, especialmente los tumores humanos. En contraste con la terapia génica, en la que se suministran genes codificantes de enzimas a las células diana mediante retrovirus, por ejemplo, la presente invención está basada en parte

en enzimas que están elevadas intrínsecamente en los tumores humanos; es decir, las enzimas se encuentran ya en ellos. La presente invención aprovecha estos aumentos de enzimas (que son importantes para el éxito del tumor) para una ventaja terapéutica. La eficacia de CldC está basada también en la capacidad de CldC, debido a la electronegatividad del átomo Cl y su radio intermedio de Van der Waals, para tener algunos de los atributos bioquímicos favorables de FdC por una parte y tanto de BrdUMP e IdUMP y sus anabolitos por otra. El autor de la presente invención observa que a) dosis altas de CldUMP formadas a partir de CldC en los tumores no sólo sobrepasarán los niveles competitivos de TTP sino que inhibirán su formación debido a la afinidad de CldUMP para la timidilato-sintetasa. Un estudio simple en el laboratorio de Santl (10) ha demostrado que el valor KI de CldUMP era mayor que el de FdUMP, pero mucho menor que el de BrdUMP e IdUMP (los valores KI para la inhibición de la timidilato-sintetasa por las sustancias siguientes son: FdUMP = 0,015, CldUMP = 0,19, BrdUMP = 1,4, e IdUMP = 1,6). CldUMP, en contraste con BrdUMP e IdUMP, no es deshalogenado por la timidilato-sintetasa (11). b) El clorouracilo derivado de CldC en los tumores inducirá a la reparación por la uracil-N-glicosilasa (una propiedad de uracilo y 5-fluorouracilo). Cuando va seguido por la endonucleasa apurínica/apirimidínica, esto daría como resultado roturas adicionales de una sola cadena del DNA en las células tumorales, lo que debería sobrepasar la reparación y conducir a radiosensibilización. La acumulación de dUMP debida a la inhibición de la timidilato-sintetasa descrita anteriormente en 'a)' debería dar como resultado roturas adicionales de las cadenas de DNA debido a la acumulación resultante de uracilo en el DNA (12). c) El CldUTP formado a partir de CldC selectivamente en los tumores inhibirá las agrupaciones competitivas de TTP debido a la inhibición de la nucleósido-difosfato-reductasa (una propiedad de BrdUTP), que es un inhibidor excelente de dicha enzima. Los desequilibrios de la agrupación de nucleótidos causados por esta inhibición, a la vista de estudios con otros inhibidores de reductasas, deberían dar como resultado apoptosis dirigida al tumor y roturas de cadenas equivalentes a la obtenida con 20 Gy (13). d) CldC en DNA tendrá la capacidad de inhibir la 5-metilcitosina-DNA-transferasa de una manera análoga por la cual FdC inhibe esta enzima (14-16). La enzima progresiva, 5-metilcitosina-DNA-metiltransferasa, es inhibida por un mecanismo similar por el cual FdUMP inhibe la timidilato-sintetasa (16). Ambas enzimas se encuentran normalmente con un hidrógeno en la posición 5 en lugar de un halógeno electronegativo, que deben extraer aquéllas para reemplazamiento con un grupo metilo. Ambas enzimas están inhibidas covalentemente debido a que no pueden extraer el grupo electronegativo flúor o cloro.

El autor de la presente invención quiere resaltar que una característica importante de la CldUMP formada a partir de CldC es que CldUMP puede inhibir la timidilato-sintetasa (TS), una fuente importante del metabolito normal (TTP) (que compite con CldUTP para incorporación en el DNA). Por esta razón, CldC en altas concentraciones no sólo sobrepasará las agrupaciones celulares de TTP, sino que inhibirá su formación. Esto podría explicar la omisión de FdC y PALA en los métodos de tratamiento de la presente invención sin una pérdida de eficacia de CldC más H₄U. FdC y PALA en el Protocolo Estándar funcionan principalmente por disminución de las agrupaciones de TTP.

35 II. Nuevas Fuentes de Radiación

La tecnología de la presente invención es aplicable a las fuentes de radiación utilizadas en la técnica anterior y asimismo a nuevas fuentes de radiación.

40 A. Protones

Para tumores profundos, los métodos de la presente invención pueden utilizar protones como fuente de radiación. En la terapia de los tumores por radiación, pueden combinarse protones como fuente de radiación con (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zb, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb, o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa.

A no ser que se especifique otra cosa, a todo lo largo de la Solicitud de Patente, la frase "administración de CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa" significa que (A) se administran CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa más 4-N-metilamino-FdC, (B) se administran CldC más un primer inhibidor de la citidina-desaminasa por separado de 4-N-metilamino-FdC ± un segundo inhibidor de la citidina-desaminasa, (C) se administra CldC por separado de 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de citidina-desaminasa, o (D) se administra CldC por separado de 4-N-metilamino-FdC, en donde los inhibidores primero y segundo de la citidina-desaminasa pueden ser el mismo o diferentes.

55 B. Braquiterapia

Debido a la sensibilización por Citoclor (CldC) a tasas de dosificación de radiación bajas, una fuente de radiación tal como agujas de itrio 90 o iridio, implantadas proximales a un tumor, v.g. tumor de próstata o de mama, puede combinarse con (a) CldC más H₄U; (b) CldC más Zb; (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa en terapia por radiación de tumores para alcanzar respuestas notables, no alcanzables por la radiación con haces externos.

C. Anticuerpos Monoclonales Fijados a Radionucleidos (por ejemplo, itrio 90)

Debido a la sensibilización por Citoclor a tasas de dosificación de radiación bajas, en la terapia de tumores por radiación, puede administrarse a un individuo un tratamiento sistémico de (a) CldC y H₄U; (b) CldC y Zebularina; (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zebularina; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, en donde el tratamiento sistémico está acoplado con la administración de

anticuerpos monoclonales fijados a un radionucleido al individuo. Esto aporta una dimensión totalmente nueva a la tecnología debido al hecho de que permite un tratamiento de una enfermedad metastásica. El anticuerpo monoclonal buscará los nidos de los focos metastásicos y erradicará los mismos cuando aquéllos han migrado del sitio primario. No es necesario que el anticuerpo monoclonal (mAb) esté fijado al radionucleido, v.g. itrio 90, para interaccionar con cualquier célula en el clon metastásico debido al efecto espectador; es decir, las células proximales a la célula que ha atraído el mAb serán sin embargo diana para la emisión beta. La presente invención hace factible el tratamiento de metástasis del cáncer.

Las dos desventajas de este “enfoque teórico” han sido: a) la señal enviada por la célula tumoral ha sido demasiado débil, es decir, la mayoría de los tumores ocultan sus antígenos de superficie singulares, b) la diana no ha sido suficientemente sensible al ‘misil inteligente’. La presente invención aborda dichos dos problemas por a) la acción de hipometilación de CldC cuando se incorpora como tal en DNA o de 4-N-metilamino-FdC que conduce a la expresión de antígenos de la superficie tumoral que pueden servir como señal para atraer selectivamente el mAb conjugado con itrio 90 y b) por el efecto de radiosensibilización de CldC. La erradicación de la enfermedad metastásica en sitios desconocidos es un aspecto sumamente crítico y nuevo de esta invención.

D. La Cuchilla Gamma

El uso de fuentes múltiples de radiación enfocadas todas ellas a una región muy pequeña en un tumor sólido, v.g. un tumor cerebral es un enfoque que ha mejorado la perspectiva para controlar los tumores sólidos, tal como glioblastoma y otros tumores cerebrales. Sin embargo, existe necesidad de una destrucción más eficaz dirigida a los tumores. Los tumores humanos del cerebro tienen niveles 125 a 130 veces mayores de dCMP-desaminasa que la corteza cerebral circundante. La dCMP-desaminasa es la enzima responsable de la conversión del profármaco, CldC, en el radiosensibilizador, CldUTP.

La combinación de CldC y radiación gamma por la cuchilla gamma proporcionará un gran potencial para curaciones de tumores sólidos, especialmente tumores cerebrales.

Pueden administrarse a un paciente, oralmente o por infusión intravenosa, los agentes de la presente invención, es decir (a) CldC y H_4U , (b) CldC y Zebularina; (c) CldC y un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H_4U o Zebularina; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC $\pm$ un inhibidor de la citidina-desaminasa, y administrarse también 3 a 4 tratamientos con la cuchilla gamma. La infusión de los agentes a través de la arteria carótida o de una vena por una bomba portátil una semana antes del tratamiento con la cuchilla gamma y durante una semana de tratamiento con la cuchilla gamma sería el método de elección si no resulta fructuosa la administración oral.

