

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 531**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2012 PCT/US2012/025816**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12112984**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2012 E 12746580 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 2675483**

54 Título: **Uso terapéutico potenciado de una purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa y aplicaciones relacionadas con profármacos**

30 Prioridad:

18.02.2011 US 201161444261 P

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

11.02.2019

73 Titular/es:

**THE UAB RESEARCH FOUNDATION (50.0%)
1530 3rd Avenue South, AB 770
Birmingham, Alabama 35294-0111, US y
SOUTHERN RESEARCH INSTITUTE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**PARKER, WILLIAM, B. y
SORSCHER, ERIC, J.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 699 531 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

Uso terapéutico potenciado de una purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa y aplicaciones relacionadas con profármacos

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional estadounidense con número de serie 61/444.261, presentada el 18 de febrero de 2011.

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general a la inducción de muerte celular mediante escisión *in situ in vivo* controlada de un profármaco para producir un efecto citotóxico y en particular para la potenciación del efecto terapéutico poniendo en práctica escisión junto con inyección *in situ* directa del profármaco, radiación terapéutica, o una combinación de las mismas.

Antecedentes de la invención

15 La quimioterapia es la base del tratamiento de muchos tumores humanos, pero la eficacia *in vivo* contra cánceres latentes o que se dividen lentamente es escasa (Takimoto *et al.* Cancer Management Handbook (11ª edición), UBM Medica 2009; Sang *et al.* Trends Mol Med 2010; 16(1):17-26; Mellor *et al.* Br J Cancer 2005; 93(3):302-9). La radioterapia y la quimioterapia administrada por vía sistémica logran especificidad alterando la replicación del ADN, pero no pueden suprimir tejidos tumorales latentes que experimentan ciclos de manera intermitente. La incapacidad de destruir células tumorales que no se dividen (incluyendo un posible compartimento de células madre tumorales) se reconoce como un motivo del fracaso contra neoplasias malignas humanas comunes, incluyendo tumores de próstata, mama, pulmón y colon de fracción de crecimiento baja, entre muchos otros (Vessella *et al.* Cancer Biol Ther 2007; 6(9):1496-504; Kusumbe *et al.* Cancer Res 2009; 69(24):9245-53). Incluso en el caso de un tumor sólido con un índice mitótico inusualmente alto (por ejemplo, fracción de crecimiento ~ 40%), y suponiendo que todas las células cancerosas en división se destruyen completamente mediante una exposición acumulativa a quimio o radioterapia convencional, la masa sería todavía menor que una que se duplica sin lograr las dimensiones de pretratamiento.

25 Los cánceres de mama, próstata, laringe y cerebro no metastásicos se tratan comúnmente con radioterapia preoperatoria (XRT) como medida de reducción de volumen antes de la resección quirúrgica definitiva (DeVita *et al.* Principles and Practice of Oncology (8ª edición). Ronald A. DePinho y Robert A. Weinbert, Eds. Lippincott Williams & Wilkins, 2008). Otros tumores no metastásicos localmente invasivos son adecuados para la XRT que prolonga la vida, y las neoplasias malignas inoperables que obstruyen las vísceras (por ejemplo, estómago, laringe, colon o vías respiratorias) se tratan habitualmente con radioterapia local para su atenuación (Washington *et al.* Principles and Practice of Radiation Therapy (3ª edición). Mosby, 2009). Tumores tales como estos presentan invariablemente una fracción de crecimiento baja, y en algún momento dejan de responder tanto a la radioterapia como a las mejores quimioterapias disponibles.

35 Se han avanzado varias modalidades más nuevas en un intento por mejorar el tratamiento de tumores no metastásicos localmente invasivos, incluyendo cánceres comunes tales como los descritos anteriormente. Se han investigado, por ejemplo, las tecnologías de destrucción celular criogénica, magnética, térmica y por ultrasonidos con grados variables de éxito preclínico o clínico temprano (Osada *et al.* Anticancer Res 2009; 29(12):5203-9; Krishnan *et al.* Int J Hyperthermia 21 de septiembre de 2010 [pub. elec. antes de la edición impresa]; Margreiter *et al.* J Endourol 2010; 24(5): 745-6). Se han sometido a prueba ampliamente terapias génicas experimentales, tales como GDEPT (terapia de profármacos enzimáticos dirigidos a genes; las denominas estrategias de "gen suicida"), pero han encontrado un éxito limitado contra tumores no metastásicos localmente invasivos debido a al menos dos motivos (GW Both. Curr Opin Mol Ther 2009; 11(4): 421-32; Altaner *et al.* Cancer Lett 2008; 270(2): 191-201; Dachs *et al.* Molecules 2009; 14(11): 4517-45). En primer lugar, la eficacia de transducción de células tumorales es baja con los vectores de transferencia de genes disponibles actualmente. La pequeña proporción de células malignas que expresan un transgén anticancerígeno a menudo no es adecuada para montar un efecto vecinal robusto contra células no transducidas en la masa tumoral. En segundo lugar, la GDEPT ha usado principalmente el gen de la timidina cinasa del herpes simple (HSV-tk) o el gen de citosina desaminasa (CD) procarriota para activar la quimioterapia intratumoral, y los compuestos producidos por estas dos enzimas (monofosfato de ganciclovir y 5-fluorouracilo (FUra), respectivamente) son principalmente activos contra células tumorales en división. La baja eficacia de transducción, escasa actividad vecinal e incapacidad de destruir células no cancerosas sin división explican el fracaso de los enfoques de GDEPT de primera generación contra tumores sólidos no metastásicos en la práctica clínica.

