



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 606**

51 Int. Cl.:
A61K 31/4188 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05804363 .9**
96 Fecha de presentación : **25.08.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1781284**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2007**

54 Título: **Uso de la combinación que comprende temozolomida y TNF- α para el tratamiento del glioblastoma.**

30 Prioridad: **25.08.2004 US 604251 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.03.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.03.2011

73 Titular/es: **The University of Chicago**
5801 South Ellis Avenue
Chicago, Illinois 60637, US
DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, Inc.

72 Inventor/es: **Weichselbaum, Ralph, R.;**
Kufe, Donald, W. y
Yamini, Bakhtiar

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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).

DESCRIPCION

INTRODUCCIÓN

[0001] A pesar del tratamiento agresivo del glioma maligno, se han obtenido pocos avances durante los últimos 30 años en la supervivencia de los pacientes con gliomas malignos. La radioterapia (RT) sigue siendo la base del tratamiento postquirúrgico. Recientemente, se ha demostrado que el uso simultáneo del agente oral alquilante temozolomida (TMZ) con RT aumenta de forma modesta el pronóstico en pacientes sometidos a resección quirúrgica completa (Stupp, R. y col. (2005) N Engl. J. Med. 352:987-996). Tratamientos dirigidos prometedores en investigación (Castro, M.G. y col. (2003) Pharmacol Ther 98:71-108), como toxinas dirigidas, anticuerpos monoclonales o estrategias mediadas por el sistema inmunitario, todavía no han tenido un efecto clínico significativo. Varios factores pueden ser responsables de la mala respuesta de los tumores cerebrales malignos al tratamiento, incluyendo la resistencia intrínseca de las células de glioma a la citotoxicidad inducida por el daño del ADN (Taghian, A. y col. (1995) Int J Radiat Oncol Biol Phys 32:99-104) (Johnstone, R.W. y col (2002) Cell 108:153-164) y la toxicidad tisular normal producida por las agentes terapéuticos empleados actualmente. La investigación de estrategias de politerapia que activan rutas citotóxicas complementarias es un aspecto importante de los tratamientos anticancerígenos en desarrollo que resuelven la resistencia al tratamiento y mejoran el pronóstico del paciente (Vivo, C. y col. (2003) J Biol Chem 278:25461-25467).

[0002] TMZ es un agente alquilante monofuncional con un perfil de toxicidad favorable utilizado normalmente en el tratamiento de gliomas malignos. Aunque el uso combinado de TMZ y RT es actualmente la pauta posológica preferida para el tratamiento tanto de glioblastomas recién diagnosticados como recurrentes, el pronóstico para personas con glioma maligno sigue siendo pésimo.

[0003] Por tanto, existe la necesidad en la técnica de procedimientos mejorados y combinaciones farmacéuticas y terapéuticas para el tratamiento de personas con glioma maligno.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] La presente invención es como se define en las reivindicaciones que la acompañan. En este documento se describe un procedimiento de inhibición sinérgica del crecimiento de una línea celular de glioma que comprende poner en contacto la célula con temozolomida y TNF α .

[0005] En este documento se describe un procedimiento de inhibición sinérgica del crecimiento de un glioma en un paciente humano con cáncer que comprende el uso

de temozolomida y un vehículo que comprende o expresa TNF α , en el que el vehículo se administra directamente al glioma.

[0006] En este documento se describe un procedimiento de inhibición sinérgica del crecimiento de un glioma en un paciente humano con cáncer que comprende el uso de temozolomida, un vehículo que comprende o expresa TNF α y radiación, en el que el vehículo y la radiación se administran directamente al glioma.

[0007] También se proporciona una combinación farmacéutica que comprende temozolomida y un vehículo que comprende o expresa TNF α , y una combinación terapéutica que comprende temozolomida, un vehículo que comprende o expresa TNF α y radiación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0008]

La Fig. 1 muestra la cantidad de TNF α producida por las células de glioma maligno U87 transfectadas con adenovirus que expresa TNF α bajo el control de un promotor Egr-1 *in vitro* (Fig. 1A) e *in vivo* (Fig. 1B) en respuesta a la exposición a TMZ.

La Fig. 2A muestra el porcentaje de viabilidad celular determinado mediante el procedimiento de exclusión de colorante azul de triptano, de las células de glioma maligno U87 sometidas a diferentes tratamientos; la Fig. 2B muestra las densidades ópticas (490 nm), obtenidas usando el ensayo colorimétrico MTS, para poblaciones de células de glioma maligno U87 expuestas a diferentes tratamientos.

La Fig. 3A muestra el volumen fraccional del tumor (V/V_0) de tumores glioma en las patas traseras en función del tiempo tras la exposición a diferentes tratamientos; la Fig. 3B muestra el porcentaje de supervivencia (en días) para poblaciones de ratones con tumores glioma en las patas traseras expuestas a diferentes tratamientos en función del tiempo.

La Figura 4 muestra apoptosis, según se determina mediante la prueba TUNEL positiva de las células de glioma U87/ 10^{-6} mm², en función del tratamiento.

La Fig. 5 muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones sin pelo con xenoinjertos intracraneales.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0009] La presente invención proporciona procedimientos para inhibir o reducir de forma sinérgica el crecimiento de células de glioma maligno usando combinaciones

farmacéuticas o terapéuticas. El procedimiento incluye el uso de una combinación farmacéutica de temozolomida (TMZ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), o una combinación terapéutica que comprende TMZ, TNF α y radioterapia (RT). Por tanto, la presente invención proporciona un enfoque terapéutico para tratar glioblastomas

5 malignos.

[0010] Antes de explicar en detalle cualquier realización de la invención, hay que entender que la invención no se limita a los detalles de la invención establecidos en la siguiente descripción o ilustrados en las figuras adjuntas. La invención es apta para otras realizaciones y para ponerse en práctica o realizarse de diversas formas.

10 También, se entenderá que la fraseología y terminología usadas en este documento es para los fines de la descripción y no debe considerarse como limitante.

[0011] Como se usa en este documento, la expresión "inhibe de forma sinérgica" significa que el efecto inhibidor total de los agentes administrados es mayor que la suma de los efectos inhibidores individuales de los agentes.

15 **[0012]** La expresión "poner en contacto" se usa en este documento indistintamente con las siguientes: combinado con, tratando, añadido a, mezclado con, pasado sobre, incubado con, etc.

[0013] Como se usa en este documento, "radiación" o "radioterapia" se refieren a todas las formas conocidas y apropiadas de energía radiante (p. ej., radiación alfa, beta, gamma y rayos X así como protones) que normalmente se utilizan en el tratamiento del

20 cáncer y se administran por cualquier procedimiento de administración conocido, por ejemplo, procedente de una fuente externa (haz), radiación de una fuente de radiación implantada próxima al tumor, radiación procedente de un radionucleido unido a anticuerpos monoclonales o un compuesto dirigido al cáncer, radiación en un bisturí

25 de rayos gamma, radiación conformacional 3D y radiación en radiocirugía estereotáctica.

[0014] Las combinaciones terapéuticas o farmacéuticas descritas en este documento quieren hacer referencia a un tratamiento de combinación o politerapia mediante cualquier ruta de administración en la que dos o más agentes terapéuticos,

30 incluyendo modalidades como son la radiación, se administran a las células, a un paciente o a un sujeto. Para una politerapia con más de un agente activo, donde los agentes activos están en formulaciones o modalidades independientes, los agentes activos pueden administrarse de forma simultánea o pueden administrarse cada uno por separados a tiempos escalonados. Los agentes pueden administrarse de forma

35 simultánea o secuencial, siempre que se den de forma suficiente para permitir que

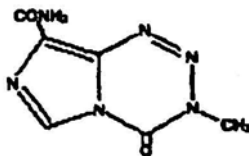
ambos agentes logren concentraciones eficaces en la célula o en el organismo. Los agentes pueden administrarse por diferentes vías, p. ej., un agente puede administrarse por vía intravenosa mientras que un segundo agente se administra por vía intramuscular, intravenosa u oral.

- 5 **[0015]** En una administración secuencial, un agente puede ir seguido directamente de la administración del otro o los agentes pueden administrarse de forma episódica, es decir, uno puede administrarse en un momento seguido del otro en un momento posterior, es decir, en 2-3 días, o uno puede administrarse diariamente mientras que el otro se administra de forma episódica, p. ej., cada 2-3 días. La administración
10 secuencial adecuada según la presente invención se detalla en los ejemplos siguientes.

- [0016]** Las composiciones farmacéuticas utilizadas en las combinaciones farmacéuticas o terapéuticas de esta invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, mediante inyección intratumoral, mediante aerosol para inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o mediante un depósito implantado. La
15 administración oral o administración mediante inyección es más frecuente. Las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden contener cualquier transportador, adyuvante o vehículo no tóxico farmacéuticamente aceptable.

- [0017]** La cantidad administrada de las composiciones según la presente invención para tratar a un paciente es una cantidad suficiente para inhibir o reducir el crecimiento
20 de una célula o tumor glioma. La administración específica y la pauta posológica de tratamiento para cualquier paciente en particular dependerán de diversos factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos, la gravedad y el desarrollo de la infección, la
25 disposición del paciente a la infección y el juicio del médico que lo trata. Por tanto, el número de variables con respecto a una pauta posológica individual es grande y se prevé un intervalo de dosis considerable.

- [0018]** En una realización ilustrada, la invención proporciona un procedimiento de inhibición o reducción sinérgica del crecimiento de células de glioma poniendo en
30 contacto las células con una combinación de TMZ y TNF α , es decir, las células se tratan o ponen en contacto con ambos agentes. La temozolomida es un derivado imidazotetracina que tiene la estructura:



[0019] La temozolomida se administra normal y convenientemente por vía oral en forma de cápsulas. Sin embargo, debería apreciarse que la TMZ podría también administrarse mediante cualquier otro medio adecuado, p. ej., por vía intraperitoneal (IP), como se muestra en los siguientes ejemplos.