E. Radiación Tridimensional Ajustable

Utilizando varios ángulos diferentes en lugar de un solo plano de radiación, el daño al tejido normal puede disminuirse por *extensión* de la radiación a diversas áreas de tejidos normales. Además de este enfoque 3D, la fuente de radiación puede modificarse por el uso de un colimador multihoja a fin de ajustar la radiación a la forma del tumor, en donde la forma del tumor se determina primeramente por tomografía asistida por ordenador. El uso de los agentes de la presente invención, es decir (a) CldC y H_4U ; (b) CldC y Zebularina; (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H_4U o Zebularina; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC $\pm$ un inhibidor de la citidina-desaminasa, en combinación con la Terapia de Radiación 3D Ajustable tiene el potencial de proporcionar curaciones de los tumores que no serían posibles de otro modo. La combinación puede reducir significativamente la hemorragia rectal, la incontinencia y la impotencia en el tratamiento del cáncer de próstata, o incluso la propagación de la progresión del tumor de próstata, las metástasis y la agresividad del tumor.

F. Radiocirugía Estereotáctica

Los agentes de la presente invención, es decir (a) CldC y H_4U ; (b) CldC y Zebularina; (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H_4U o Zebularina; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC $\pm$ un inhibidor de la citidina-desaminasa pueden combinarse también con radiocirugía estereotáctica para aumentar la eficacia de la terapia de radiación. Esto implica el uso de un marco estereotáctico y se utiliza usualmente para tratar tumores cerebrales. Sin embargo, la radiocirugía estereotáctica puede adaptarse al tratamiento de tejidos tumorales distintos del cerebro.

III. Nuevos Métodos de Suministro

A. Liberación Intratumoral Lenta y Sostenida de CldC y los Moduladores

Pueden emplearse polímeros tales como bis(p-carboxifenoxi)propano-ácido sebácico y otros agentes tales como suspensiones de lecitina para obtener una liberación intratumoral sostenida de CldC y un inhibidor de la citidina-desaminasa, v.g. H_4U , con o sin 4-N-metilamino-FdC. También pueden utilizarse otras formulaciones de liberación lenta sostenida conocidas en la técnica.

B. Perfusión del Tumor con o CldC y los Moduladores

IV. Nuevos Inhibidores de Desaminasas

Además de tetrahidrouridina (H_4U) y Zebularina (1- β -ribofuranosil-1,2-dihidropirimidin-2-ona), es decir Zb, se contempla en la presente invención el uso de otros inhibidores de desaminasas para mejorar la eficacia de CldC y/o FdC como radiosensibilizador y modulador.

Debido a que la tetrahidrouridina es inestable en medio ácido, no es práctico administrar tetrahidrouridina por vía oral a no ser que se utilice una forma recubierta del fármaco. La administración oral puede ser posible para los otros fármacos. La administración oral es la ruta ideal de administración, por supuesto, dado que CldC, FdC y 4-N-metilamino-FdC son profármacos, CldC, FdC y 4-N-metilamino-FdC pueden administrarse por vía oral, en donde la ruta entérica es una ruta de administración deseable.

Inhibidores de citidina-desaminasa distintos de tetrahidrouridina y Zebularina pueden incluir los siguientes:

- A. Pirimidin-2-ona-nucleósidos, tales como 5-F-pirimidin-2-ona-nucleósidos (4,5,6), distintos de 1- β -ribofuranosil-1,2-dihidropirimidin-2-ona,
- B. Nucleósidos de F-pirimidin-2-ona,
- C. Diazepin-2-1-nucleósidos,

Los diazepin-2-1-nucleósidos actúan de una manera análoga a los inhibidores de adenosina-desaminasa, que son inhibidores potentes.

Los diazepin-2-1-nucleósidos son lábiles en medio ácido pero muy potentes, siendo 10 veces más potentes que la tetrahidrouridina. Los diazepin-2-1-nucleósidos dan como resultado una mayor eficacia de CldC y/o FdC como radiosensibilizador y modulador, respectivamente.

D. 1-(2-Desoxi-2-fluoro- β -D-arabinofuranosil)-1,2-dihidropirimidin-2-ona.

E. 2'-Desoxi-2'-F-arazebularina.

F. Diazoepinona.

G. 4-Hidrometil-2-oxopirimidin-2-ona-nucleósido.

H. 2'-Fluoro-2'-desoxiarabinosil-tetrahidrouracilo, que es improbable sufra escisión N-glicosídica.

V. La presente invención es sumamente eficaz contra tumores humanos que poseen niveles altos de 5-metilcitosina-DNA-transferasa. Un nivel elevado de 5-metilcitosina-DNA-transferasa es una característica de muchos tumores.

La 5-metilcitosina-DNA-transferasa es una nueva enzima diana inhibida por (a) FdC + H_4U , (b) 4-N-metilamino-FdC con o sin un inhibidor, v.g. H_4U o Zb, de la citidina-desaminasa, o (c) CldC con o sin un inhibidor, v.g. H_4U o Zb, de la citidina-desaminasa. La 5-metilcitosina-DNA-transferasa es una enzima mutagénica causante de cáncer, responsable de metástasis, progresión del tumor y resistencia a la terapia (17, 18).

La 5-metilcitosina-DNA-transferasa puede ser responsable del origen del tumor. Los análogos de pirimidina clorados y fluorados inhiben esta enzima progresiva de modo irreversible y no estequiométrico. La enzima es inhibida únicamente en presencia de S-adenosil-metionina. El mecanismo de inhibición es como sigue: la enzima extrae usualmente un H de la posición 5 de la citosina en el DNA y añade un grupo metilo procedente de S-adenosil-metionina. Cuando CldC, FdC o 4-N-metilamino-FdC se encuentra en el DNA, la enzima no puede extraer el cloro o flúor electro-negativo y queda pegada y desactivada en dicha posición. La enzima progresiva no puede atravesar el DNA e interfiere con la transcripción, fallando en la metilación de los dinucleótidos CG situados aguas abajo en la cadena hija opuesta a la $G^{me}C$ en la cadena parental.

Los agentes de la presente invención, es decir (a) CldC más H_4U ; (b) CldC más Zb; (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H_4U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC $\pm$ un inhibidor de la citidina-desaminasa darán como resultado la hipometilación dirigida al tumor. Con anterioridad, se añadían FdC + H_4U para disminuir las agrupaciones competidoras de TTP que interfieren con la incorporación de CldUTP en el DNA del tumor. 4-N-metilamino-FdC, cuando se coadministra con un inhibidor de la citidina-desaminasa, no rebajará las agrupaciones menores de CTP, sirviendo en su lugar únicamente como agente de hipometilación dirigido al tumor. CldC a dosis altas actuará como FdC como agente de hipometilación y actuará al mismo tiempo como radiosensibilizador e inhibirá la reductasa (como BrdU e IdU) e inhibirá la timidilato-sintetasa, una enzima diana en la quimioterapia del cáncer (como FdU o 5-fluorouracilo).

Lo que resulta sorprendente e inesperado con la presente invención es que CldC es un fármaco multifacetado, como 5-bromo-2'-desoxiuridina o 5-yodo-2'-desoxiuridina en algunos aspectos y como 5-fluoro-2'-desoxiuridina o FdC en otros aspectos.

VI. Uno de los aspectos de la presente invención utiliza un análogo de nucleósido, 4-N-metilamino-5-fluoro-2'-desoxicitidina (4-N-metilamino-FdC), con una nueva función inesperada

La estructura del nuevo fármaco, 4-N-metilamino-FdC, se ha representado anteriormente. 4-N-metilamino-FdC no requiere absolutamente la coadministración de un inhibidor de la citidina-desaminasa. El mismo es solamente un sustrato moderado de citidina-desaminasa. Cuando se co-administra con H₄U, 4-N-metilamino-FdC actuará únicamente como agente de hipometilación sin generar FdUMP, FUMP, FUrA, FdU o FUTP o FdUTP. No interferirá con el procesamiento del RNA y no generará inhibidores de la timidilato-sintetasa como sucede con 5-fluorouracilo (FUrA), 5-fluoro-desoxiuridina (FdU) o 5-fluorodesoxicitidina (FdC).

VII. Los agentes de la presente invención, v.g. (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, cuando se combinan con radiación, son especialmente eficaces contra tumores, tales como tumores humanos, que no son inmunógenos debido a que no expresan antígenos de la superficie del tumor, v.g. HLA. La presente invención es especialmente eficaz contra tumores que enmascaran la superficie tumoral o antígenos HLA, es decir, tumores no inmunógenos.