55 Se ha demostrado que el gen de purina nucleósido fosforilasa de *E. coli* (PNP) genera compuestos muy potentes tales como 2-fluoroadenina (F-Ade) o 6-metilpurina (MeP) de manera intratumoral (Ungerechts *et al.* Cancer Res. 2007; 67: 10939-10947; Fu *et al.* Cancer Gene Ther. 2008; 15: 474-484; Fu W, Lan *et al.* Cancer Sci. 2008; 99: 1172-1179; Parker *et al.* Cancer Gene Therapy 18 de junio de 2011 (6):390-8; Gadi *et al.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003; 304: 1280-1284). Las bases de purina tales como estas difunden libremente entre PNP de *E. coli* transducida y células vecinas (vecinales) por medio de rutas de difusión facilitadas ubicuas en todas las células, y confieren un

efecto de destrucción vecinal pronunciado (Hong *et al.* Cancer Res. 2004; 64: 6610-6615). Los compuestos actúan mediante un mecanismo único que altera la síntesis de ARN y proteína, y son por tanto activos contra tanto células tumorales (latentes) en división y sin división *in vivo* (Parker *et al.* Biochem. Pharmacol. 1998; 55: 1673-1681). F-Ade puede generarse mediante PNP de *E. coli* intracelular a partir de profármacos tales como 2-F-2'-desoxiadenosina (F-dAdo) o fosfato de fludarabina (F-araAMP) (Hong *et al.* Cancer Res. 2004; 64: 6610-6615; Parker *et al.* Biochem. Pharmacol. 1998; 55: 1673-1681; Martiniello-Wilks *et al.* Human Gene Therapy 1998; 9: 1617-1626; Mohr *et al.* Hepatology 2000; 31: 606-614; Voeks *et al.* Gene Therapy 2002; 9: 759-768; Martiniello-Wilks *et al.* J. Gene Med. 2004; 6: 1343-1357; Parker *et al.* Cancer Gene Therapy 2003; 10: 23-29; Parker *et al.* Human Gene Therapy 1997; 8: 1637-1644; Martiniello-Wilks *et al.* J. Gene Med. 2004; 6: 43-54). El último agente, F-araAMP, está aprobado clínicamente para el tratamiento de leucemia linfocítica crónica, pero no tiene actividad contra neoplasias malignas no linfoides.

F-Ade es aproximadamente 1.000 veces más activo como agente anticancerígeno que FUra. A pesar de su potencia, numerosos laboratorios han mostrado que F-Ade puede usarse con seguridad como parte de GDEPT. Debido a 1) fuerte secuestro intratumoral en ácido nucleico celular, 2) lenta liberación en el compartimento sistémico tras muerte de células tumorales, con captación por células cancerosas vecinas (vecinales) en las proximidades inmediatas y 3) dilución extensa (en todo el huésped) de cualquier quimioterapia liberada del tumor, el enfoque conduce a eficacia antitumoral segura y constante en numerosos modelos animales *in vivo* (Ungerechts *et al.* Cancer Res. 2007; 67: 10939-10947; Fu *et al.* Cancer Gene Ther. 2008; 15: 474-484; Parker *et al.* Cancer Gene Therapy junio de 2011; 18 (6):390-8; Gadi *et al.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003; 304: 1280-1284; Hong *et al.* Cancer Res. 2004; 64: 6610-6615; Martiniello-Wilks *et al.* Human Gene Therapy 1998; 9: 1617-1626; Mohr *et al.* Hepatology 2000; 31: 606-614; Voeks *et al.* Gene Therapy 2002; 9: 759-768; Martiniello-Wilks *et al.* J. Gene Med. 2004; 6: 1343-1357; Parker *et al.* Cancer Gene Therapy 2003; 10: 23-29; Parker *et al.* Human Gene Therapy 1997; 8: 1637-1644; Martiniello-Wilks *et al.* J. Gene Med. 2004; 6: 43-54; Deharvengt *et al.* Int. J. Oncol. 2007; 30: 1397-1406; Kikuchi *et al.* Cancer Gene Ther. 2007; 14: 279-86). Varias comparaciones directas entre PNP de *E. coli* y estrategias de primera generación (HSV-tk y CD) indican aumento sustancial de GDEPT mediante un mecanismo basado en PNP (Martiniello-Wilks *et al.* Human Gene Therapy 1998; 9: 1617-1626; *et al.* Clin Cancer Res 1997; 3:2075-80; Nestler *et al.* Gene Terapia 1997; 4:1270-77; Puhlmann *et al.* Human Gene Therapy 1999; 10: 649-657). El enfoque ha sido aprobado recientemente por la Food and Drug Administration para pruebas clínicas en los Estados Unidos (IND n.º 14271, aprobado el 19/3/2010).