[0020] En los procedimientos de la invención, las células de glioma se ponen en contacto con TNF α poniendo en contacto las células de glioma con un vehículo que comprende o expresa TNF α . Entre estos vehículos pueden incluirse, por ejemplo, un liposoma o nanopartícula que comprenda el polipéptido TNF α , o un vector de expresión, como un vector vírico que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido TNF α ligado de forma operativa a un promotor funcional en la célula hospedadora. Preferiblemente, el promotor es un promotor inducible que responde a TMZ y/o RT, como un promotor que comprende los elementos GArG del promotor Egr-1. Adecuadamente, el vector viral es un vector de adenovirus, preferiblemente un vector de adenovirus de replicación defectuosa.

[0021] En los Ejemplos, se inyectó Ad.Egr-TNF dentro del glioma, seguido de la administración intraperitoneal de TMZ, o RT y TMZ. Como apreciará un experto en la materia, el orden en que se administran los diversos componentes de la combinación farmacéutica o la combinación terapéutica no es crítico. Alguna optimización de rutina puede suponer asegurar que TMZ y/o la RT estén presentes a un nivel suficiente para inducir la expresión de TNF α , o que TMZ está presente en un momento y concentración eficaces para inhibir NF κ B, o para actuar de forma sinérgica con TNF α para aumentar la apoptosis o la citotoxicidad.

[0022] El TNF α es un ligando de muerte celular prototípico e induce citotoxicidad a través de la cascada de apoptosis extrínseca tras la unión a su receptor de la superficie celular. Sin embargo, la citotoxicidad inducida por TNF α se anula mediante activación preferencial del factor de transcripción prosupervivencia, el factor nuclear κ B (NF- κ B) (Karin, M. y Lin, A. (2002) Nat Immunol 3:221-227), que confiere resistencia a las células. También se ha demostrado que la activación del NF- κ B media en la resistencia a otros factores de estrés genotóxicos como la RT (Wang, CY. y col. (1996) Science 274:784-787) y se ha demostrado que la inhibición de NF- κ B inducida por TNF α o RT potencia la citotoxicidad de estos agentes (Beg, A.A. y Baltimore, D.

(1996) Science 274:782-784) (Van Antwerp, D.J. y col. (1996) Science 274:787-789) (Yamagishi, N. y col. (1997) Int J Radiat Biol 72:157-162) (Miyakoshi, J. y Yagi, K. (2000) Br J Cancer 82:28-33).

[0023] Brevemente, la familia de NF- κ B consta de cinco proteínas
 5 estructuralmente relacionadas, cuyas formas más abundantes son el heterodímero de p50 (NF- κ B1) y p65 (RelA). En células no estimuladas, el NF- κ B está secuestrado en el citosol unido al inhibidor de la proteína κ B (I κ B α). Tras la estimulación con TNF α , I κ B α se fosforila y degrada liberando las subunidades de NF- κ B que se translocan al núcleo, se unen al ADN y activan la transcripción. La fosforilación de I κ B α tiene lugar
 10 tras la activación del complejo cinasa I κ B α (I κ K). Además de la degradación de I κ B α , se ha demostrado también que la actividad transcripcional de NF- κ B está regulada por la modificación postraduccional de la subunidad p65.

[0024] Como se describe a continuación en los Ejemplos, los efectos de las combinaciones de TMZ y Ad.Egr-TNF, y TMZ, RT y Ad.Egr-TNF se evaluaron en
 15 xenoinjertos de gliomas malignos en las patas traseras de ratón e intracraneales, dos modelos de glioma maligno humano. Se demostró que el tratamiento era significativamente más eficaz que la pauta posológica convencional antiglioma actual de TMZ y RA, por varios criterios diferentes, como la extensión de la supervivencia, la reducción del volumen del tumor, la potenciación de la apoptosis y la potenciación de
 20 la citotoxicidad. La inhibición mediada por TMZ de la activación de NF- κ B inducida por TNF α y RT es responsable, al menos en parte, de los resultados potenciados obtenidos utilizando estas combinaciones. Adicionalmente, la interacción potenciada entre TNF α y TMZ lleva a la acumulación de especies de oxígeno reactivo (EOR), lo que da lugar a un retraso en la activación de la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) que
 25 media en la apoptosis de la célula tumoral.

[0025] Los Ejemplos siguientes pretenden ser puramente ilustrativos.

EJEMPLOS

[0026] Ejemplo 1. Reactivos y células. TMZ fue suministrado por Schering Corporation (Kenilworth, Nueva Jersey, EE.UU.) y se disolvió en DMSO a una
 30 concentración final que no excedía del 0,1% (v/v). DMSO y TNF α humano se obtuvieron de Sigma (St. Louis, Missouri, EE.UU.). La N-acetilcisteína (NAC) se obtuvo de Roxane Laboratories, Inc. (Columbus, Ohio, EE.UU.). El kit II de detección de apoptosis anexina V-FITC fue fabricado por BD Pharmingen (San José, California, EE.UU.). La hidroetidina (HE) se obtuvo de Molecular Probes, Invitrogen Detection
 35 Technologies (Eugene, Oregón, EE.UU.). SP600125 se obtuvo de (EMD Bioscience,

San Diego, California, EE.UU.). Las líneas celulares de glioblastoma humano: U87 MG, T98MG, U251, las células de cáncer pancreático: Panc1, MLkPaCa-2 y BcPC-3 y las células de cáncer esofágico: Seg-1 se obtuvieron de la American Type Culture Collection y se cultivaron en medio DMEM suplementado con SFT al 10% (Intergen Co., Purchase, Nueva York, EE.UU.), penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, California, EE.UU.) a 37°C y CO₂ al 5%.

[0027] **Ejemplo 2. Plásmidos y virus.** Los vectores de expresión pRC-CMV-p65, pRC-CMV y la proteína fluorescente verde (PFV) se han descrito previamente (Tang, F. y col. (2002) Mol Cell Biol 22:8571-8579). La construcción indicadora NF-κB luciferasa, Ig-κB-Luc, que contiene tres repeticiones del sitio xB potenciador de la cadena ligera κ de la inmunoglobulina y la construcción luciferasa promotor Egr-1, pE425 GL3, también han sido descritas previamente (Park, J.O. y col. (2002) J Clin Invest 110:403-410) (Kanno, T. y col. (1995) J Biol Chem 270:11745-11748). El vector adenovírico de replicación incompetente Ad.Egr-TNF se describió en la solicitud provisional de EE.UU. N° 60/604.251 (Yamini, B., y col. (2004) Cancer Res 64:6381-6384). Ad.Egr-TNF (GenVec Inc., Gaithersburg, Maryland) se conservó a -80°C y se diluyó en tampón de formulación a la concentración apropiada. La temozolomida (Schering Corporation, Kenilworth, Nueva Jersey, EE.UU.) se disolvió en DMSO con una concentración final que no excedía del 0,1% (v/v).

[0028] **Ejemplo 3. Inducción de TNFα *in vitro*.** Se sembraron en placas 10⁶ células U87 y se incubaron durante la noche. A continuación, las células se infectaron con Ad.Egr-TNF a una multiplicidad de infección (MDI) de 100 durante 3 h a 37°C. Tras la incubación se añadieron 3,8 ml de medio completo con o sin TMZ. Los medios condicionados se recogieron 48 h después del tratamiento y se cuantificó la producción de TNFα humano usando el kit de ELISA Quantikina (R&D System Inc., Minneapolis, Minnesota).

[0029] **Ejemplo 4. Inducción de TNFα *in vivo*.** Las células U87 (5 x 10⁶) en 100 µl de DMEM se inyectaron por vía subcutánea (sc) en de las patas traseras derechas de ratones sin pelo. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño medio de 200 mm³ (longitud x anchura x espesor/2), los ratones portadores de tumores se asignaron aleatoriamente a 4 grupos: 1. Control sin tratar (CST); 2. sólo Ad.Egr-TNF; 3. sólo TMZ; 4. Ad.Egr-TNF y TMZ. Ad.Egr-TNF se inyectó intratumoralmente (IT) a dosis de 2 x 10⁸ unidades de partícula (up) cada día. Se administraron dos dosis de TMZ: 2,5 mg/kg/día y 5 mg/kg/día mediante inyección intraperitoneal (IP) 3 h después del

vector. Se administraron cuatro inyecciones consecutivos IT e IP diariamente, los animales control recibieron medio sin suero (MSS) IT e IP. Los animales fueron sacrificados los día 2 y 4 (es decir, 48 h y 96 h después del inicio del tratamiento), se recogieron los tumores, se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se
 5 homogeneizaron en tampón RIPA (NaCl 150 mM, Tris 10 mM a pH 7,5; EDTA 5 mM a pH 7,5, PMSF 100 mM, leupeptina a 1 µg/ml y aprotinina a 2 µg/ml). Se aislaron las proteínas y se determinó la concentración usando un reactivo de ensayo de proteínas (Bio-Rad Laboratories, Hércules, California). Los niveles de TNFα en los sobrenadantes se determinaron como se describe anteriormente.

- 10 **[0030] Ejemplo 5. Estudios de viabilidad de las células U87.** Se empleó el procedimiento de exclusión con azul de tripán. Se sembraron 10^4 células U87 y se incubaron a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, las células se pusieron en contacto con medios que contenían TNFα (10 ng/ml) y/o TMZ (100 µM), se incubaron durante 3 h y se lavaron. A las 24 h, 48 h y 72 h tras la exposición al agente, las células
 15 se tripsinizaron y se determinó el número de células viables/pocillo usando un hemocitómetro. La viabilidad de las células a las 72 h se verificó usando la prueba colorimétrica MTS, según el protocolo del fabricante (ensayo de proliferación celular Cell Titer 96 Aqueous, One Solution, Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EE.UU.). La densidad óptica se leyó a 490 nm usando un lector de microplacas de
 20 ELISA después de 1,5 h a 37°C. Todos los estudios se realizaron por triplicado.

Ejemplo 6. Estudios de xenoinjertos

- [0031]** *Estudios en las patas traseras:* los xenoinjertos de U87 en las patas traseras se establecieron como se describe anteriormente en el Ejemplo 4. En un estudio, los ratones fueron asignados aleatoriamente a cuatro grupos como se describe
 25 en el Ejemplo 4 y con el tratamiento indicado (día 0). Se inyectó Ad.Egr-TNF (2×10^8 up) IT dos veces a la semana hasta un total de 4 inyecciones y se administró TMZ a 5 mg/kg IP, 3 h después de la inyección de cada vector, hasta un total de 20 mg/kg. La dosis de TMZ utilizada era aproximadamente 0,2 DL₁₀, que se eligió por tener un modesto efecto antitumoral pero no ser curativa en función de estudios
 30 previos (Friedman, H.S. y col. (1995) Cancer Res 55(13):2853-2857) y los datos del laboratorio de los solicitantes laboratorio mostraron que la DL₅₀ para IP por TMZ era aproximadamente de 500 mg/kg. El volumen del tumor se determinó cada 2-3 días. Se calculó y representó el volumen fraccional del tumor (V/V_0 , donde V_0 = volumen a día 0).

