

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 768**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 31/5377 (2006.01)
A61K 31/495 (2006.01)
A61K 35/768 (2015.01)
A61K 31/63 (2006.01)
A61K 31/635 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2014 PCT/EP2014/002001**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2015 WO15010782**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2014 E 14752272 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 3024491**

54 Título: **Terapia contra un cáncer con un parvovirus en combinación con un inhibidor de Bcl-2**

30 Prioridad:

22.07.2013 EP 13003664

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2017

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS (50.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE y
RUPRECHT-KARLS-UNIVERSITÄT HEIDELBERG
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**MARCHINI, ANTONIO;
LI, JUNWEI;
SCHROEDER, LEA;
ROMMELAERE, JEAN y
GELETNEKY, KARSTEN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 636 768 T3

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

Terapia contra un cáncer con un parvovirus en combinación con un inhibidor de Bcl-2

- 5 El presente invento se refiere a una composición farmacéutica que comprende (a) un parvovirus y (b) un inhibidor de Bcl-2 y a la utilización de tal composición para el tratamiento de un cáncer, p.ej. de un tumor sólido.

El cáncer es la segunda causa principal de mortalidad en todo el mundo. Se ha estimado que a la mitad de los hombres y un tercio de las mujeres se les diagnosticará una cierta forma de cáncer durante su período de vida. Además, puesto que el cáncer es predominantemente una enfermedad de la vejez, se ha predicho que el número de muertes por cáncer en todo el mundo va a aumentar a aproximadamente un 45 % desde 2007 hasta 2030 (de 7,9 millones a 11,5 millones de muertes) debido a la proporción aumentada de personas ancianas (estimaciones de la OMS, en 2008). El cáncer es también la enfermedad más costosa. Las últimas estimaciones del National Cancer Institute (Instituto Nacional de un cáncer) mostraron que el coste económico global de un cáncer en los EE.UU. en 2007 fue de 226,8 mil millones de dólares, y a no ser que se desarrollen unas intervenciones preventivas más exitosas, una detección temprana y unos tratamientos más eficientes, se espera que durante las dos próximas décadas aumente adicionalmente esta carga económica, que de por sí ya es enorme. A pesar de que se han hecho unos significativos progresos en la prevención, la detección, el diagnóstico y el tratamiento de muchas formas de cáncer, que son testimoniadas por un aumento del porcentaje de supervivientes al cáncer después de 5 años en los EE.UU. y en Europa a lo largo de los últimos treinta años, ciertos tipos de tumores, tales como el pancreático, el hepático, el pulmonar y el cerebral, siguen huérfanos de unos tratamientos eficaces, lo que plantea la necesidad de desarrollar nuevas opciones terapéuticas. Los virus oncolíticos, que aprovechan ciertas vulnerabilidades específicas de un cáncer para matar a las células cancerosas mientras que preservan las células normales, están surgiendo rápidamente expansión como unas herramientas prometedoras para combatir un cáncer (Breitbach y colaboradores, 2011; Russell y colaboradores, 2012). No menos de doce diferentes virus oncolíticos están siendo sometidos actualmente a ensayos clínicos de fases I-III contra diversas malignidades (Russell y colaboradores, 2012), los cuales son utilizados por sí solos o en combinación con otros agentes anticancerosos. Entre ellos, el parvovirus oncolítico de rata H-1PV está siendo evaluado en este momento en cuanto a la seguridad y a las primeras señales de eficacia en un ensayo clínico de fase I/IIa en unos pacientes que tienen un glioblastoma multiforme recurrente (GBM) (Geletneký y colaboradores, 2012).

El H-1PV es una pequeña partícula (con alrededor de 25 nm de diámetro) icosaédrica no envuelta, que contiene un genoma de ADN monocatenario de 5,1 kb de longitud (Cotmore & Tattersall, 2007). La organización genómica del H-1PV se compone de dos unidades de transcripción que están bajo el control de dos promotores, el promotor temprano P4 y el promotor tardío P38. El P4 regula la expresión del gen que codifica las proteínas no estructurales (NS, acrónimo del inglés "non-structural") (NS1 y NS2), y el P38 regula el gen que codifica las proteínas cápsidas (VP) (VP1, VP2, VP3) (Cotmore & Tattersall, 2007). El virus se multiplica preferentemente en las células cancerosas que se dividen rápidamente. Esta selectividad oncológica no está basada en una mejor captación del virus por las células cancerosas, sino que se debe más bien al hecho de que las células cancerosas sobreexpresan ciertos factores tales como ciclina A, E2F o CREB/ATF que se requieren para la replicación de un ADN vírico. Asimismo, las células cancerosas son frecuentemente deficientes en su capacidad para establecer una eficaz respuesta inmunitaria antivírica, que favorece la multiplicación de los virus (Nuesch y colaboradores, 2012). Se sabe que el virus activa múltiples rutas de muerte celular. Dependiendo del tipo de células y de las condiciones de crecimiento, el H-1PV puede inducir una apoptosis (Hristov y colaboradores, 2010; Ohshima y colaboradores, 1998; Rayet y colaboradores, 1998; Ueno y colaboradores, 2001), una necrosis (Ran y colaboradores, 1999), o una muerte celular dependiente de la catepsina B (Di Piazza y colaboradores, 2007). El virus era capaz de inducir una oncolisis incluso en unas células de cáncer resistentes al TRAIL (acrónimo del inglés "Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand", ligando inductor de apoptosis relacionada con el factor de necrosis tumoral), cisplatino, incluso cuando la Bcl-2 se sobreexpresaba (di Piazza y colaboradores., 2007). Los últimos resultados sugieren que Bcl-2 no es un modulador negativo de la citotoxicidad del parvovirus. La terapia de un cáncer que utiliza un parvovirus y su combinación con una quimioterapia o con un inhibidor de HDAC se han descrito recientemente (en los documentos de solicitudes de patentes internacionales WO 2009/083232 A1, WO 2011/113600 A1).

La proteína no estructural principal NS1 es el regulador dominante de la replicación del ADN vírico, de la expresión de los genes víricos y de la citotoxicidad. La expresión de NS1 por sí sola, de manera similar a la del virus entero, es suficiente para inducir una interrupción del ciclo celular, una apoptosis y una lisis celular mediando acumulación de unas especies reactivas de oxígeno y el daño causado al ADN (Hristov y colaboradores, 2010). Como resultado de sus actividades oncolíticas, se ha mostrado que el virus posee unas propiedades oncosupresoras, que se han demostrado en cierto número de modelos con animales, los cuales han establecido la base para el lanzamiento del ensayo clínico contra el GBM (Geletneký y colaboradores, 2012).

Sin embargo, dentro del marco de la terapia de un cáncer, tal como se ha observado también con otros agentes anticancerosos, existe un cierto riesgo de que algunas células cancerosas puedan ser resistentes o que adquieran una resistencia frente a la citotoxicidad del H1PV dando lugar a un recidivo del tumor. Por lo tanto, subsiste una necesidad de encontrar un diseño racional de una terapia combinada, que incluya al H1-PV y a otros agentes

anticancerosos, que se complementen mutuamente y aumenten sus efectos terapéuticos individuales, sin aumentar unos efectos secundarios indeseados para los tejidos normales.

5 Por lo tanto, es un objeto del presente invento poner a disposición unos medios para una terapia mejorada basada en un parvovirus.

De acuerdo con el invento, este objetivo se consigue mediante los objetos definidos en las reivindicaciones.

10 En el estudio que dio como resultado el presente invento se planteó la cuestión de si los inhibidores de Bcl-2 ABT-637 o ABT-199 se sinergizan con el H-1PV para matar a las células cancerosas. Se puso de manifiesto que unas dosis sub-letales de ABT-737 (y ABT-199) potencian la actividad oncolítica del H-1PV de un modo sinérgico en 25 linajes de células humanas derivadas de una amplia gama de tumores sólidos, tales como los gliomas (n=11), los carcinomas pancreáticos (n=3), los carcinomas cervicales (n=3), y los cánceres de pulmón (n=3), cabeza y cuello (n=3), mama (n=1) y colon (n=1), mientras que se conserva el perfil de seguridad del virus para las células primarias normales no transformadas. Sorprendentemente, se observaron también unos fuertes efectos sinérgicos en unos linajes de células de cáncer que son notoriamente resistentes frente a la citotoxicidad de los parvovirus. De manera remarcable, el tratamiento conjunto con H-1PV/ABT-737 era asimismo eficaz contra unos cultivos de células madre que desencadenan tumores, las cuales se derivan de los cánceres cerebral y cervical (n=5). En unos linajes de células derivados de un glioma, que habían sido tratados conjuntamente con H-1PV/ABT-737, se pudo demostrar también una inducción aumentada de una apoptosis caracterizada por una permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP, acrónimo de "mitochondrial membrane permilization") y una activación de las caspasas 3 y 7.

25 Una respuesta modificada a las señales apópticas es un sello distintivo de un cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011). Una apoptosis tiene lugar a través de la activación de dos diferentes rutas, que sin embargo se cruzan: la ruta extrínseca, que es iniciada por unos ligandos pro-apópticos tales como Apo2/TRAIL, que activan a los receptores superficiales de la muerte celular, y la ruta intrínseca, que es activada por unas señales intracelulares de estrés, y que dan lugar a una permeabilización de la membrana mitocondrial exterior (MMP) seguida por una liberación de citocromo C desde las mitocondrias al citosol, y finalmente a una activación de las caspasas. Los miembros de la familia del linfoma 2 de células B (Bcl-2) desempeñan un cometido decisivo en la regulación de una apoptosis mediante el control de la integridad de la membrana mitocondrial exterior (Youle & Strasser, 2008). Hasta ahora han sido identificados veinticinco miembros de la familia de proteínas Bcl-2. Dependiendo de su efecto sobre la ruta apoptótica y del número de los dominios de homología de Bcl-2, ellos se subdividen en las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1), las proteínas pro-apoptóticas que contienen sólo el dominio BH3 (Bim, Bad, Bid, Bik etc.) y las proteínas pro-apoptóticas similares a Bax ((Bax, Bak y Bok) (Bajwa y colaboradores, 2012). El equilibrio entre las proteínas pro-apoptóticas y las anti-apoptóticas determina el destino de una célula. Si el número de las proteínas pro-apoptóticas no puede ser neutralizado por las proteínas anti-apoptóticas, las Bak y Bax se oligomerizan y forman poros de gran conductancia en la membrana de las mitocondrias, dando como resultado la inducción de una apoptosis. Frecuentemente, las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 son sobreexpresadas en diversos tipos de cáncer, que incluyen el linfoma, los cánceres de pulmón e hígado, un cáncer colorrectal y los cánceres de ovario, próstata, cerebro y mama (Andersen y colaboradores, 2005), y ellas están asociadas frecuentemente con el inicio de un tumor, y con la progresión y la resistencia a los medicamentos quimioterapéuticos convencionales (Bajwa y colaboradores, 2012). Por lo tanto, se han dirigido muchos esfuerzos a intentar antagonizar la actividad de estas proteínas anti-apoptóticas. Una de estas estrategias es la utilización de ciertas moléculas selectivas pequeñas tales como los miméticos de BH3 ABT-737 y ABT-199.

45 Al igual que las proteínas que sólo contienen el dominio BH3, los miméticos de BH3 inhiben a miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 mediando fijación a su surco hidrófobo (Cragg y colaboradores, 2009). La liberación de las proteínas activadoras, que sólo contienen el dominio BH3, induce la activación de Bax y Bak, y desencadena una apoptosis. El mimético de BH3 ABT-737 fue descubierto por Oltersdorf y colaboradores. Él se fija con una alta afinidad ($K_i \leq 1$ nM) a Bcl-2, Bcl-X_L y Bcl-w (Oltersdorf y colaboradores, 2005), y desplaza a una proteína que sólo contiene el dominio BH3, tal como la BIM de Bcl-2 (Del Gaizo Moore y colaboradores, 2007). Se demostró *in vitro* que él induce una apoptosis como un agente único en células de leucemia y linfoma, en linajes de células derivados del mieloma múltiple y de un cáncer pulmonar de células pequeñas (Vogler y colaboradores, 2009). El tratamiento con ABT-737 condujo a una regresión completa de un carcinoma pulmonar de células pequeñas en modelos de ratones con un xenotrasplante (Oltersdorf y colaboradores, 2005). Adicionalmente, se demostró que ABT-737 aumenta sinérgicamente la citotoxicidad del medicamento contra un cáncer paclitaxel en un carcinoma pulmonar de células pequeñas (Oltersdorf y colaboradores, 2005) así como la de vincristina y etopósido en células de glioblastoma (Tagscherer y colaboradores, 2008). Las células mononucleares no malignas procedentes de sangre periférica (PMBCs, acrónimo de "peripheral blood mononuclear cells") no son sensibles frente a ABT-737, puesto que se determinó que la concentración eficaz semimáxima (EC50) era de más que 1.000 nM (Del Gaizo Moore y colaboradores, 2007). Actualmente, el ABT-263 un derivado de ABT-737, que está a disposición por vía oral, está siendo investigado en ensayos clínicos de fase II frente a malignidades linfoides, al linfoma no de Hodgkin, a la leucemia linfocítica crónica, el linfoma folicular, el linfoma de células del manto y el linfoma de células T periféricas (ClinicalTrials.gov). Sin embargo, la preocupación sobre la trombocitopenia ha limitado la introducción de ABT-737 y ABT-263 en ensayos clínicos de leucemias agudas, a pesar de su fuerte actividad anticancerosa. Esto se debe muy probablemente a una toxicidad sobre una diana, que resulta de la dependencia de

las plaquetas con respecto de BCL-X_L (Davids & Letai, 2012). Recientemente, Souers y colaboradores han generado el inhibidor de Bcl-2 ABT-199, que es altamente selectivo, mediante modificación de ABT-263, un análogo de ABT-737, que está estrechamente emparentado y que está disponible por vía oral. El ABT-199 se fija a Bcl-2 selectivamente, con una alta afinidad ($K_i \leq 0,01$ nM), pero no a Bcl-X_L ($K_i = 48$ nM) ni a Bcl-w ($K_i = 245$ nM) (Souers y colaboradores, 2013). En estudios *in vivo*, se puso de manifiesto que él inhibe el crecimiento de tumores en varios modelos de xenotrasplantes de tumores hematológicos humanos, y en contraste con el ABT-737, él protege a las plaquetas humanas con menos efectos secundarios (Souers y colaboradores, 2013). Recientemente, se ha informado que un tratamiento con un inhibidor de Bcl-2 sensibiliza a unos linajes de células derivados de una leucemia linfocítica crónica (CLL) a una oncolisis por el virus de estomatitis vesicular (VSV), y que se puede superar la resistencia a una apoptosis (Samuel y colaboradores., 2010; Samuel y colaboradores, 2013).

Además, el documento WO 2009/083232 A1 describe una composición farmacéutica que contiene (a) un parvovirus y (b) un agente quimioterapéutico, y la utilización de tal composición para el tratamiento de un cáncer, p.ej. de un tumor cerebral o pancreático. Unos agentes quimioterapéuticos preferidos son gemcitabina y temozolodina.

Por otra parte, el documento WO 2011/113600 A1 se orienta a una composición farmacéutica, que contiene (a) un parvovirus y (b) un inhibidor de la histona desacetilasa (HDACI), y la utilización de esta composición para el tratamiento de un cáncer, p.ej. de tumores cerebrales, de un carcinoma cervical o de un carcinoma pancreático. Unos HDACI preferidos son butirato de sodio (NaB), tricoastatina A (TSA), ácido valproico (VPA) o suberoilánilida de ácido hidroxámico (SAHA).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: El ABT-737 aumenta la citotoxicidad inducida por H-1PV contra linajes de células de glioma humano de una manera sinérgica

Ensayos de LDH. La citotoxicidad de un tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-737 se evaluó en 11 linajes de células de glioma (a-k) (el nombre de los linajes de células se indica en la parte superior de los diagramas). Se sembraron 4.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos, y después de 24 horas, éstas se trataron o no se trataron con las concentraciones indicadas de H-1PV (MOI: pfu/célula) y/o ABT-737 (ABT). 72 horas después de la infección, la lisis celular se analizó mediante un ensayo de LDH tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Las columnas representan los valores promedios de 3 repeticiones con barras de desviación típica relativa.

Figura 2: El ABT-737 aumenta la citotoxicidad inducida por H-1PV contra linajes de células humanas procedentes de de varias entidades tumorales de una manera sinérgica

Ensayos de LDH. La citotoxicidad de un tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-737 se evaluó en linajes de células de 3 adenocarcinomas ductales pancreáticos (a-c), 3 carcinomas cervicales (d-f), 3 carcinomas pulmonares (g-i), 3 carcinomas de cabeza y cuello de células escamosas (j-1), un carcinoma colorrectal de colon (m) y un cáncer de mama (n) (los nombres de los linajes de células se han indicado en la parte superior de los diagramas). Se sembraron 4.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos, y después de 24 horas, éstas se trataron o no se trataron con H-1PV (MOI: pfu/célula) y/o ABT-737 (ABT) con las concentraciones indicadas. 72 horas después de la infección, la lisis celular se analizó mediante un ensayo de LDH tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Las columnas representan los valores promedios de 3 repeticiones con barras de desviación típica relativa.

Figura 3: El ABT-737 aumenta la citotoxicidad inducida por H-1PV contra células madre cancerosas (CSC, acrónimo de "cancer stem cells") de una manera sinérgica

Ensayos de LDH. El tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-737 se ensayó contra unas CSCs aisladas a partir de tumores de glioblastoma multiforme (GBM) (a-c) y de linajes de células cancerosas derivadas de un paciente con un GBM (U87, d) y un carcinoma cervical (HeLa, e). Se sembraron 10.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos, y después de 24 horas, éstas se trataron o no se trataron con las concentraciones indicadas de H-1PV (MOI: pfu/célula) y/o ABT-737 (ABT). 72 horas después de la infección, la lisis celular se analizó mediante un ensayo de LDH tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Las columnas representan los valores promedios de 3 repeticiones con barras de desviación típica relativa.

Figura 4: Los ABT-737 y H-1PV no son nocivos para células primarias normales en las condiciones de tratamiento del presente invento

El perfil de seguridad de un tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-737 se evaluó en astrocitos humanos (a), fibroblastos orales primarios (POF, b), melanocitos (c) y fibroblastos de prepucio humano (HFF, d). Se sembraron 4.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos, y después de 24 horas, éstas se trataron o no se trataron con las concentraciones indicadas de H-1PV (MOI: pfu/célula) y/o 40 μ M de ABT-737 (ABT). 96 horas después de la infección, se analizó la lisis celular mediante un ensayo de LDH tal como se describe en la sección de materiales y métodos. Las columnas representan los valores promedios de 3 repeticiones con barras de desviación típica relativa.

Figura 5: El ABT-737 aumenta una apoptosis inducida por H-1PV de una manera sinérgica

La incidencia de la fragmentación del ADN (población celular sub-G1) en respuesta a un tratamiento se evaluó mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo en ocho linajes de células de glioma humano (a-h). Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células/pocillo (o $6,25 \times 10^4$ células/pocillo para NCH37 y NCH125) en placas de 6 pocillos, y

después de 24 horas, éstas se trataron o no se trataron con las concentraciones indicadas de H-1PV y/o ABT-737 (ABT). A las 48-96 horas después de la infección, las células se tiñeron y se analizaron tal como se ha descrito en la sección de materiales y métodos. Los histogramas representativos se muestran en el panel superior. El gráfico en el panel inferior muestra los resultados de un experimento típico realizado por triplicado. Las columnas representan los valores promedios con barras de desviación típica relativa (panel inferior).

Figura 6: Los ABT-737 y H-1PV inducen una permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP)

El efecto de un tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-737 sobre la MMP (un sello distintivo de una apoptosis) se evaluó mediante tinción con Rojo de Mitotracker y citometría de flujo en cuatro linajes de células de gliomas humanos (a-d). Se sembraron $2,5 \times 10^5$ células/pocillo (o $6,25 \times 10^4$ células/pocillo para NCH125) en placas de 6 pocillos, y después de 24 horas, éstas se trataron o no se trataron con H-1PV y/o ABT-737 en las concentraciones indicadas. A las 48-96 horas después de la infección, las células se tiñeron con rojo de Mitotracker, se cosecharon y se analizaron mediante citometría de flujo. El porcentaje de células con una MMP se determinó mediante utilización del software CellQuest. En el panel superior se muestran los histogramas representativos para cada condición. En el panel inferior se muestran los resultados de un experimento típico realizado por triplicado. Las columnas representan los valores promedios con barras de desviación típica relativa.

Figura 7: Los ABT-737 y H-1PV inducen una apoptosis a través de las caspasas 3/7

La inducción de una apoptosis se evaluó mediante un análisis de las caspasas activas 3 y 7 (las formas clivadas, en inglés "cleaved") en ocho linajes de células de glioma humano mediante utilización del reactivo CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent (a-h). Se sembraron 4.000 células/pocillo en portaobjetos de microscopio de 10 pocillos, y después de 24 horas, éstas se trataron o no se trataron con H-1PV y/o ABT-737 en las concentraciones indicadas. 48 horas después de la infección, las células se tiñeron con CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent y se fijaron. Los núcleos se visualizaron mediante tinción con DAPI. La señal de fluorescencia se detectó mediante microscopía mediante utilización del canal azul y verde con un aumento de 20 x. Se muestran unas imágenes representativas.

Figura 8: El ABT-199 potencia una oncolisis inducida por H-1PV

Ensayo de LDH: La eficacia de ABT-737 y ABT-199 en combinación con H-1PV se comparó en el linaje de células de glioblastoma humano U138. Se sembraron 4.000 células/pocillo en placas de 96 pocillos, y después de 24 horas, éstas se trataron o no se trataron con H-1PV y/o ABT-737 y/o ABT-199 en las concentraciones indicadas. 72 horas después de la infección, se midió el porcentaje de las células que se sometían a lisis mediante el ensayo de LDH. Las columnas representan los valores promedios de 3 repeticiones con barras de desviación típica relativa.

Figura 9: Un tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-737 conduce a una regresión completa de los xenotrasplantes de Asp-1

5×10^6 células AsPC-1 se inyectaron por vía subcutánea en el costado derecho de 5 ratas hembra desnudas de 5 semanas de edad. Después de 1 semana (cuando los tumores alcanzaron un volumen de 200-400 mm³), los animales que tenían un tumor se distribuyeron al azar en cuatro grupos (n=8). Los grupos fueron tratados o bien con una PBS (testigo), ABT-737 (50 mg/kg, administrado cada dos días durante los primeros 14 días), H-1PV (en una dosis total de $2,5 \times 10^8$ pfu/animal), fraccionada en 4 administraciones por vía intratumoral), o con una combinación de ambos agentes. El volumen de los tumores se midió con un calibrador digital en los días indicados y se calculó de acuerdo con la fórmula: volumen (cm³) = anchura² x longitud/2. Las ratas se sacrificaron cuando la masa de los tumores había alcanzado 4.000 mm³, en atención a las reglamentaciones de bienestar de los animales. Los datos mostrados representan los valores promedios con barras de desviación típica relativa.