La semivida intratumoral prolongada de metabolitos de F-Ade específicamente tras la generación mediante PNP de *E. coli* (> 24 horas) (Hong *et al.* Cancer Res. 2004; 64: 6610-6615; Parker *et al.* Biochem. Pharmacol. 1998; 55: 1673-1681; Parker *et al.* Cancer Gene Therapy 2003; 10: 23-29) junto con la destrucción vecinal de células tumorales latentes y células madre tumorales (mediante supresión de la síntesis de ARN y proteína), sugirió el posible uso de PNP como una modalidad de "apuntar y destruir" para concentrar una quimioterapia potente dentro de tejidos tumorales.

Los tratamientos contra el cáncer con fármacos quimioterápicos se han basado en la administración sistémica como equivalente o superior a la inyección intratumoral. La inyección intratumoral directa de un agente quimioterápico no se considera por la técnica convencional anterior como más eficaz que las vías sistémicas para provocar un efecto antitumoral debido a la escasa captación intratumoral, escaso uso por células tumorales del agente quimioterápico y letalidad de células tumorales despreciable *in vivo*. Además, la administración intratumoral es un procedimiento exacto mientras que la administración sistémica por vía intravenosa u otra vía sistémica es comparativamente fácil de realizar.

Por tanto, existe la necesidad de proporcionar una terapia de inhibición más eficaz contra células diana *in vivo* y en células tumorales particulares. Existe además la necesidad de mejorar un efecto inhibitorio vecinal contra células diana y mantener tal efecto durante un periodo prolongado.

Sumario de la invención

El uso de una purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o un vector que codifica para la expresión de una de estas enzimas se detalla junto con el uso de un profármaco escindido por la purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para la preparación de una inhibición por inyección directa de células seleccionadas como diana que se replican o que no se replican; las células seleccionadas como diana normalmente no expresan la purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa introducida. La enzima y el profármaco son susceptibles de entremezclarse e inyectarse como una única dosis o como inyecciones separadas u otras vías de administración a las células seleccionadas como diana. La expresión intracelular de la enzima mejora la eficacia. El uso de las sustancias de la invención es particularmente eficaz en el tratamiento de tumores como resultado de un efecto vecinal en el que células próximas a células transfectadas y fluido intercelular que contienen la enzima inhiben la función o destruyen células en contacto con el fármaco liberado por la escisión del profármaco. La eficacia de la sustancia y el profármaco se potencian mediante exposición de las células diana a radiación de rayos X.

También se proporciona un procedimiento para inhibir células seleccionadas como diana que se replican o que no se replican que incluye la administración de una purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa a las células seleccionadas como diana. Un profármaco escindido por la purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa se

5 inyecta directamente en proximidad de las células diana para liberar una base de purina citotóxica para las células seleccionadas como diana para destruir o inhibir la función de las células seleccionadas como diana. El procedimiento es particularmente adecuado para la administración a un tumor. La administración de un profármaco independientemente de si está directamente en proximidad a las células seleccionadas como diana por vía sistémica es eficaz en combinación con terapia de radiación de rayos X para destruir o inhibir la función de las células seleccionadas como diana.

Breve descripción de los dibujos

10 La figura 1 es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra el efecto de diferentes programas de fosfato de fludarabina (F-araAMP) sistémico intraperitoneal (IP) en tumores D54 que expresan PNP de *E. coli* en el 5% de las células;

la figura 2A es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra los efectos de F-araAMP inyectado de manera intratumoral en tumores que expresan PNP de *E. coli* en el 10% de sus células y que da como resultado actividad antitumoral;

15 la figura 2B es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra el efecto de la inyección intratumoral de F-araAMP a altas concentraciones en tumores D54 en los que ninguna de las células expresan actividad de PNP de *E. coli*;

la figura 2C es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra el efecto de la inyección de F-araAMP en tumores sobre el crecimiento de tumores D54 en los que el 10% de las células expresan actividad de PNP de *E. coli*;

20 la figura 2D es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra el efecto de la inyección de F-araAMP en tumores sobre el crecimiento de tumores D54 en donde ninguna de las células expresan actividad de PNP de *E. coli*;

25 la figura 3 es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra que la inyección intratumoral directa de F-araAMP (una vez al día o dos veces al día) en tumores que no expresan PNP de *E. coli* no tiene efecto sobre el crecimiento tumoral;

la figura 4 es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra que la inyección intratumoral directa de F-araAMP en tumores que expresan PNP de *E. coli* en el 10% de sus células da como resultado muy buena actividad antitumoral, siendo seis inyecciones mejor que tres inyecciones;

30 la figura 5A es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra el efecto de PNP de vector adenoviral (Ad) más F-araAMP sobre tumores D54 a un régimen de dosificación con alto contenido en F-araAMP de 24 mg de profármaco intratumoral;

la figura 5B es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra el efecto de PNP de vector adenoviral (Ad) más F-araAMP sobre tumores D54 a un régimen de dosificación con menor contenido en F-araAMP (18 mg);

35 la figura 5C es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra el efecto bajo secuencias variadas de administración intratumoral directa y secuencias de PNP de origen diferente;

la figura 6A es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra la eficacia de F-dAdo mediante inyección intratumoral directa en tumores sobre el crecimiento de tumores D54, donde ninguna de las células expresa actividad de PNP de *E. coli*;