Estos tumores no inmunógenos silencian los genes formadores de antígenos por hipermetilación. Los agentes de la presente invención, es decir (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, dan como resultado la expresión de antígenos de la superficie tumoral (HLA). Esto permite que el paciente monte una respuesta inmunitaria contra el tumor y asegure la eficacia del uso de anticuerpos monoclonales fijados a radionucleidos frente a los focos metastásicos del tumor. Los agentes de la presente invención tienen un efecto notable contra tumores que "ocultan" sus antígenos singulares (y mucho tumores exitosos ocultan de hecho sus antígenos) con lo que se obtendrá una mayor eficacia. Esto es consistente con la meta de la radioterapia que consiste en reducir la carga tumoral a fin de que el sistema inmunitario del paciente pueda controlar las células supervivientes restantes.

VIII. Los agentes de la presente invención, v.g. (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, cuando se combinan con radiación, son especialmente eficaces contra los tumores, v.g. tumores humanos que se presentan como resultado de la desactivación de un gen supresor de tumores.

Los agentes de la presente invención son especialmente eficaces contra tumores que se han presentado como resultado de la silenciación (hipermetilación) de genes supresores de tumores. Dado que muchos tumores surgen como resultado de la desactivación de un gen supresor de tumores - no por mutación o delección sino por metilación, que da como resultado la silenciación de los genes, los agentes de la presente invención, es decir (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, juegan un papel en la reexpresión del gen supresor de tumores inactivo que dará lugar como resultado curaciones del tumor.

IX. Los agentes de la presente invención, v.g. (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, cuando se combinan con radiación, son especialmente eficaces contra tumores de cadherina que dan lugar a subclones metastásicos debido a la silenciación del gen cadherina.

Esto ocurre a menudo en los tumores de mama y próstata y en el carcinoma de células escamosas del pulmón, por ejemplo.

Los tumores humanos llegan a hacerse a menudo metastásicos como resultado de la desactivación del gen que codifica cadherina, una glicoproteína adherente que impide que las células migren a sitios distantes. Este gen se desactiva a menudo no por mutación o delección sino por metilación, la cual da como resultado la silenciación del gen. La mayoría de los tumores metastásicos de mama son de tipo cadherina, es decir que carecen de la expresión del gen cad.

X. Los agentes de la presente invención, v.g. (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, cuando se combinan con radiación, son especialmente eficaces contra tumores que no pueden ser tratados con análogos de estrógenos y andrógenos debido a que los receptores hormonales están ausentes.

Los tumores humanos de mama y próstata pueden controlarse por análogos hormonales cuando sus receptores hormonales están intactos. Por ejemplo, aproximadamente el 40% de los tumores de mama son negativos a los receptores de estrógenos (ER) y, por tanto, no pueden tratarse con tamoxifeno. Se ha demostrado que en la gran mayoría de los casos, el gen ER está desactivado no por mutación o delección sino por metilación de la citosina.

(XI). Los agentes de la presente invención, v.g. (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, cuando se combinan con radiación, son especialmente eficaces contra tumores que tienen niveles bajos de glutatión-S-transferasa. La glutatión-S-transferasa es una enzima antioxidante y su silenciación puede haber

dado lugar a los tumores. Su silenciación puede conducir a subclones del tumor que son más agresivos, metastásicos y resistentes a la terapia.

XII. Los agentes de la presente invención, v.g. (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, cuando se combinan con radiación, son especialmente eficaces contra tumores que tienen niveles bajos de O⁶-metil-guanina-metiltransferasa. La O⁶-metil-guanina-metiltransferasa es una enzima reparadora que repara las purinas alquiladas. Su silenciación puede conducir a subclones del tumor que son más agresivos, resistentes a la terapia y metastásicos.

XIII. Los agentes de la presente invención, v.g. (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, cuando se combinan con radiación, son especialmente eficaces contra tumores que tienen niveles bajos del inhibidor tisular de la metaloproteinasa-3. El inhibidor tisular de la metaloproteinasa-3 (TIMP-3) puede suprimir el crecimiento tumoral, la angiogénesis, la invasión y las metástasis en muchos tumores humanos.

XIV. Los agentes de la presente invención, v.g. (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, combinados con radiación, son especialmente eficaces contra tumores que han surgido debido a mutación en el gen p53 supresor de tumores. Los análogos cambian un tumor humano inestable en uno más estable genéticamente.

Muchos tumores humanos son genéticamente inestables y dan lugar a subclones más metastásicos y más agresivos que pueden ser también resistentes a la terapia. La razón de esto es que ha ocurrido una metilación inapropiada de la citosina por la 5-metil-citosina-DNA-transferasa. Cuando ^mC se desamina espontáneamente o por la enzima tumorigénica 5-metilcitosina-DNA-transferasa, ello da como resultado la mutación (una transición de C a T). Tumores tales como los que se encuentran en la glándula prostática progresan a una tumorigénesis mayor por acumulación de mutaciones en el gen p53 supresor de tumores. Con el gen p53 supresor de tumores, ocurren transiciones de C a T muy frecuentemente en los tumores humanos de pulmón (46%), de colon (79%), de vejiga (47%), de ovario (36%), de cerebro (75%) y de mama (40%). Estas transiciones son debidas a la acción de la 5-metilcitosina-DNA-transferasa que no sólo metila C en los dinucleótidos CG, sino que desamina también ^mCG para formar pares de bases TG y además, impide que la enzima reparadora de los desapareamientos repare los desapareamientos TG (TA y CG son apareamientos normales de pares de bases). La 5-metil-citosina-DNA-transferasa metila también, notablemente, el uracilo en el DNA que se genera por desaminación espontánea de la citosina o por la acción de 5-metilcitosina-DNA-transferasa (17). Esto forma un par de bases TG y por tanto impide indirectamente la eliminación de uracilo del DNA, que podría ser eliminado normalmente del DNA por una cascada de reparación que comienza con uracil-N-glicosilasa. La 5-metilcitosina-DNA-transferasa inhibe también directamente la uracil-N-glicosidasa.

Así pues, la metil-transferasa es una enzima mutagénica y tumorigénica (18) que está elevada en muchos tumores humanos (19,20). La 5-metilcitosina-DNA-transferasa es la diana de los análogos de desoxicitidina de esta invención. Por esta razón, la acción de los análogos de desoxicitidina en la 5-metilcitosina-DNA-transferasa en combinación con radiosensibilización hace que el método de utilización de CldC de la presente invención sea un enfoque potente para controlar el cáncer humano. La desactivación de p53 es sumamente importante teniendo en cuenta el hecho de que los tumores y las líneas de células tumorales que carecen de p53 son resistentes a la radiación.

^mC es un “punto caliente” de mutación y los agentes de la presente invención, es decir (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, pueden eliminar estos puntos calientes en virtud de la hipometilación.

Los apartados VII-IX tienen como base la elevación de la 5-metilcitosina-DNA-transferasa en tumores humanos y la capacidad de los agentes de la presente invención, es decir (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa, para hipometilar los genes que han sido silenciados por hipermetilación.

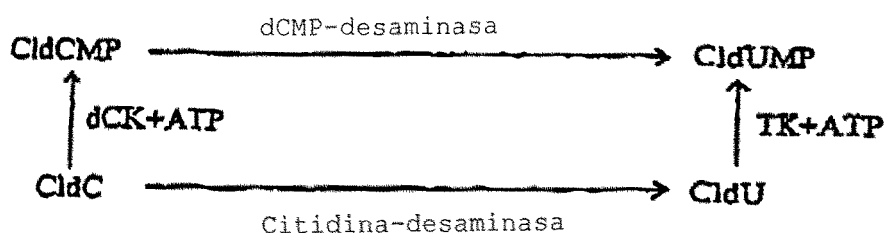
CldC tiene la ventaja de ser a la vez un radiosensibilizador y un agente de hipometilación. 4-N-metilamino-FdC no es un radiosensibilizador, pero cuando se coadministra con H₄U u otro inhibidor de la citidina-desaminasa, es un agente de hipometilación más potente. Cuando se administra 4-N-metilamino-FdC sin un inhibidor de la citidina-desaminasa, 4-N-metilamino-FdC no es tampoco un radiosensibilizador; sin embargo, 4-N-metilamino-FdC sigue siendo un agente de hipometilación, pero genera también un sistema de antimetabolitos que inhiben las enzimas tumorales implicadas en el metabolismo de DNA y RNA.