Figura 10: Estructura de ABT-737

Fig. 11: Estructura de ABT-199

El presente invento pone a disposición una composición farmacéutica que contiene (a) un parvovirus y (b) un inhibidor de Bcl-2. De manera preferida, en esta composición farmacéutica el parvovirus y el inhibidor de Bcl-2 están presentes en una dosis eficaz, y están combinados con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Se entiende que el concepto de "farmacéuticamente aceptable" comprende cualquier vehículo, que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica de los ingredientes activos y que no es tóxico para el paciente al que se le administran éstos. Ejemplos de unos vehículos farmacéuticos apropiados son bien conocidos dentro del estado de la técnica e incluyen unas soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite y agua, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Tales vehículos pueden ser formulados mediante métodos convencionales y pueden ser administrados al sujeto en una dosis eficaz.

El concepto de "parvovirus" comprende generalmente el tipo silvestre o unos derivados modificados de éste, que son competentes en la replicación, así como unos virus relacionados con éste o unos vectores basados en tales virus o derivados. Los parvovirus, sus derivados, etc., así como unas células que se pueden utilizar para producir activamente los parvovirus y que son determinables fácilmente dentro de experiencia de la técnica.

El concepto de "una dosis eficaz" se refiere a unas cantidades de los ingredientes activos que son suficientes para afectar el desarrollo y la gravedad de la enfermedad, dando lugar a la reducción o remisión de tal patología. Una "dosis eficaz" que es útil para el tratamiento y/o la prevención de estas enfermedades o trastornos puede ser determinada mediando utilización de unos métodos conocidos para un experto en la especialidad.

5 Unos adicionales vehículos farmacéuticamente compatibles pueden incluir unos geles, unos materiales de matriz bioabsorbibles, unos elementos de implantación que contienen el agente terapéutico, o cualquier otro vehículo, medio(s) o material(es) de entrega o suministro apropiados.

10 La administración de los compuestos se puede efectuar por diversas vías, p.ej. mediante una administración por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intratumoral o intradérmica. La vía de la administración depende, por supuesto, del tipo de la terapia y del tipo de los compuestos que están contenidos en la composición farmacéutica. El régimen de dosificación del parvovirus y del inhibidor de Bcl-2 puede ser determinado fácilmente dentro del estado de la técnica por el médico responsable basándose en los datos de un paciente, en observaciones y otros factores clínicos, que incluyen por ejemplo el tamaño del paciente, el área de la superficie corporal, la edad, 15 el sexo, el parvovirus concreto, el inhibidor concreto, etc., que han de ser administrados, el período de tiempo y la vía de administración, el tipo del tumor y sus características, el estado de salud general del paciente, y de otras terapias medicamentosas a las que es sometido el paciente.

20 Si el parvovirus, en la combinación con unos inhibidores de Bcl-2 de acuerdo con el invento, comprende unas partículas víricas infecciosas que son capaces de penetrar a través de la barrera hematoencefálica, el tratamiento se puede realizar, o por lo menos se puede iniciar, mediante una inyección intravenosa del virus. Sin embargo, una vía preferida de administración es la administración intratumoral.

25 Puesto que un tratamiento intravenoso a largo plazo es susceptible de volverse ineficaz como resultado de la formación de anticuerpos neutralizadores para el virus, se pueden adoptar diversos modos de administración después de un régimen inicial de administración por vía intravenosa de los virus, o en el transcurso de todo el tratamiento parvovírico se pueden utilizar alternativamente diferentes técnicas de administración tales como p.ej. la administración intracraneal o intratumoral del virus.

30 Como otra técnica específica de administración, el parvovirus (un virus, un vector y/o un agente celular) se pueden administrar al paciente desde una fuente implantada dentro del paciente, Por ejemplo, un catéter, p.ej. uno de silicona o de otro material biocompatible, puede ser conectado con un pequeño reservorio subcutáneo (un reservorio de Rickham), que había sido instalado en el paciente durante la extirpación de un tumor o mediante un procedimiento separado, para permitir que la composición del parvovirus pueda ser inyectada localmente en diversos momentos sin ninguna intervención quirúrgica adicional. El parvovirus o unos vectores derivados de éste puede(n) ser inyectado(s) en el tumor mediante unas técnicas quirúrgicas estereotácticas o mediante unas técnicas de dirección por neuronavegación.

40 La administración del parvovirus se puede realizar también mediante una infusión continua de partículas víricas o de unos líquidos que contienen partículas víricas a través de unos catéteres implantados a bajas velocidades de flujo mediando utilización de unos apropiados sistemas de bombeo, p.ej. unas bombas peristálticas de infusión o unas bombas de entrega mejorada por convección (CED, acrónimo de "convection enhanced delivery").

45 Todavía otro método para la administración de la composición del parvovirus es a partir de un artículo implantado construido y dispuesto para dispensar el parvovirus al tejido canceroso deseado. Por ejemplo, se pueden emplear unas obleas que han sido impregnadas con el parvovirus, por ejemplo, con el parvovirus H-1, en donde la oblea se fija a los bordes de la cavidad de resección después de haber concluido la extirpación quirúrgica de un tumor. En esta intervención terapéutica se pueden emplear múltiples obleas. Unas células que producen activamente el parvovirus, p.ej. el parvovirus H-1, o unos vectores basados en H-1, se pueden inyectar en el tumor o en la cavidad 50 tumoral después de haber extraído el tumor.

La terapia combinada de acuerdo con el invento es provechosa para el tratamiento terapéutico de un cáncer, en particular (pero no exclusivamente) de un tumor cerebral, carcinoma pancreático, carcinoma cervical, cáncer de pulmón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama o cáncer de colon, y puede mejorar significativamente el pronóstico de tales enfermedades. Ella también puede permitir la utilización clínica de los virus y/o del/de los inhibidor(es) de bcl-2 a unas dosis terapéuticas más bajas, preservando o incluso aumentando la eficacia contra un cáncer con un simultáneo aumento de la seguridad y reduciendo y/o evitando los efectos secundarios. En vista del fuerte efecto sinérgico entre el parvovirus y el inhibidor de Bcl-2 es posible prever la reducción de las dosis terapéuticas, por ejemplo, a la mitad o un tercio de las dosis anteriormente utilizadas de los componentes individuales conservan el efecto terapéutico deseado. En vista de las dosis reducidas se pueden reducir o incluso evitar los (graves) efectos secundarios.

65 Una infección con un parvovirus tiene por efecto la aniquilación de las células tumorales pero no daña a las células normales, y tal infección se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante una utilización intracerebral de un parvovirus apropiado, por ejemplo, del parvovirus H-1, o de un virus relacionado con éste o de unos vectores basados en tales

virus, para efectuar una terapia específica para tumores sin efectos neurológicos desfavorables ni otros efectos secundarios.

5 El presente invento se refiere también a la utilización de (a) un parvovirus y (b) un inhibidor de Bcl-2 para la preparación de una(s) composición (composiciones) farmacéutica(s) para el tratamiento de un cáncer.

10 El modo de la administración de (a) y (b) puede ser simultáneo o secuencial, realizándose que, de manera preferida, (a) y (b) se administran secuencialmente (o por separado). Esto significa que (a) y (b) pueden ser puestos a disposición en una forma de dosificación de una sola unidad para poder ser ingeridos conjuntamente o como unas entidades separadas (p.ej. en unos recipientes separados) para ser administrados simultáneamente o en diferentes momentos. Esta diferencia cronológica puede ser de entre 1 hora y 1 semana, de manera preferida de entre 12 horas y 3 días. Por añadidura, es posible administrar el parvovirus por otra vía de administración distinta de la del inhibidor de Bcl-2. En este contexto, puede ser ventajoso administrar o bien el parvovirus o el inhibidor de Bcl-2 por vía intratumoral, y el otro por vía sistémica u oral. En una forma de realización particularmente preferida, el parvovirus se administra por vía intratumoral y el inhibidor de Bcl-2 por vía intravenosa u oral.

15 En una forma de realización preferida del presente invento, la combinación de los agentes se utiliza para el tratamiento de tumores sólidos. Ejemplos de ellos son un tumor cerebral, un carcinoma pancreático, un carcinoma cervical, un cáncer de pulmón, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de mama y un cáncer de colon. En una forma de realización preferida, estos tumores son resistentes a la toxicidad del parvovirus. Una ventaja especial de la composición farmacéutica del presente invento consiste en que incluso unas células madre iniciadoras de cáncer pueden ser tratadas con éxito.

20 De acuerdo con el presente invento, el parvovirus de la composición incluye el parvovirus H-1 (H-1PV) o un parvovirus relacionado con éste, seleccionado entre Lulll, el virus diminuto de ratón (MMV, acrónimo de "mouse minute virus"), el parvovirus de ratón (MPV, acrónimo de "mouse parvovirus"), el virus diminuto de rata (RMV, acrónimo de "rat minute virus"), el parvovirus de rata (RPV, acrónimo de "rat parvovirus") o el virus de rata (RV, acrónimo de "rat virus").

25 Los pacientes que pueden ser tratados con la combinación de agentes de acuerdo con el invento incluyen seres humanos así como también animales no humanos. Ejemplos de los citados en último lugar incluyen, sin estar limitados a ellos, unas animales tales como vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros y gatos.

30 Unos inhibidores de Bcl-2 que son útiles para los propósitos del presente invento incluyen a todos los compuestos que (a) aumentan el potencial anticancerígeno de los parvovirus, de manera preferida sin provocar efectos secundarios para células normales, y (b) inhiben a las proteínas anti-apoptóticas tales como Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1, Bfl-1 pBcl-2 y/ unos compuestos miméticos de las proteínas pro-apoptóticas que sólo contienen el dominio BH3 (bim, Bad, Bid, Bik, etc.) o las proteínas pro-apoptóticas similares a Bax (Bax, Bak, Bok). La administración de un inhibidor de Bcl-2 se puede llevar a cabo de diversas maneras (véase más arriba), incluyendo la sistémica, por las vías parenteral y enteral. De manera preferida, el parvovirus y el inhibidor de Bcl-2 se administran como unos compuestos separados. Por lo tanto, es posible realizar el tratamiento concomitante con los dos agentes.

35 Ejemplos de unos inhibidores de Bcl-2 que son apropiados para la terapia combinada incluyen a ABT-263, mesilato de obatoclax (GX15070), TW-37, HA14-1, apogospolona (ApoG2), BAM7, sabutoclax, AT101 y BM-1074. Se prefiere en particular la utilización de un inhibidor mimético de BH3 de molécula pequeña, de manera preferida ABT-737 (obtenible de Selleck Chemicals LLC, Houston, TX; Fig. 10) y ABT-199 (obtenible de Active Biochemicals, Maplewood, NJ; Fig. 11).

40 Los siguientes Ejemplos explican el invento más detalladamente.

50 **Ejemplo 1**

Materiales y métodos

55 (A) Linajes de células y cultivo

Los linajes de células derivados de glioblastomas humanos U373, U251, T98G, A172 y U87 fueron donados amablemente por la Dr. Iris Augustin (DKFZ, Heidelberg, Alemania). Los U138 y U343 fueron puestos a disposición por el Tumorbank (DKFZ, Heidelberg, Alemania). Los linajes de células derivados de glioblastomas NCH89, NCH82, NCH125 y el linaje de células derivado de glicosarcoma NCH37 fueron producidos y caracterizados en el Departament of Neurosurgery (Departamento de Neurocirugía) (Heidelberg, Alemania). Los linajes de células de carcinoma cervical (CC) HeLa y SiHa fueron puestos a disposición amablemente por el catedrático Dr. Ángel Alonso (DKFZ, Heidelberg, Alemania). El linaje de células derivado de CC CaSki y los linajes de células derivados de adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, acrónimo de "pancreatic ductal adenocarcinoma") MIA PaCa-2, T3M-4 y AsPC-1 fueron adquiridos de la ATCC (LGC Standards GmbH, Wesel, Alemania). Los linajes de células de carcinoma de cabeza y cuello de células esponjosas (HNSCC, acrónimo de "head and neck squamous cell

carcinoma") HNC97, Cal27, 211MC y los fibroblastos orales primarios humanos (POF, acrónimo de "primary oral fibroblast"), y los fibroblastos de prepucio humano (HFF, acrónimo de "human foreskin fibroblasts) fueron donados amablemente por el Dr. Massimo Tommasino (IARC, Lyon, Francia). Los linajes de células de cáncer de pulmón (LC, acrónimo de "lung cancer") EKVX, Hop92, H322M, el linaje de células de carcinoma colorrectal de colon HCT-116 y el linaje de células de cáncer de mama Hs578T fueron adquiridos del National Cancer Institute (NCI) (Bethesda, MD). Los linajes de células derivados de gliomas LN229, LN308 y los linajes de células iniciadoras de gliomas (GIC, acrónimo de "glioma-initiating cell") T269, S24 y T325 fueron puestos a disposición amablemente por el catedrático W. Wick (Department of Neurooncology, University of Heidelberg, Alemania).

Las células U-87 similares a células madres fueron aisladas del linaje de células U87 tal como lo han descrito Yu y colaboradores, 2008). Unos esferoides fueron generados a partir del linaje de células HeLa de acuerdo con el método descrito por Chen y colaboradores (Chen y colaboradores, 2011). Unos melanocitos humanos fueron adquiridos de Invitrogen (Carlsbad, CA) y unos astrocitos lo fueron de ScienCell Research Laboratories (San Diego, CA).

Los linajes de células derivados de gliomas fueron cultivados en el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM acrónimo de "Dulbecco Eagle's modified medium") con una alta concentración de glucosa (Gibco, Life Technologies, Darmstadt, Alemania). Los linajes de células HeLa, CaSki, SiHa, AsPC-1, HNC-97, 211MC, Cal27 y HFF fueron cultivados en un DMEM (SIGMA-Aldrich, Munich, Alemania). Los T3M-4, MIA PaCa-2, H322M, HOP-92, EKVX, HCT-116 y Hs578T fueron cultivados en el medio del Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI, Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Todos los medios fueron suplementados con 10 % de suero bovino fetal desactivado térmicamente (FBS, PAA, Cölbe, Alemania) y L-glutamina 2 mM (Gibco). Exceptuando las células de gliomas, los medios contenían adicionalmente 100 U/ml de penicilina (Gibco) y 100 µg/ml de estreptomina (Gibco) y 20 ng/ml del factor de crecimiento de fibroblastos humanos (FGF-2, acrónimo de "fibroblast growth factor") y 20 ng/ml del factor de crecimiento epidérmico (EGF, acrónimo de "epidermal growth factor") (Biochrom AG, Berlin, Alemania). Células HELA esferoides fueron cultivadas en un medio Quantum 263 exento de suero (Biochrom AG), suplementado con 10 ng/ml de FGF-2 y 10 ng/ml de EGF. Los melanocitos se cultivaron en el medio 254 con el suplemento de crecimiento de melanocitos humanos (HMGS, acrónimo de "Human Melanocyte Growth Supplement") (Invitrogen, Darmstadt, Germany). Los astrocitos se cultivaron en el medio para astrocitos (Gibco). Los POF se cultivaron en un DMEM sin L-glutamina ni rojo de fenol. Todas las células se cultivaron a 37°C, con 5 % de CO₂, una humedad de 95 %, y se controlaron rutinariamente en cuanto a una contaminación con micoplasmas.

(B) Producción de virus

El H-1PV de tipo silvestre fue producido en células NB324K por Barbara Leuchs y fue purificado en gradientes de iodixanol tal como se ha descrito previamente (Wrzesinski y colaboradores, 2003). Los títulos de virus se determinaron mediante ensayos con calvas (Daefler y colaboradores, 2003). El H-1PV fue tratado con UV con una dosis total de 50 ml/cm² tal como ha sido descrito por Morita y colaboradores (Morita y colaboradores, 2003).

(C) Ensayo de la lactato deshidrogenasa (LDH)

La citotoxicidad de un H-1PV se evaluó mediante cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), la cual es liberada a partir de las células debido a la pérdida de la integridad de la membrana (lisis). El ensayo se realizó mediante utilización del estuche CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega, Heidelberg, Alemania).

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos usualmente con una densidad de 4.000 células/pocillo en 50 µl de su respectivo medio de cultivo suplementado con 10 % de FBS. Tomando en cuenta las diferentes velocidades de crecimiento de algunos linajes de células, se sembraron 2.000 células para las células T3M-4 y HeLa y 10.000 células para los cultivos de células madre cancerosas. Después de 24 horas, se añadieron a las células 50 µl de un medio exento de FBS con o sin H-1PV y/o ABT-737 (Selleck Chemicals LLC, Houston, TX) en las concentraciones indicadas en la Tabla 1.

Tabla 1: Linajes de células

Origen del tumor	Linajes de células	H-1PV (MOI)	ABT-737 (µM)
Cerebro Glioblastoma	U373	25, 50, 75, 100	2,5
	LN308	1, 2,5, 10, 25	0,1
	U251	5, 10, 25, 50	2,5
	T98G	1, 5, 10, 25	1
	U138	1, 2,5, 5, 10	0,5
	U343	1, 2,5, 5, 10	2,5
	A172	2,5, 5, 10, 20	1,25
	LN229	1, 2,5, 10, 25	0,1
	U87	1, 2,5, 5, 10	5
	NCH125	1, 2,5, 5, 10	1

Origen del tumor	Linajes de células	H-1PV (MOI)	ABT-737 (µM)
Gliosarcoma Células madre iniciadoras de glioma	NCH37	1, 2,5, 5, 10	1
	T269	1, 2,5, 5, 10	0,1
	S24	1, 5, 10, 25	0,1
	T325	1, 2,5, 5, 10	0,1
	U87 (madre)	1, 2,5, 5, 10	1
Páncreas	MIA PaCa-2	0,5, 1, 5, 10	2,5
	T3M-4	5, 10, 25, 50	0,625
	AsPC-I	25, 50, 100, 200	0,625
Cérvix	HeLa	0,1, 0,5, 0,75,	1
Células similares a células madre	CaSki	1, 2,5, 5, 10	0,3125
	SiHa	1, 2,5, 5, 10	0,625
	HeLa (madre)	0,005, 0,01, 0,05, 0,1	1
Pulmón	H322M	1, 5, 10, 20	0,5
	HOP92	1, 2,5, 5, 7,5	0,5
	EKVX	1, 2,5, 5, 7,5	0,5
Cabeza y cuello	HNC97	1, 2,5, 5, 10	1,25
	211MC	5, 10, 20, 40	1,25
	Cal27	10, 25, 50, 100	2,5
Colon	HCT-116	5, 10, 25, 50	2,5
Mama	Hs578T	0,5, 1, 2,5, 5	0,1

5 Melanocitos, astrocitos, HFF y POF fueron infectados con H-1PV con la alta multiplicidad de infección (MOI, unidad formadora de placas (pfu) por célula) de 50 a 100 pfu/cell en presencia o ausencia de 40 µM de ABT-737. El ensayo de LDH se llevó a cabo tal como se ha expuesto más arriba con la excepción de un prolongado período de tiempo de incubación de 96 horas en lugar de 72 horas después de la infección.

10 Para una comparación directa de la eficacia de ABT-737 y ABT-199, el linaje de células de glioblastoma U138 fue infectado con H-1PV con una MOI de 5 a 10 pfu/célula y fue tratado o no con 0,5 µM de ABT-737 o ABT-199 (Active Biochemicals, Maplewood, NJ).

15 Para cada condición ensayada se prepararon 7 réplicas, 3 de las cuales se utilizaron para calcular la lisis celular total en presencia de un detergente. Una línea de la placa se dejó sin células para realizar el cálculo del fondo. Después de 72 horas a 37°C, las células se procesaron para el ensayo de LDH tal como se ha descrito precedentemente (El-Andaloussi y colaboradores, 2012).

20 En resumen, por cada pocillo se añadieron 10 µl de un tampón de lisis 10x [9% (v/v) de Triton X-100 (AppliChem, Darmstadt, Alemania) en una solución salina tamponada con fosfato (PBS, acrónimo de "phosphate buffered saline")] en tres líneas de la placa, que sirvió como un testigo de 100 % de lisis celular. A las otras líneas se les añadieron 10 µl de PBS. Cuando la lisis celular se hubo completado, se transfirieron 30 µl del material sobrenadante de cada pocillo a una placa fresca de 96 pocillos. A cada pocillo se añadieron 30 µl de la mezcla de substratos puesta a disposición por el estuche. La placa se protegió frente a la luz y se incubó a la temperatura ambiente durante 30 min antes de que la reacción fuese interrumpida mediando adición de 30 µl de la solución de interrupción puesta a disposición por el estuche. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm mediando utilización del Multiscan ELISA Reader. La cantidad de color que se forma por la conversión de la sal de tetrazolio en un producto de formazano de color rojo es proporcional al número de las células lisadas. Para cada condición nosotros calculamos el promedio de los tres pocillos incubados (A) o no incubados (B) con un tampón de lisis. El valor promedio medido en los pocillos sin células (fondo) se restó de los valores obtenidos en los pocillos con las células. El porcentaje de lisis total se calculó mediando utilización la siguiente fórmula:

30
$$\text{Lisis celular [\%]} = (A - \text{fondo}) / (B - \text{fondo}) \times 100$$

(D) Determinación de la población apoptótica sub-G1 mediante citometría de flujo

35 Se llevó a cabo una tinción con yoduro de propidio con el fin de detectar células apoptóticas después de un tratamiento. El colorante se intercala en el ADN, en donde puede ser medido mediante una citometría de flujo. La emisión de fluorescencia es proporcional al contenido de ADN en las células. Las células apoptóticas son caracterizadas mediante una fragmentación del ADN nuclear y pueden ser identificadas mediante una menor emisión de fluorescencia (la población de células apoptóticas sub-G1) (Riccardi & Nicoletti, 2006).

40 Se sembraron células de glioma (U373, U251, U138, U343, A172, NCH37, U87, NCH125) en placas de 6 pocillos con la densidad de 2,5x 10⁵ células/pocillo en 3 ml de un medio de cultivo con la excepción de las células NCH37 y NH125 que fueron sembradas con una densidad de 6,25 x 10⁴ células/pocillo. 24 horas después de la siembra, las

células fueron infectadas o no con H-1PV con una MOI de 0,5 - 7,5 pfu/célula y/o fueron tratadas con 0,25 - 5 μ M de ABT-737. Los H-1PV y ABT-737 fueron diluidos en un DMEM con 10% de FBS, y se añadió un volumen final de 200 μ l a los pocillos. Todas las condiciones se ensayaron por triplicado.