40 la figura 6B es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra la eficacia de F-dAdo mediante inyección intratumoral directa en tumores sobre el crecimiento de tumores D54 en los que el 10% de las células expresan actividad de PNP de *E. coli*;

la figura 7A es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra el efecto de F-araAMP y Ad/PNP intratumoral sobre tumores DU145;

45 la figura 7B es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra el efecto de F-araAMP y Ad/PNP intratumoral sobre tumores de adenocarcinoma de células de pulmón no pequeñas NCIH322M;

la figura 8A es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra el efecto de la inyección intratumoral de F-araAMP más radiación sobre tumores D54 en los que 10% de células expresan PNP de *E. coli*;

50 la figura 8B es un diagrama del peso tumoral en función del tiempo que muestra el efecto de la inyección intraperitoneal (IP) de F-araAMP más radiación sobre el 10% de tumores D54/PNP para regímenes de radiación variados.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

La presente invención tiene utilidad en la inhibición *in vivo* del crecimiento tumoral. Se refiere a una purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o un vector que codifica para la expresión de las mismas y a un profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso en la inyección de profármacos para potenciar la eficacia de la radioterapia en el tratamiento de cáncer en el compartimento que no experimenta ciclos de una neoplasia maligna sólida mediante inhibición funcional o destrucción de células seleccionadas como diana que se replican o que no se replican, en la que las células diana definen un tumor. Se ha descubierto sorprendentemente para la administración proximal directa de un profármaco a células seleccionadas como diana en general y en particular mediante inyección intratumoral directa que tras la escisión por una enzima, se produce una base citotóxica dentro de una masa de células seleccionadas como diana tales como un tumor, que contiene o que expresa la enzima, es más eficaz que vías de administración sistémica convencionales incluyendo por vía oral, por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa), por vía intramuscular, por vía intraperitoneal o por vía transdérmica. Se indica que esto es incluso más eficaz cuando la enzima se activa por vía intracelular dentro de las células diana.

La inyección intratumoral directa de un profármaco se ha considerado convencionalmente como innecesaria e ineficaz en comparación con la administración sistémica de profármacos debido en parte a los tumores de naturaleza bien vascularizada y los otros puntos mencionados anteriormente. La administración de un profármaco de este tipo, independientemente de la vía de administración, a células que expresan o están próximas a la enzima se vuelve más efectiva cuando se acopla con irradiación del tumor. Esto se considera sorprendente ya que no se sabe que PNP o NH sean sensibilizadores de la radiación, cada enzima sola, o en presencia de un sustrato de profármaco.

La presente invención se basa en la inyección de un profármaco tal como fosfato de fludarabina en proximidad a células diana que expresan purina nucleósido fosforilasa (PNP) o nucleósido hidrolasa (NH) que no están en el huésped dando como resultado un alto nivel de inhibición y destrucción vecinales; y destrucción de grandes xenoinjertos de tumores humanos en modelos murinos *in vivo*. PNP o NH que no están en el huésped y sustrato de profármaco para la enzima, independientemente de la tasa de administración de profármacos, aumenta la radioterapia y funciona mediante un mecanismo único. En particular, la generación intratumoral de 2-fluoroadenina u otra purina tóxica a partir de un profármaco y que se libera lentamente al compartimento sistémico y se diluye en gran medida en el huésped tiene un efecto mejorado. La inyección en tumores subcutáneos grandes de un vector adenoviral que expresa PNP de *E. coli* seguido por fosfato de fludarabina u otros profármacos da como resultado regresiones tumorales e inhibición prolongada del crecimiento tumoral. Se proporciona un proceso anticancerígeno en el que los tumores resistentes a los agentes disponibles se infiltran de manera segura mediante repeticiones del tratamiento (por ejemplo, a diario) para conferir 1) atrapamiento de quimioterapia potente dentro del tejido canceroso, y 2) destrucción del parénquima maligno de una manera valorable.

La inhibición prolongada de células dianas se promueve mediante la inyección directa del profármaco en las células diana en una formulación de liberación sostenida. La liberación prolongada de profármaco promueve la inhibición de tumores con una fracción de crecimiento baja.

Una enzima operativa en el presente documento es una purina nucleósido fosforilasa (PNP) o nucleósido hidrolasa (NH) no humana tal como la obtenida de *E. coli*, *Trichomonas vaginalis*, o incluso cualquier otra PNP no humana que pueda convertir un sustrato de profármaco para producir una base de purina citotóxica. Las nucleósido hidrolasas que no están en el huésped junto con un profármaco adecuado se consideran también operativas en el presente documento como base para poner en práctica la presente invención. El profármaco, a través de la escisión con hidrolasa, se selecciona para producir un compuesto de citotoxicidad comparativamente más alta. Se aprecia además que PNP e hidrolasas mutantes, tales como las que se detallan en el documento US 7.488.598, son operativas en el presente documento para generar una base de purina citotóxica a partir del profármaco y son adecuadas para inhibir la función celular, tal como la reproducción e incluso destrucción de aquellas células de un sujeto humano que se han transfectado o están simplemente en proximidad a la enzima. Se aprecia que una enzima tal como se usa en el presente documento proporciona una base de purina citotóxica de potencia suficiente para generar un efecto vecinal, inhibiendo de ese modo las células transfectadas, las células transducidas, así como las células vecinales.