La importancia y novedad de este enfoque es que el mismo asegura más razonablemente una curación del tumor sin deterioro del tejido subyacente. En lugar de utilizar una dosis elevada de radiación, que podría afectar al tejido normal (a pesar de la gran selectividad del radiosensibilizador de esta invención), la presente invención implica una estrategia independiente de enfoque frente a las células restantes del tumor que pueden haber escapado a los efectos letales de la radiación. CldC en sí mismo y los análogos nucleosídicos hacen que CldC sea un radiosensibilizador más eficaz debido de que aquéllos pueden desempeñar el papel dual de afectar a la expresión génica en las células tumorales

supervivientes en virtud de su inhibición de la 5-metilcitosina-DNA-transferasa. Esto asegurará de un modo más eficaz el control completo del tumor, o al menos impedirá la progresión y metástasis del tumor, por (A) el restablecimiento de las células tumorales a un estado normal por reactivación de los genes supresores de tumores y (B) el restablecimiento de la estabilidad genética de las células supervivientes por 1) reactivación de la transcripción de los genes codificados por mRNA cuyos productos proteínicos impiden la modificación adicional del DNA (alteraciones adicionales en el DNA podrían conducir a una progresión adicional hacia la neoplasia), 2) reactivación de la expresión de enzimas que reparan alteraciones en el DNA de las células supervivientes o, más directamente, 3) prevención de la herencia epigenética, por la vía de metilación de mantenimiento, de puntos calientes de mutación en el DNA de las células supervivientes.

XV. La presente invención permite un tratamiento en el cual el tumor se irradia antes del tratamiento con fármacos para inducir una mayor actividad de desoxicitidina-quinasa (dCK) en las células diana. La desoxicitidina-quinasa convierte inicialmente CldC, FdC y 4-N-metilamino-FdC en sus anabolitos, CldCMP, FdCMP y 4-N-metilamino-FdCMP, respectivamente.

La radiación activa también la timidina-quinasa (TK) que aumenta la conversión de CldU y FdU derivados de CldC y FdC en metabolitos superiores.



XVI. En el caso del cáncer de próstata humano, la tecnología utiliza un supositorio de liberación lenta de una dosis baja de bisulfito para proteger el recto por desactivación de 5-CldC y conversión del mismo en desoxiuridina (un metabolito normal seguro y un antagonista de la toxicidad y radiosensibilización). Esto protegerá el recto contra los efectos de la radiación sin disminuir la radiosensibilidad del tumor de próstata. El bisulfito desamina y deshalogena CldC como precursor del DNA y deshalogenará CldU cuando se incorpora en el DNA del tejido rectal. El tejido genital no tumoral circundante puede protegerse también por administración localizada y controlada de bisulfito, un eliminador de los radicales libres.

Podría administrarse al paciente un supositorio rectal de liberación lenta de una dosis baja segura de bisulfito con o sin cisteína (que es también un eliminador de los radicales libres), 1 hora antes de la irradiación de su tumor de próstata. El paciente se ensayará primeramente en cuanto a sensibilidad al bisulfito. Este curso de tratamiento no se aplicará a individuos asmáticos o pacientes que tengan deficiencia de sulfito-oxidasa. La sensibilidad al bisulfito es extremadamente rara.

Los agentes de la presente invención incluyen (a) CldC más H₄U, (b) CldC más Zebularina, (c) CldC más un inhibidor de la citidina-desaminasa distinto de H₄U o Zb; o (d) CldC y 4-N-metilamino-FdC ± un inhibidor de la citidina-desaminasa. Pueden utilizarse también compuestos distintos de H₄U o Zb, 2'-desoxitetrahidrouridina (dH₄U) como el inhibidor de la citidina-desaminasa.

Algunos aspectos de la invención aprovechan la ventaja de tres propiedades de CldC en el sentido de que es (1) un radiosensibilizador, (2) un agente de hipometilación, y (3) un inhibidor indirecto de la formación de un metabolito competitivo. Por utilización de estas tres propiedades de CldC, la presente invención simplifica los regímenes de tratamiento clínico conocidos en la técnica anterior. Por ejemplo, los agentes de la presente invención pueden administrarse al individuo sin la administración de un inhibidor de la formación de un metabolito, a saber, TTP, que compite con la incorporación de un metabolito radiosensibilizador, es decir, CldUTP, de CldC en DNA, en donde dichos inhibidores pueden ser 5-fluoro-2'-desoxicidina (FdC), 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FdU) o N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA).

Los agentes de la presente invención son eficaces en el tratamiento de tumores, preferiblemente tumores sólidos. Los tumores que pueden tratarse con los agentes de la presente invención incluyen tumores de mama, pulmón, cerebro, hígado, riñón, ovario, útero, testículos, páncreas, tracto gastrointestinal, cabeza y cuello, nasofaringe, piel, y próstata, y tumores orofaciales.

En la presente invención, CldC puede administrarse a un individuo que se encuentra en necesidad de ello a una dosis de aproximadamente 5 mg por kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 10 g por kg de peso corporal por día. La dosis preferida es aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal por día hasta aproximadamente 6 g por kg de peso corporal por día. Los otros agentes, es decir H₄U, Zebularina, inhibidores de la citidina-desaminasa distintos de H₄U o Zebularina, y 4-N-metilamino-FdC, de la presente invención pueden administrarse al individuo a una dosis que va desde aproximadamente 50 veces menor a aproximadamente la mitad, con preferencia aproximadamente 30 veces menor a aproximadamente 10 veces menor, que la dosis de CldC.

Los agentes de la presente invención pueden administrarse sea a aproximadamente la misma dosis durante todo un periodo de tratamiento, en un régimen de escalación de la dosis, o en un régimen de dosis de carga, en el cual una dosis de carga es aproximadamente 2 a 5 veces una dosis de mantenimiento. Alternativamente, la dosis para los agentes de la presente invención puede modificarse durante el curso de un periodo de tratamiento de acuerdo con las condiciones del individuo objeto del tratamiento y/o la gravedad de la enfermedad que se esté tratando tal como se considere apropiado por un experto en la técnica.

Los agentes de la presente invención pueden administrarse de 1 a 4 veces al día. El tratamiento con los agentes de la presente invención puede repetirse diariamente o interrumpirse temporalmente durante hasta varios días durante el curso del tratamiento del tumor. La irradiación puede comenzar después de la primera administración de CldC. Alternativamente, la irradiación puede iniciarse después de un intervalo de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 18 horas, con preferencia aproximadamente 6 a 14 horas, después de la última administración de CldC.

La dosis de radiación puede ser la misma o 1/4 a 3/4 de la dosis administrada a los pacientes que no reciben los agentes de la presente invención.

Las dosis de los agentes de la presente invención y el intervalo entre administraciones, así como la frecuencia de administración, pueden ser determinadas por un experto en la técnica basándose en el estado del paciente y la gravedad de la enfermedad a tratar. El intervalo entre terapia con fármacos y tratamiento de radiación puede modificarse también.

Los agentes de la presente invención pueden administrarse por vías parenteral o enteral. Sin embargo, para la administración oral de tetrahidouridina, la misma debe encontrarse en una formulación que la proteja contra los ácidos. Las rutas parenterales incluyen inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal, infusión intravenosa o intraarterial, o administración dérmica. También está dentro del alcance de la presente invención el tratamiento de tumores o la protección de tejidos normales durante la radioterapia de los tumores por administración de los agentes de la presente invención mediante formulaciones de liberación lenta preparadas de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Los agentes de la presente invención pueden administrarse con o sin un vehículo farmacéuticamente aceptable en una composición farmacéutica. Dentro del alcance de la presente invención se incluye una composición farmacéutica que comprende CldC y 4-N-metilamino-FdC, con o sin un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Individuos que pueden ser tratados por los agentes de la presente invención incluyen animales, tales como mamíferos, y preferiblemente humanos.

Los agentes de la presente invención pueden ser obtenidos comercialmente o preparados por un experto en la técnica a partir de compuestos intermedios que están disponibles comercialmente. Los procesos de preparación de la mayoría de los agentes de la presente invención se exponen en las Patentes U.S. Núms. 4.894.364 y 5.985.266.

Otras referencias que pueden ser interesantes se enumeran también a continuación (21-69).

Referencias

1. Santos, O. Perez, L. Briggie, T. Boothman, D. Greer, S. 1990. Radiation, pool size and incorporation studies in mice with 5-chloro-2'-deoxycytidine. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 19:357-365.

2. Greer, S., Santos, O. Gottlieb, C. Schwade, J., Marion, S. 1990. 5-Chlorodeoxycytidine, a radiosensitizer effective against RIF-1 and Lewis lung carcinoma, is also effective against a DMBA-induced mammary adenocarcinoma and the EMT-6 tumor in BALB/c mice. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 22:505-510.

3. Greer, S. Schwade, J. Marion, S. 1995. Five-chlorodeoxycytidine and biomodulators of its metabolism result in fifty to eighty percent cures of advanced EMT-6 tumors when used with fractionated radiation. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 32:1059-1069.