5 Después de 48 (U251, U138, A172, U87, NCH125), 72 (U373) o 96 (U343, NCH37) horas desde la infección, los materiales sobrenadantes y las células (cosechadas mediante tripsinización) se recogieron y lavaron con una PBS. Después de haber centrifugado, el sedimento de células se resuspendió en 500 μ l de una PBS y las células se fijaron con 4,5 ml de etanol al 70 % enfriado con hielo, que se añadió gota a gota. Las células se almacenaron entonces a -20°C durante 24 h. Antes de la tinción, las células se centrifugaron y se lavaron una vez con una PBS.
10 Luego, las células se resuspendieron en 1 ml de una solución de tinción del ADN, que contenía 20 μ g/ml de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) y 200 μ g/ml de ARNasa (Promega) y se incubaron durante 30 minutos a la temperatura ambiente en la oscuridad. La suspensión de células se filtró en una red de nilón, y se midió en un FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Se incluyeron un mínimo de 20.000 sucesos y se analizaron con el programa lógico CellQuest Software (BD Biosciences). El yoduro de propidio se detectó en el canal FL-2. Las células no tratadas se utilizaron para establecer el umbral para la fracción de células apoptóticas, puesto que ellas muestran la emisión de fluorescencia de las células no apoptóticas viables. El porcentaje de la población de sub-G1 se determinó en cada muestra y se calculó el valor promedio a partir de los triplicados.

(E) Evaluación de la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP)

20 El colorante fluorescente MitoTracker® Red CMXRos (Molecular Probes, Invitrogen, Darmstadt, Alemania), que tiñe a las mitocondrias en las células vivientes se utilizó para medir el cambio en la MMP. Debido a la formación de poros en la membrana mitocondrial, las células apoptóticas no pueden retener el colorante y muestran una más baja señal de fluorescencia en el análisis por citometría de flujo.

25 Unas células de glioma se sembraron en placas de 6 pocillos en una densidad de $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en 3 ml de un medio de cultivo con la excepción de las células NCH125, que se sembraron en una densidad de $6,25 \times 10^4$ células/pocillo. Después de 24 horas, las células fueron infectadas o no con H-1PV con una MOI de 2,5 pfu/célula (U343 y NCH125) o de 5 pfu/célula (U373) o de 7,5 pfu/célula (U138) y fueron tratadas o no con ABT-737 en una concentración de 0,5 μ M (U373, U138, U343) o 1 μ M (NCH125), o fueron tratadas concomitantemente con ambos agentes. Después de 48 (U138, NCH125) o 72 (U373) o 96 (U343) horas de incubación, se reemplazó el medio con 1 ml de una solución para tinción de las mitocondrias que contiene el colorante MitoTracker® Red CMXRos (200nM) en DMEM sin suplementos. Después de haber teñido durante 1 hora a 37°C, se cosecharon las células por tripsinización, se lavaron una vez con una PBS y finalmente se resuspendieron en una PBS. La suspensión de células se analizó con un FACSCalibur (BD Biosciences). Se incluyeron un mínimo de 10.000 sucesos y se analizaron con el programa lógico CellQuest Software (BD Biosciences). El porcentaje de las células que se sometieron a una MMP se calculó a partir de tres réplicas.

(F) Detección de las formas activadas de las caspasas clivadas 3/7

40 El clivaje de las caspasas-3/7 (un sello distintivo de una apoptosis) después de un tratamiento con H-1PV y ABT-737 fue analizado mediante utilización del reactivo CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Invitrogen, Darmstadt, Alemania). La activación de la caspasa 3 o 7 en las células apoptóticas conduce a un clivaje de una secuencia peptídica del reactivo, que libera un colorante que se fija a los ácidos nucleicos. Cuando el colorante se fija al ADN, este hecho da lugar a una señal de fluorescencia verde que puede ser detectada por microscopía de fluorescencia.
45

Las células fueron sembradas en una densidad de 4.000 células/pocillo en portaobjetos para microscopio de 10 pocillos. Después de 24 horas, las células fueron infectadas con H-1PV con una MOI de 1 pfu/célula (NCH37 y NCH125) o de 5 pfu/célula (U373, U251, U138, A172, U87) o de 10 pfu/célula (U343), en presencia o ausencia de 0,25 μ M de ABT-737 (U373) o 1 μ M (NCH37, NCH125) o 1,25 μ M (A172) o 2,5 μ M (U251, U138, U343, U87). Las células no tratadas fueron utilizadas como un testigo. Después de 24 horas, las células fueron teñidas con 10 μ M del reactivo CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent durante 30 min. Las células fueron lavadas entonces con una PBS y fueron fijadas con paraformaldehído al 4 % (PFA). Una solución de DAPI comercial para la tinción de núcleos (Vector Laboratories, Lórrach, Alemania) fue añadida a las células. Después de haber lavado con una PBS,
55 las células fueron montadas con un cubreobjetos y analizadas mediante un microscopio de fluorescencia (Keyence, Neu-Isenburg, Alemania) mediante utilización de los canales azul y verde a un aumento de 20 x.

Ejemplo 2

60 El ABT-737 potencia la actividad oncolítica de H-1PV de una manera sinérgica

Es conocido el hecho de que el H-1PV puede infectar a unos linajes de células cancerosas humanas de diferentes tejidos y que desarrolla unas actividades citotóxicas. Sin embargo, no todos los linajes de células responden en el mismo nivel a la citotoxicidad del virus, siendo algunos linajes de células muy sensibles al virus mientras que otros son casi resistentes (El-Andaloussi y colaboradores, 2012). Por lo tanto, sería extremadamente importante encontrar otros agentes anticancerosos que pudiesen cooperar con el H-1PV en la aniquilación de las células cancerosas con
65

una simultánea conservación del excelente perfil de seguridad del virus. Puesto que la célula cancerosa manifiesta frecuentemente ciertos defectos en las rutas de muerte de la célula, p.ej. una sobreexpresión de los miembros anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2 tales como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w y Mcl-1, nosotros planteamos la hipótesis de que estos defectos pueden contribuir a una resistencia frente a la citotoxicidad de H-1PV, y examinamos si la utilización del inhibidor de Bcl-2 ABT-737 en combinación con H-1PV puede restaurar la muerte apoptótica de la célula en las células cancerosas y si dan como resultado unos efectos terapéuticos mejorados.

Primero, se evaluó un tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-737 contra unos gliomas humanos. A este efecto se utilizó un conjunto de once linajes de células cancerosas humanas, diez de ellas aisladas de pacientes con un GBM (U373, LN308, U251, T98G, U138, U343, A172, LN229, U87, NCH125), y una de ellas aislada de un paciente con gliosarcoma (NCH37). Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos y se analizó la lisis de las células inducida por H-1PV en presencia o ausencia de ABT-737 mediante unos ensayos de LDH (acerca de las condiciones experimentales véanse la Tabla 1 y el Ejemplo 1). En todos los linajes de células ensayados se observó una aniquilación de las células dependiente de la dosis del virus. Sin embargo, los linajes de células variaron en cuanto a su susceptibilidad frente a la infección vírica, realizándose que ciertos linajes de células tales como U373, LN308, U251, T98G y U138 eran altamente resistentes frente a la citotoxicidad del virus y manifestaban unos menores efectos citotóxicos, incluso cuando eran infectados con una alta multiplicidad de infección vírica (MOI, pfu/célula) (con una aniquilación de células $\leq 25\%$ cuando fueron infectadas con H-1PV con una MOI = 10) (Fig. 1a-e) y otros, tales como U343, A172 y LN229, mostraron un fenotipo intermedio (con un 25-50 % de aniquilación de células) (Fig. 1 f-h) y otros, tales como NCH37, U87 y NCH125 fueron sensibles frente a la citotoxicidad del virus (más de un 50 % de aniquilación de células (Fig. 1i-k). El ABT-737 a solas en las dosificaciones utilizadas no tenía aparentemente ninguna citotoxicidad para las células, exceptuando a las de glioma U87, en cuyo caso se observaron unos modestos efectos citotóxicos (Fig. 1). Es digno de mención el hecho de que estas cantidades de ABT-737 eran suficientes para aumentar una oncolisis por H1-PV en todos los linajes de células ensayados de una manera sinérgica estadísticamente significativa, aumentando en muchos casos la citotoxicidad vírica en más de un 100-200 %. Es importante que incluso unos linajes de células menos sensibles tales como U343 (con un aumento de 4,7 veces en la aniquilación de células inducida por H-1PV cuando las células eran infectadas con H-1PV con una MOI = 10 en presencia de ABT-737), U138 (con un aumento de 3,5 veces) y LN308 (con un aumento de 3,2 veces) se volvieron susceptibles a los efectos citotóxicos de los virus y fueron aniquiladas eficientemente en presencia de ABT-737 (Fig. 1).

Segundo, se investigó si el tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-737 era también eficiente para aniquilar a las células cancerosas de otras entidades tumorales. Para los ensayos de LDH se escogieron los siguientes 14 linajes de células cancerosas humanas: MIA PaCa-2, T3M-4 y AsPC-1 de adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC), HeLa, CaSki y SiHa de carcinoma cervical (CC), H322M, HOP92 y EKVX de carcinoma de pulmón (LC), y HNC97, 211MC y Cal27 de carcinoma de células esponjosas de cabeza y cuello (HNSCC), HCT-116 de carcinoma de colon y Hs5787 de cáncer de mama. De acuerdo con los resultados obtenidos con los linajes de células de glioma, el H-1PV estimulado por ABT-737 inducía una oncolisis de una manera sinérgica en todos los linajes ensayados de células cancerosas, independientemente de su origen (Fig. 2).

Las células madre cancerosas (CSC) son muy probablemente responsables del mantenimiento del tumor, de su agresividad y recurrencia. Por lo tanto, en una tercera etapa se evaluó la capacidad de un tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-73 para lisar unas CSC aisladas a partir de tumores frescos (GBM T269, S24 y T325) y de linajes de células cancerosas derivadas de un paciente con un GBM (U87) y un CC (HeLa). Los CSCs se propagaron como unas esferas de tumores antes de que se infectasen con H-1PV en combinación o no con ABT-737. El H-1PV era capaz de infectar eficientemente a los diferentes cultivos de CSC (datos no mostrados). Por lo tanto, en este caso, el ABT-737 aumentaba la citotoxicidad de H-1PV (Fig. 3).

Finalmente, se ensayó si el tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-73 era seguro para las células primarias humanas normales. Unos fibroblastos primarios normales (orales y del prepucio), melanocitos y astrocitos fueron infectados con H1-PV en combinación o no con ABT-737, y luego fueron sometidos a unos ensayos de MTT (supervivencia celular) (datos no mostrados) y de LDH (lisis celular). Incluso si el virus y ABT-737 fueron utilizados en altas concentraciones (MOI 100 y 40 μM , respectivamente) y durante un período de tiempo más largo (96 en lugar de 72 horas) no se observó la citotoxicidad masiva, que se había observado contra las células cancerosas. Estos resultados proporcionan una importante evidencia de que estos dos agentes combinados no son dañinos para las células primarias normales (Fig. 4).

En conclusión, estos resultados muestran por primera vez que la utilización combinada de H-1PV y del inhibidor de Bcl-2 ABT-737 puede ser un enfoque válido contra un cáncer.

Ejemplo 3

El tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-73 induce una apoptosis a través de una permeabilización de la membrana mitocondrial y una activación de las caspasas

El ABT-737 bloquea la actividad de las moléculas Bcl-2 anti-apoptóticas restableciendo una apoptosis en las células cancerosas (Cragg y colaboradores, 2009). No obstante, para ejercer unos efectos citopáticos, el medicamento tiene que ser utilizado en unas concentraciones más altas que las que se utilizaron en anteriores experimentos (Tagscherer y colaboradores, 2008). Por otra parte, se sabe que el H-1PV puede inducir múltiples programas de muerte celular que van desde una apoptosis hasta una necrosis por muerte celular mediada por catepsina (Nuesch y colaboradores, 2012). La capacidad del H-1PV para inducir una apoptosis en presencia o ausencia de ABT-737 se comprobó en una selección de ocho linajes de células de glioma (U373, U251, U138, U343, A172, NCH37, U87, NCH125), mediante la evaluación de la presencia de fragmentación del ADN mediante un análisis por citometría de flujo (detección de la población celular sub-G1). Unas células no tratadas o tratadas con ABT-737, infectadas o no con H-1PV fueron cosechadas y teñidas con yoduro de propidio. En las concentraciones utilizadas en los experimentos, los tratamientos individuales con ABT-737 y H-1PV no fueron capaces de inducir eficazmente una apoptosis. Por el contrario, cuando los dos agentes fueron utilizados en combinación, éstos eran muy eficaces para desencadenar una apoptosis tal como se deduce del fuerte aumento de la población de sub-G1 observado en todos los linajes de células analizadas (un aumento de 4,7 veces en U251, 3,8 veces en U343, 3,4 veces en U373 y NCH125, 2,8 veces en U87, 2,1 veces en U138, 1,9 veces en A172 y 1,8 veces en NCH37, cuando se comparó el tratamiento individual con H-1PV con la combinación de H-1PV/ABT-737 (Fig. 5).

Las mitocondrias desempeñan un cometido decisivo en la ruta apoptótica intrínseca y la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP) es un sello distintivo de una apoptosis. La MMP es controlada principalmente por los miembros de la familia de Bcl-2. Se planteó la cuestión acerca de si o bien una apoptosis inducida por H-1PV/ABT-737 abarca la activación de la ruta apoptótica mitocondrial. Los linajes de células U373, U138, U343 y NCH125 fueron infectados o no con H-1PV en presencia y ausencia de ABT-737. Después de 48-96 horas, las células se tiñeron con rojo MitoTracker y ellas se analizaron por citometría de flujo en cuanto a una MMP (Fig. 6). Mientras el tratamiento individual con ABT-737 no tenía casi ningún efecto sobre la MMP, y la infección con H-1PV a solas estaba asociada sólo con una ligera MMP, el tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-73 aumentó espectacularmente la MMP (con un aumento de 2 veces en U373, 2,1 veces en U138, 3,6 veces en U343 y 3,4 veces en NCH125 cuando se comparaba el tratamiento individual con H-1PV con la combinación de H-1PV/ABT-737), lo que indica la participación de las mitocondrias en una apoptosis inducida por el tratamiento concomitante.

Luego se investigó el cometido de las caspasas 3 y 7 en una apoptosis inducida por H-1PV/ABT-737. Unas células de glioma, que habían sido previamente analizadas por análisis de FACS en cuanto a la presencia de la población celular apoptótica sub-G1, se tiñeron con el reactivo CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent, el cual detecta las formas activas de las caspasas efectoras 3 y 7. De acuerdo con los resultados previos, se observó un fuerte aumento de una apoptosis en todos los ocho linajes de células de glioma tratados concomitantemente con H-1PV/ABT-737 (Fig. 7).

Ejemplo 4

El ABT-199 aumenta la actividad oncolítica de H-1PV, si bien menos eficazmente que el ABT-737

El ABT-199 es un inhibidor más específico y potente que el ABT-737 frente al Bcl-2, pero en contraste con el ABT-737, no es capaz de actuar sobre la Bcl-X_L ni la Bcl-w (Souers y colaboradores, 2013). En este experimento, se investigó si el ABT-199 es también capaz de aumentar la actividad oncolítica del H-1PV. El experimento con LDH se llevó a cabo mediando utilización del linaje de células de glioblastoma humano U138. Las células fueron infectadas o no con el H-1PV y se cultivaron en presencia o ausencia del ABT-737 o ABT-199. Tal como se ha encontrado precedentemente, el ABT-737 aumentaba la citotoxicidad del H-1PV de una manera sinérgica con un aumento de 3,8 veces en comparación con el tratamiento con el virus a solas (con una MOI de 5). El ABT-199 era también capaz de aumentar la actividad citotóxica del virus si bien en una extensión menor que el ABT-737 (con un aumento de 1,7 veces) (Fig. 8). La diferencia en la potenciación de la citotoxicidad de H-1PV puede deberse al hecho de que las células U138, adicionalmente a la Bcl-2, expresan también unos altos niveles de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-X_L y Bcl-w, que son también dianas del ABT-737 pero no del ABT-199. No obstante, la utilización del ABT-199 en combinación con el virus puede ser considerada como valiosa a la vista del superior perfil de seguridad, especialmente en unos cánceres que expresan bajos niveles de Bcl-X_L y Bcl-w.

Ejemplo 5

El tratamiento concomitante con H-1PV/ABT-73 erradica tumores establecidos

Con el fin de validar el sinergismo de H-1PV/ABT-737 *in vivo*, los autores del invento utilizaron el modelo de rata desnuda con el xenotrasplante AsPC-1 de carcinoma de páncreas humano [Li y colaboradores, 2013]. H-1PV y ABT-737 a solas, en las dosis utilizadas, no pudieron tener ningún efecto terapéutico significativo (las ratas fueron sacrificadas cuando los tumores alcanzaron un tamaño máximo tolerable de 4.000 mm³). En contraposición a esto, el tratamiento combinado dio lugar a un fuerte efecto sinérgico que condujo a una completa y duradera remisión del

tumor en todos los animales tratados concomitantemente (Fig. 9). En ninguno de los animales tratados se documentaron una pérdida de peso ni otros efectos secundarios adversos.

5 En conclusión, los resultados de los ejemplos anteriores muestran por primera vez que la utilización combinada de un parvovirus (p.ej. H-1PV) y de un inhibidor de Bcl-2 (p.ej. ABT-737) puede constituir un enfoque válido contra un cáncer, en particular en los gliomas y los carcinomas pancreáticos.

Lista de referencias

10 Andersen MH, Svane IM, Kvistborg P, Nielsen OJ, Balslev E, Reker S, Becker JC, Straten PT (2005) Immunogenicity of Bcl-2 in patients with cancer. *Blood* 105: 728-734

Bajwa N, Liao C, Nikolovska-Coleska Z (2012) Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert opinion on therapeutic patents* 22: 37-55

15 Breitbart CJ, Burke J, Jonker D, Stephenson J, Haas AR, Chow LQ, Nieva J, Hwang TH, Moon A, Patt R y colaboradores (2011) Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* 477: 99-102

20 Chen C, Wei Y, Hummel M, Hoffmann TK, Gross M, Kaufmann AM, Albers AE (2011) Evidence for Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Stem Cells of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 6: e16466

Cotmore SF, Tattersall P (2007) Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv Virus Res* 70: 183-232

25 Cragg MS, Harris C, Strasser A, Scott CL (2009) Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nat Rev Cancer* 9: 321-326

Daeffler L, Hörlein R, Rommelaere J, Nüesch JPF (2003) Modulation of Minute Virus of Mice Cytotoxic Activities through Site-Directed Mutagenesis within the NS Coding Region. *Journal of Virology* 77: 12466-12478

30 Davids MS, Letai A (2012) Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer. *J Clin Oncol* 30: 3127-3135

Del Gaizo Moore V, Brown JR, Certo M, Love TM, Novina CD, Letai A (2007) Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *The Journal of Clinical Investigation* 117: 112-121

35 Di Piazza M, Mader C, Geletneky K, Herrero y Calle M, Weber E, Schlehofer J, Deleu L, Rommelaere J (2007) Cytosolic Activation of Cathepsins Mediates Parvovirus H-1-Induced Killing of Cisplatin and TRAIL-Resistant Glioma Cells. *Journal of Virology* 81: 4186-4198

40 El-Andaloussi N, Bonifati S, Kaufmann JK, Maily L, Daeffler L, Deryckere F, Nettelbeck DM, Rommelaere J, Marchini A (2012) Generation of an adenovirus-parvovirus chimera with enhanced oncolytic potential. *J Virol* 86: 10418-10431

45 Geletneky K, Huesing J, Rommelaere J, Schlehofer JR, Leuchs B, Dahm M, Krebs O, von Knebel Doeberitz M, Huber B, Hajda J (2012) Phase I/IIa study of intratumoral/intracerebral or intravenous/intracerebral administration of Parvovirus H-1 (ParvOryx) in patients with progressive primary or recurrent glioblastoma multiforme: ParvOryx01 protocol. *BMC cancer* 12: 99

Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674

50 Hristov G, Kramer M, Li J, El-Andaloussi N, Mora R, Daeffler L, Zentgraf H, Rommelaere J, Marchini A (2010) Through Its Nonstructural Protein NS1, Parvovirus H-1 Induces Apoptosis via Accumulation of Reactive Oxygen Species. *J Virol* 84: 5909-5922

55 Li, J., Bonifatit, S., Hristov, G., Marttila, T., Valmary-Degano, S., Stanzel, S., Schnolzer, M., Mougin, C., Aprahamian, M., Grekova, S., Raykov, Z., Rommelaere, J., Marchini, A., (2013), Synergistic combination of valproic acid and oncolytic parvovirus H-1PV as a potential therapy against cervical and pancreatic carcinomas, *EMBO Mol. Med.* 5: 1537-1555

60 Morita E, Nalcashima A, Asao H, Sato H, Sugamura K (2003) Human Parvovirus B19 Nonstructural Protein (NS1) Induces Cell Cycle Arrest at G1 Phase. *Journal of Virology* 77: 2915-2921

Nuesch JP, Lacroix J, Marchini A, Rommelaere J (2012) Molecular pathways: rodent parvoviruses--mechanisms of oncolysis and prospectus for clinical cancer treatment. *Clin Cancer Res* 18: 3516-3523