- 35 **[0032]** En un segundo estudio, los ratones portadores de tumores se asignaron

aleatoriamente a ocho grupos de tratamiento: control sin tratar (CST); solo Ad.Egr-TNF intratumoral (IT); solo TMZ intraperitoneal (IP); solo RT; Ad.Egr-TNF y TMZ; Ad.Egr-TNF y RT; TMZ y RT y Ad.Egr-TNF, TMZ y RT. Ad.Egr-TNF se administró IT a dosis de 2×10^8 up/10 μ l dos veces a la semana durante 2 semanas, TMZ IP se administró 3 h después del vector a 5 mg/kg hasta un total de 20 mg/kg. Los animales se colocaron en cámaras de Lucita y se administraron 5 Gy de RT al tumor durante 1 h antes de la TMZ (los días en los que se administraron tanto TMZ como RT), cada 2-3 días hasta un total de 30 Gy. Para todos los controles, los animales fueron inyectados IT o IP con medios sin suero (MSS) y los animales también se colocaron en cámaras sin RT. Los xenoinjertos se midieron dos veces a la semana usando calibradores, se calculó el volumen del tumor y se representaron los volúmenes fraccionales del tumor (V/V_0 donde V_0 = volumen el día 0).

[0033] *Estudios intracraneales:* en dos experimentos independientes, se inocularon 5×10^5 células U87 dentro del núcleo caudado derecho el día 0 usando una técnica de tornillo guía (Lal, S. y col. (2000) J Neurosurg 92:326-333). En el primer experimento, los *ratones* se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos como se describe en el Ejemplo 4. El día 5, se administró una única inyección intracraneal (IC) de 5×10^8 up de Ad.Egr-TNF en un volumen de 5 μ l directamente dentro del tumor usando la técnica del tornillo guía. Se administró TMZ (5 mg/kg) IP, 3 h después de la inoculación del vector IC. Se administraron tres inyecciones adicionales de TMZ IP en días consecutivos hasta una dosis total de 20 mg/kg. Los animales control recibieron MSS IT e IP.

[0034] En un segundo experimento, los ratones se asignaron aleatoriamente a ocho grupos (control sin tratar (CST); solo Ad.Egr-TNF intratumoral (IT); solo TMZ intraperitoneal (IP); solo RT; Ad.Egr-TNF y TMZ; Ad.Egr-TNF y RT; TMZ y RT y Ad.Egr-TNF, TMZ y RT). Se inoculó una única dosis de 5×10^5 células U87 dentro del núcleo caudado derecho de cada ratón el día 0 usando una técnica de tornillo guía (LaI, S. y col. (2000) J Neurosurg 92:326-333). El día 5, se inyectaron 5×10^8 up de Ad.Egr-TNF en un volumen de 5 μ l mediante el tornillo guía directamente dentro del tumor. Empezando dos horas después de la inyección de vector, se administraron 5Gy de RT al área del tumor y se repitió cada 2-3 días hasta un total de 30Gy. Se administró TMZ (5 mg/kg) IP 3 h después de la inoculación del vector y se administraron diariamente dosis similares durante los dos días siguientes hasta una dosis total de 15 mg/kg. Los animales control recibieron MSS IT e IP y también se colocaron en cámaras de Lucita. Se realizó una evaluación diaria de la apariencia de los animales.

Se realizó un seguimiento de los ratones hasta su muerte o se sacrificaron cuando estaban moribundos. Se recogieron los cerebros de los ratones tras perfusión intracardiaca y se fijaron con formalina neutra tamponada al 10%. Para la evaluación TUNEL (véase a continuación) los animales se sacrificaron el día 7 tras el tratamiento
 5 (n = 3 por grupo).

Ejemplo 7. Análisis de la apoptosis por citometría de flujo.

[0035] *Contenido fraccional de ADN:* las células U87 (10^5) se sembraron en placas y se dejaron durante toda la noche a 37°C con CO₂ al 5%. A continuación, las células se trataron con TNF α (10 ng/ml) y/o TMZ (100 μ M). A las 72 h, las células se
 10 lavaron en PBS y se fijaron en etanol enfriado en hielo al 70% (v/v). Las células se lavaron dos veces y se incubaron en RNasa (1 mg/ml) durante 30 m a 37°C, a continuación se incubaron con una solución de yoduro de propidio (PI) (100 μ g/ml) durante 30 m a 4°C. Los análisis por citometría de flujo se realizaron en un equipo FACSsort (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, California) y los
 15 datos se analizaron usando el software CellQuest (Becton Dickinson).

[0036] *Unión de anexina V* (van Engeland, M. y col. (1998) Cytometry 31(1): 1-9): a las 72 h, las células se lavaron en PBS y se incubaron en la oscuridad durante 15 m con tampón de unión que contenía Anexina V-FITC y 5 μ l de PI (kit II de detección de apoptosis Anexina V-FITC). Los datos se analizaron mediante software
 20 de análisis Flowjo (Tree Star Inc., Ashland, Oregón).

[0037] **Ejemplo 8. Análisis histológico.** Los cerebros incluidos en parafina se cortaron (8 μ m), se tiñeron con hematoxilina y eosina y analizaron de forma enmascarada.

[0038] El ensayo de adición de nucleótidos dUTP marcados con biotina con la
 25 deoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) se realizó según las instrucciones del fabricante (Chemicon) y se analizó de forma enmascarada con un aumento 400x usando un microscopio óptico acoplado a un ordenador con software de reconstrucción (Neurolucida, Microbrightfield, Vt). Se documentó el número de células positivas en TUNEL por 10^{-6} mm².

30 [0039] **Ejemplo 9. Ensayo de luciferasa.** Las células U87 (5×10^3) se sembraron en placas y se dejaron durante toda la noche y, posteriormente, se transfectaron simultáneamente con Ig- κ B-Luc (o pE425 GL3) y el vector de expresión de *Renilla reniformes*, pRL-TK, para normalizar la eficacia de la transfección, a una proporción de 10:1 usando el kit de transfección SuperFectin (Qiagen, Valencia, California,
 35 EE.UU.). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se trataron

previamente con TMZ (100 μ M) durante 16 h, a continuación, se trataron con TNF α (10 ng/ml). Cinco horas después, se midió la actividad del NF- κ B (o Egr-1) y de la luciferasa de *Renilla* con el sistema doble de ensayo indicador de luciferasa (Promega Corp. Madison, Wisconsin, EE.UU.). La luciferasa relativa se calculó como la

5 proporción de luminiscencia de luciérnaga/luminiscencia de *Renilla* para cada muestra.

[0040] Ejemplo 10. Preparación de extractos nucleares. Los cultivos confluyentes de células U87 se crecieron en medio completo y, a continuación, se dejaron sin tratar o se trataron con TNF α a 10 ng/ml durante 20 m y 1 h +/- 16 h de tratamiento previo con 100 μ M de TMZ (o DMSO como vehículo control al 0,1%). A

10 continuación, las células se lavaron con 10 ml de PBS enfriado en hielo, se despegaron de la placa y se sedimentaron por centrifugación a 1.000 rpm durante 5 m a 4°C. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 400 μ l de tampón A enfriado en hielo (HEPES 10 mM, pH 7,9; KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, DTT 1 mM; fenilmetilsulfonilfluoruro [PMSF] 0,5 mM; leupeptina a 1 μ g/ml; aprotinina a 5 μ g/ml)

15 y se dejó que crecieran en hielo durante 15 m. Tras la adición de 25 μ l de NP-40 al 10%, la suspensión se removi6 durante 10 s y se centrifug6 a 14.500 rpm durante 1 m a 4°C. Los núcleos se resuspendieron en 50 μ l de tampón B enfriado en hielo (HEPES 20 mM, pH 7,9; NaCl 0,4; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; PMSF 1 mM; glicerol al 25%, leupeptina a 1 μ g/ml; aprotinina a 5 μ g/ml) y se incubaron en hielo durante 15 m. A

20 continuación, la suspensión nuclear se centrifug6 a 14.500 rpm durante 5 m a 4°C y el sobrenadante que contenía las proteínas nucleares se transfirió a un tubo limpio. Las concentraciones de proteína de cada muestra se determinaron mediante el procedimiento de Bradford (Bio-Rad, Richmond, California, EE.UU.) y se ajustaron a una concentración de 2 μ g/ μ l mediante la adición de tampón B.

25 **[0041] Ejemplo 11. Ensayo de cambio de movilidad electroforética.** Los ensayos se realizaron usando el sistema de ensayo de cambio en gel de Promega. El oligonucle6tido consenso de NF- κ B (oligo) (5'AGTTGAGGGGACTITCCCAGGC3') (SEQ ID NO: 1) se marc6 en el extremo con [γ -³²P]ATP usando la polinucle6tido cinasa T4 y se incub6 durante 10 m a 37°C. La reacción se detuvo mediante la adición

30 de 1 μ l de EDTA 0,5 M. Las reacciones de unión contenían lo siguiente: 5 μ l de extracto nuclear (10 μ g de proteína), 2 μ l de agua destilada desionizada y 2 μ l de tampón de unión de cambio en gel x 5 (glicerol al 20%; MgCl₂ 5 mM; EDTA 2,5 mM; DTT 2,5 mM; NaCl 250 mM; Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, poli(dI-dC) poli(dI-dC) a 0,25 mg/ml. La mezcla de reacción se incub6 a temperatura ambiente durante 10 m y, a

35 continuación, se añaadi6 1 μ l (0,035 pmol) del oligo de NF- κ B marcado con ³²P.