4. Kim, C-H., Marquez, V., Mao, D., Haines, D., McCormack, J. 1986. Synthesis of pyrimidin-2-one nucleoside as acid-stable inhibitors of cytidine deaminase. *J. Med. Chem* 29: 1374-1380.

5. Marquez, V. 1994. Inhibition of cytidine deaminase: mechanism and effects of the metabolism of antitumor agents. In: *Developments in Cancer Chemotherapy*, Robert I. Glazer, ed, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 92-114.

6. Kelly, J., Driscoll, J., McCormack, J., Roth, J., Marquez, V. 1986. Furanose-pyranose: isomerization of reduced pyrimidine and cyclic urea ribosides. *J. Med. Chem.* 29: 2351-2358.

7. Wempen, I., Duschinsky, R., Kaplan, L., and Fox, J. 1961. Organic and biological chemistry. Thiation of Nucleosides. IV. The synthesis of 5-fluoro-2'-deoxycytidine and related compounds. *J. Amer. Chem. Soc.* 83:4755-4766.

8. Russell, K., Rice, G., Brown, J. 1986. *In vivo* and *in vitro* radiation sensitization by the halogenated pyrimidine 5-chloro-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 46:2883-2887.

9. Kinsella, T., Kunugi, K., Vielhuber, K., McCulloch, W., Liu, S-H., and Cheng, Y-C. 1994. An *in vivo* comparison of oral 5-iodo-2'-deoxyuridine and 5-iodo-2-pyrimidinone-2'-doxyribose toxicity, pharmacokinetics, and DNA incorporation in athymic mouse tissues and the human colon cancer xenograft, HCT-116. *Cancer Res.* 54:2695-2700.
10. Wataya, Y., Santi, D., Hansch, C. 1977. Inhibition of *Lactobacillus casei* thymidylate synthetase by 5-substituted 2'-deoxyuridylates. Preliminary quantitative structure-activity relationship. *J. Med. Chem.* 20: 1469-1473. In: Balzarini, J., DeClerq, E., Mertes, M., Shugar, D., Torrence, P. 1982. 5-Substituted 2'-deoxyuridines: Correlation between inhibition of tumor cell growth and inhibition of thymidine kinase and thymidylate synthetase. *Biochem. Pharmacol.* 31:3673-3682.
11. Wataya, Y., Santi, D. 1975. Thymidylate synthetase catalyzed dehalogenation of 5-bromo- and 5-iodo-2'-deoxyuridylate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67: 818-823.
12. Caradonna, S. Cheng, Y-C. 1980. The role of deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase, uracil-DNA glycosylase, and DNA polymerase α in the metabolism of FUdr in human tumor cells. *Mol. Pharmacol.* 18:513-520.
13. Hirota, Y. Yoshioka, A. Tanaka, S. *et al.* 1989. DNA double-strand breaks, and cell death caused by 2-chlorodeoxy-adenosine in mouse FM3A cells. *Cancer Res.* 49:915-919.
14. Jones, P. Taylor, S. 1980. Cellular differentiation, cytidine analogs, and DNA methylation. *Cell.* 20:85-93.
15. Kaysen, J. Spriggs, D. Kufe, D. 1986. Incorporation of 5-fluorodeoxycytidine and metabolites into nucleic acids of human MCF-7 breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 46: 4534-4538.
16. Osterman, D., DePillis, G., Wu, J. Matsuda, A., Santi, D. 1988. 5-Fluorocytosine in DNA is a mechanism-based inhibitor of HhaI methylase. *Biochemistry.* 27:5204-5210.
17. Yang, A., Shen, J-C, Zingg, J-M, Jones P. 1995. HhaI and HpaII DNA methyltransferase bind DNA mismatches, methylate uracil and block DNA repair. *Nucl. Acids Res.* 23:1380-1387.
18. Jones, P. Rideout, W., III, Shen, J-C, *et al.* 1992. Methylation, mutation and cancer. *BioEssays.* 4:33-36.
19. El-Deiry, W., Nelkin, B., Celano, P., Yen, C., Falco, J., Hamilton, S., Baylin, S. 1991. High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 3470-3474.
20. Baylin, S. and Herman, J. 2000. Promoter hypermethylation and gene silencing in cancer. *Advances in Gene Tech: DNA, RNA and Cancer. Miami Nature Biotechnology Winter Symposium*, p. 43.
21. Driscoll, J., Marquez, V., Plowman, J., Liu, P., Kelley, J., Barchi, J., Jr. 1991. Antitumor properties of 2(1H)-pyrimidinone riboside (Zebularine) and its fluorinated analogues. *J. Med. Chem.* 34:3280-3284.
22. Laird, P., Jaenisch, R. 1994. DNA methylation and cancer. *Human Molecular Genetics.* 3: 1487-1495.
23. Doiron, A., Yapp, D., Olivares, M., Zhu, J., and Lehnert, S. 1999. Tumor radiosensitization by sustained intratumoral release of bromodeoxyuridine. *Cancer Res.* 59:3677-3681.
24. Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Inoue, M., Tahara, H., Kobayashi, T., Takatsuka, Y., Matsuyoshi, N., Hirano, S., Takeichi, M., Mori, T. 1993. Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res.* 53: 1696-1701.
25. Graff, J., Herman, J., Lapidus, R., Chopra, H., Xu, R., Jarrard, D., Isaacs, W., Pitha, P., Davidson, N., Baylin, S. 1995. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. *Cancer Res.* 55: 5195-5199.
26. Kanai, Y., Ushijima, S., Hui, A., Ochiai, A., Tsuda, H., Sakamoto, M., Hirohashi, S. 1997. The E-cadherin gene is silenced by CpG methylation in human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer.* 71: 355-359.
27. Graff, J., Greenberg, V., Herman, J., W., Boghaert, E., Ain, K., Saji, M., Zeiger, M., Zimmer, S., Baylin, S. 1998. Distinct patterns of E-cadherin CpG island methylation in papillary, follicular, hurthle's cell, and poorly differentiated human thyroid carcinoma. *Can. Res.* 58: 2063-2066.
28. Qian, X. and Brent, T. 1997. Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res* 57:3672-3677.

29. **Esteller, M., Hamilton, S., Burger, P., Baylin, S., and Herman, J. 1999.** Inactivation of the DNA repair gene *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res.* 59: 793-797.
- 5 30. **Lee, W., Morton, R., Epstein, J., Brooks, J., Campbell, P., Bova, G., Hsieh, W., Isaacs, W., Nelson, W. 1994.** Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11733-11737.
- 10 31. **Esteller, M., Corn, P., Urena, J., Gabrielson, E., Baylin, S., and Herman, J., 1998.** Inactivation of glutathione S-transferase *P1* gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res.* 58:4515-4518.
- 15 32. **Bachman, K., Herman, J., Com, P., Merlo, A., Costello, J., Cavenee, W., Baylin, S., and Graff, J. 1999.** Methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene suggests a suppressor role in kidney, brain, and other human cancers. *Cancer Res.* 59:798-802.
33. **Ferguson, A., Lapidus, R., Baylin, S., Davidson, N. 1995.** Demethylation of the estrogen receptor gene in estrogen receptor-negative breast cancer cells can reactivate estrogen receptor gene expression. *Cancer Res.* 55: 2279-2283.
- 20 34. **Zhau, H., Chang, S., Chen, B., Wang, Y., Zhang, H., Kao, C., Sang, Q., Pathak, S., Chung, L. 1996.** Androgen-repressed phenotype in human prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 15151-15157.
- 25 35. **Jarrard, D., Kinoshita, H., Yan, S., Sandefur, C., Hoff, D., Meisner, L., Chang, C., Herman, J., Isaacs, W., Nassif, N. 1998.** Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Can. Res.* 58: 5310-5314.
36. **Rideout, W., III, Coetzee, G., Jones, P. 1990.** 5-Methylcytosine as an endogenous mutation in the human LDL receptor and p53 genes. *Science.* 249: 1288-1290.
- 30 37. **Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., Harris, C. 1991.** p53 mutations in human cancers. *Science.* 253: 49-50.
38. **Chi, S., de Vere White, R., Meyers, F., Siders, D., Lee, F., Gumerlock, P. 1994.** p53 in prostate cancer: frequent expressed transition mutations. *J. Natl. Cancer Institute.* 86: 926-933.
- 35 39. **Merlo, A., Herman, J., Mao, L., Lee, D., Gabrielson, E., Burger, P., Baylin, S., Sidransky, D. 1995.** CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumor suppressor p16VFKN2/TS1 in human cancers. *Nature Med* 1: 686-692.
- 40 40. **Costello, J., Berger, M., Huang, H-J., and Cavenee, W. 1996.** Silencing of *p16/CDKN2* expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res.* 56:2405-2410.
41. **Zhang, S.-J., Endo, S., Ichikawa, T., Washiyama, K., and Kumanishi, T. 1998.** Frequent deletion and 5' CpG island methylation of the p16 gene in primary malignant lymphoma of the brain. *Cancer Res.* 58:1231-45 1237.
42. **Gonzalgo, M., Hayashida, T., Bender, C., Pao, M., Tsai, Y., Gonzales, F., Nguyen, H., Nguyen, T., and Jones, P. 1998.** The role of DNA methylation in expression of the *p19/p16* locus in human bladder cancer cell lines. *Cancer Res.* 58:1245-1252.
- 50 43. **Wong, I. Lo, Y., Zhang, J., Liew, C-T., Ng, M., Wong, N., Lai, P., Lau, W., Hjelm, N., and Johnson, P. 1999.** Detection of aberrant *p16* methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res.* 59: 71-73.
44. **Herman, J., Jen, J., Merlo, A., and Baylin, S., 1996.** Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for *p15*^{INK4B1}. *Cancer Res.* 56:722-727.
- 55 45. **Sakai, T., Toguchida, J., Ohtani, N., Yandell, D.W., Rapaport, J.M., Dryja, T.P. 1991.** Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am. J Hum. Genet.* 48: 880-888.
- 60 46. **Phillips, S., Barton, C., Lee, S., Morton, D., Wallace, D., Lemoine, N., Neoptolemos, J. 1994.** Loss of the retinoblastoma susceptibility gene (RB₁) is a frequent early event in prostatic tumorigenesis. *Brit J Cancer.* 70: 1252-1257.
47. **Lee, W., Isaacs, W., Bova, G., Nelson, W. 1997a.** CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention.* 6: 443-450.
- 65