65

- Ohshima T, Iwama M, Ueno Y, Sugiyama F, Nakajima T, Fukamizu A, Yagami K (1998) Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection. *The Journal of general Virology* 79 (Pt 12) : 3067-3071
- 5 Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J, Hajduk PJ y colaboradores (2005) An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 435: 677-681
- 10 Ran Z, Rayet B, Rommelaere J, Faisst S (1999) Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis. *Virus Res* 65: 161-174
- 15 Rayet B, Lopez-Guerrero JA, Rommelaere J, Dinsart C (1998) Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J Virol* 72: 8893-8903
- Riccardi C, Nicoletti I (2006) Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc* 1: 1458-1461
- Russell SJ, Peng KW, Bell JC (2012) Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol* 30: 658-670
- 20 Samuel S, Tumilasci V., Olieri S., Nguyen T., Shamy A., Bell J., Hiscott J. (2010), VSV Oncolysis in Combination with the BCL-2 Inhibitor Obatoclax overcomes Apoptosis Resistance in Chronic Lymphatic Leukemia, *Mol. Ther.* 18: 2094-2103
- 25 Samuel S, Beljanski V, Van Grevenynghe J, Richards S, Ben Yebdri F, He Z, Nichols C, Belgnaoui SM, Steel C, Goulet ML y colaboradores (2013) BCL-2 Inhibitors Sensitize Therapy-resistant Chronic Lymphocytic Leukemia Cells to VSV Oncolysis. *Mol Ther* 21: 1413-1423
- 30 Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ y colaboradores (2013) ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med* 19: 202-208
- 35 Tagscherer KE, Fassel A, Campos B, Farhadi M, Kraemer A, Bock BC, Macher-Goeppinger S, Radlwimmer B, Wiestler OD, Herold-Mende C y colaboradores (2008) Apoptosis-based treatment of glioblastomas with ABT-737, a novel small molecule inhibitor of Bcl-2 family proteins. *Oncogene* 27: 6646-6656
- 40 Ueno Y, Harada T, Iseki H, Ohshima T, Sugiyama F, Yagami K (2001) Propagation of rat parvovirus in thymic lymphoma cell line C58(NT)d and subsequent appearance of a resistant cell clone after lytic infection. *J Virol* 75: 3965-3970
- Vogler M, Weber K, Dinsdale D, Schmitz I, Schulze-Osthoff K, Dyer MJS, Cohen GM (2009) Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death Differ* 16: 1030-1039
- 45 Wrzesinski C, Tesfay L, Salomé N, Jauniaux J-C, Rommelaere J, Cornelis J, Dinsart C (2003) Chimeric and Pseudotyped Parvoviruses Minimize the Contamination of Recombinant Stocks with Replication-Competent Viruses and Identify a DNA Sequence That Restricts Parvovirus H-1 in Mouse Cells. *Journal of Virology* 77: 3851-3858
- Youle RJ, Strasser A (2008) The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 47-59
- 50 Yu S-c, Ping Y-f, Yi L, Zhou Z-h, Chen J-h, Yao X-h, Gao L, Wang JM, Bian X-w (2008) Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87. *Cancer Letters* 265: 124-134

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica, que contiene (a) un parvovirus y (b) un inhibidor de Bcl-2, en la que el parvovirus es H-1 (H-1PV) o un parvovirus emparentado de roedor, que se escoge entre LU111, el virus diminuto de ratón (MMV), el parvovirus de ratón (MPV), el virus diminuto de rata (RMV), el parvovirus de rata (RPV) o el virus de rata (RV).
2. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, que contiene (a) el parvovirus y (b) el inhibidor de Bcl-2 como unos elementos separados.
- 10 3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el inhibidor de Bcl-2 es ABT-737 o ABT-199.
- 15 4. Un parvovirus y un inhibidor de Bcl-2 tal como se han definido en las reivindicaciones 1 hasta 3 para la utilización en un procedimiento para la terapia de un cáncer.
5. Un parvovirus y un inhibidor de Bcl-2 para la utilización de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizados por que** el parvovirus y el inhibidor de Bcl-2 se administran consecutivamente.
- 20 6. Un parvovirus y un inhibidor de Bcl-2 para la utilización de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, **caracterizados por que** el aprovechamiento se efectúa para el tratamiento de tumores sólidos y/o de células madre iniciadoras de tumores.
- 25 7. Un parvovirus y un inhibidor de Bcl-2 para la utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 hasta 6, **caracterizados por que** el empleo se efectúa utilización para el tratamiento de unos tumores, que son resistentes frente a la citotoxicidad del parvovirus.
- 30 8. Un parvovirus y un inhibidor de Bcl-2 para la utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 hasta 7, **caracterizados por que** el tumor es un tumor cerebral, un carcinoma de páncreas, un carcinoma de cuello uterino, un cáncer de pulmón, un cáncer de cabeza y cuello, un cáncer de mama o un cáncer de intestinos.
- 35 9. Un parvovirus y un inhibidor de Bcl-2 para la utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 hasta 8, **caracterizados por que** la utilización se efectúa para el tratamiento de un glioma o de un glioblastoma multiforme recidivante.
10. Un parvovirus y un inhibidor de Bcl-2 tal como se han definido en una de las reivindicaciones 1 hasta 3 para la utilización de acuerdo con una de las reivindicaciones 4 hasta 9, **caracterizado por que** el parvovirus y/o el inhibidor de Bcl-2 se han de administrar mediante una administración intratumoral.

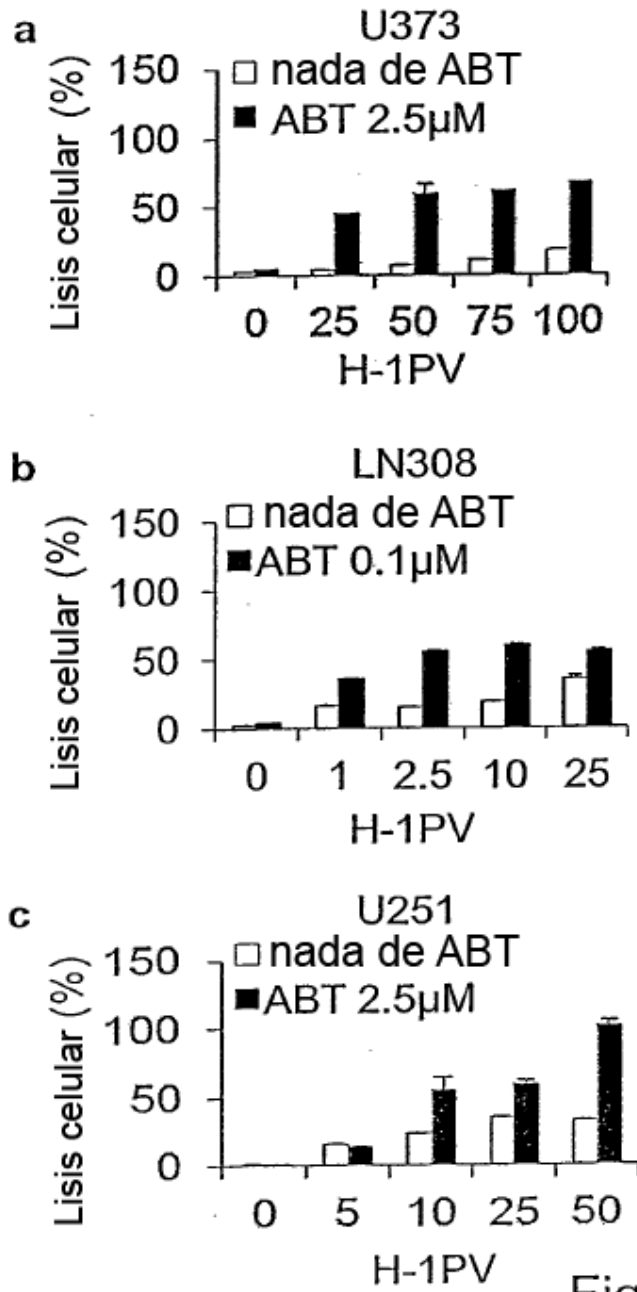


Fig. 1a-c

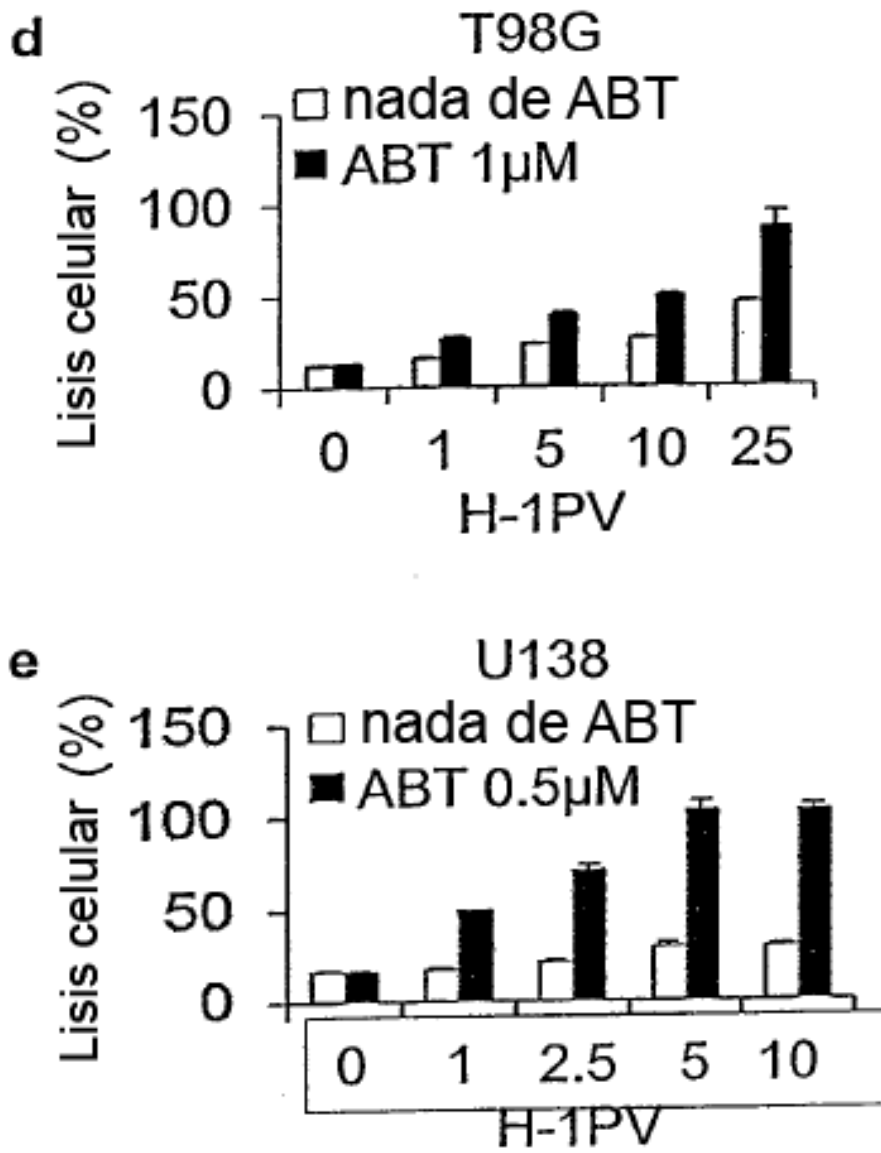


Fig. 1d-e

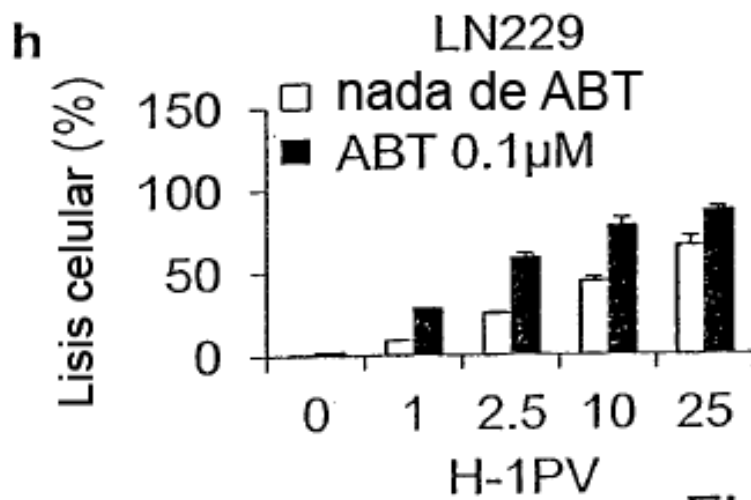
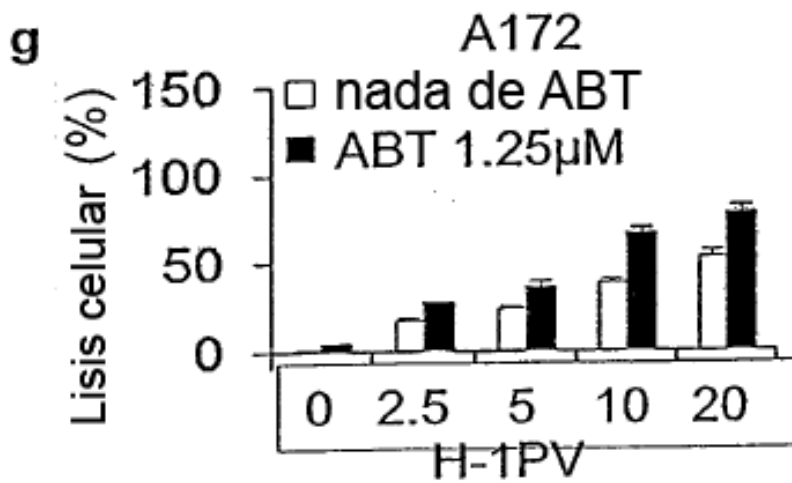
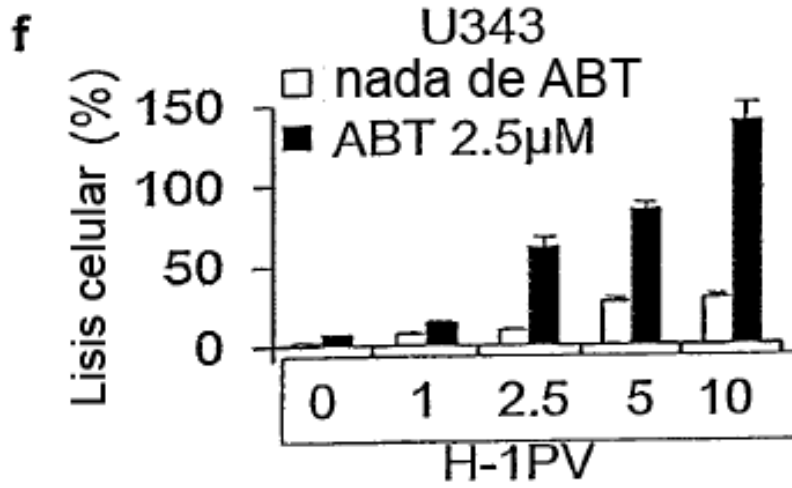
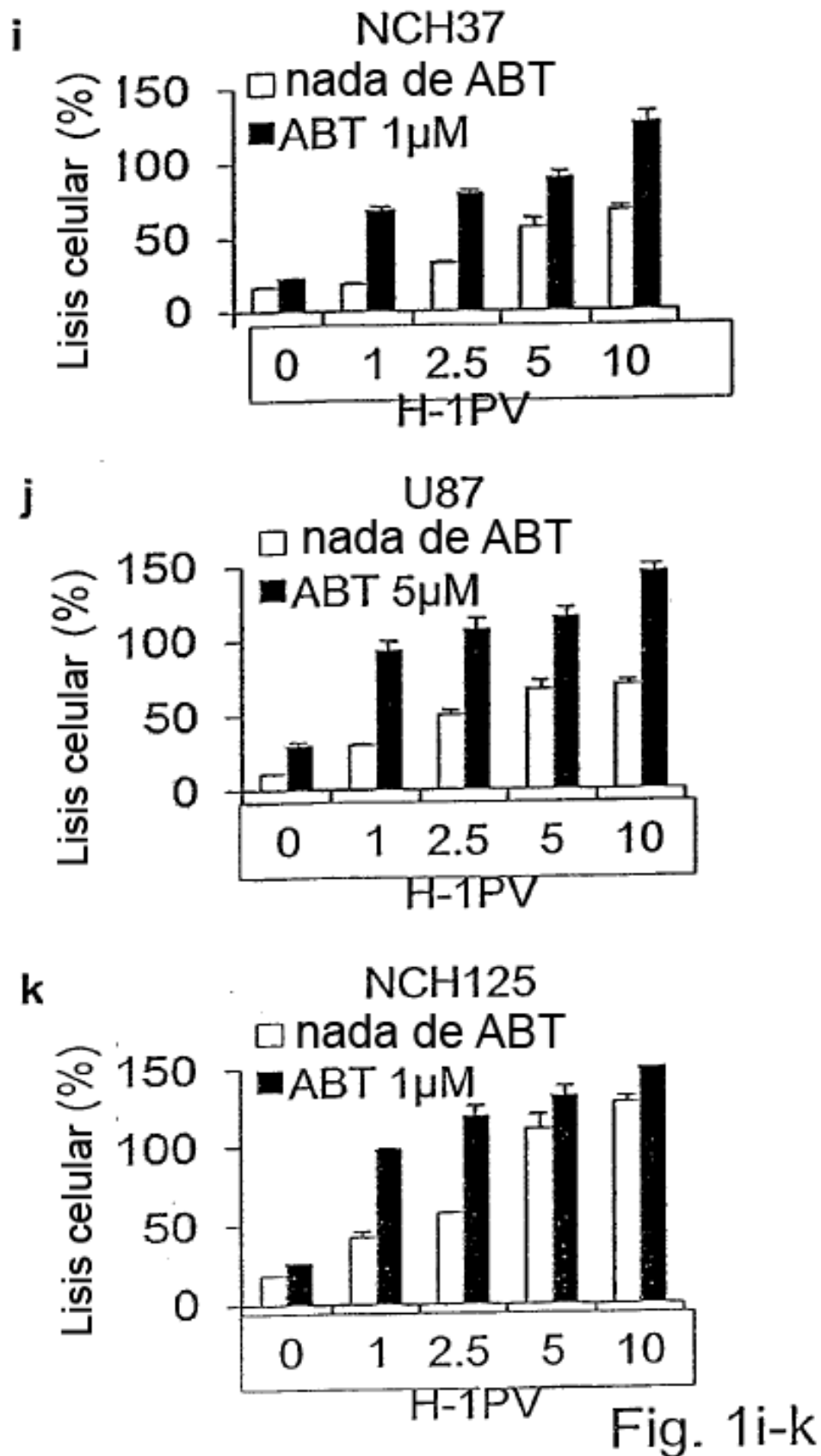