Después de 20 m más, la reacción se detuvo mediante la adición de 1 µl de tampón de carga en gel x10 (Tris-HCl 250 mM, pH 7,5; azul de bromofenol al 0,2%; glicerol al 40%). Se cargaron 10 µl en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes al 5% que se desarrolló en TBE x 0,5 (Tris-HCl 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1 mM) durante 1 h. El gel se secó al vacío a 80°C durante 1 h y se expuso a una placa fotográfica a -70°C. En el caso de reacciones de competición, se incubaron 10 ng de extracto nuclear de U87 tratado con TNFα durante 30 m con un exceso de 50 veces de oligonucleótido de secuencia consenso de NF-κB sin marcar u oligonucleótido de secuencia consenso AP-I sin marcar (competidor no específico).

10 Los estudios “supershift” se realizaron mediante preincubación durante 30 m de los extractos nucleares de células tratadas con TNFα con un anticuerpo frente a p65 o p50 (Active Motif, Carlsbad, California, EE.UU.).

[0042] Ejemplo 12. Análisis por inmunotransferencia. Veinte µg de lisado completo (o nuclear) de células U87 se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS). Tras la electrotransferencia, las membranas Immobilon P (Millipore Corp. Burlington, Massachusetts, EE.UU.) se incubaron con una sonda de anticuerpo policlonal primario frente a IxBa, fosfo-Ser32-IκBα, SAPK/JNK, fosfo-Thr183/Tyr185-SAPK/JNK, p65, fosfo-Ser536-p65 (Cell Signaling Technology Inc. Beverly, Maryland, EE.UU.) diluido 1:1.1000 durante toda la noche a 4°C. El anticuerpo secundario anti-IgG de ratón unido a HRP (Cell Signaling Technology) se diluyó 1:1.000 en tampón de bloqueo y se aplicó durante 1 h a temperatura ambiente. Las bandas inmunoreactivas se detectaron mediante superseñal de quimioluminiscencia mejorada (ECL) (Pierce, Rockford, Illinois, EE.UU.) y se expusieron a placas X-Omat

20

25 de Kodak.

[0043] Ejemplo 13. Unión de anexina V. Las células bien no se transfectaron, o se transfectaron simultáneamente con pRC-CMV-p65 o pRC-CMV en presencia de un plásmido de GFP en una proporción 4:1. En estas condiciones, las células que expresaban GFP también expresaban el plásmido cotransfectado (Tang, F. y col. (2002) Mol Cell Biol 22:8571-8579). A continuación, las células se dejaron sin tratar o se trataron como se describe en las leyendas de las figuras. A las 72 h, las células se lavaron en PBS y se incubaron en la oscuridad durante 15 m con tampón de unión que contenía 5 µl de Anexina V-FITC y 5 µl de yoduro de propidio (PI). En las células transfectadas, la unión a anexina V se evaluó en células positivas para GFP. Los datos

30

35 se analizaron mediante software de análisis Flowjo (Tree Star Inc., Ashland, Oregón,

EE.UU.) como se describe en la solicitud provisional de EE.UU. N° 60/604.251 (Yamini, B. y col. (2004) Cancer Res 64:6381-6384)

[0044] Ejemplo 14. Ensayo de proteína cinasa. IkK se inmunoprecipitó a partir de extractos de células U87 tratadas con anticuerpo dirigido contra IKK β (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, EE.UU.). La actividad cinasa del inmunocomplejo se ensayó a 30°C durante 30 a 60 m en 30 μ l de tampón de cinasa (Mercurio, F. y col. (1997) Science 278:860-866) en presencia de ATP 10 μ M-[γ -³²P] ATP 10 μ Ci de Dupont NEN con proteína (GST)-IkB α (1-54) (purificada a partir de perlas de agarosa-glutación como se ha descrito (DiDonato, J.A. y col. (1997) Nature 388:548-554)) como sustrato. La reacción se detuvo con tampón de muestra de Laemmli x4 y las proteínas se separaron mediante PAGE-SDS al 12%. La actividad cinasa se cuantificó usando un Phosphoimager y una carga de proteína similar determinada mediante inmunotransferencia con anticuerpo anti-IkK β (Upstate USA, Charlottesville, Virginia, EE.UU.). Los complejos antígeno-anticuerpo se visualizaron mediante el sistema de detección ECL (Amersham, Inglaterra).

[0045] Ejemplo 15. Determinación de la producción de superóxido (O₂). Las células U87 se sembraron a una densidad de 10⁶ células en placas de cultivos tisulares de 6 pocillos de fondo plano, se incubaron durante toda la noche y se trataron como se indica en la leyenda de la figura. A continuación, las células se lavaron, resuspendieron en PBS, se añadió 1 μ l de hidroetidina (HE) 10 mM por ml de suspensión celular (concentración final de 10 μ M) y se incubaron durante 5 m a 37°C. Las células se recogieron y analizaron en un citómetro de flujo (FACSort; BD Biosciences) con excitación a 488 nM y se recogió la emisión usando un filtro de paso largo de absorbancia a 620-670 nm. Los datos se analizaron mediante el software Flowjo.

[0046] Ejemplo 16. Análisis estadístico. Los resultados se expresan como la media $\pm$ ETM. La significancia estadística se tomó como $P < 0,05$ usando una prueba T de Student unilateral. También se empleó el análisis de varianza (ANOVA). Las curvas de Kaplan-Meier se dibujaron a partir del experimento intracraneal y se analizaron mediante el procedimiento de rango logarítmico.

[0047] Ejemplo 17. El TNF α inducido por TMZ reducía la viabilidad de las células U87MG Se encontró que TMZ inducía la expresión de TNF α en las células U87 infectadas con Ad.Egr-TNF. En los estudios *in vitro*, se detectó TNF α en células control no tratadas o en células tratadas sólo con TMZ. Tras la infección con Ad-Egr-TNF, 100 μ M de TMZ inducían un aumento de 2,3 veces en la expresión de TNF α en comparación con las células infectadas sólo con el vector (Fig. 1A). Los xenoinjertos

de las patas traseras se usaron para evaluar la inducción *in vivo*. No se detectó TNF en los animales no tratados ni en los animales tratados solo con TMZ (Fig. 1B). Sin embargo, tras la politerapia con Ad.Egr-TNF/TMZ, se detectaron 287 ± 111 pg de TNF α /mg de proteína a las 96 h, 6,4 veces más TNF α que el encontrado en células de glioma de animales tratados solo con Ad.Egr-TNF ($n=3$ animales por grupo, $P=0,02$) (Fig. 15).

[0048] El efecto citotóxico de TNF α y TMZ sobre la viabilidad de las células de glioma se evaluó *in vitro*. Los efectos mínimos sobre la viabilidad de las células U87 se observaron en células U87 tratadas solo con TNF α a 10 ng/ml o con 100 μ M de TMZ. Sin embargo, la politerapia inducía una reducción significativa en la viabilidad celular, cuya magnitud era mayor que la suma de las reducciones de cada tratamiento solo (Fig. 1A y B). El hecho de que exista una interacción sinérgica entre TNF α y TMZ está apoyado por el análisis de la valoración de la varianza (ANOVA) ($P=0,0016$).

[0049] Ejemplo 18. La combinación de TNF α y TMZ mostraba eficacia antitumoral. La eficacia antitumoral de TNF α y TMZ se evaluó en los xenoinjertos de las patas traseras. El tratamiento de tumores solo con Ad.Egr-TNF no afectada significativamente a las cinéticas de crecimiento con respecto a las cinéticas de crecimiento de animales control no tratados. El volumen tumoral fraccional de animales tratados con Ad.Egr-TNF y TNF era significativamente menor en comparación con el volumen tumoral fraccional de animales tratados solo con TMZ ($P<0,02$ al día 20) (Fig. 3A). En experimentos de xenoinjertos intracraneales, se registró la supervivencia de los ratones sin pelo tras el tratamiento. El tratamiento solo con TMZ a 20 mg/kg prolongaba la mediana de la supervivencia por encima de los animales control no tratados y los animales tratados solo con Ad.Egr-TNF (28 días frente a 18 y 21 días, respectivamente). Ningún ratón vivía más de 48 días. Sin embargo, la mediana de supervivencia tras la politerapia con Ad.Egr-TNF/TMZ aumentaba significativamente a 76 días ($P<0,001$ por Log-rango en comparación solo con TMZ) (Fig. 3B). Los animales de todos los grupos de tratamiento parecían sanos. La evaluación histológica de las secciones intracraneales mostró una disminución de la densidad celular en el grupo de politerapia con toxicidad oligodendroglial mínima y, más significativamente, no se observó aumento en la necrosis tumoral cuando se comparó con cualquier tratamiento solo (datos no mostrados).

[0050] Ejemplo 19. TMZ y TNF α actúan sinérgicamente para potenciar la apoptosis. El análisis por citometría de flujo (FACS) de las células U87 se usó para evaluar el contenido fraccional de ADN tras el tratamiento. Como era previsible, el

TNF α solo tenía un efecto mínimo sobre la apoptosis de las células U87 y TMZ sola llevaba a un aumento del porcentaje de células en fase G2/M. Sin embargo, el tratamiento con TNF α y TMZ llevaba a un aumento significativo en el pico sub-G1 (hipodiploide/apoptótico) a las 72 h, en comparación con cualquier tratamiento aislado 5 ($P < 0,05$). La tinción con anexina V de células U87 confirmó los resultados obtenidos por FACS. La politerapia inducía un aumento de 9 y 3,3 veces en las células positivas para anexina en comparación con aquellos tratados solo con TNF α o TMZ, respectivamente, a las 72 h. Se determinó que la interacción entre TNF α y TMZ que inducían apoptosis era sinérgica, según se evaluó mediante ANOVA ($P < 0,05$). Para 10 determinar si el efecto sinérgico de TNF α y TMZ sobre la apoptosis observado *in vitro* también ocurría *in vivo*, se evaluaron secciones tumorales intracraneales, específicamente, secciones tomadas durante el estadio inicial del tratamiento (día 7), usando la técnica TUNEL. Los tumores tratados con la combinación Ad.Egr-TNF/TMZ tenían significativamente más células positivas para TUNEL que aquellos 15 tratados solo como TMZ o Ad.Egr-TNF (110 ± 77 frente a 14 ± 12 y 13 ± 13 células TUNEL+ en 10^{-6} mm^2 respectivamente, $P < 0,05$) (Fig. 4).