48. Nelson, J., Lee, W-H., Nguyen, S., Jarrard, D., Brooks, J., Magnuson, S., Opgenorth, T., Nelson, W., Bova, G. 1997. Methylation of the 5' CpG island of the endothelin B receptor gene is common in human prostate cancer. *Cancer Res.* 57:35-37.
- 5 49. Lou, W., Krill, D., Dhir, R., Becich, M., Dong, J-T., Frierson, H., Jr., Isaacs, W., Isaacs, J., and Gao, A.C. 1999. Methylation of the *CD44* metastasis suppressor gene in human prostate cancer. *Cancer Res.* 59: 2329-2331.
- 10 50. Issa, J.-P., Vertino, P., Wu, J., Sazawal, S., Celano, P., Nelkin, B., Halmilton, S., Baylin, S. 1993. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer. *J National Cancer Institute.* 85: 1235-1239.
51. Laird, P., Jackson-Grusby, L., Fazeli, A., Dickinson, S., Jung, W., Li, E., Weinberg, R., Jaenisch, R. 1995. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell.* 81: 197-205.
- 15 52. De Marzo, A., Marchi, V., Yang, E., Veeraswamy, R., Lin, X., and Nelson, W. 1999. Abnormal regulation of DNA methyltransferase expression during colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* 59: 3855-3860.
53. Toyota, M., Ahuja, N., Suzuki, H., Itoh, F., Ohe-Toyota, M., Imai, K., Baylin, S., and Issa, J-P. 1999. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG Island methylator phenotype. *Cancer Res.* 59: 5438-5442.
- 20 54. Lombardi, D., Geradts, J., Foley, J., Chiao, C., Lamb, P., and Barrett, J. 1999. Loss of KAI1 expression in the progression of colorectal cancer. *Cancer Res.* 59:5724-5731.
55. Belinsky, S., Nikula, K., Baylin, S., Issa, J: P. 1996. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity in target-cell-specific and an early event in lung cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 4045-4050.
- 25 56. Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D., Baylin, S., and Herman, J. 1999. Detection aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.* 59:67-70.
- 30 57. Leung, S., Yuen, S., Chung, L., Chu, K., Chan, A., and Ho, J. 1999. *hMLH1* promoter methylation and lack of *hMLH1* expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res.* 59:159-164.
- 35 58. Ahuja, N., Mohan, A., Li, Q., Stolker, J., Herman, J., Hamilton, S., Baylin, S., and Issa, J-P. 1997. Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 57:2270-3374.
59. Berry, S., Garces, C., Hwang, H-S., Kunugi, K., Meyers, M., Davis, T., Boothman, D., and Kinsella, T. 1999. *hMLH1*, mediates 5-Substituted halogenated thymidine analogue cytotoxicity, DNA incorporation, and radiosensitization in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 59:1840-1845.
- 40 60. Westphal, C., Hoyes, K., Canman, C., Huang, X., Kastan, M., Hendry, J., and Leder, P. 1998. Loss of *atm* radio-sensitizes multiple *p53* null tissues. *Cancer Res.* 58:5637-5639.
- 45 61. Lin, H., Huber, R., Schlessinger, D., and Morin, J. 1999. Frequent silencing of the *GPC3* gene in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.* 59: 807-810.
62. Tseng, J., Kemp, B., Khuri, F., Kurie, J., Lee, J., Zhou, X., Liu, D., Hong, W., and Mao, L. 1999. Loss of Fhit is frequent in stage 1 non-small cell lung cancer and in the lungs of chronic smokers. *Cancer Res.* 59: 4798-4803.
- 50 63. Toyota, M., Ho, C., Ohe-Toyota, M., Baylin, S., and Issa, J-P. 1999. Inactivation of *CACNA1G*, a T-Type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' CpG Island in human tumors. *Cancer Res.* 59:4535-4541.
- 55 64. Devereux, T., Horikawa, I., Anna, C., Anna, L., Afshari, C., Barrett, J. 1999. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene. *Cancer Res.* 59:6087-6090.
- 65 65. Widschwendter, M., Berger, J., Daxenbichler, G., Müller-Holzner, E., Widschwendter, A., Mayr, A., Marth, C., and Zeimet, A. 1997. Loss of retinoic acid receptor β expression in breast cancer and morphologically normal adjacent tissue but not in the normal breast tissue distant from the cancer. *Cancer Res.* 57:4158-4161.
66. Barletta, J., Rainier, S., and Feinberg, A. 1997. Reversal of loss of imprinting in tumor cells by 5-Aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res.* 57:48-50.
- 65 67. Cameron, E., Bachman, K., Myohanen, S., Herman, J., and Baylin, S. 1999. Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genet* 21:103.

68. Glick, R., Swendeman, S., Coffey, D., Rifkind, R., Marks, P., Richon, V., and La Quaglia, M., 1999. Hybrid polar histone deacetylase inhibitor induces apoptosis and CD95/CD95 ligand expression in human neuroblastoma. *Cancer Res.* 59:4392-4399.

- 5 69. Wang, J., Sauntharajah, Y., Redner, R., and Liu, J. 1999. Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of AML1-ETO leukemia cells. *Cancer Res.* 59:2766-2769.

TABLA 1

10 *El Protocolo Estándar (StP) que indica las dosis de tipo bolus de fármacos administrados por vía i.p. y el protocolo de la administración de los fármacos y la radiación. Este protocolo se siguió durante 3 a 5 semanas como se indica en la Tabla 2. PALA: N-(fosfonacetil)-L-aspartato; FdC: 3-fluoro-2'-desoxicitidina; CldC: 5-cloro-2'-desoxicitidina; H₄U: tetrahidrouridina*

Tabla de Protocolo					
Hora	LUN	MAR	MIÉ	JUE	VIE
9 MAÑ	PALA (70)*	FdC+H ₄ U (7) (25)	CldC+H ₄ U (150) (25)	CldC+H ₄ U (125) (25)	Radiación
1 TAR	FdC +H ₄ U (7) (25)				
3 TAR					
4 TAR		CldC+H ₄ U (180) (25)	Radiación	Radiación	
5 TAR	CldC + H ₄ U (180) (25)				
* (mg/kg)					

TABLA 2

Un resumen de los resultados finales de los 5 experimentos obtenidos con dos tumores de próstata humanos, un tumor humano de pulmón, un glioblastoma humano y un tumor de mama humano con relación a tres puntos finales. Los ratones fueron seguidos durante un mínimo de 7 meses. Se muestran también los resultados de un experimento adicional que utilizó 5-yododesoxiuridina y protocolos modificados con PC3, el tumor de próstata humano