Fig. 1f-h



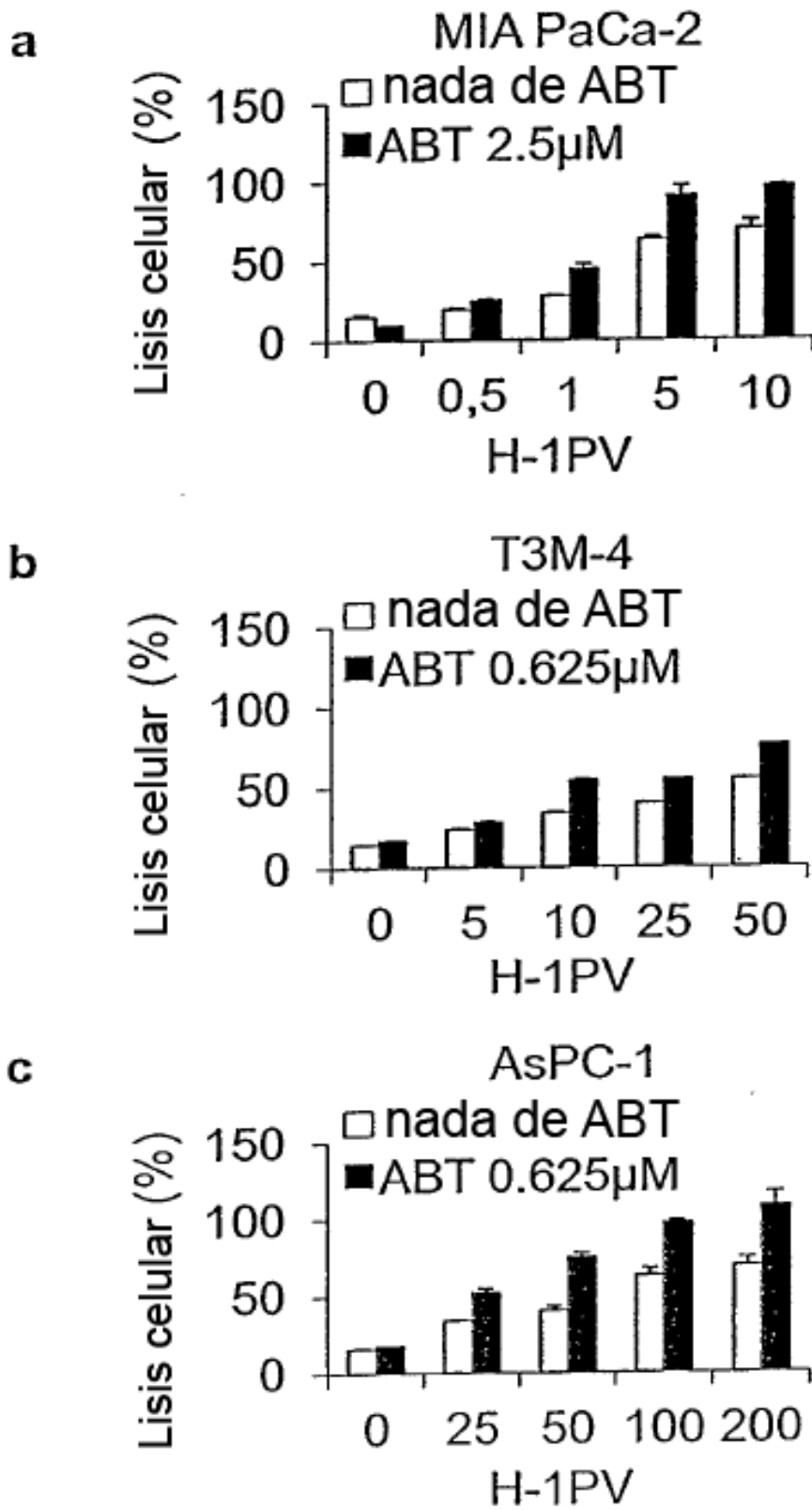


Fig. 2a-c

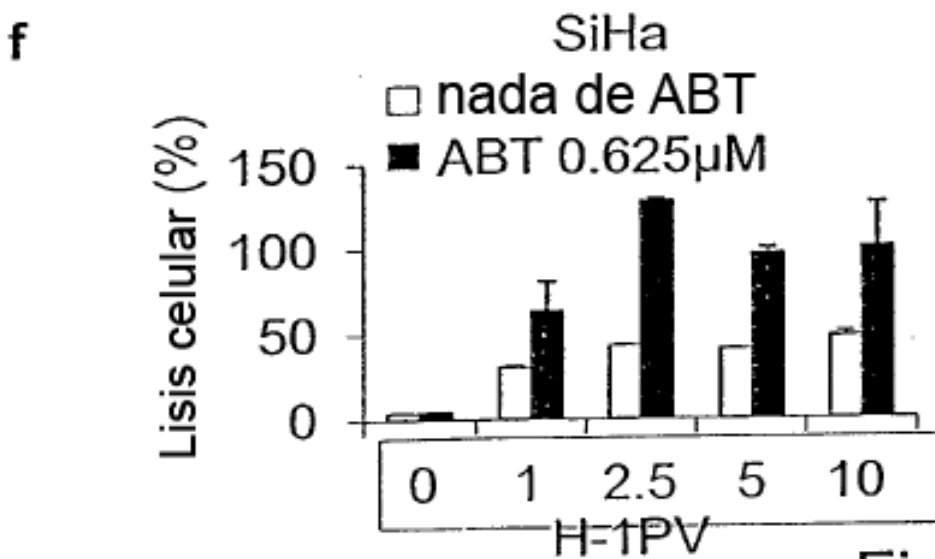
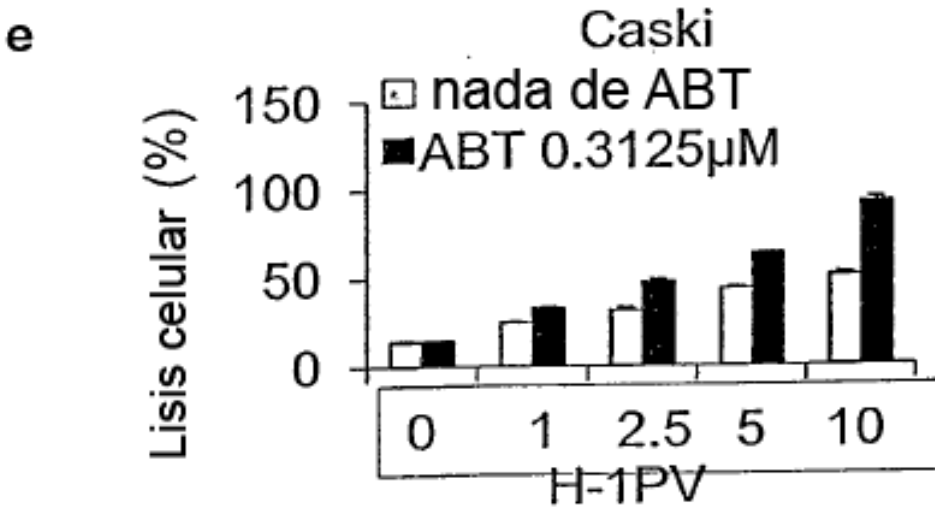
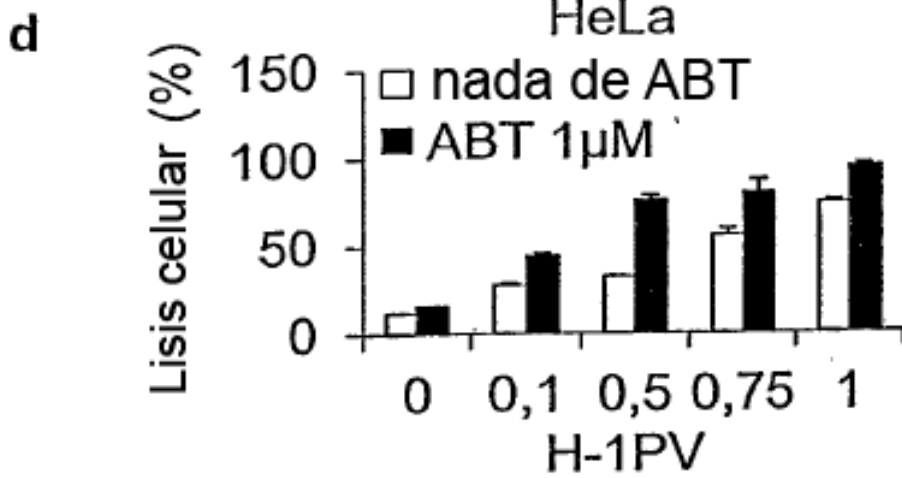


Fig. 2d-f

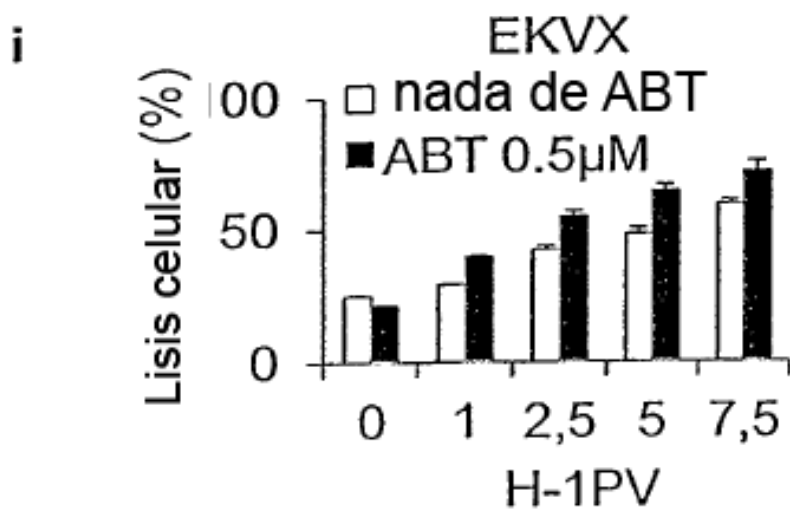
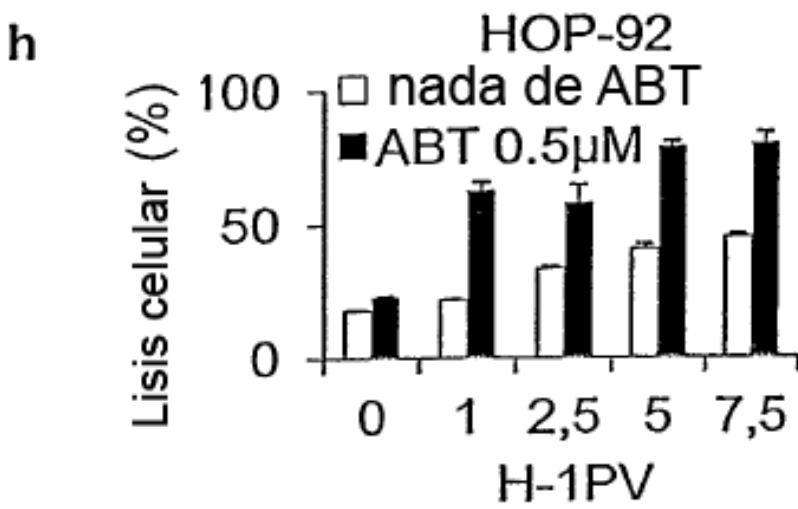
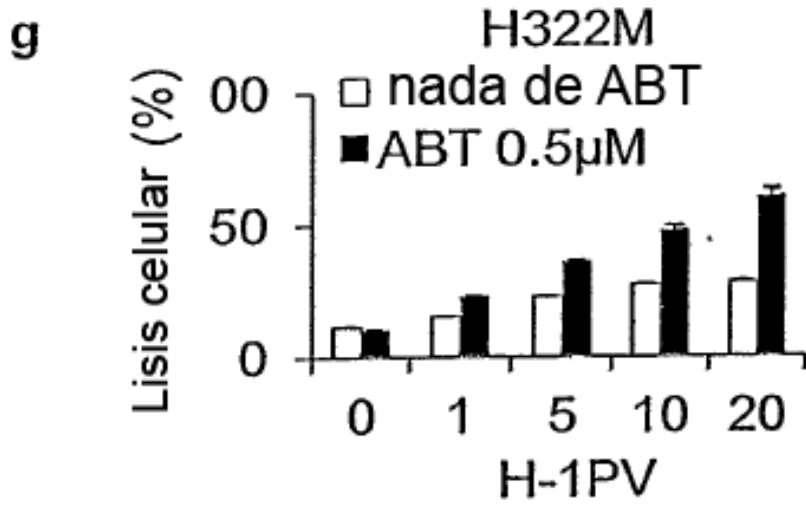


Fig. 2g-i

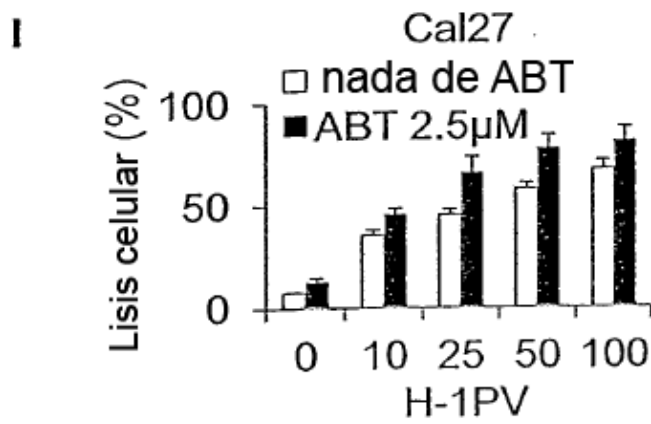
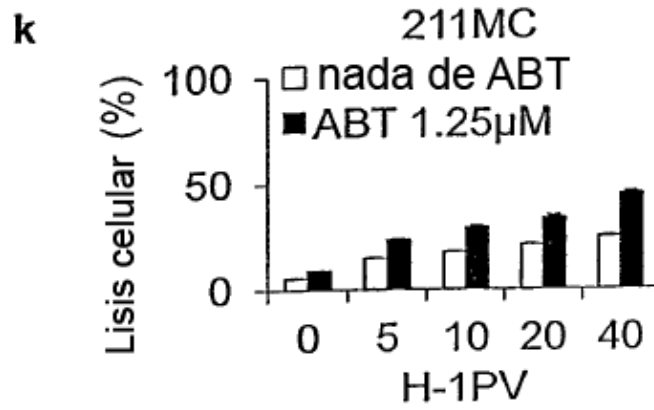
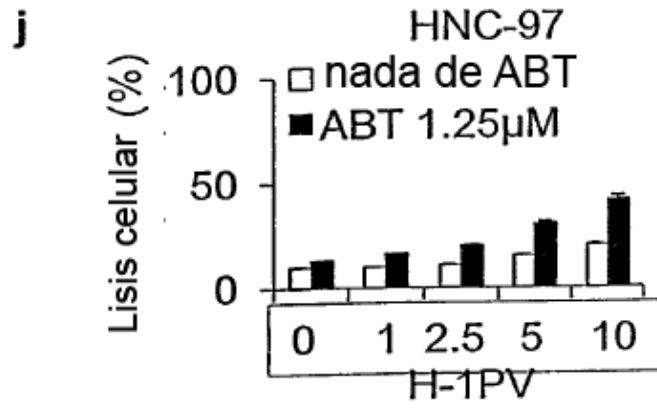


Fig. 2j-l

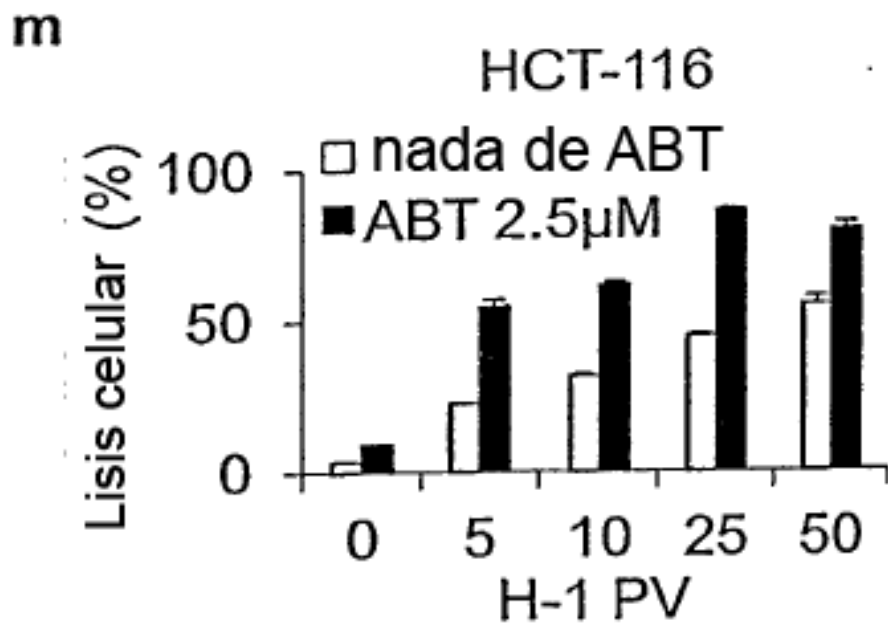


Fig. 2m

n

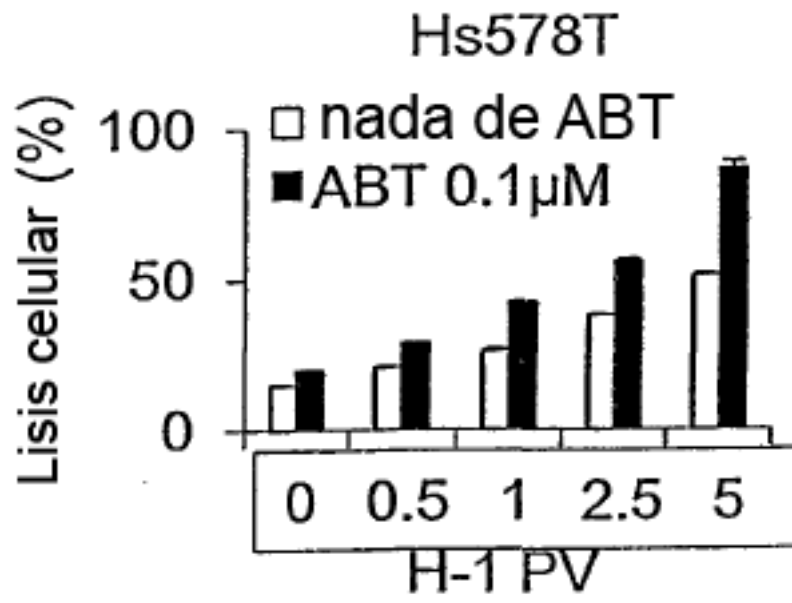


Fig. 2n

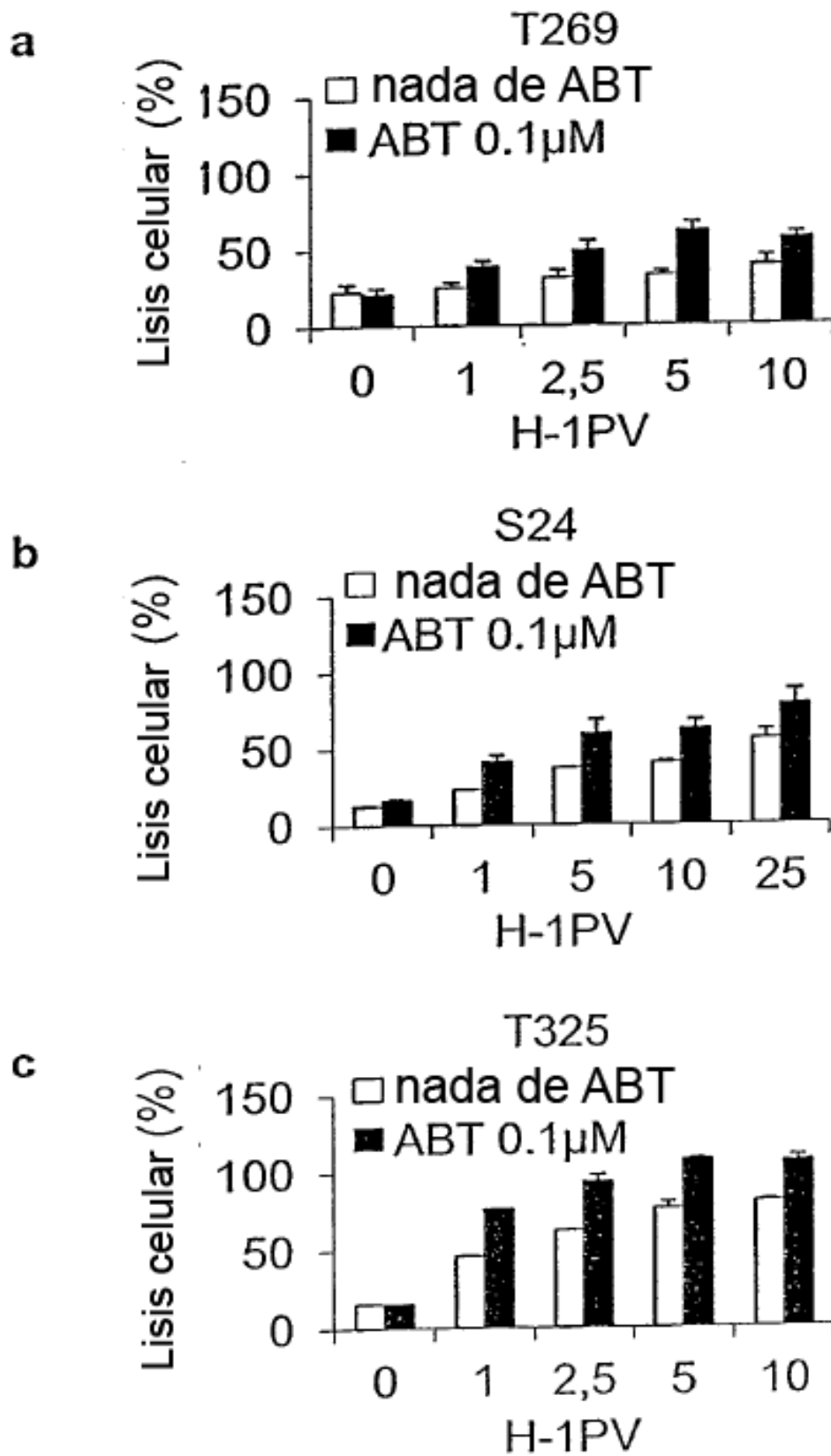


Fig. 3a

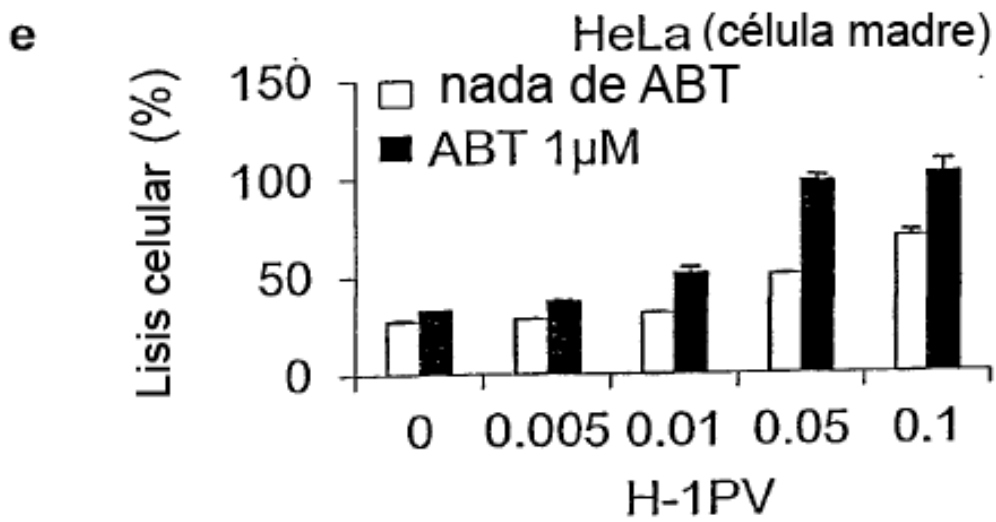
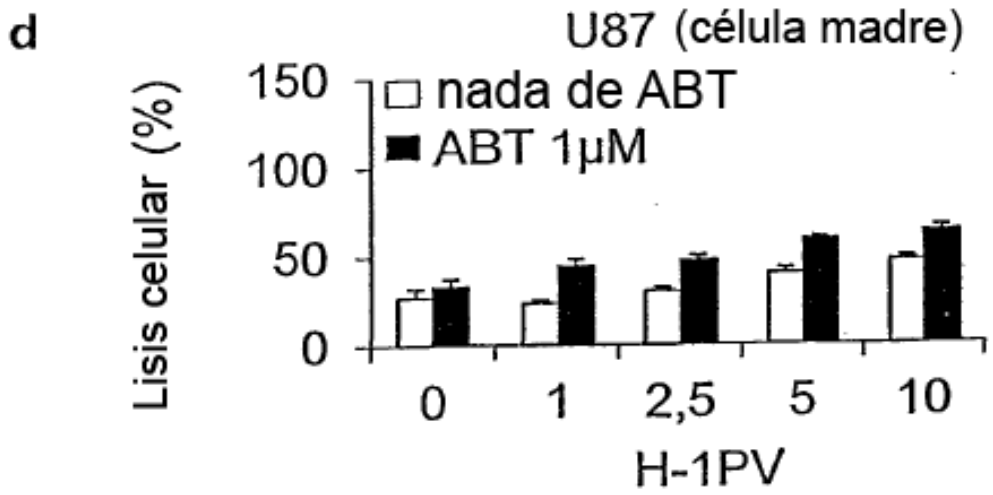