[0051] La sinergia entre TNF α y TMZ proporciona una eficacia potenciada en la inhibición del crecimiento de las células de glioma sobre el uso solo de TMZ. Aunque TMZ tiene efectos adversos relativamente leves, la dosis máxima que puede 20 administrarse con seguridad está limitada por la toxicidad hematológica. El índice terapéutico de TMZ puede potenciarse en gran medida cuando se usa TMZ en una estrategia de politerapia con la administración por vía vírica del TNF α .

[0052] Estos resultados son inesperados a la vista de los informes previos. Eggermont y col., notificaron que la interacción sinérgica observada entre dosis altas 25 de TNF α y un agente alquilante en estudios aislados de perfusión de las patas, era debida a un aumento de la necrosis tumoral, posiblemente resultado de un aumento de la permeabilidad vascular que llevaba a un aumento en la concentración de fármaco intratumoral (Eggermont, A.M. y col. (2003) Lancet Oncol 4(7):429-437). También se observó un patrón similar de necrosis tumoral cuando se combinó radioterapia con 30 Ad.Egr-TNF en un modelo de glioma en el lomo del animal (Staba, M.J. y col. (1998) Gene Ther 5(3):293-300). Por el contrario, la combinación de TMZ y TNF no producía necrosis histológicamente detectable y, en su lugar, causaba un aumento significativo en la apoptosis de las células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*, mientras que ni TNF α ni TMZ solos causan apoptosis significativa en células de glioma. Considerados 35 en conjunto, estos datos sugieren con fuerza que existe una interacción directa entre

TNF α y TMZ en células de glioma que potencia la apoptosis dando lugar al beneficio terapéutico observado en nuestros experimentos.

[0053] Se ha especulado con que un aumento terapéutico de la apoptosis de las células tumorales es un objetivo deseable de nuevos tratamientos para el glioma (Raza, S.M. y col. (2002) *Neurosurgery* 51(1):2-12); discusión 12-3), especialmente porque la necrosis tumoral se ha asociado con un pronóstico significativamente peor en pacientes GBM (Lacroix, M. y col. (2001) *J Neurosurg* 95(2): 190- 198). Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para determinar el mecanismo implicado en la inducción de apoptosis y evaluar si la apoptosis inducida por el tratamiento produce un índice terapéutico mayor en el glioma maligno que la necrosis terapéuticamente inducida.

[0054] La mortalidad debida a glioma maligno se relaciona principalmente con una enfermedad recurrente, que tiene una naturaleza casi universalmente local no metastásica (20). Por esta razón, una estrategia de tratamiento activada regionalmente es especialmente adecuada para tratar estos tumores.

[0055] Ejemplo 20. La temozolomida inhibe la transcripción de NF- κ B inducida por TNF α en células de glioma. Debido a que se sabe que el TNF α induce el factor de transcripción prosupervivencia NF- κ B, cuya activación media en la resistencia a otros agentes estresantes genotóxicos, se evaluó el efecto de TMZ sobre NF- κ B inducido por TNF α , ya que la pregunta era si cualquier de estos efectos contribuía a la interacción apoptótica/citotóxica entre TMZ y TNF α . En un ensayo del indicador luciferasa sensible a NF- κ B, se demostró que el tratamiento previo con TMZ causaba una inhibición dependiente de dosis de la actividad transcripcional de NF- κ B inducida por TNF α en células de glioma U87 ($P = 0,002$ para TNF α + 100 μ M de TMZ en comparación con sólo TNF α). TMZ tiene un efecto similar sobre la actividad NF- κ B inducida por TNF α en las líneas celulares de glioma humano probadas T98 y U251. Por el contrario, TMZ activaba la actividad transcripcional de NF- κ B inducida por TNF α en líneas celulares cancerígenas pancreáticas y esofágicas humanas (Panel, MIAPaCa-2, BxPC-3 y Seg-1). Estos resultados sugieren que la inhibición de la actividad NF- κ B inducida por TNF α por TMZ puede ser selectiva para las células de glioma humano en comparación con otros tipos de células cancerígenas.

[0056] Ejemplo 21. La temozolomida suprime la translocación nuclear, la translocación nuclear y la activación de NF- κ B inducida por TNF α . Los resultados de los experimentos realizados para caracterizar más en profundidad el efecto de la TMZ sobre NF- κ B inducido por TNF α indica que TMZ inhibe la actividad

transcripcional de NF- κ B inducido por TNF- α inhibiendo, en parte, la translocación nuclear de NF- κ B. Adicionalmente, se demostró que, en células de glioma, el NF- κ B inducido a translocarse al núcleo tras la estimulación con TNF α contenía la subunidad p65 como componente principal. TMZ no afecta directamente a la unión al ADN del NF- κ B inducido por TNF α . Adicionalmente, TMZ inhibe la degradación de I κ B α inducida por TNF α , un regulador anterior al extremo 5' de NF- κ B. Los datos de los experimentos realizados según se describe anteriormente en los ejemplos previos mostraban que el tratamiento con TNF α producía una degradación completa de I κ B α a los 15 m y que, aunque el tratamiento previo con TMZ tenía poco efecto sobre los niveles globales de proteína I κ B α , reducía la degradación inducida por TNF α . Adicionalmente, el aumento de las concentraciones de TMZ daba lugar a una mayor inhibición de la degradación de I κ B α inducida por TNF α a los 15 m. Estos resultados sugieren que TMZ inhibe la actividad NF- κ B inducida por TNF α al menos en parte inhibiendo la degradación de I κ B α inducida por TNF α . El tratamiento previo con TMZ también reducía la fosforilación de I κ B α inducida por TNF α , reacción catalizada por I κ KI, al 50% en 5 m. Además, TMZ inhibía la fosforilación alterada de p65 inducida por TNF α , que tenía el mismo efecto de reducción de la translocación nuclear de NF- κ B inducida por TNF α . La inhibición de la fosforilación de p65 inducida por TNF α se contrarresta mediante la sobreexpresión de p65.

20 **[0057] Ejemplo 22. La temozolomida induce la activación prolongada de JNK que contribuye a la apoptosis de las células tumorales.** Se ha demostrado que la activación mantenida de JNK media tanto en la apoptosis inducida por TNF α como en la inducida por daño del ADN en el ámbito de una activación reducida de NF- κ B (Tang, G. y col. (2001) Nature 414:313-317) (Benhar, M. y col. (2001) Mol Cell Biol 21:6913-6926). Por tanto, se realizaron experimentos para evaluar si TMZ y TNF α afectan a la fosforilación de JNK (activación) en las células de glioma. Como se mostró previamente, las células de glioma tienen una activación inicial de JNK (Antonyak, M.A. y col. (2002) Oncogene 21:5038-5046). Los experimentos iniciales demostraron en un principio que, aunque TNF α aumentaba transitoriamente la actividad JNK, el tratamiento con TMZ y TNF α induce un aumento bifásico en la fosforilación de JNK, observándose la fase retrasada aproximadamente 20 h después del tratamiento. El tratamiento solo con TMZ da lugar a una activación progresiva y retardada de JNK. Debido a que se ha mostrado previamente que la activación de JNK tiene lugar como resultado de la activación de la caspasa (Cardone, M.H. y col. (1997) Cell 90:315-323), las células se trataron previamente con el inhibidor general de

caspasas zVAD-fmk, antes de evaluar la activación de JNK. Los resultados mostraron que, incluso aunque zVAD revertía completamente la citotoxicidad inducida por la politerapia con TMZ y TNF α , esto no inhibía la activación retardada de JNK inducida por esta combinación. De hecho, se demostró que la activación de JNK era incluso
5 mayor tras el tratamiento previo con zVAD.

[0058] La necesidad de una activación prolongada de JNK para la apoptosis de las células U87 se evaluó usando la unión a anexina V tras el tratamiento con TNF α y TMZ en presencia del inhibidor específico de JNK SP600125. El tratamiento previo con SP600125 inhibía la activación tanto transitoria como retardada de JNK tras la
10 estimulación con TMZ y TNF α , y SP600125 revertía la apoptosis inducida por la politerapia con TMZ y TNF α ($P < 0,01$ para TNF α + TMZ + SP600125 en comparación con TNF α + TMZ). El efecto de SP600125 sobre la muerte celular se confirmó usando un ensayo MTS de células U87 72 h después del tratamiento. Tomados en conjunto, estos datos sugieren que es necesaria la activación de JNK para
15 la apoptosis tras el tratamiento con TNF α y TMZ, pero que la activación de JNK, como se observa con el tratamiento solo con TMZ, no es suficiente para inducir apoptosis.

**[0059] Ejemplo 23. Las especies de oxígeno reactivo (EOR) median en la fosforilación retardada de JNK y en la inducción de apoptosis tras la politerapia
20 con TMZ y TNF α .** Se ha demostrado que las EOR median en el componente mantenido de la activación de JNK inducida por TNF α en células que presenta un defecto en la activación de NF- κ B (Sakon, S. y col. (2003) EMBO J 22:3898-3909). Si el tratamiento con TMZ y TNF α daba lugar o no a una acumulación de EOR en células U87 se evaluó usando el colorante permeable en células hidroetidina (HE), que se
25 oxida con radicales superóxido (O_2^-) al etidio fluorescente. La politerapia con TMZ y TNF α induce un aumento progresivo de la acumulación de O_2^- durante 24 h como muestra el aumento de la intensidad de etidio y este aumento de O_2^- era inhibido significativamente por el tratamiento previo con el antioxidante NAC ($P < 0,05$ para TNF α + TMZ + NAC en comparación con TNF α + TMZ). Adicionalmente, el
30 tratamiento previo de células U87 con NAC reduce la activación JNK retardada inducida por la politerapia con TMZ y TNF α 1,7 veces sin afectar a la activación transitoria de JNK.

[0060] Se evaluó si las EOR estaban implicadas en la apoptosis inducida por la politerapia con TNF α y TMZ. El tratamiento previo de las células U87 con NAC tenía
35 efectos mínimos sobre la muerte células. Sin embargo, NAC revertía

significativamente la apoptosis inducida por la politerapia con TMZ y TNF α ($P < 0,01$ para TNF α + TMZ + NAC en comparación con TNF α + TMZ). A continuación, para evaluar una relación directa entre p65 y EOR, se evaluó la oxidación de HE en células cotransfectadas con HA-p65 (o el vector vacío) y un vector de expresión para GFP.