Tal como se usa en el presente documento "proximidad" pretende significar introducción directamente en una masa de tejido definida, tal como, por ejemplo, una masa tumoral, así como adyacente a una célula diana dentro de una separación de aproximadamente 50 diámetros de células adyacentes o separación lineal equivalente y preferiblemente dentro de 20 diámetros de células adyacentes o separación lineal equivalente.

Un profármaco operativo en el presente documento tiene el atributo de ser relativamente no tóxico en las células en cuestión aunque tras escisión enzimática del profármaco produce una base de purina citotóxica. En la técnica se conocen profármacos representativos (Ungerechts *et al.* Cancer Res. 2007; 67: 10939-10947; Fu *et al.* Cancer Gene Ther. 2008; 15: 474-484; Fu *et al.* Cancer Sci. 2008; 99: 1172-1179; Parker *et al.* Cancer Gene Therapy In press; Gadi *et al.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003; 304: 1280-1284; Hong *et al.* Cancer Res. 2004; 64: 6610-6615; *et al.* Biochem. Pharmacol. 1998; 55: 1673-1681; Martiniello-Wilks *et al.* Human Gene Therapy 1998; 9: 1617-1626; Mohr

et al. Hepatology 2000; 31: 606-614; Voeks *et al. Gene Therapy* 2002; 9: 759-768; Martiniello-Wilks *et al. J. Gene Med.* 2004; 6: 1343-1357; Parker *et al. Cancer Gene Therapy* 2003; 10: 23-29; Parker *et al. Human Gene Therapy* 1997; 8: 1637-1644; Martiniello-Wilks *et al. J. Gene Med.* 2004; 6: 43-54). Aunque los siguientes datos detallan el funcionamiento de la presente invención en el contexto de F-dAdo y F-araAMP, se aprecia que estos resultados pueden extenderse a otros profármacos.

Se selecciona un modelo de glioma humano D54 para investigar la seguridad y eficacia de PNP/F-araAMP de *E. coli* por varios motivos. En primer lugar, los tumores D54 en ratones son resistentes a agentes quimioterápicos convencionales, incluyendo compuestos tales como BCNU que están clínicamente aprobados para el tratamiento de glioma humano. En segundo lugar, el modelo de D54 crece relativamente lento en ratones (tiempo de duplicación de 10 a 15 días), y proporciona un medio para someter a prueba si un enfoque destruye tanto células tumores en división como sin división. Debido a que los programas de administración de F-araAMP descritos a continuación se administran a lo largo de un periodo de tres días, la regresión o cura completa establece la destrucción del compartimento no proliferativo de una masa tumoral. En tercer lugar, los gliomas humanos han sido una diana para las pruebas clínicas de GDEPT. Los tumores humanos D54 son muy resistentes a intervenciones basadas en quimioterapia, radioterapia y terapia génica convencional. Debe indicarse que aunque se selecciona un modelo de glioma para el presente análisis, el mecanismo establecido de destrucción celular mediante bases de purina tales como F-Ade u otros profármacos (alteración de la síntesis de ARN y proteína) es activo contra diversos tipos de células malignas. (Parker *et al. Biochem. Pharmacol.* 1998; 55: 1673-1681). Los experimentos a continuación describen la destrucción de células tumorales latentes tras o bien transducción lentiviral o bien administración de genes adenovirales. Se aprecia que otros tumores incluyendo DU145, así como otros numerosos vectores de transferencia de genes y sustratos de profármaco para enzimas codificadas son operativos en el presente documento.

Para explorar la amplitud y eficacia de la terapia de la invención, también se estudia la línea celular de adenocarcinoma de pulmón de células pequeñas NCI-H322M. Los protocolos de quimioterapia y radioterapia convencionales proporcionan a los enfermos de este cáncer una supervivencia a los cinco años de menos del 15%. NCI-H322M comparte muchos de los atributos del glioma humano D54 porque los tumores son generalmente resistentes a terapias convencionales. La capacidad de la presente invención para destruir tanto células NCI-H322M en división como sin división demuestra la generalidad de la invención reivindicada como capaz de destruir o de otro modo inhibir la función celular en una variedad de tipos de células diana.

La presente invención detalla un procedimiento para generar un agente citotóxico muy potente específicamente dentro de un volumen de células dianas en general y específicamente en parénquima tumoral. La estrategia de la invención se ha demostrado segura basándose en el radio limitado de difusión de F-Ade tras la generación dentro de una masa tumoral y dilución extensa (hasta niveles de F-Ade no medibles en suero) tras la liberación de células tumorales moribundas y confiere destrucción vecinal *in vivo* constante. El mecanismo de la invención de la actividad antitumoral también difiere fundamentalmente de todos los demás enfoques de GDEPT. La actividad antitumoral de F-Ade se debe a alteración de la síntesis de ARN y proteína, lo que provoca la destrucción de tanto células tumorales en división como sin división. (Parker *et al. Biochem. Pharmacol.* 1998; 55: 1673-1681.) El hallazgo de que los tumores D54, NCIH322M o DU145 de crecimiento relativamente lento se reducen en masa en tres días de tratamiento intratumoral (véase en particular la figura 2C, así como las figuras 5A, 5B, y 7B) indica actividad contra tanto células tumorales tanto que experimentan ciclos como que no *in vivo*.