Fig. 3b

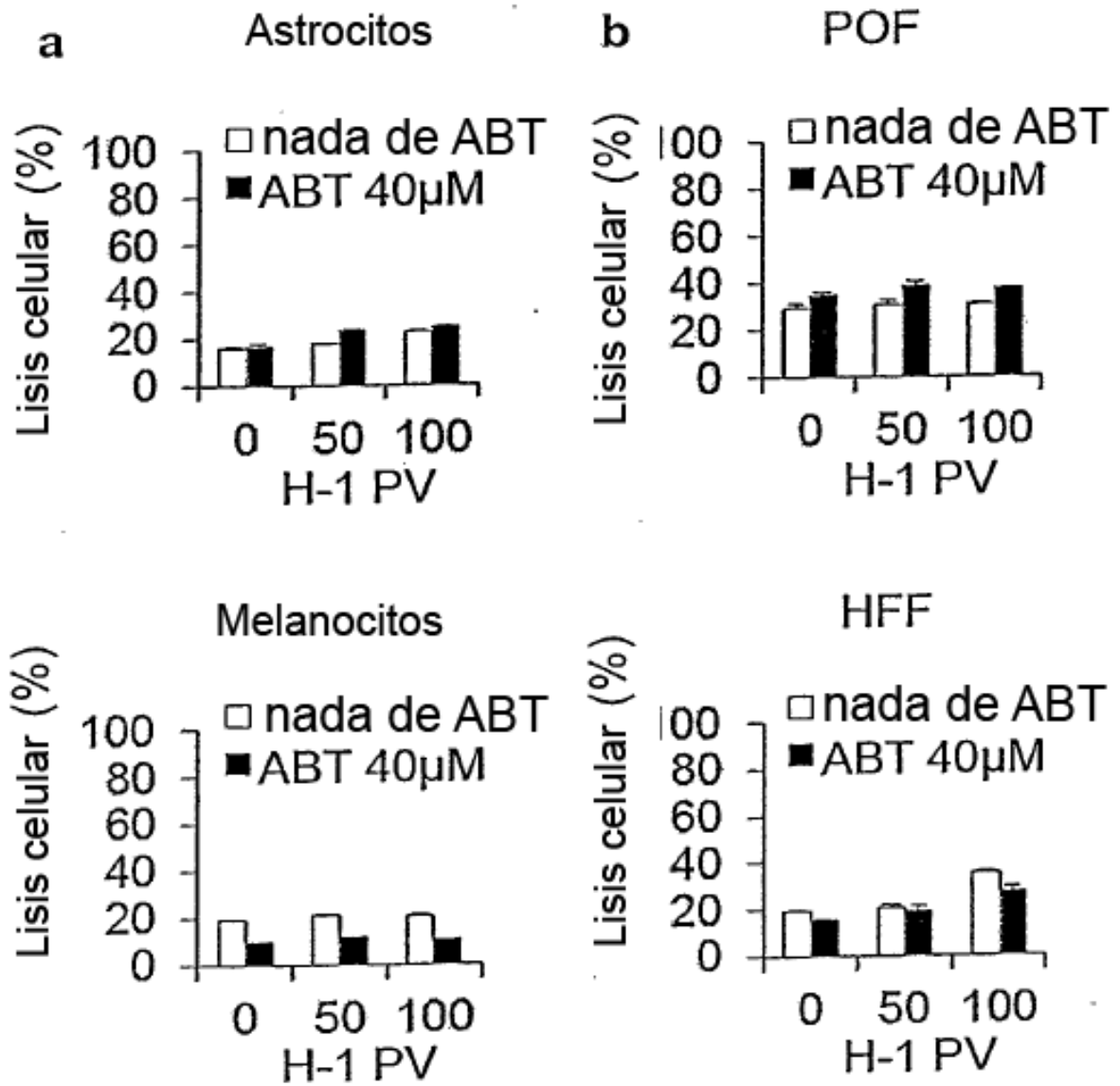


Fig. 4 (a-d)

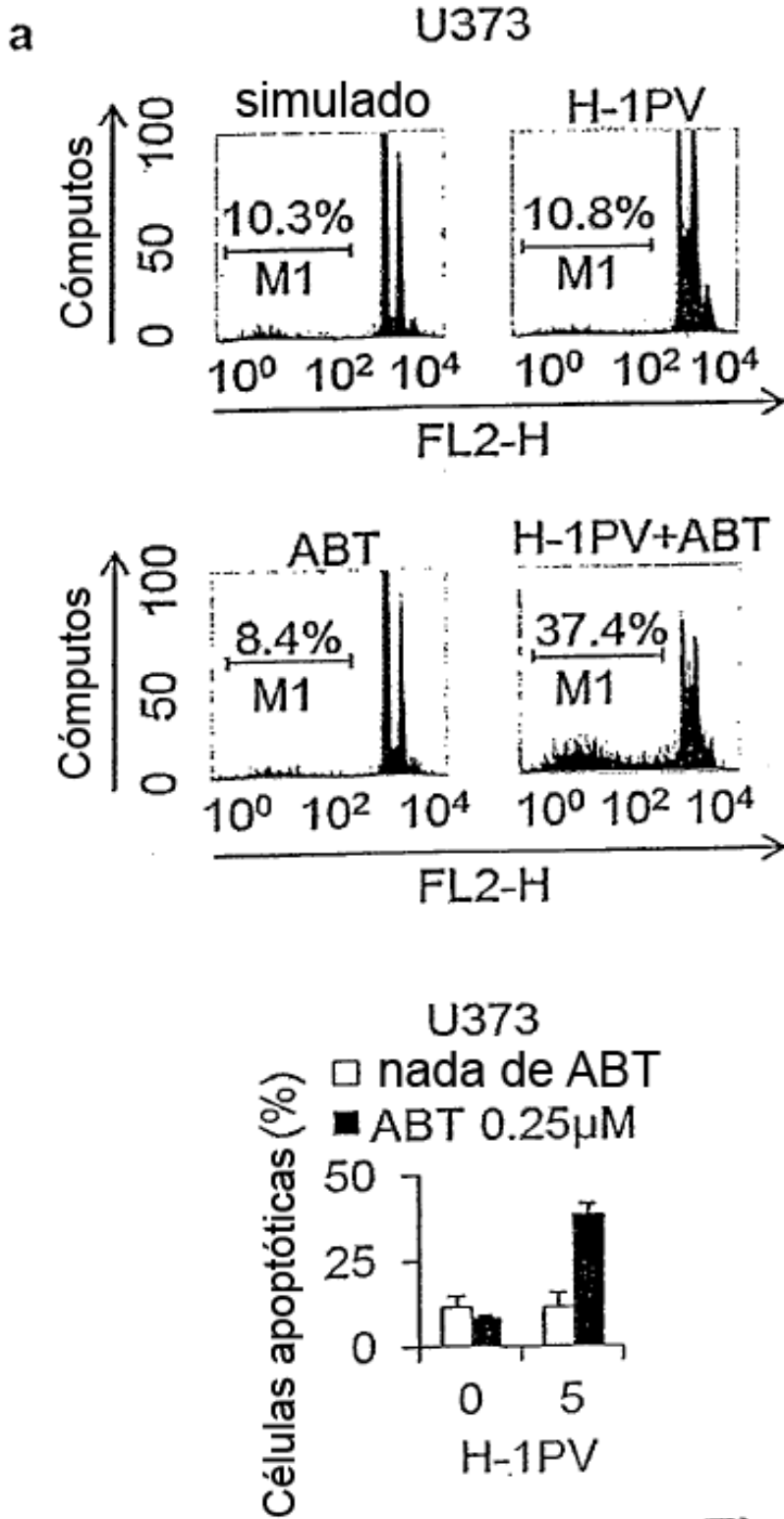


Fig. 5a

b

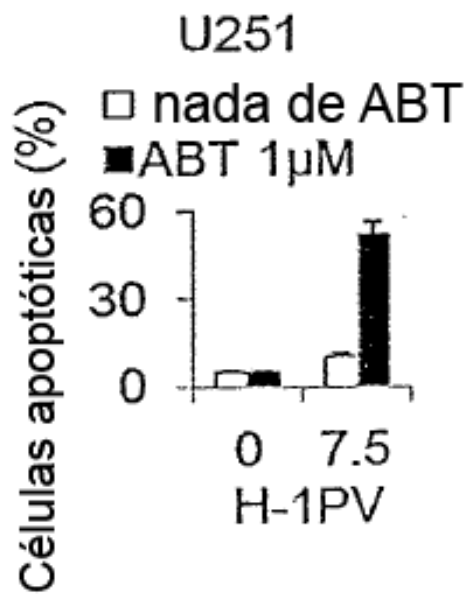
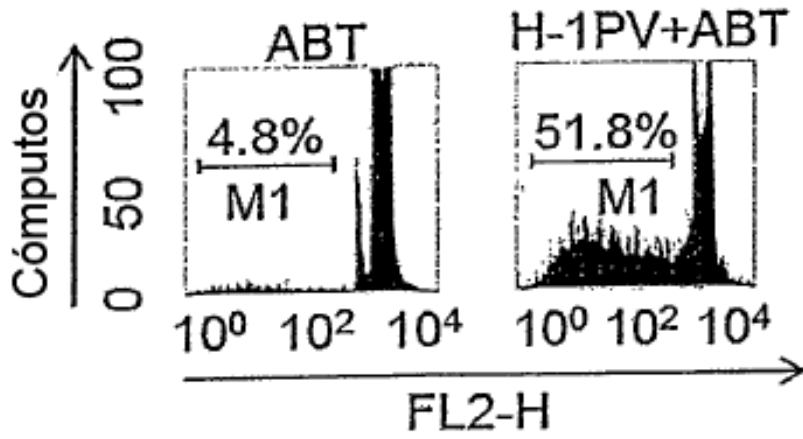
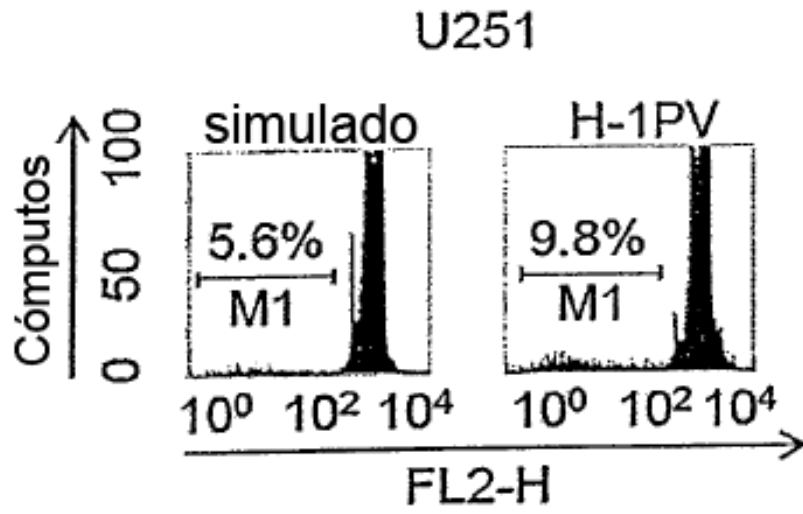


Fig. 5b

c

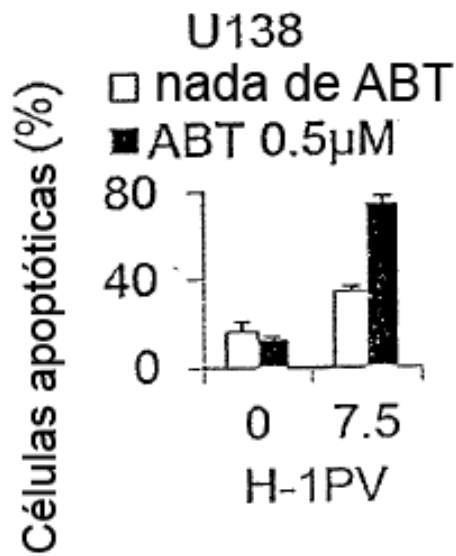
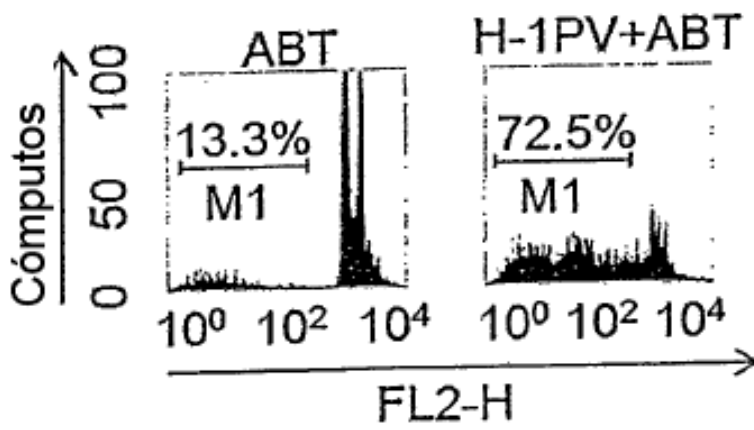
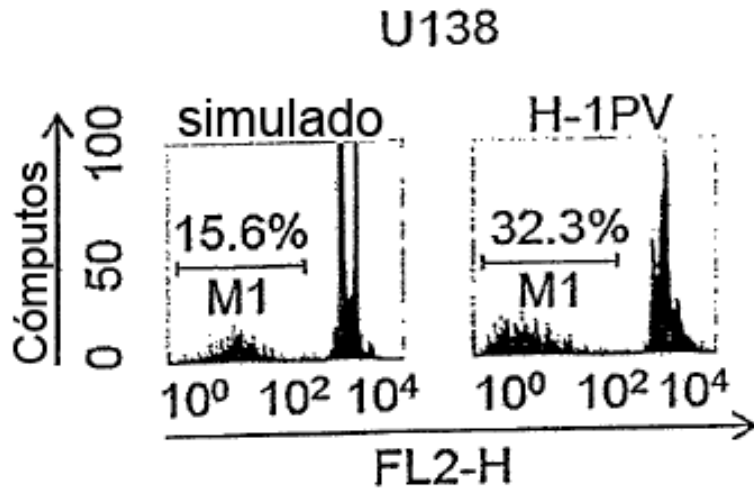


Fig. 5c

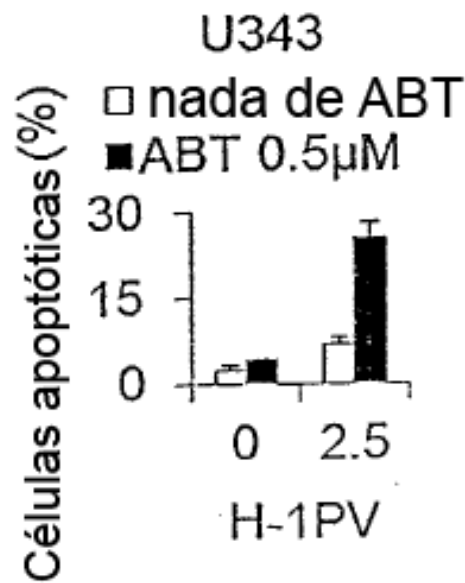
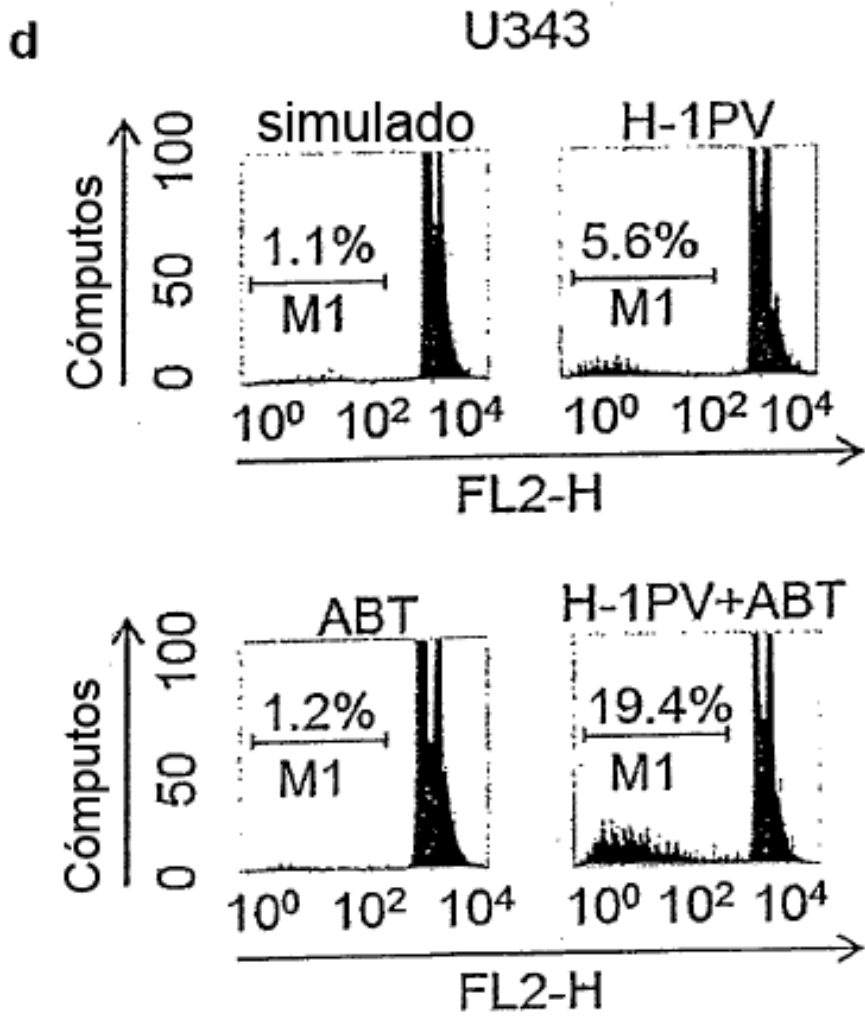


Fig. 5d

e

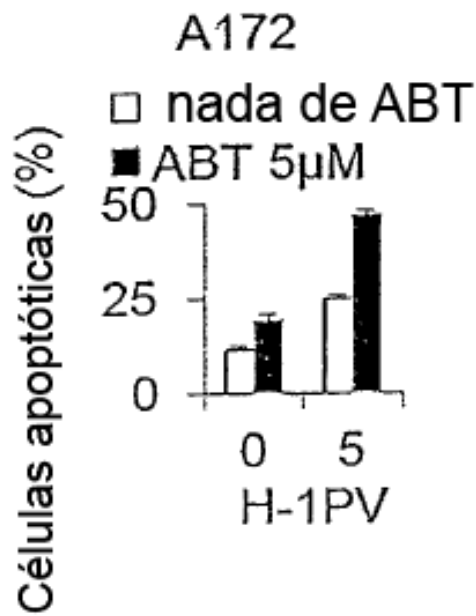
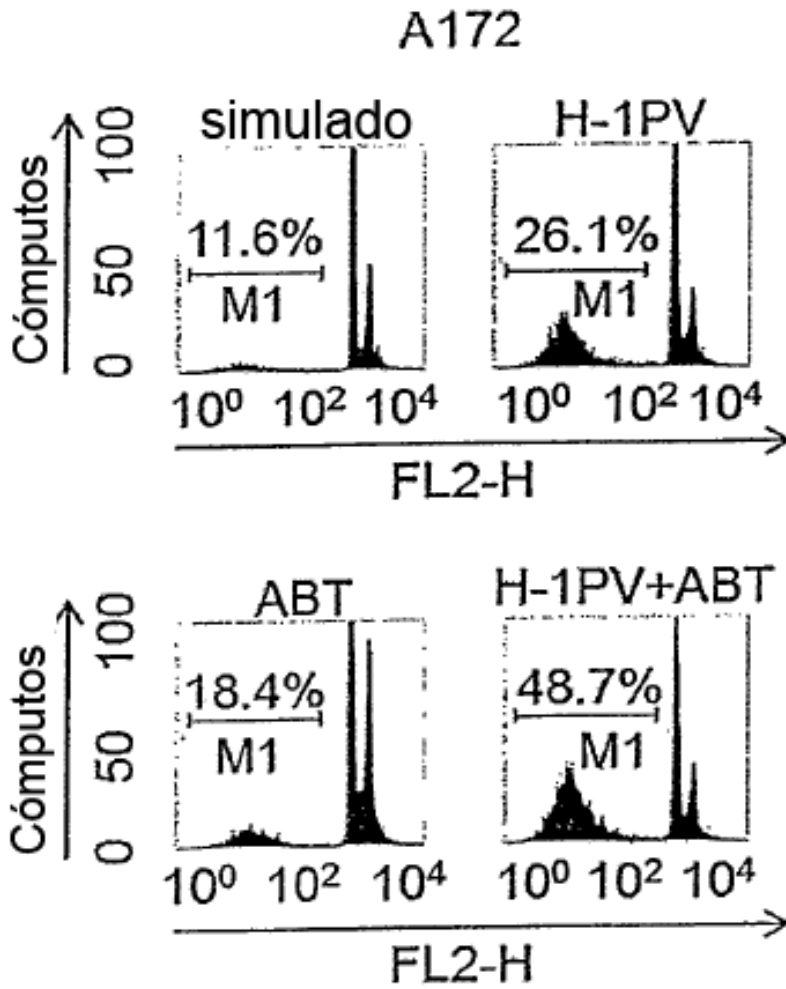


Fig. 5e

f

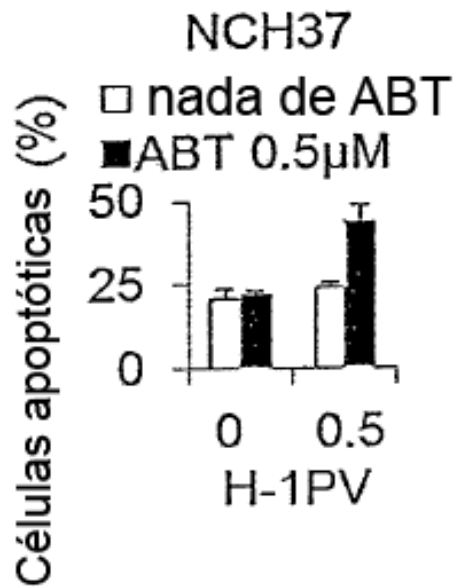
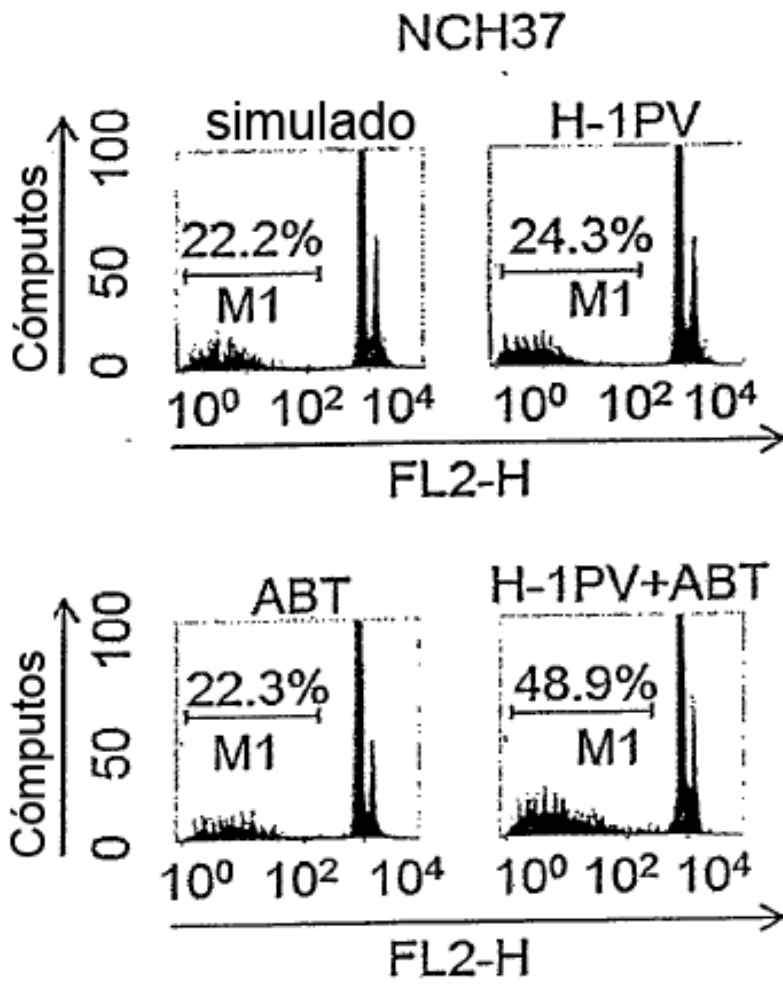