Tumor, Condición de Irradiación	Condición	No. de tumores	Días para alcanzar 4 x volumen inicial	Días de retardo en recrecimiento del tumor	Fracción de curaciones
No. Gy, Fracciones, Semanas • Próstata, PC-3	Control	5	14	0	0
	StP*	6	28	0	0
	X-ray	9	72	42	0
	StP + X-ray	10	116*/124**	85*/97**	1/10
	Full†. No PALA	5	104/142	56/113	2/5
• Próstata, H1579 43, 11, 4 Pooled data	Control	5	13	0	0
	StP	4	45	2	0
	X-ray	8	24/48	5/29	1/8
	StP + X-ray	7	108/134	81/115	2/7
• Próstata, H1579 43, 11, 4 Datos agrupados	Control	5	3†	0	0
	StP	5	3†	0	0
	X-ray	8	17	5	0
	StP + X-ray	7	31/56	21/51	1/7
• Mama, G101 42, 14, 5	Control	7	26	0	0
	StP	8	31	0	0
	X-ray	11	83	50	0
	StP + X-ray	11	100/106	70/80	1/11
• Pulmón, H165 47, 12, 4	Control	4	12	0	0
	StP	3	20	0	0
	X-ray	5	58	32	0
	StP + X-ray	5	89/133	72/123	2/5

Experimento con Protocolos Modificados

o Próstata, PC-3 52,5, 15, 5	Control	4		0	0
	X-ray	4		17	0
	StP* + X-ray	6		68/112	2/6
	StP + PALA** + X-ray	6		29/86	2/6
	StP + IdU*** + X-ray	5		38	0
	PALA & FdC*** + X-ray	5		25/60	1/5
	StP E(·) CldC*** + X-ray	5		25/130	3/5

* StP, Protocolo Estándar (CldC, moduladores y protocolo como se muestra en la Tabla 1).

-/-- Los cálculos excluyen curas/cálculos que designan curas como >200 días.

; Para control de glioblastoma y StP solamente, se muestran los días para alcanzar 2 x el volumen inicial.

: Tres semanas; un descanso, dos semanas.

¶ Cuatro semanas, tres semanas de descanso, una semana.

// No ocurrió retardo alguno del recrecimiento ni curación alguna con los fármacos solos (tres animales/grupo).

ES 2 273 672 T3

a StP como se muestra en la Tabla 1 excepto que no se administró PALA los lunes. En lugar de ello, se administraron a la vez FdC (4 mg/kg) por la mañana y a mediodía los lunes y se administraron 3 mg/kg en lugar de 7 mg/kg los martes. H₄U se coadministró siempre con FdC.

5 b StP $\hat{C}$ IdU. Se reemplazó CldC con IdU. Dosis total de FdC 2,4 mg/ratón de 30 g.

c PALA (como en FdC + H₄U) administrados como en el StP pero, adicionalmente, se reemplazaron FdC + H₄U para todas las administraciones de CldC más H₄U. La dosis de FdC en las semanas 1-5 fue 27, 32, 32, 37 y 37 mg/kg; es decir una dosis total de 4,95 mg/ratón de 30 g en comparación con 2,1 mg/ratón de 30 g en el StP.

10 d StP $\hat{C}$ (1) CldC, dosis de CldC escalada 9% en las semanas 2-4. No se utilizó PALA, ni FdC; se administraron CldC + H₄U como en el StP, pero, adicionalmente, se reemplazaron CldC + H₄U para todas las administraciones de FdC + H₄U.

15 //, b, d, la dosis total de CldC, IdU y CldC elevado (1) era 95, 129 y 184 mg/ratón de 30 g, respectivamente.

TABLA 3

CldC + H₄U solos PC3 1998

4 semanas tratamiento; 3 semanas descanso; 1 semana tratamiento

H₄U 25* coadministrado en todos los casos

BC		LUN	MAR	MIÉ	JUE	Total
I	MAÑ TAR	CldC 150* 150	CldC 225 180	CldC 180	CldC 150	1035
II	MAÑ TAR	150 180	225 200	225	180	1160
III	MAÑ TAR	150 200	225 220	250	200	1345
IV	MAÑ TAR	150 225	225 250	275	225	1350
VII	MAÑ TAR	150 225	225 250	275	225	1350

*

mg/kg

3,5 Gy en 15 fracciones

6.140 * CldC

Dosis total: 52,5 Gy

184,4 mg/ratón de 30 g

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente para el tratamiento de tumores que comprende:

- (a) 5-cloro-2'-desoxicitidina y un inhibidor de la citidina-desaminasa, en el cual el agente no contiene 5-fluoro-2'-desoxicitidina (FdC), 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FdU), y N-(fosfonacetil)-L-aspartato (PALA),
- (b) 5-cloro-2'-desoxicitidina y 4-N-metilamino-FdC, o
- (c) 5-cloro-2'-desoxicitidina, 4-N-metilamino-FdC y un inhibidor de la citidina-desaminasa;

para la fabricación de un medicamento para administración en terapia de radiación de tumores humanos asociados con hipermetilación seleccionados del grupo constituido por tumores humanos de mama, pulmón, cerebro, hígado, riñón, ovario, testículos, páncreas, tracto gastrointestinal, cabeza y cuello, nasofaringe, piel, próstata y región orofacial,

y en el cual el agente de tratamiento del tumor tiene por objeto ser administrado subsiguientemente a la exposición del individuo a una cantidad de radiación suficiente para inducir la actividad incrementada de desoxicitidina-quinasa (dCK) y/o actividad incrementada de timidina-quinasa (TK) en células diana del tumor o tumores humanos,

y en el cual dicho agente de tratamiento del tumor tiene por objeto ser administrado antes de la exposición ulterior del individuo a una cantidad de radiación eficaz para tratamiento del tumor.

2. El uso de la reivindicación 1, en el cual el agente de tratamiento de tumores comprende:

- (a) 5-cloro-2'-desoxicitidina y 4-N-metilamino-FdC, o
- (b) 5-cloro-2'-desoxicitidina, 4-N-metilamino-FdC y un inhibidor de la citidina-desaminasa;

para la fabricación de un medicamento para administración en terapia de radiación de tumores humanos asociados con hipermetilación seleccionados del grupo constituido por tumores humanos de mama, pulmón, cerebro, hígado, riñón, ovario, útero, testículos, páncreas, tracto gastrointestinal, cabeza y cuello, nasofaringe, piel, próstata y región orofacial.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el cual el agente de tratamiento de tumores tiene por objeto administración en una formulación de liberación lenta.

4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el cual el inhibidor de la citidina-desaminasa es tetrahidrouridina, desoxitetrahidrouridina, un pirimidin-2-ona-nucleósido, un F-pirimidin-2-ona-nucleósido, un diazepin-2-1-nucleósido, 1-(2-desoxi-2-fluoro-beta-D-arabinofuranosil)-1,2-dihidropirimidin-2-ona, 2'-desoxi-2'-F-arazebularina, diazoe-pinona, 4-hidrometil-2-oxo-pirimidin-2-ona-nucleósido, o 2'-fluoro-2'-desoxi-arabinosil-tetrahidrouracilo.

5. Uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual dicho pirimidin-2-ona-nucleósido es 1-β-ribofuranosil-1,2-dihidropirimidin-2-ona (Zebularina), o 5-fluoro-pirimidin-2-ona-nucleósido.

6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el cual el inhibidor de citidina-desaminasa es tetrahidro-uridina o Zebularina.

7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual el inhibidor de la citidina-desaminasa es tetrahidrouridina.

8. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el cual la radiación se selecciona del grupo constituido por radiación de protones como fuente de radiación, radiación procedente de una fuente de radiación implantada proximal al tumor humano, radiación a partir de un radionucleido fijado a anticuerpos monoclonales, radiación con una cuchilla gamma, radiación 3D ajustable, y radiación en radiocirugía estereotáctica.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual dicha fuente de radiación implantada proximal al tumor humano comprende agujas de itrio 90 o agujas de iridio.

10. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el cual dicho radionucleido es itrio 90.

11. Uso de (A) un agente de tratamiento de tumores que comprende:

- (a) 5-cloro-2'-desoxicitidina y un inhibidor de la citidina-desaminasa, en el cual el agente no contiene 5-fluoro-2'-desoxicitidina (FdC), 5-fluoro-2'-desoxiuridina (FdU), y N-(fosfonacetil)-L-aspartato (PALA)
- (b) 5-cloro-2'-desoxicitidina y 4-N-metilamino-FdC, o
- (c) 5-cloro-2'-desoxicitidina, 4-N-metilamino-FdC y un inhibidor de la citidina-desaminasa;

y (B) bisulfito

para la fabricación de un medicamento para administración en terapia de radiación de tumores humanos asociados con hipermetilación seleccionados del grupo constituido por tumores humanos de mama, pulmón, cerebro, hígado, riñón, ovario, testículos, páncreas, tracto gastrointestinal, cabeza y cuello, nasofaringe, piel, próstata y región orofacial,

y en el cual el agente para el tratamiento del tumor tiene por objeto ser administrado antes de la exposición del individuo a una cantidad de radiación eficaz para el tratamiento del tumor.