La inyección intratumoral de F-araAMP de la presente invención minimiza la exposición sistémica al profármaco y maximiza los niveles de fármaco dentro de la masa de células dianas tal como un tejido tumoral en sí mismo. La actividad antitumoral pronunciada después de la inyección intratumoral de F-araAMP u otros profármacos se indica en el establecimiento de la expresión de PNP o NH. La combinación de Ad/PNP con inyección intratumoral de F-araAMP se indica en el presente documento que es significativamente más eficaz que Ad/PNP seguido por F-araAMP sistémica según la presente invención. Se indica que la inyección de profármacos es eficaz cuando se administra en un único bolo con PNP o NH, o en inyecciones temporalmente desplazadas en relación con la presencia de enzimas PNP o NH no humanas en el parénquima.

Estos resultados sugieren un medio sencillo para aplicar una estrategia comparable en sujetos humanos y sin la necesidad de modificar el tropismo del vector, la destrucción de células vecinales potenciada o el redireccionamiento. Tanto el vector adenoviral como F-araAMP se han estudiado exhaustivamente en ensayos clínicos anteriores. Además, las dosis de F-araAMP administradas como terapia local para tratar tumores de 300 mg en ratones (de 3 a 24 mg administrados 3 veces) son mucho menores que la cantidad de F-araAMP administrada rutinariamente como parte de la atención clínica convencional en seres humanos (~ 40 mg por dosis x 5 dosis diarias administradas cada 4 semanas). La presente invención proporciona una modalidad terapéutica en la que se administran repetidamente Ad/PNP seguido por F-araAMP a tumores accesibles mediante aguja (próstata, mama, cabeza y cuello, o con guía radiológica, otras masas tumorales) de manera frecuente (por ejemplo, diariamente) para destruir secuencialmente grandes regiones de un tumor al tiempo que se minimiza la exposición sistémica a o bien F-araAMP, F-Ade o bien otro profármaco escindido por PNP. Un enfoque de "apuntar y suprimir" es factible específicamente para el enfoque de GDEPT de PNP debido a la potente actividad antitumoral de F-Ade y su alta actividad vecinal, junto con la actividad contra las células tumorales que no proliferan. La generación intratumoral de F-Ade debe proporcionar un medio para concentrar el agente de manera intratumoral y minimizar la exposición

sistémica en el huésped.

La radioterapia se dirige principalmente a células tumorales en división activa, pero no logra suprimir tejidos tumorales latentes, particularmente en áreas de necrosis (Puhlmann *et al.* Human Gene Therapy 1999; 10: 649-657). La presente invención proporciona una potenciación de la radioterapia en combinación con profármaco de PNP o NH. En el presente documento se proporcionan agentes anticancerígenos muy potentes que funcionan a través de un mecanismo distinto de XRT para tratar el compartimiento que no experimenta ciclos de neoplasias malignas sólidas. F-Ade, que destruye de manera potente tanto células tumorales en división como sin división, es un compuesto preferido a este respecto. Los tumores comunes a los que se administra radioterapia antes de la resección quirúrgica (glioma, mama, próstata, cabeza y cuello, pulmón y otros cánceres tratados con intención curativa o paliativa) también se benefician de una terapia de combinación de la invención.

En el método de la invención descrito anteriormente, las células de mamífero que van a destruirse pueden ser células tumorales. Células que comprenden cualquier tumor sólido, ya sea maligno o no, pueden destruirse mediante el presente método basándose en la capacidad de transferir o expresar el gen de PNP o NH de manera selectiva a al menos un pequeño porcentaje de células que comprenden el tumor. Por ejemplo, se ha demostrado que la inyección intravenosa de liposoma que porta ADN puede mediar en la expresión dirigida de genes en determinados tipos de células. El direccionamiento de un gen de PNP o NH o la expresión del gen a una pequeña fracción de las células en una masa tumoral seguido por la administración del sustrato podría ser adecuada para mediar en la involución. (Zhu *et al.* Science 261:209-211, 1993). A través del efecto vecinal sustancial y la destrucción de células sin división demostrados en los ejemplos, el presente método puede destruir el tumor. Aunque, en el método ejemplificado, las células de mamífero son células de glioma humano, adenocarcinoma de pulmón de células no pequeñas o de próstata, puede apreciarse que los métodos enseñados en este documento pueden aplicarse a otras células y puede determinarse su susceptibilidad a los presentes métodos tal como se enseña