- 5 Los resultados indican que la sobreexpresión de p65 reducía significativamente la oxidación de HE tras el tratamiento con TNF α y TMZ en comparación con el control ($P < 0,05$).

[0061] La combinación de TNF α y TMZ aumenta las especies de O₂ y la inhibición de las EOR da lugar a la inhibición de la actividad retardada de JNK y a
10 apoptosis. La activación de JNK es posterior a la acumulación de ROS, lo que contrasta con publicaciones previas (Ventura, J.J y col. (2004) Genes Dev 18:2905-2915). Los resultados indican que p65 inhibe la acumulación de EOR inducida por el tratamiento de TNF α y TMZ, mientras que no tiene un efecto significativo sobre la producción basal de EOR.

- 15 [0062] **Ejemplo 24. La combinación de TMZ, RT y Ad.Egr-TNF suprime el recrecimiento del glioma en las patas traseras.** La RT tiene una función principal en el tratamiento del glioma maligno (Walker, M.D. y col. (1980) N Engl J Med 303:1323-1329) y el uso combinado de RT y Ad.Egr-TNF provoca la regresión del tumor mediante un mecanismo que implica tanto toxicidad tumoral directa como
20 efecto antivasculador indirecto (Weichselbaum, R.R. y col. (2002) Lancet Oncol 3:665-671). Se evaluó si la adición de RT podría potenciar significativamente el efecto antitumoral de TMZ y TNF α . Se apreció una desaparición completa del tumor palpable en los xenoinjertos de gliomas de las patas traseras en ratones sin pelo (10/10) tratados con TMZ, RT y Ad.Egr-TNF a los 30 días de tratamiento de 10/10 animales. Por el
25 contrario, 1/10 animales de los grupos tratados sólo con TMZ, sólo con RT, con RT y TMZ o TMZ/Ad.Egr-TNF ($P < 0,0001$ para TMZ + RT + Ad.Egr-TNF en comparación con Ad.Egr-TNF + TMZ). Estos datos muestran una potente interacción antitumoral *in vivo*.

- [0063] **Ejemplo 25. TMZ suprime la actividad NF- κ B inducida por TNF α y
30 RT, y la translocación nuclear *in vivo*.** Debido a que se ha demostrado que la activación de NF- κ B inducida por RT media en la resistencia a la radiación en células tumorales, se evaluó el efecto inhibidor de TMZ sobre NF- κ B inducido por TNF α *in vivo*. El tratamiento conjunto de las células de glioma con TNF α y RT aumenta la actividad transcripcional y la translocación nuclear de NF- κ B y estos efectos del TNF α
35 y la RT son inhibidos por TMZ de una forma dependiente de dosis.

[0064] Ejemplo 26. El tratamiento triple con Ad.Egr-TNF, TMZ y RT induce un aumento de la supervivencia del animal en un modelo de xenoinjerto intracraneal de glioma. Los resultados obtenidos tratando a los ratones con un xenoinjerto de glioma en las patas traseras con TMZ, RT y Ad.Egr-TNF fueron confirmados usando un modelo de xenoinjerto de glioma intracraneal. Se evaluó la supervivencia de los ratones tratados con Ad.Egr-TNF, RT y TMZ sólo y en combinación. Se encontró que los animales tratados con Ad-Egr-TNF, RT y TMZ presentaban un aumento significativo en la mediana de supervivencia en comparación con todos los demás grupos de tratamiento y en comparación, específicamente, con la pauta posológica convencional de RT y TMZ. El 50% de los animales tratados con TMZ, RT y Ad.Egr-TN seguían vivos y parecían sanos 100 días después de la inoculación del tumor, en comparación con 0% de animales en todos los demás grupos de tratamiento ($P < 0,01$ para Ad.Egr-TNF + RT + TMZ frente a Ad.Egr-TNF + TMZ) (Fig. 5).

[0065] El uso de TMZ con RT simultánea se ha convertido en una estrategia inicial convencional para el tratamiento de pacientes con glioma maligno. Sin embargo, el pronóstico para estos pacientes sigue siendo pésimo. La naturaleza heterogénea de los gliomas malignos sugiere que puede ser necesaria una estrategia terapéutica multimodal que incorpore quimio o radioterapia convencional con estrategias experimentales más nuevas para lograr mejores resultados (Guha, A. y Mukherjee, J. (2004) Curr Opin Neurol 17:655-662). Una estrategia potencialmente prometedora para el tratamiento del cáncer ha sido dirigirse a ligandos de muerte, como el del TNF α , para desencadenar la apoptosis en células tumorales. Esta es una estrategia atractiva ya que los ligandos de muerte pueden activar directamente la cascada apoptótica en parte a través de mecanismos diferentes que los activados por agentes que dañan el ADN (Ashkenazi, A. (2001) Nat Rev Cancer 2:420-430). Aunque se ha demostrado que las células de glioma son resistentes a la citotoxicidad inducida por la superfamilia del TNF α (Sakuma, S. y col (1993) Neurooncol 15:107-208) (Knight, M.J. y col. (2004) Mol Carcinog. 39:173-182), se ha demostrado que la politerapia con agentes quimioterapéuticos sensibiliza a las células a la citotoxicidad inducida por ligandos de muerte (Vivo, C. (2003) J Biol Chem 278:25461-25467) (Yamini, B. (2004) Cancer Res 64:6381-6384) (Duan, L. (2001) J Neurooncol 52:23-36) (Saito, R. (2004) Cancer Res 64:6858-6862).

[0066] El TNF α inducido intracranealmente (administrado a través de Ad.Egr-TNF), en combinación con TMZ y RT, aumenta significativamente la supervivencia de

animales portadores de un xenoinjerto de glioma intracraneal en comparación con la supervivencia de animales alcanzada con la posología antiglioma convencional actual de RT y TMZ. Lo más importante, los animales tratados con terapia triple parecen sanos sin muertes precozmente relacionados con el tratamiento.

- 5 **[0067]** La activación del factor de transcripción NF- κ B media en la resistencia a TNF α , RT y quimioterapia (Wang, C.Y. (1996) *Science* 274:784-787) (Beg, A.A. y Baltimore, D. (1996) *Science* 274:782-784) (Wang, C.Y. (1999) *Nat Med* 5:412-417). Se ha demostrado que la inhibición de la activación de NF- κ B sensibiliza a las células tumorales ante la apoptosis inducida por TNF α e inducida por RT (Van Antwerp, D.J. col.(1996) *Science* 274:787-789) (Yamagishi, N. y col. (1997) *Int J Radiat Biol* 72:157-162). Aunque TNF α y RT aumentan la actividad de NF- κ B, se ha demostrado que diversos agentes quimioterapéuticos mostraban tanto aumento como reducción de la actividad de NF- κ B (Das, K.C. y White, C.W. (1997) *J Biol Chem* 272:14914-14920) (Campbell, KJ. y col. (2004) *Mol Cell* 13:853-865) (Chuang, S.E. y col. (2002) *Biochem Pharmacol* 63:1709-1716). Este estudio proporciona el primer resultado de que TMZ inhibe fuertemente la actividad transcripcional de NF- κ B inducida por TNF α . Cuando se usa sola, TMZ aumenta ligeramente la actividad transcripcional de NF- κ B en células de glioma. Por tanto, la observación de que la actividad NF- κ B inducida por TNF- α se inhibe completamente mediante TMZ es bastante improbable.
- 20 Previamente se publicó que otros agentes quimioterapéuticos no utilizados en la clínica general inhibían la actividad NF- κ B inducida por TNF α (Ichikawa, H. y col. (2005) *J Immunol* 174:7383-7392). Actualmente, se está poniendo mucho énfasis e investigación en el desarrollo de inhibidores clínicamente útiles de la ruta de activación de NF- κ B (Karin, M. y col. (2004) *Nat Rev Drug Discov* 3:17-26)
- 25 (Aggarwal, B. B. (2004) *Cancer Cell* 6:203-208). TMZ es un agente alquilante de ADN utilizado normalmente con un perfil de toxicidad favorable y su inhibición de NF- κ B inducido por TNF α y RT, representa potencialmente un mecanismo novedoso y clínicamente útil por el cual pueden combinarse ligandos de muerte y agentes convencionales que dañan el ADN en el tratamiento del glioma maligno. Los
- 30 resultados descritos en este documento indican que TMZ suprime la actividad NF- κ B inducida por TNF α en varias líneas celulares de glioma (células U251, T98 y U87) pero no en líneas celulares de cáncer pancreático o esofágico, lo que sugiere que la inhibición mediada por TMZ de la activación de NF- κ B puede ser específica para las células de glioma.

REIVINDICACIONES

1. El uso de temozolomida en la preparación de un medicamento para el tratamiento del glioma maligno, mediante la inhibición del tratamiento de una célula
5 de glioma, siendo dicho tratamiento una politerapia con TNF α .
2. El uso de TNF α en la preparación de un medicamento para el tratamiento del glioma maligno, inhibiendo el crecimiento de una célula de glioma, siendo dicho tratamiento una politerapia con temozolomida.
- 10 3. El uso de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que el TNF se proporciona mediante un vehículo que comprende o expresa TNF α .
4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la célula de
15 glioma está dentro de un glioma de un paciente humano con cáncer.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la temozolomida inhibe la transcripción, la translocación nuclear o la activación de NF κ B inducida por TNF α .
- 20 6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la temozolomida aumenta la actividad cinasa c-Jun N-terminal.
7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la temozolomida
25 inhibe la fosforilación de p65.
8. El uso de la reivindicación 1 en el que el tratamiento utiliza un vehículo que comprende o expresa TNF α , donde el vehículo se administra directamente al glioma en un paciente humano con cáncer.
- 30 9. El uso de la reivindicación 2 en el que el tratamiento utiliza un vehículo que comprende o expresa TNF α donde el vehículo se administra directamente al glioma en un paciente humano con cáncer.
- 35 10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el tratamiento se

correlaciona con aumento de la citotoxicidad o apoptosis de las células de glioma en relación con la de las células de glioma tratadas solo con TNF α o solo con temozolomida.

5 11. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el tratamiento no se correlaciona con un aumento de la necrosis de las células de glioma.

12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, comprendiendo además dicho tratamiento el uso de radiación ionizante para inhibir el crecimiento de la
10 célula de glioma.

13. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que la célula de glioma es una célula de glioma maligna.

15 14. El uso de la reivindicación 8 o de la reivindicación 9, comprendiendo además dicho tratamiento la administración de radiación directamente al glioma.

15. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 3-14, en el que el TNF α se suministra mediante un vehículo que comprende o expresa TNF α , donde dicho
20 vehículo está compuesto de un adenovirus manipulado genéticamente que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica TNF α unido de forma operativa a un promotor quimioinducible o radioinducible.

16. El uso de la reivindicación 15, en el que el promotor comprende los
25 elementos GArG del promotor Egr-1.

17. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 3-16, en el que el TNF α se suministra mediante un vehículo que comprende o expresa TNF α , siendo dicho vehículo una construcción genética.

30

18. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-17, en el que el TNF α se suministra mediante un vehículo que comprende o expresa TNF α , y el vehículo se administra intratumoralmente.

35 19. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en el que la

temozolomida induce la expresión de TNF α .

20. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 4-19, en el que el tratamiento reduce el tamaño del glioma.

5

21. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4-20, en el que el tratamiento aumenta la supervivencia del paciente en relación con la supervivencia de un control o población control que recibe solo temozolomida.

10 22. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 4-21, en el que el tratamiento aumenta la supervivencia del paciente en relación con un control o población control que recibe una subcombinación de temozolomida, un vehículo que comprende o expresa TNF α y radiación.

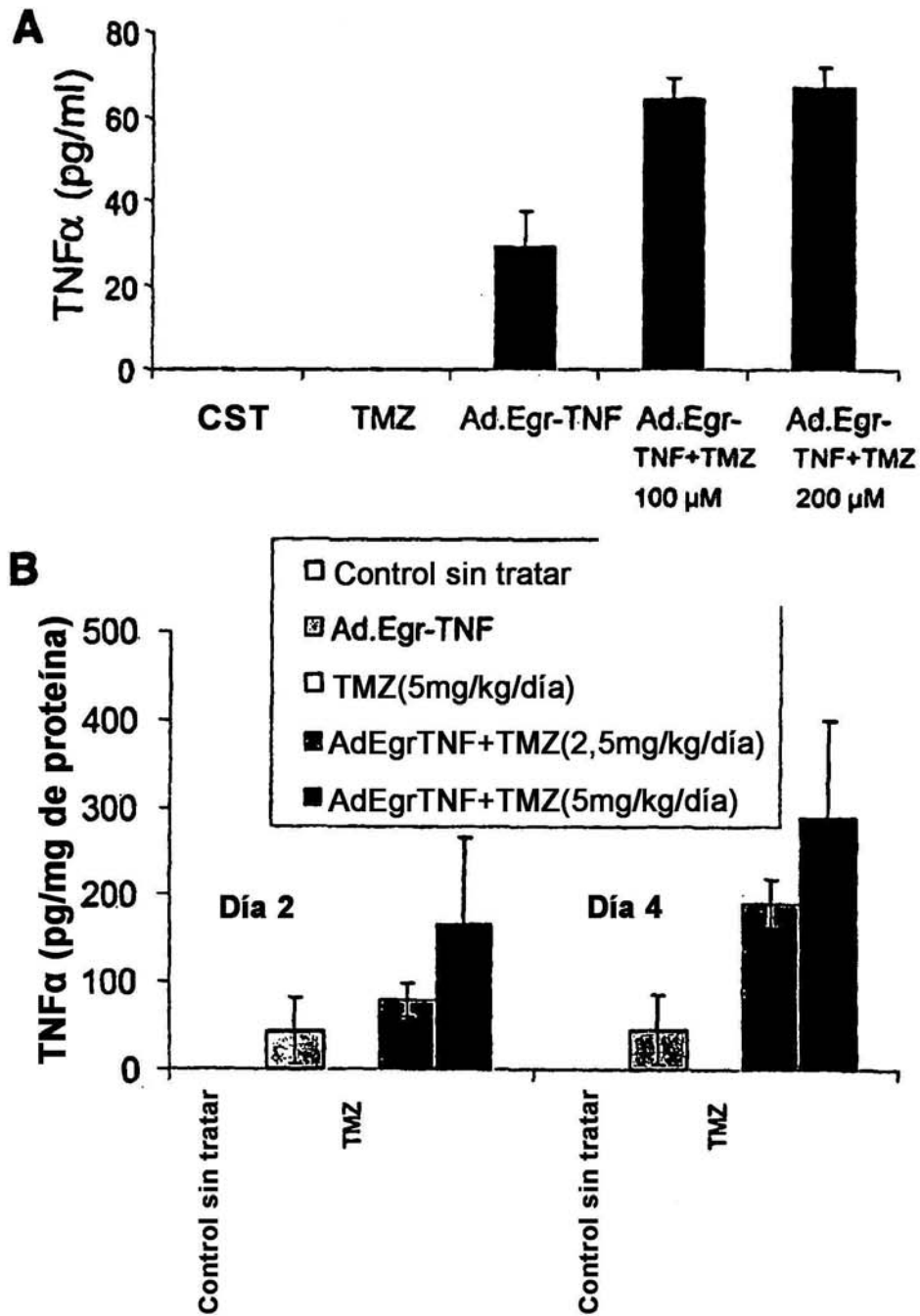
15 23. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 4-22, en el que el glioma está físicamente asociado al cerebro, la médula espinal o el nervio óptico.

24. Una combinación farmacéutica que comprende temozolomida y un vehículo que comprende temozolomida y un vehículo que comprende o expresa TNF α .

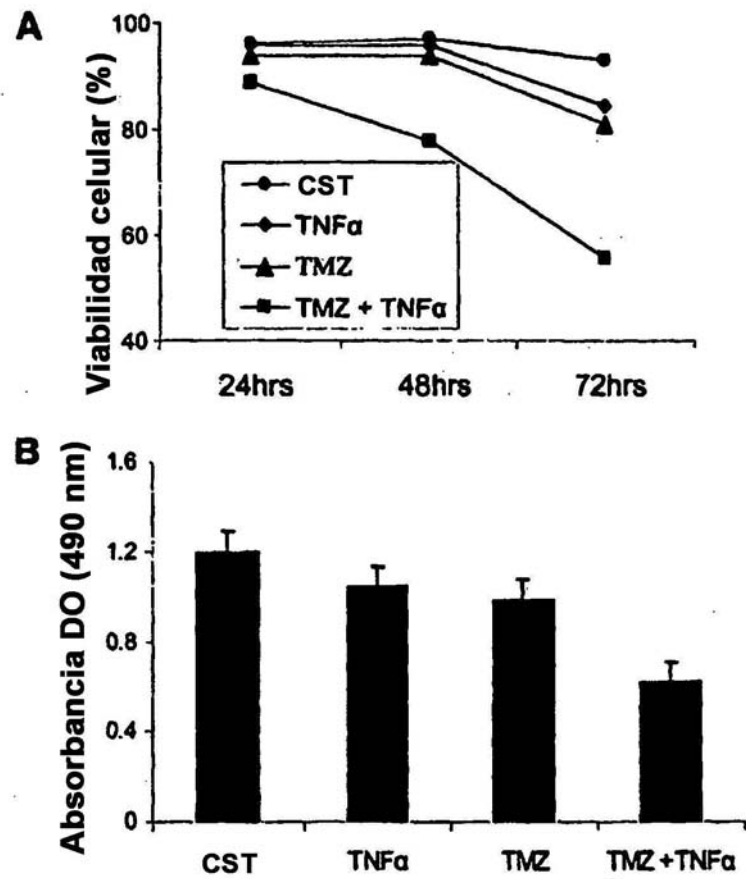
20

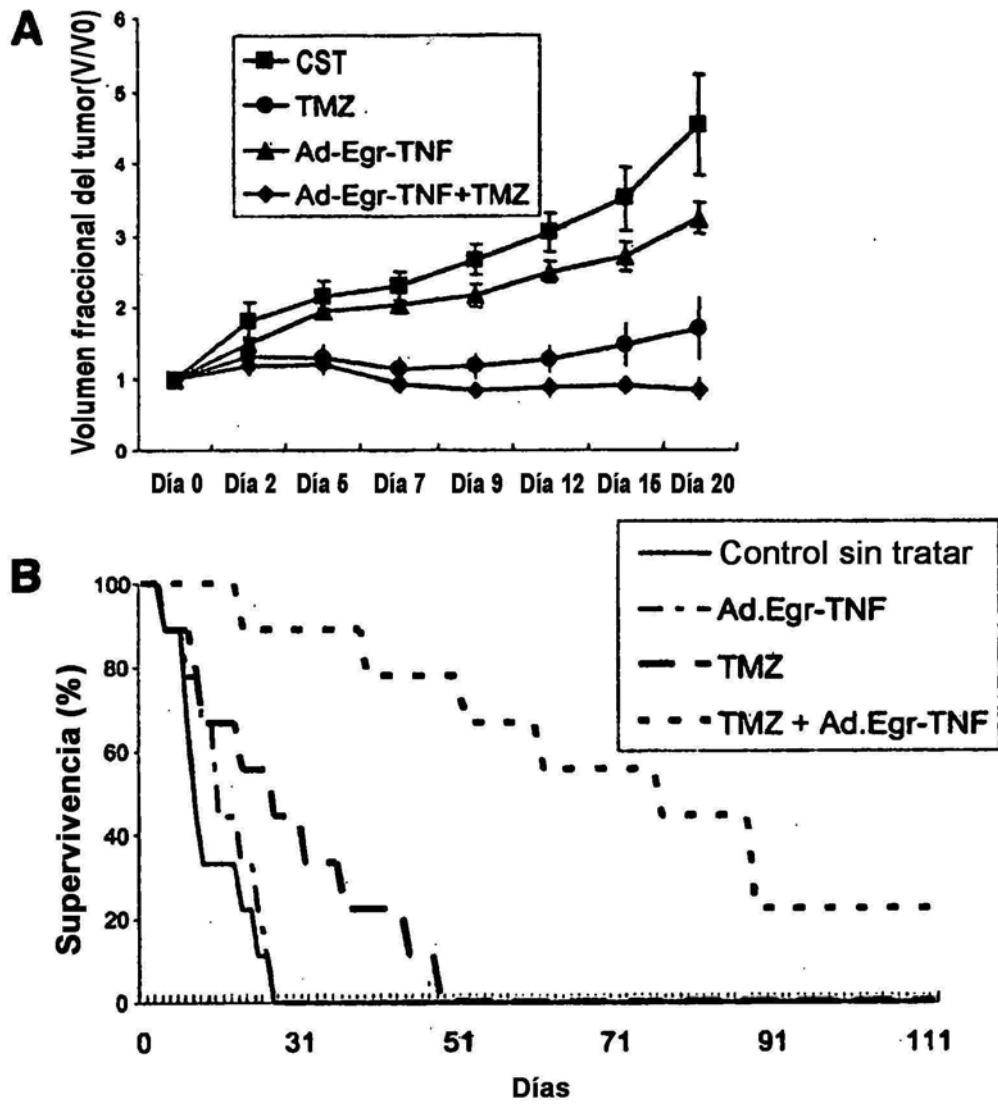
25. La combinación de la reivindicación 24, que además comprende un radionucleido.