Fig. 5f

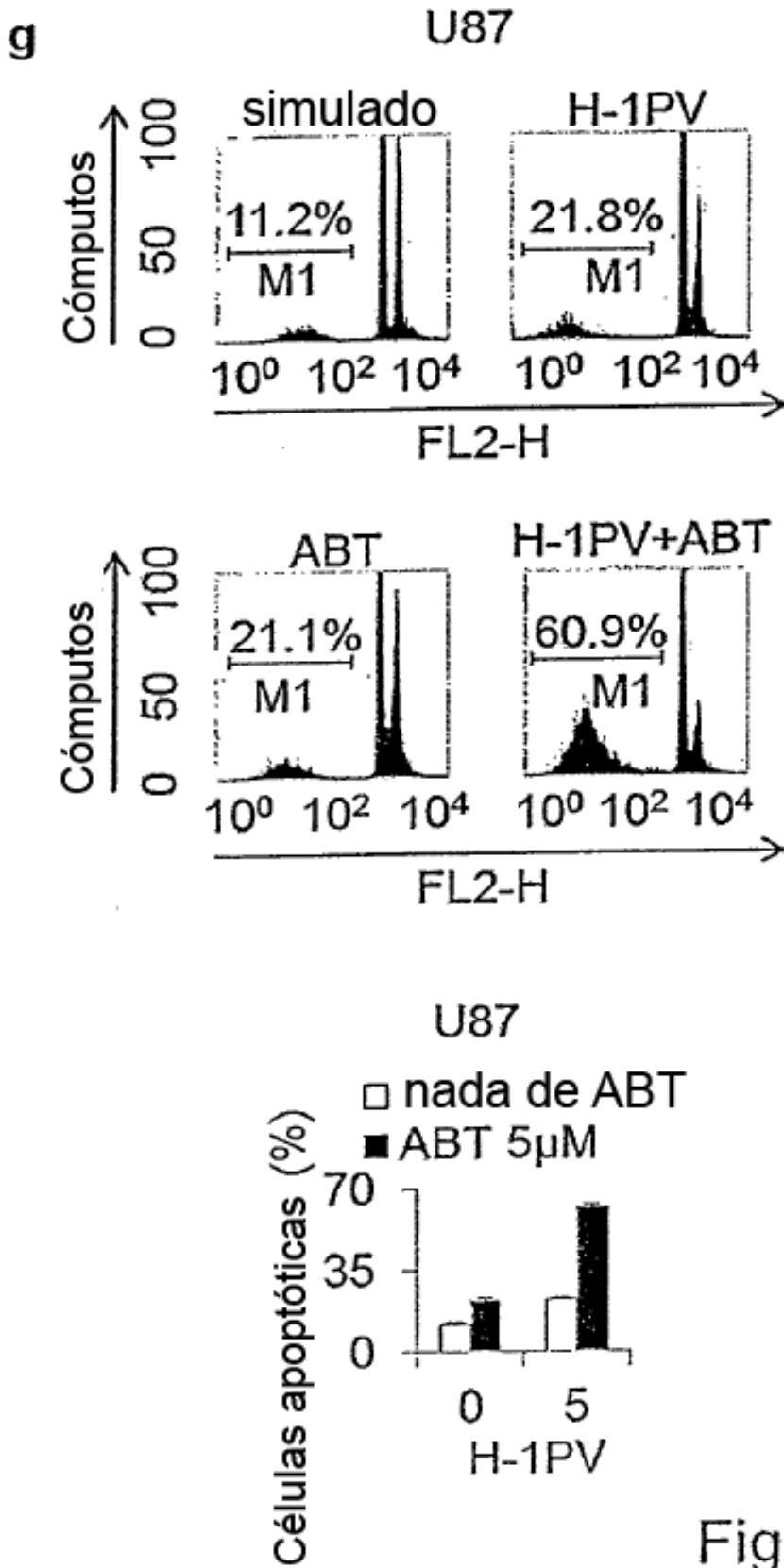


Fig. 5g

h

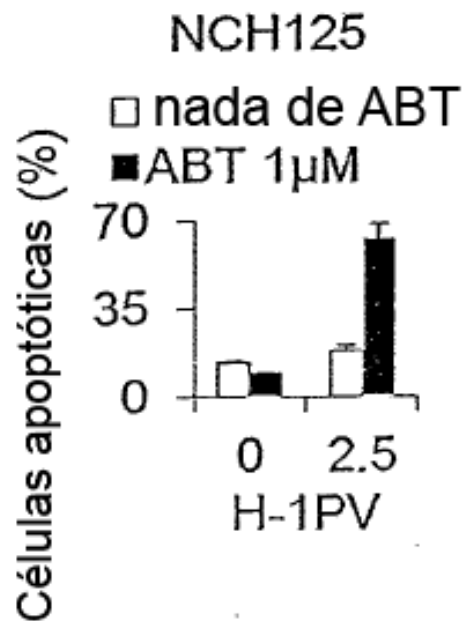
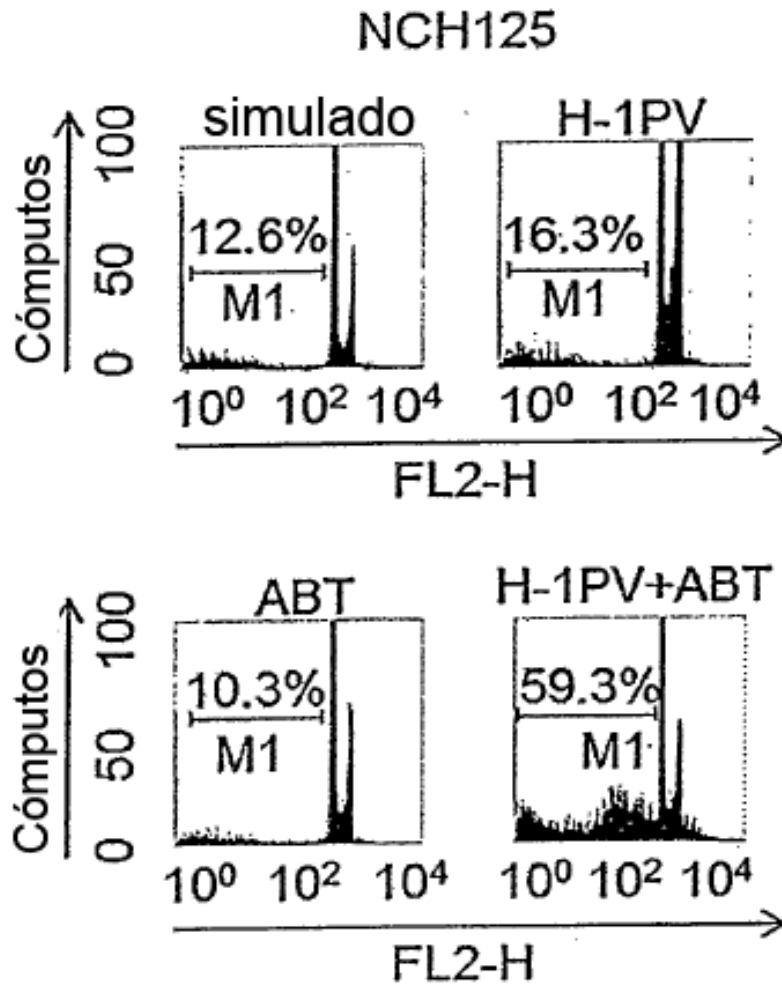


Fig. 5h

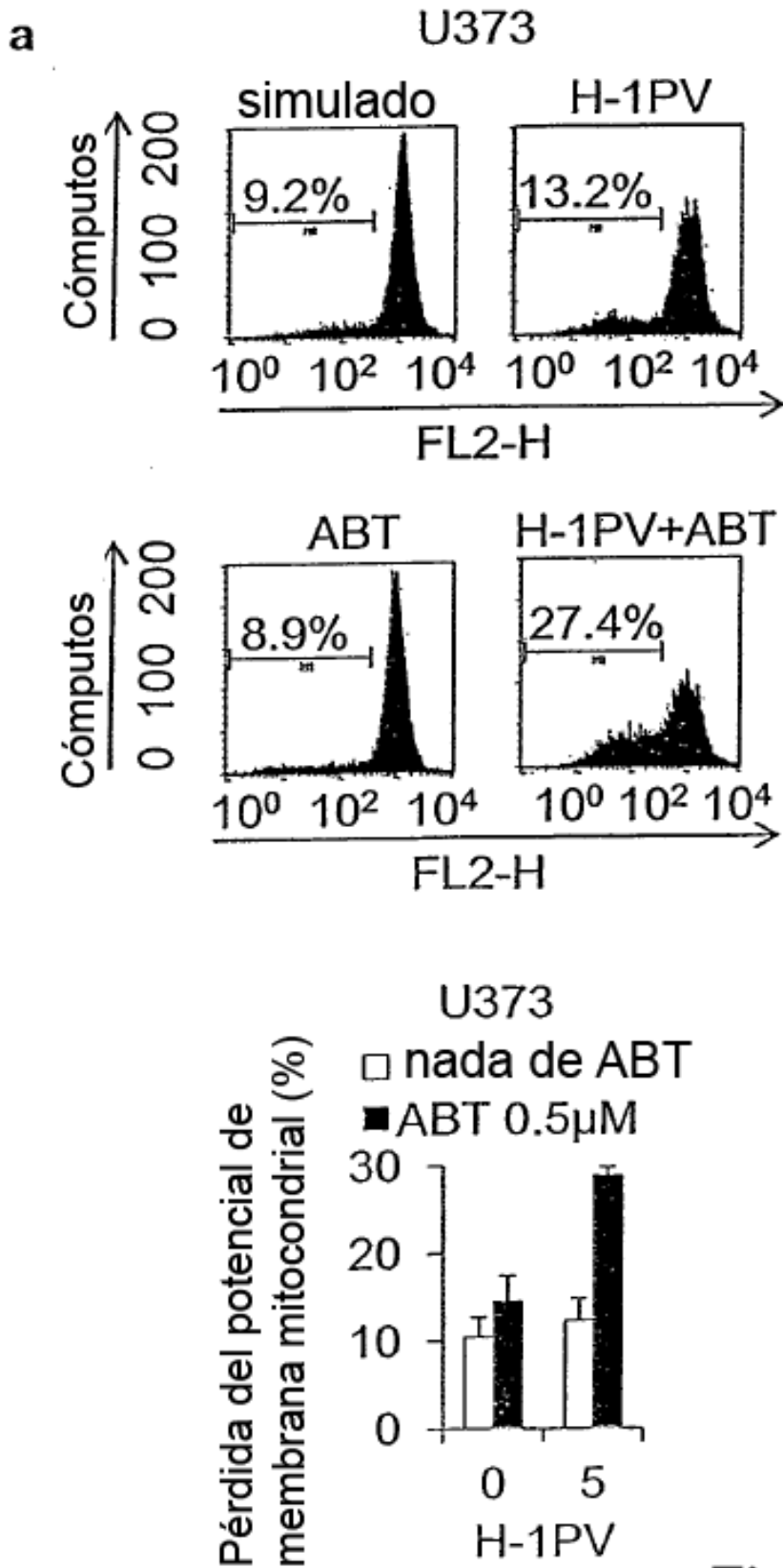


Fig. 6a

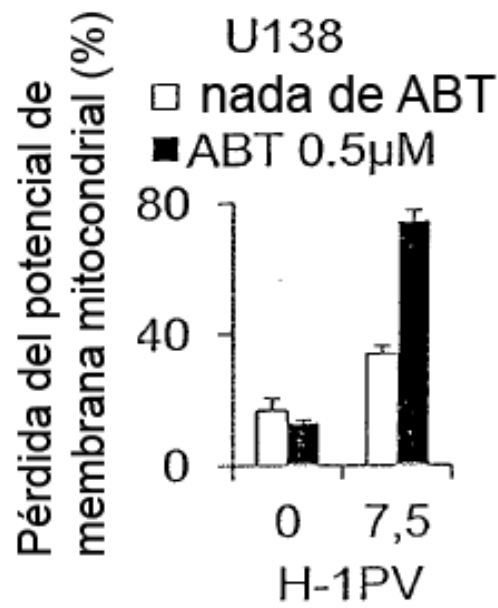
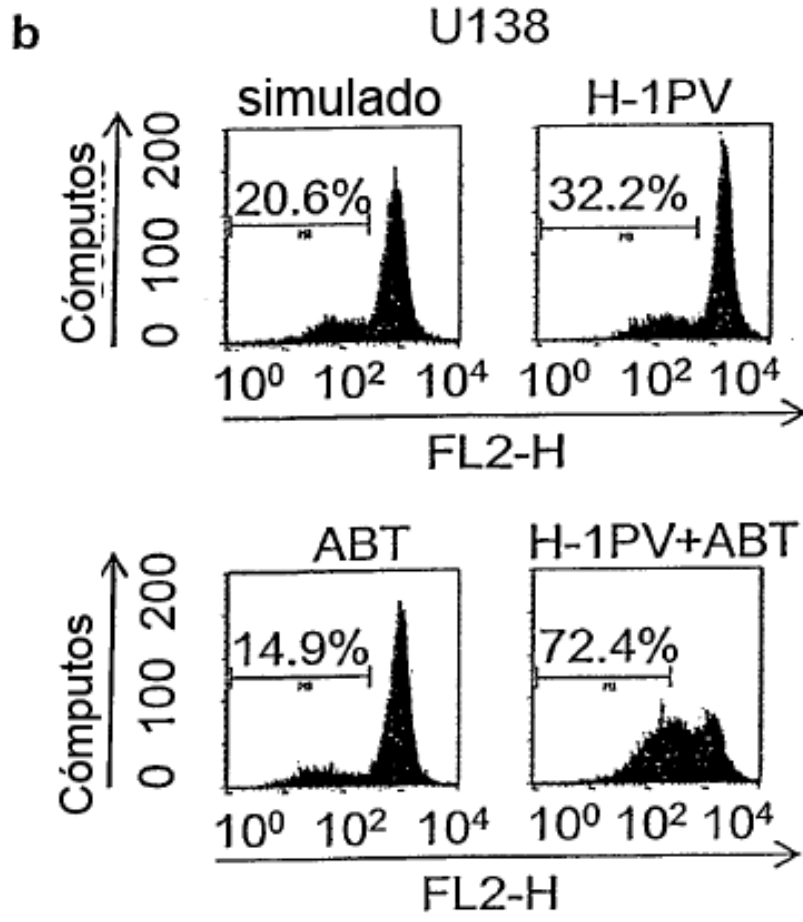


Fig. 6b

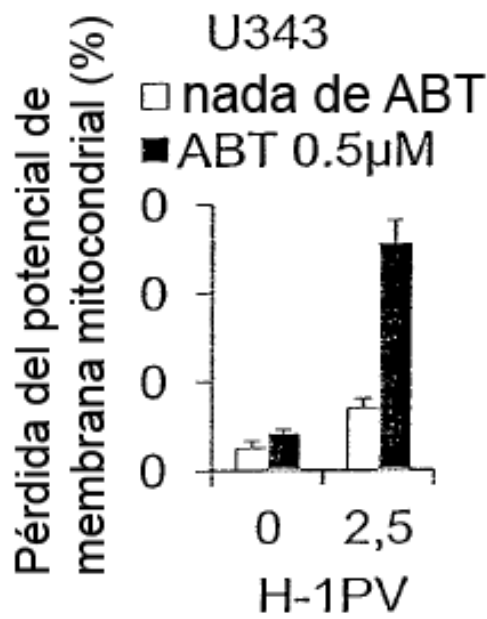
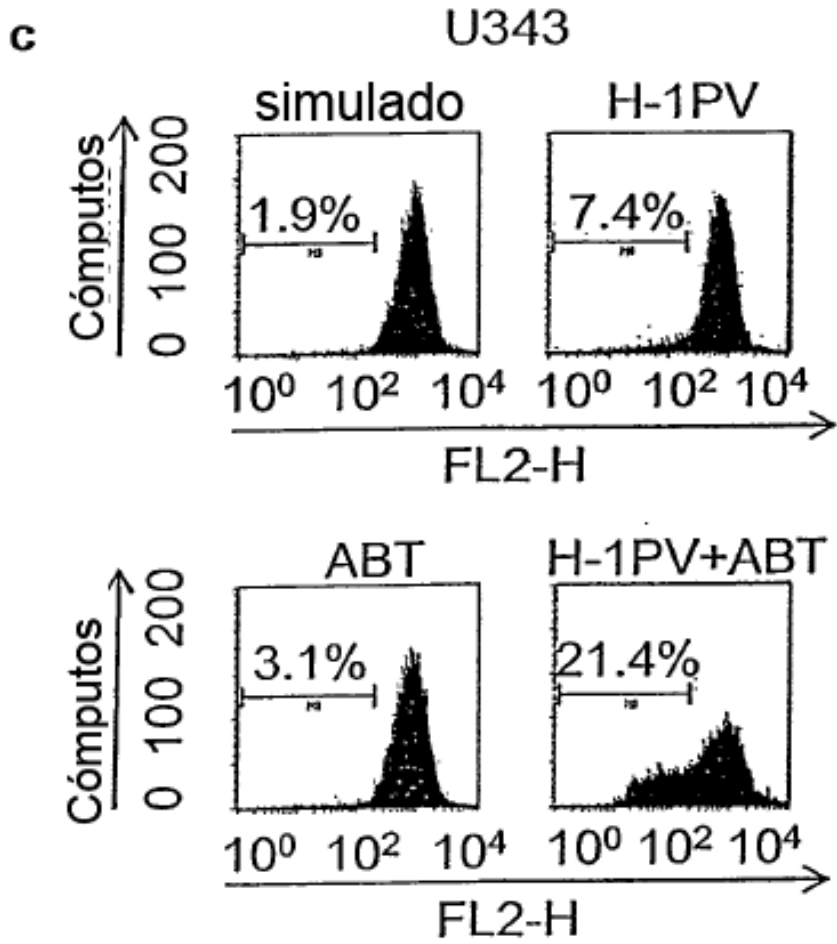


Fig. 6c

d

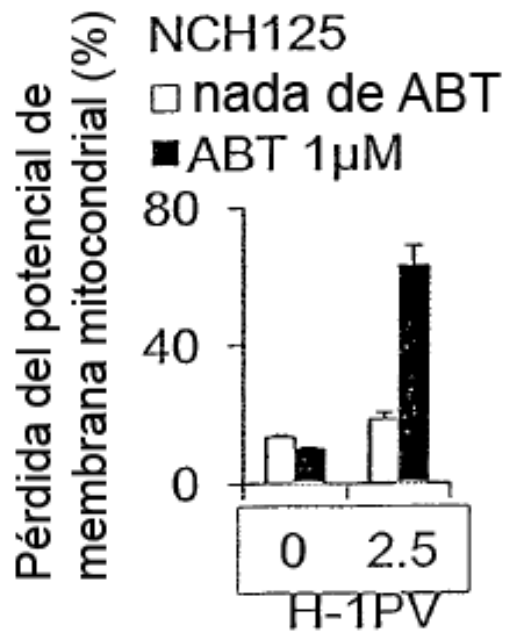
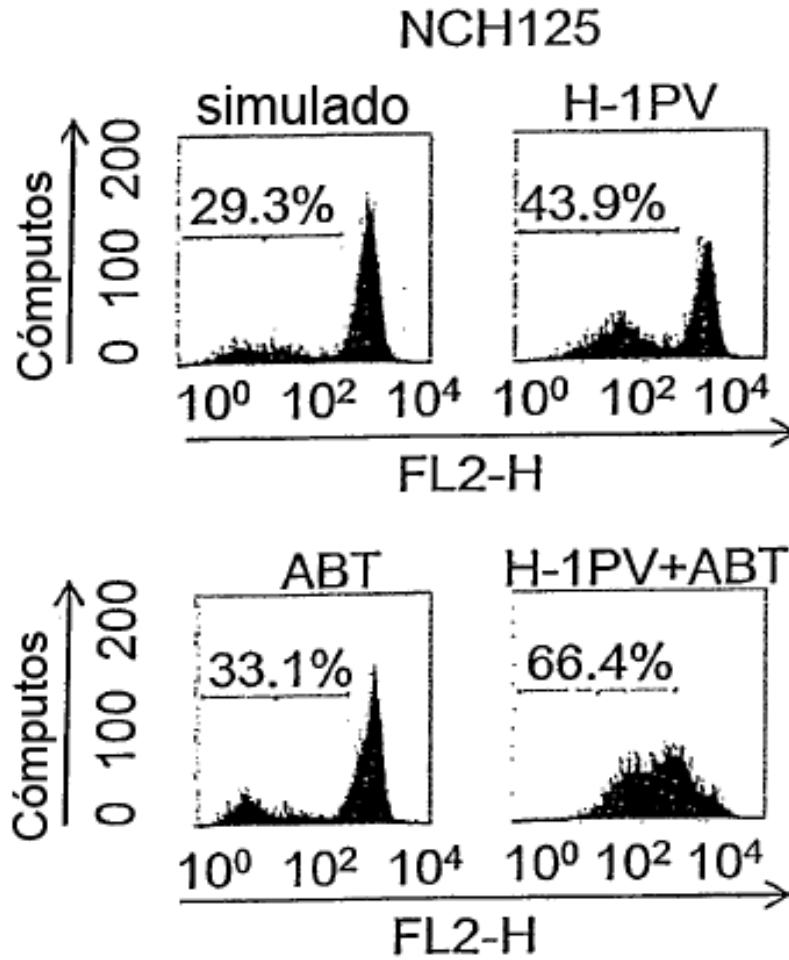