12. Uso de acuerdo con la reivindicación 11 y de (C) cisteína antes de la exposición del individuo a radiación.

13. Uso de un agente de hipometilación génica que comprende:

(a) 5-cloro-2'-desoxicitidina y un inhibidor de la citidina-desaminasa,

(b) 5-cloro-2'-desoxicitidina y 4-N-metilamino-FdC, o

(c) 5-cloro-2'-desoxicitidina, 4-N-metilamino-FdC y un inhibidor de la citidina-desaminasa;

para la fabricación de un medicamento para administración en terapia de radiación de un tumor humano resultante de al menos un gen hipermetilado seleccionado del grupo constituido por tumores humanos de mama, pulmón, cerebro, hígado, riñón, ovario, útero, testículos, páncreas, tracto gastrointestinal, cabeza y cuello, nasofaringe, piel, próstata y región orofacial, en una cantidad eficaz para hipometilar dicho al menos un gen hipermetilado, y en el cual el agente de hipometilación de genes tiene por objeto ser administrado antes de la exposición del individuo a una cantidad de radiación eficaz para tratamiento del tumor.

14. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual el inhibidor de la citidina-desaminasa es tetrahidrouridina, desoxitetrahidrouridina, un pirimidin-2-ona-nucleósido, un F-pirimidin-2-ona-nucleósido, un diazepin-2-1-nucleósido, 1-(2-desoxi-2-fluoro- β -D-arabinofuranosil)-1,2-dihidropirimidin-2-ona, 2'-desoxi-2'-F-arazebularina, diazoepinona, 4-hidrometil-2-oxopirimidin-2-ona-nucleósido, o 2'-fluoro-2'-desoxiarabinosil-tetrahidrouracilo.

15. Uso de acuerdo con la reivindicación 14, en el cual dicho pirimidin-2-ona-nucleósido es 1- β -ribofuranosil-1,2-dihidropirimidin-2-ona (Zebularina) o 5-fluoro-pirimidin-2-ona-nucleósido.

16. Uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el cual el inhibidor de la citidina-desaminasa es tetrahidrouridina o Zebularina.

17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el cual el inhibidor de citidina-desaminasa es tetrahidrouridina.

18. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual el agente de hipometilación génica somete a hipometilación genes silenciados en un tumor humano para reducir (A) la agresividad del tumor humano, (B), la propensión metastásica del tumor humano, (C) la inestabilidad genética del tumor humano, y/o (D) la resistencia del tumor humano al tratamiento con fármacos o radiación.

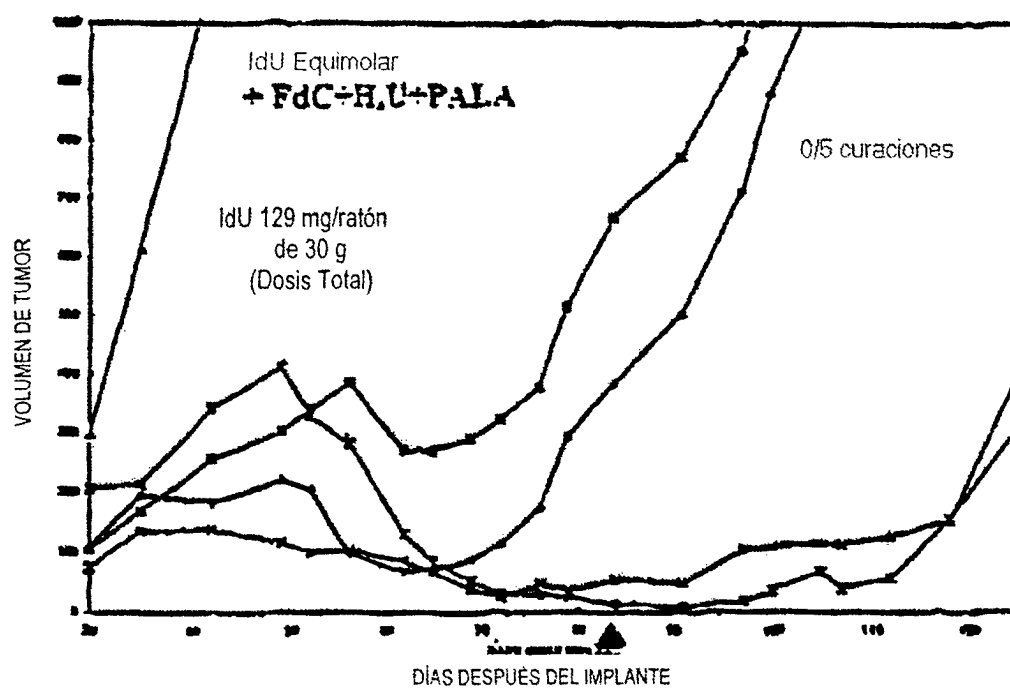
19. Uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el cual dicho agente de hipometilación génica comprende:

(c) 5-cloro-2'-desoxicitidina y 4-N-metilamino-FdC, o

(d) 5-cloro-2'-desoxicitidina, 4-N-metilamino-FdC y un inhibidor de la citidina-desaminasa.

20. Una composición farmacéutica que comprende 5-cloro-2'-desoxicitidina y 4-N-metilamino-FdC.

Fig. 1a PCB PAAL POSITION - X-RAY METHOD



Debido a restricciones presupuestarias se utilizaron tumores > 300 mm³

Fig. 1b Protocolo Estándar

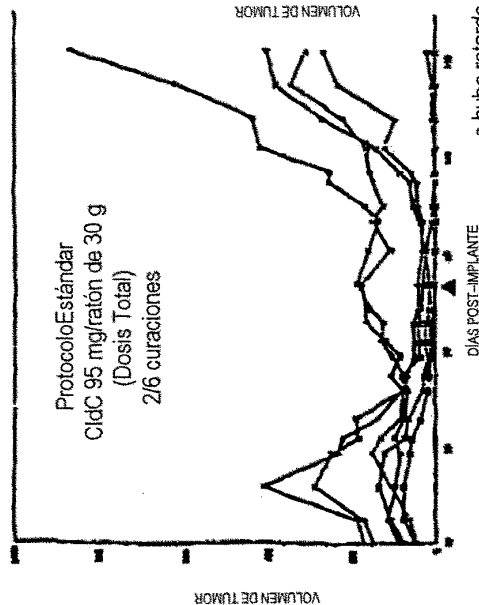
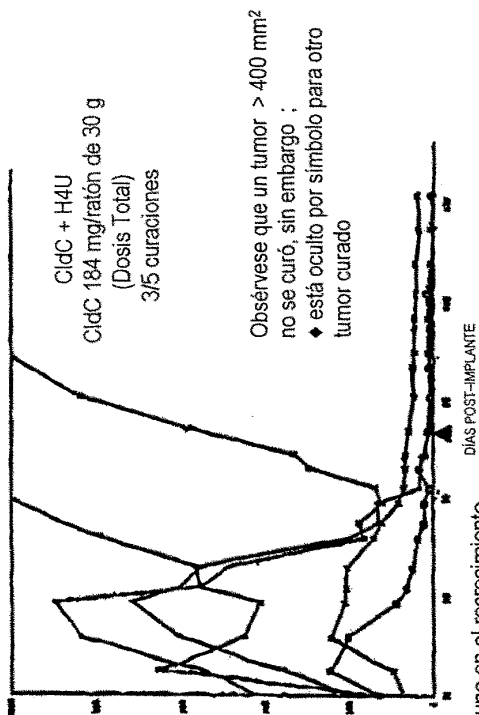


Fig. 1c CidC + H4U



o hubo retardo alguno en el recrescimiento de los tumores con los fármacos solos

Fig. 1d Rayos X solos

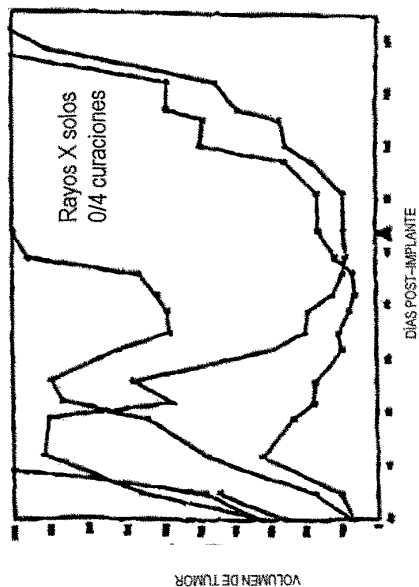


Fig. 1e