Se proporciona un medicamento para destruir o inhibir de otro modo la función de cualquier volumen deseado de células diana de un sujeto. La amplia aplicabilidad de la presente invención para destruir o inhibir de otro modo la función de las células proporciona a los profesionales clínicos un control superior de la administración, así como perfiles de curación mejorados con respecto a una variedad de procedimientos convencionales. La presente invención proporciona una alternativa de supresión celular química a los procedimientos que involucran cauterización, extirpación. Se ha observado sorprendentemente que la supresión celular química proporcionada por la presente invención excluye la granulación y la escarificación asociadas con técnicas de cauterización, radiosupresión o extirpación, proporcionando de ese modo un tejido curado superior alrededor del sitio de la supresión química y, como resultado, la presente invención tiene usos en el tratamiento de arritmia cardíaca, reducción de quistes, tratamiento de ganglios, esterilización masculina, procedimientos dermatológicos cosméticos y tratamiento de melanoma. Se aprecia que la supresión celular química según la presente invención se realiza fácilmente mediante la administración de la enzima PNP o NH, genes que expresan cualquier forma de un vector viral tal como se detalla en el presente documento; junto con administración proximal de un profármaco para la PNP o NH. Basándose en la ubicación de las células diana para la supresión celular química, el medicamento de la invención se administra por medio de un catéter, una microjeringa, una cánula o una jeringa; así como por vía tópica en una base de crema. Preferiblemente, la enzima PNP o NH se expresa de manera intracelular.

Se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica para una purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa no humana o humana genéticamente modificada en una célula de mamífero en la presente invención. Más específicamente, la invención proporciona un ácido nucleico aislado que codifica para una PNP de *E. coli* en una célula de mamífero. Por "aislado" quiere decirse separado de otros ácidos nucleicos encontrados en el organismo que se produce de manera natural a partir del cual se obtiene el gen de PNP.

Tal como se describió anteriormente, en una realización preferida, la PNP o NH usada en los presentes métodos puede incluir PNP o NH humana genéticamente modificada o de mamífero no humano que puede reaccionar con un sustrato que la PNP o NH nativa en la célula que va a destruirse no reconocerá o reconoce muy escasamente. Por tanto, los ácidos nucleicos de la invención que codifican para la PNP o NH de la invención están presentes en células en las que no se encuentran de manera natural, o bien porque son de un organismo diferente o bien porque se han modificado de su estado natural. Los requisitos clave de los ácidos nucleicos que codifican para la PNP o NH es que deben codificar para una enzima funcional que pueda reconocer y actuar sobre un sustrato que no reconoce bien la PNP o NH nativa de la célula.

También se proporciona un vector de transferencia eucariota que comprende un ácido nucleico que codifica para una purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa no humana o genéticamente modificada. El vector debe poder transducir o transfectar al menos algún porcentaje de las células seleccionadas como diana. El vector de transferencia puede ser cualquier construcción de nucleótido usada para suministrar genes a células (por ejemplo, un plásmido), o como parte de una estrategia general para suministrar genes, por ejemplo, como parte de retrovirus o adenovirus recombinante (Ram *et al.* Cancer Res. 53:83-88, 1993). Los ejemplos proporcionan un vector lentiviral o adenoviral que contiene un ácido nucleico que codifica para PNP.

El vector de la invención puede estar en un huésped que puede expresar una PNP o NH funcional. Tal como se usa

en el método de la invención, la célula huésped es la célula que va a destruirse, que expresa la PNP o NH y se destruye mediante el producto tóxico de la reacción de la enzima y el profármaco que es un sustrato enzimático. Se proporciona un método para determinar la susceptibilidad en los ejemplos que enseñan protocolos para la transfección de células huésped, y demuestran la expresión de PNP y la toxicidad en las células huésped en presencia de sustrato. Alternativamente, la enzima activa o proenzima de la misma se administra a una masa de células diana.

Además de los presentes métodos de transferencia génica, el producto génico de PNP también puede suministrarse selectivamente a las células tumorales mediante varios mecanismos diferentes y esta PNP podría usarse para producir F-Ade en el sitio del tumor.

Por ejemplo, la enzima PNP o NH puede unirse a cualquier anticuerpo monoclonal deseado e inyectarse en el paciente o bien por vía sistémica o bien en proximidad a las células diana. Después de dejar suficiente tiempo para el aclaramiento de todas las PNP o NH conjugadas con anticuerpo monoclonal que no se ha unido a las células diana, el paciente se trata con una inyección directa del profármaco, tal como F-araAMP, que se escinde a F-Ade sólo en el sitio seleccionado como diana. Un procedimiento de este tipo requiere sólo la disponibilidad de un anticuerpo monoclonal apropiado. Los procedimientos usados para conjugar proteínas con anticuerpos monoclonales específicos de diana están disponibles de manera rutinaria. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas a tejido tumoral (Senter *et al.* Bioconjugate Chem. 2:447-451, 1991; Bagshawe *et al.* Br. J. Cancer 60:275-281, 1989; Bagshawe *et al.* Br. J. Cancer 58:700-703, 1988; Senter *et al.* Bioconjugate Chem. 4:3-9, 1993; Battelli *et al.* Cancer Immunol. Immunother. 35:421-425, 1992; Pietersz y McKenzie Immunolog. Reviews 129:57-80, 1992; y Roffler *et al.* Biochem. Pharmacol 42:2062-2065, 1991). Pueden seleccionarse otros ligandos, además de los anticuerpos monoclonales, por su especificidad para una célula diana y pueden someterse a prueba según los métodos enseñados en el presente documento.