Fig. 6d

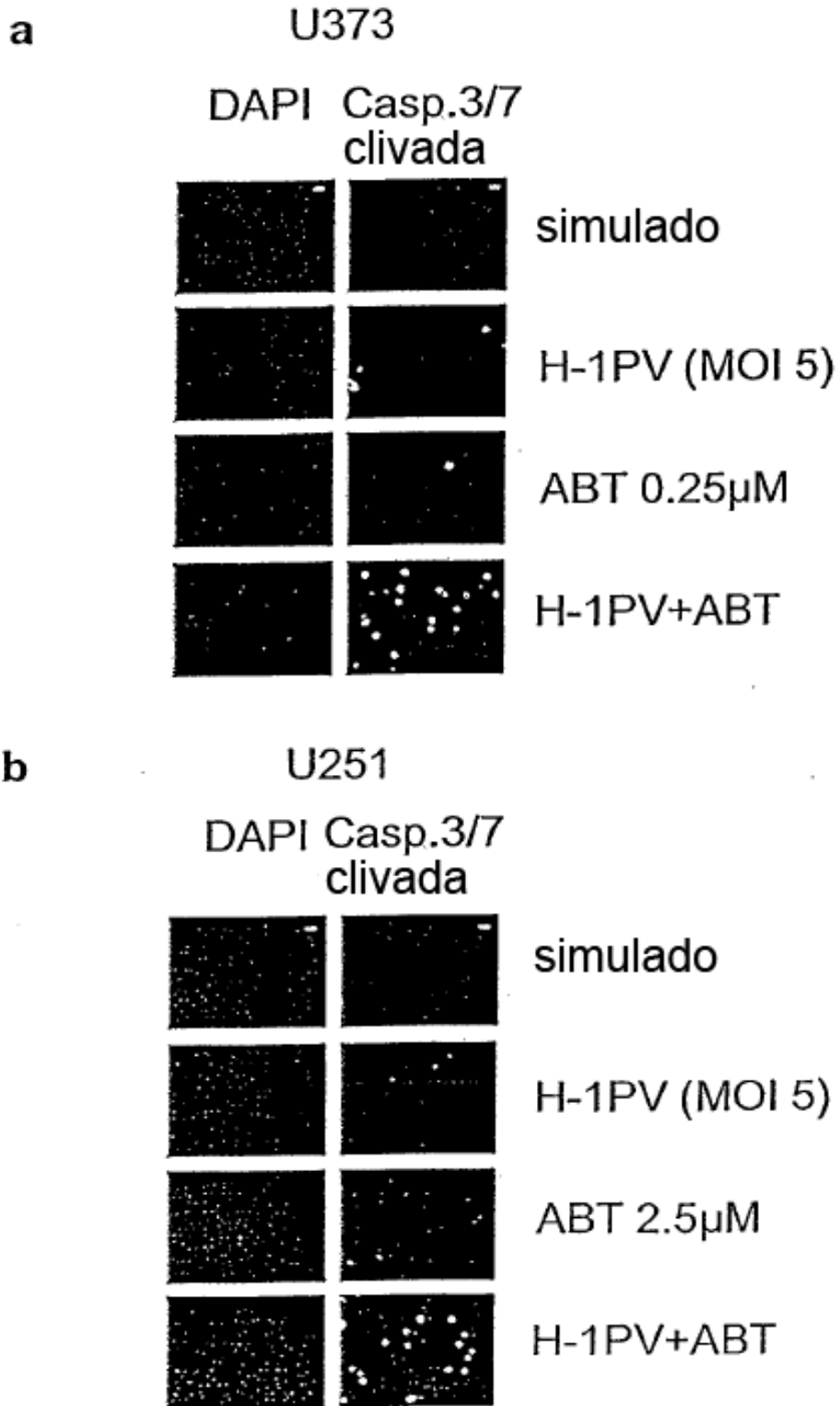
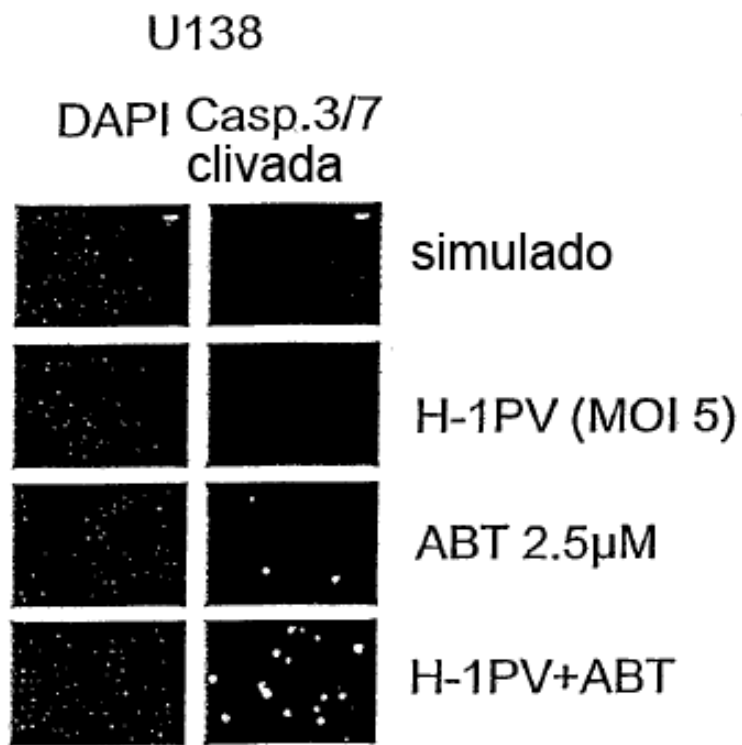


Fig. 7a, b

c



d

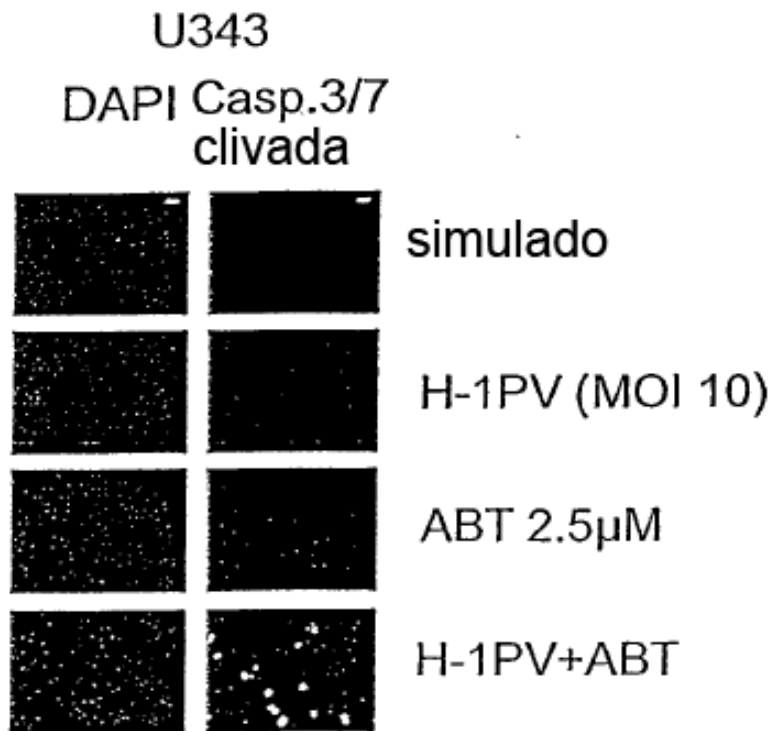
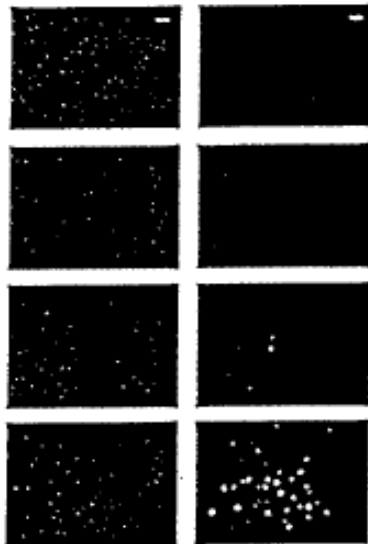


Fig. 7c, d

e

A172

DAPI Casp.3/7
clivada



simulado

H-1PV (MOI 5)

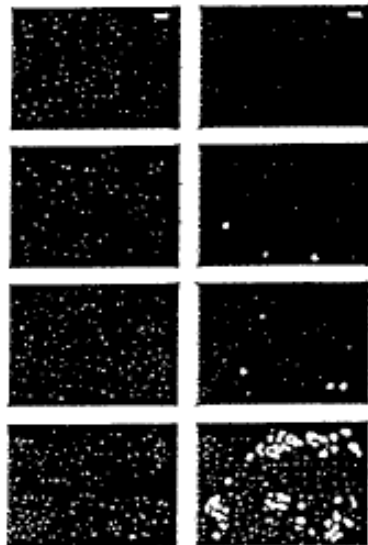
ABT 1.25µM

H-1PV+ABT

f

NCH37

DAPI Casp.3/7
clivada



simulado

H-1PV (MOI 1)

ABT 1µM

H-1PV+ABT

Fig. 7e, f

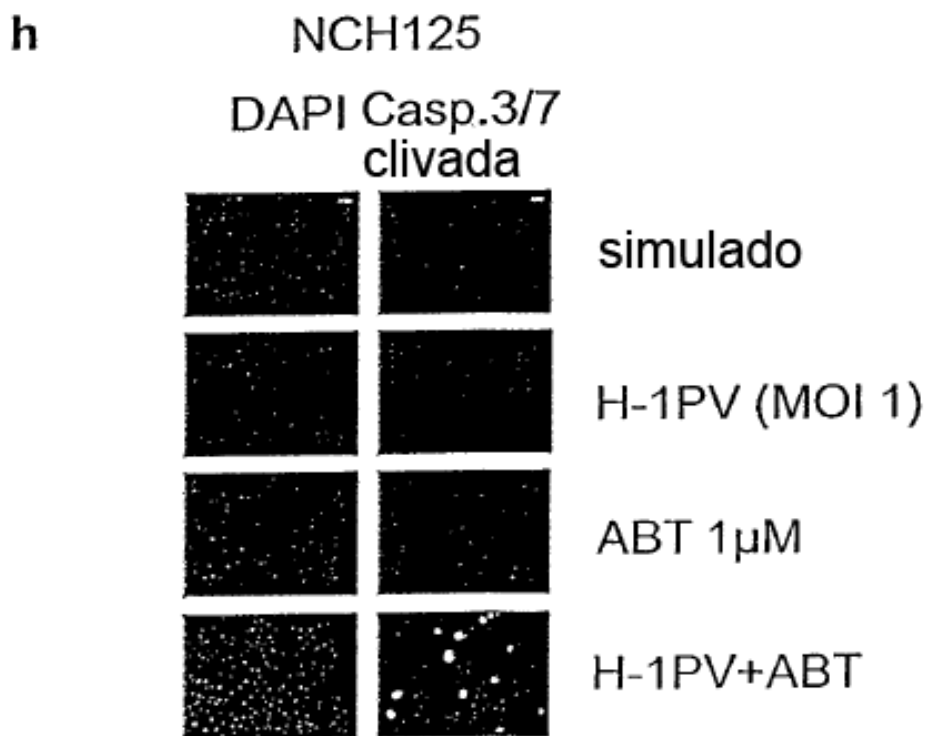
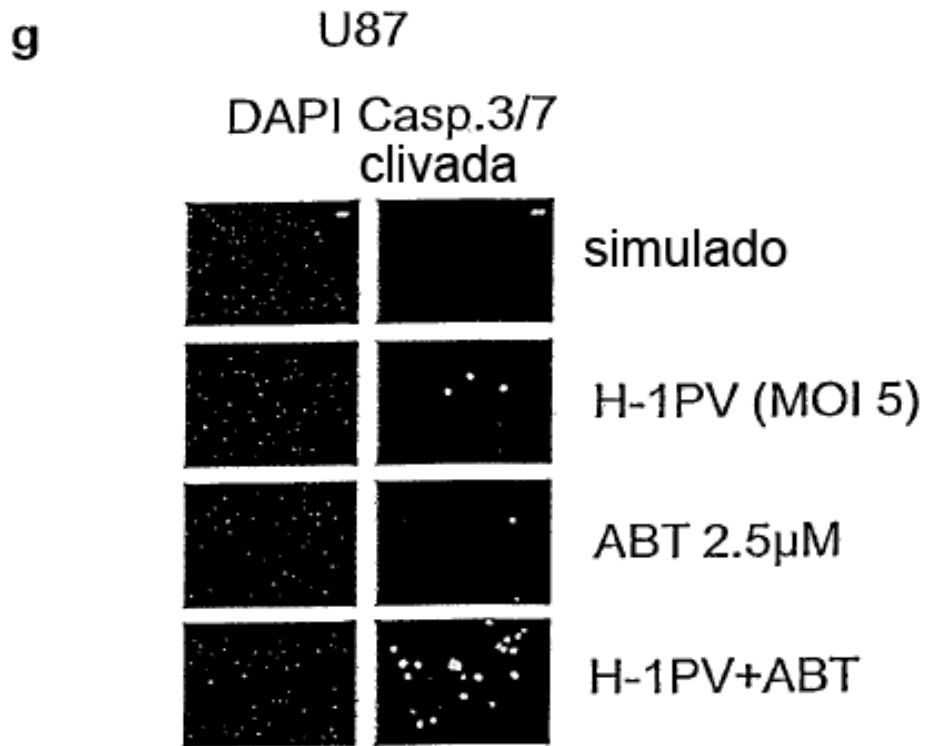


Fig. 7g, h

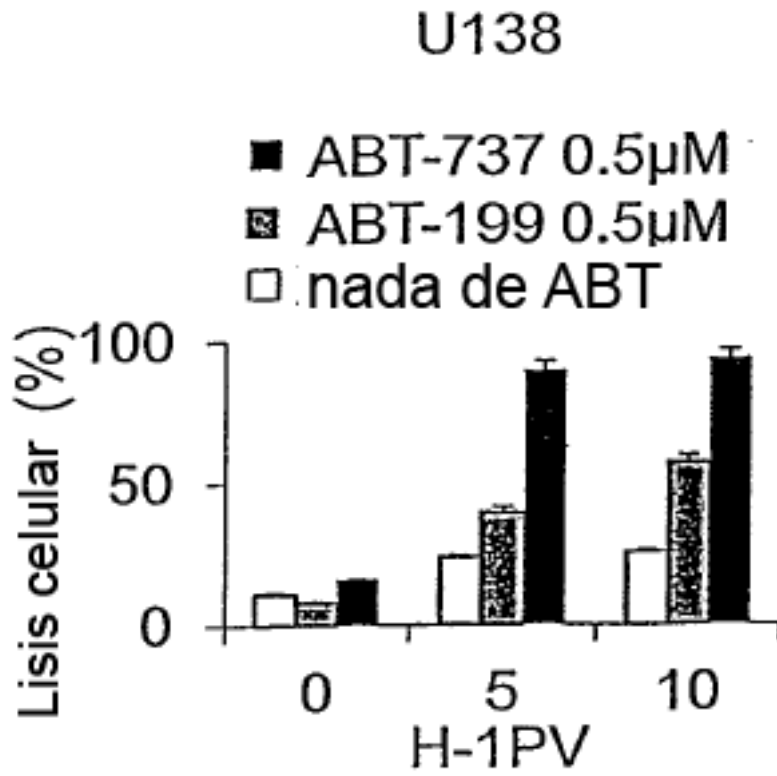


Fig. 8

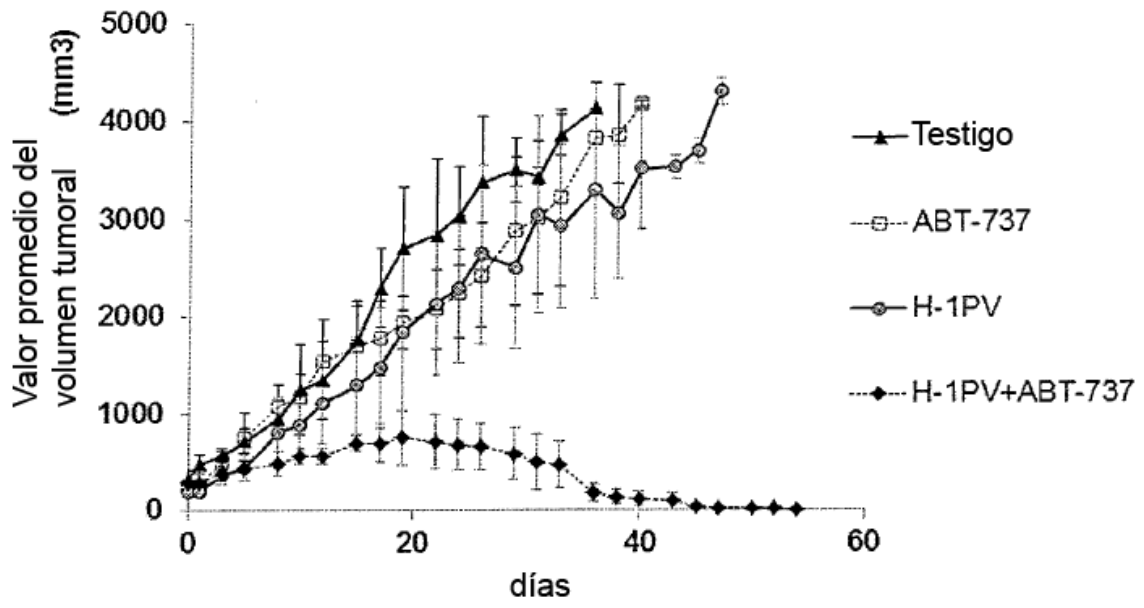


Fig. 9

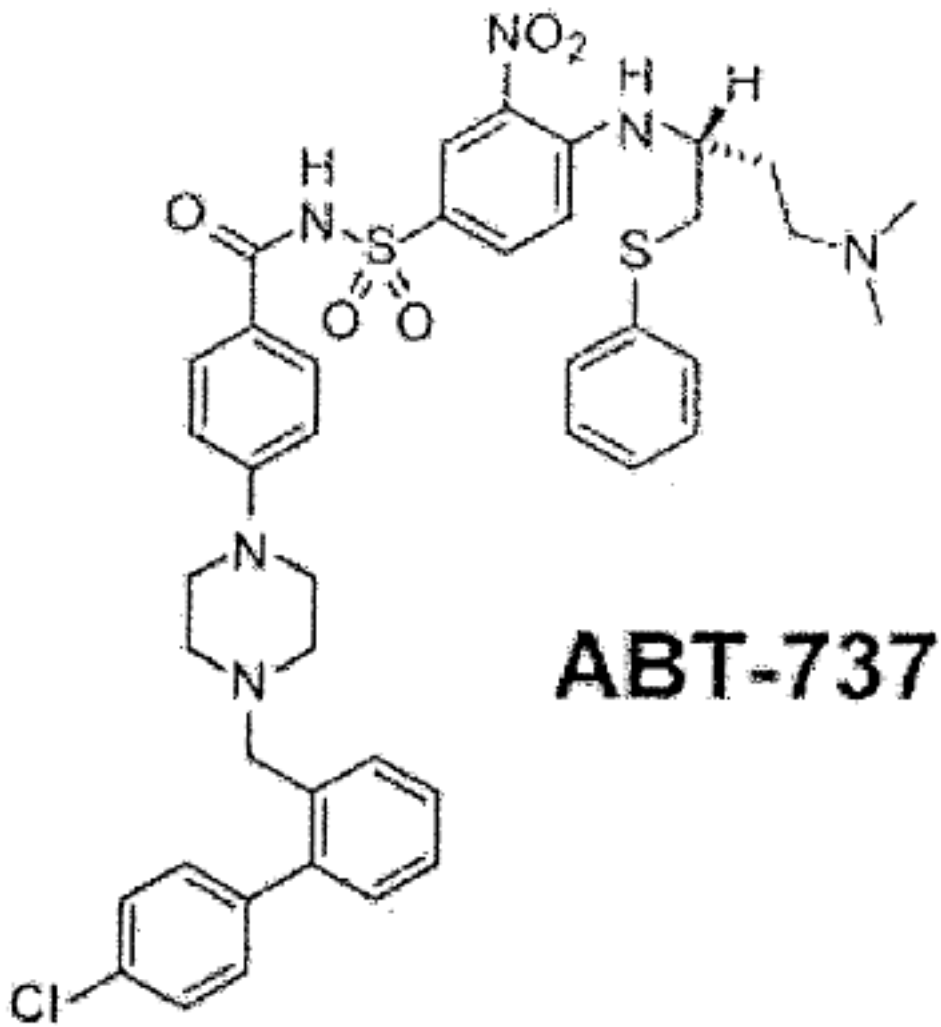


Fig. 10

ABT-199

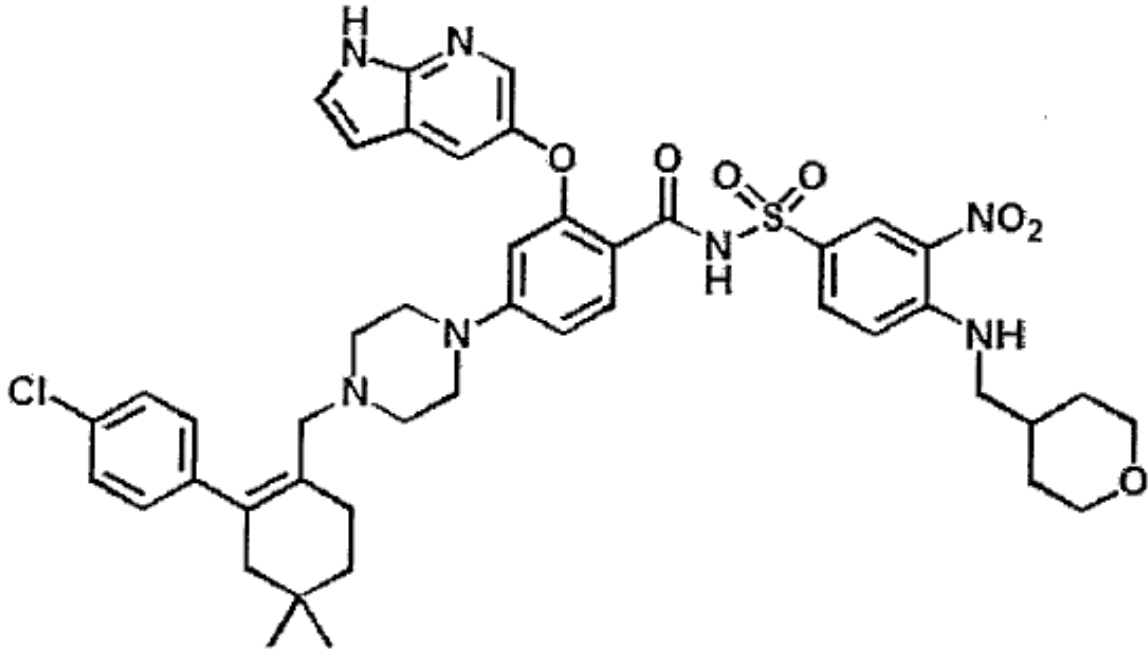


Fig. 11