26. La combinación de la reivindicación 24 o de la reivindicación 25 para su
25 uso en un procedimiento de tratamiento del glioma maligno.

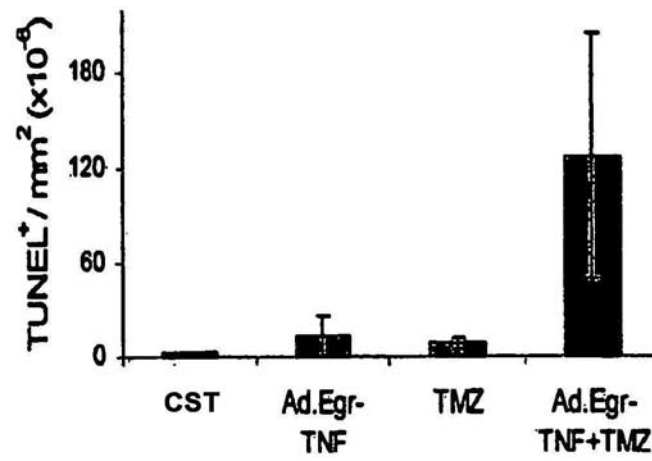


FIGS. 1A & 1B

**FIGS. 2A & 2B**



FIGS. 3A y 3B

**FIG. 4**

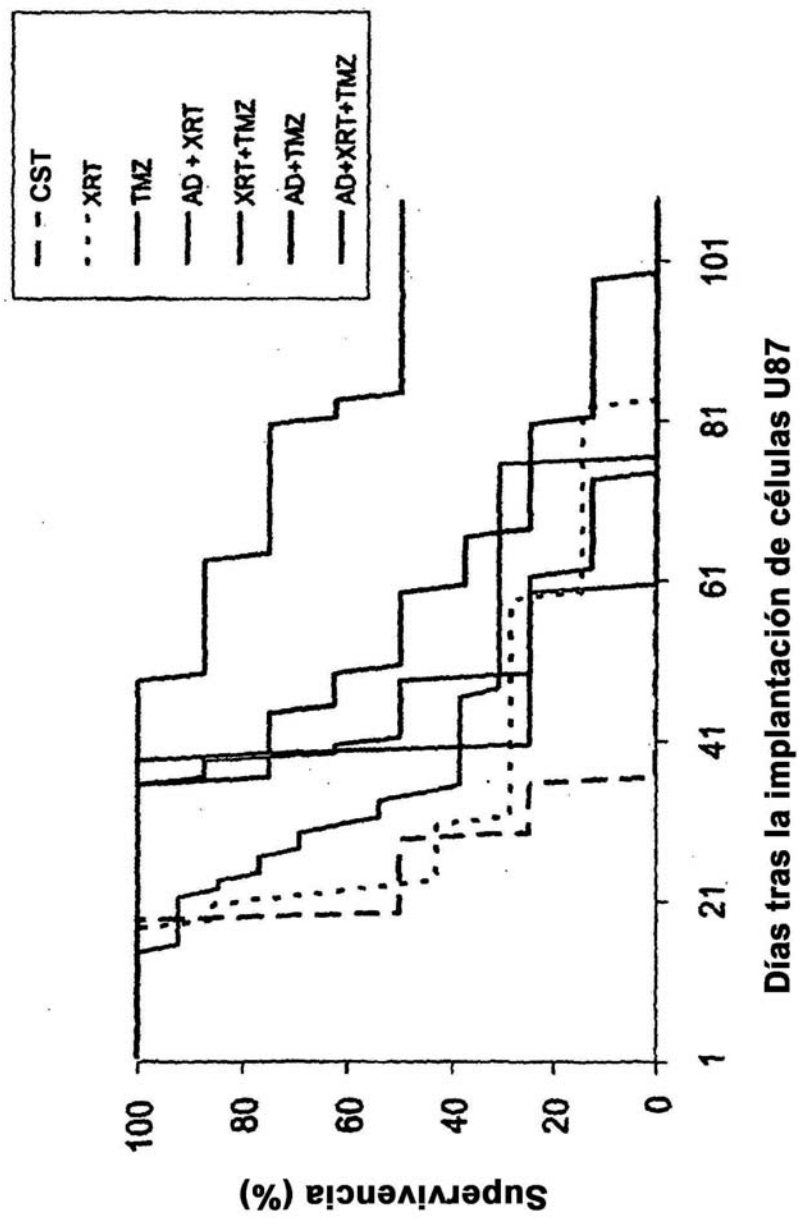


FIG. 5

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el
 5 máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- 10 • US 604251 P [0027] [0043]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- Stupp, R. et al. N Engl J Med, 2005, vol. 352, 987-996 [0001]
- 15 • Castro, M.G. et al. Pharmacol Ther, 2003, vol. 98, 71-108 [0001]
- Taghian, A. et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995, vol. 32, 99-104 [0001]
- Johnstone, R.W. et al. Cell, 2002, vol. 108, 153-164 [0001]
- Vivo, C. et al. J Biol Chem, 2003, vol. 278, 25461-25467 [0001] [0065]
- Karin, M. ; Lin, A. Nat Immunol, 2002, vol. 3, 221-227 [0022]
- 20 • Wang, C.Y. et al. Science, 1996, vol. 274, 784-787 [0022] [0067]
- Beg, A.A. ; Baltimore, D. Science, 1996, 274-782784 [0022]
- Van Antwerp, D.J. et al. Science, 1996, vol. 274, 787-789 [0022] [0067]
- Yamagishi, N. et al. Int J Radiat Biol, 1997, vol. 72, 157-162 [0022] [0067]
- Miyakoshi, J. ; Yagi, K. Br J Cancer, 2000, vol. 82, 28-33 [0022]
- 25 • Tang, F. et al. Mol Cell Biol, 2002, vol. 22, 8571-8579 [0027] [0043]
- Park, J.O. et al. J Clin Invest, 2002, vol. 110, 403-410 [0027]
- Kanno, T. et al. J Biol Chem, 1995, vol. 270, 11745-11748 [0027]
- Yamini, B. et al. Cancer Res, 2004, vol. 64, 6381-6384 [0027] [0043] [0065]
- Friedman, H.S. et al. Cancer Res, 1995, vol. 55 (13), 2853-2857 [0031]
- 30 • Lal, S. et al. J Neurosurg, 2000, vol. 92, 326-333 [0033] [0034]
- van Engeland, M. et al. Cytometry, 1998, vol. 31 (1), 1-9 [0036]
- Mercurio, F. et al. Science, 1997, vol. 278, 860-866 [0044]
- DiDonato, J.A. et al. Nature, 1997, vol. 388, 548-554 [0044]
- Eggermont, A.M. et al. Lancet Oncol, 2003, vol. 4 (7), 429-437 [0052]
- 35 • Staba, M.J. et al. Gene Ther, 1998, vol. 5 (3), 293-300 [0052]
- Raza, S.M. et al. Neurosurgery, 2002, vol. 51 (1), 2-12 [0053]
- Lacroix, M. et al. J Neurosurg, 2001, vol. 95 (2), 190-198 [0053]
- Tang, G. et al. Nature, 2001, vol. 414, 313-317 [0057]
- Benhar, M. et al. Mol Cell Biol, 2001, vol. 21, 6913-6926 [0057]
- 40 • Antonyak, M.A. et al. Oncogene, 2002, vol. 21, 5038-5046 [0057]
- Cardone, M.H. et al. Cell, 1997, vol. 90, 315-323 [0057]
- Sakon, S. et al. Embo J, 2003, vol. 22, 3898-3909 [0059]
- Ventura, J.J. et al. Genes Dev, 2004, vol. 18, 2905-2915 [0061]
- Walker, M.D. et al. N Engl J Med, 1980, vol. 303, 1323-1329 [0062]

- Weichselbaum, R.R. et al. *Lancet Oncol*, 2002, vol. 3, 665-671 [0062]
- Guha, A. ; Mukherjee, J. *Curr Opin Neurol*, 2004, vol. 17, 655-662 [0065]
- Ashkenazi, A. *Nat Rev Cancer*, 2002, vol. 2, 420-430 [0065]
- Sakuma, S. et al. *Neurooncol*, 1993, vol. 15, 197-208 [0065]
- 5 • Knight, M.J. et al. *Mol Carcinog*, 2004, vol. 39, 173-182 [0065]
- Duan, L. et al. *J Neurooncol*, 2001, vol. 52, 23-36 [0065]
- Saito, R. et al. *Cancer Res*, 2004, vol. 64, 6858-6862 [0065]
- Beg, A.A. ; Baltimore, D. *Science*, 1996, vol. 274, 782-784 [0067]
- Wang, C.Y. et al. *Nat Med*, 1999, vol. 5, 412-417 [0067]
- 10 • Das, K.C. ; White, C.W. *J Biol Chem*, 1997, vol. 272, 14914-14920 [0067]
- Campbell, K.J. et al. *Mol Cell*, 2004, vol. 13, 853-865 [0067]
- Chuang, S.E. et al. *Biochem Pharmacol*, 2002, vol. • Ichikawa, H. et al. *J Immunol*, 2005, vol. 174, 7383-7392 [0067]
- Karin, M. et al. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, vol. 3, 17-26 [0067]
- 15 • Aggarwal, B.B. *Cancer Cell*, 2004, vol. 6, 203-208 [0067]