También es posible atrapar proteínas en liposomas y dirigirlas a tejidos específicos. El producto génico de PNP o NH puede, por tanto, administrarse selectivamente a una masa tumoral usando liposomas dirigidos. Después de que todos los liposomas no dirigidos se aclaren de la sangre, el paciente se trata con F-araAMP, que se escinde en F-Ade mediante la PNP sólo en el sitio seleccionado como diana. Una vez más, este procedimiento requiere sólo la disponibilidad de un vehículo de direccionamiento adecuado. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas a tejido tumoral (Hughes *et al.* Cancer Research 49:6214-62210, 1989; y Litzinger y Huang Biochimica et Biophysica Acta 1104:179-187, 1992).

Un profármaco que representa un sustrato enzimático para una PNP o NH que no están en el huésped se inyecta directamente en la masa de células diana como, por ejemplo, de manera intratumoral en un portador farmacéuticamente aceptable tal como, por ejemplo, solución salina o DMSO, o alternativamente, se encapsula para modificar la estabilidad y/o características terapéuticas del profármaco. Un profármaco de la invención se administra fácilmente como un gel, pasta o se encapsula dentro de micropartículas. Se aprecia que tales portadores para profármacos se usan fácilmente para proporcionar una liberación prolongada del profármaco, difusión modificada dentro de la masa de células diana y capacidad de almacenamiento en comparación con disolución en una solución salina. Con respecto a las micropartículas, las tasas de liberación de un profármaco de la invención se extienden fácilmente a más de una semana, más de dos semanas, incluso más allá de seis semanas. (Zentner *et al.*, J. control release 72 (1-3): 203-215, 2001). Un profármaco de la invención se prepara fácilmente y se inyecta en una pasta de poli(ácido láctico), poli(épsilon-caprolactona), o una combinación de los mismos (Jackson *et al.*, Cancer research 60 (15): 4146-4151, 2000). Los profármacos también se encapsulan adecuadamente dentro de microesferas de una variedad de materiales incluyendo poli(ácido láctico), poli(épsilon-caprolactona), polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa y otros polisacáridos (Harper *et al.* Clin. Canc. Res. 5:4242-4248, 1999; Dordunno *et al.*, Cancer Chemother. Pharmacol. 36: 279-282, 1995; Bert *et al.*, Cancer Lett. 88:73-78, 1995). Se aprecia que con una formulación de liberación controlada de un profármaco, se inyectan dosis mayores de profármaco en una masa de células diana con menos frecuencia para lograr una inhibición celular prolongada y efecto vecinal.

La presente invención se detalla adicionalmente con respecto a los siguientes ejemplos no limitativos. No se pretende que estos ejemplos limiten el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1. Estudios con xenoinjertos de tumores humanos en ratones. Se inyectan células tumorales D54MG (glioma humano) que expresan PNP parental y de *E. coli* (2×10^7 células) por vía subcutánea en los costados de ratones desnudos (*nu/nu*) adquiridos de Charles River Laboratories (Wilmington, MA). Se preparan células tumorales D54 transducidas de manera estable con PNP de *E. coli* tal como se describió anteriormente (Parker *et al.* Cancer Gene Therapy junio de 2011; 18 (6):390-8). Se miden los tumores con calibres y se calcula una estimación del peso usando la ecuación $(\text{longitud} \times \text{anchura}^2)^2 = \text{mm}^3$, y se convierte en mg suponiendo densidad unitaria. A menos que se establezca lo contrario, se inyectan fármacos terapéuticos y el vector adenoviral que expresa PNP de *E. coli* (Ad/PNP) en tumores D54 en volúmenes de 150 μl en 8 inyecciones diferenciadas de aproximadamente 20 μl cada una en un esfuerzo por distribuir uniformemente el agente administrado. Cada rama de tratamiento de cada grupo contenía al menos 6 ratones. Los ratones se monitorizan diariamente para determinar la pérdida de peso y dos

veces a la semana para determinar las dimensiones del tumor. T-C (retardo del crecimiento tumoral) se toma como la diferencia en días a 2 duplicaciones entre grupos tratados con fármaco y tratados con solución salina. Se usa el tiempo hasta el punto de evaluación para cada animal (2 duplicaciones) como el punto final en una prueba de la t de Student, la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney o un análisis de tabla de vida con el fin de comparar estadísticamente los datos de crecimiento entre grupos de tratamiento. Todos los procedimientos se realizan según un protocolo aprobado por la IACUC de Southern Research Institute. F-araAMP se obtiene de Schering A.-G. (Berlín, Alemania). En este y ejemplos posteriores, F-Ade se obtiene de General Intermediates of Canada, Inc. (Edmonton, Alberta, Canadá). Se inician los tratamientos cuando los tumores son de 250 a 300 mg (~1-1,5% del peso total del animal).

5 Ejemplo 2. Medición de la actividad de PNP de *E. coli*. Se verifica la proporción de células transducidas lentivirales en una masa tumoral midiendo la actividad de PNP de *E. coli* en cánceres representativos extirpados de ratones el primer día de tratamiento farmacológico. Se preparan extractos de bruto tal como se describió anteriormente (Parker *et al.* Human Gene Therapy 1997; 8: 1637-1644) tras la extirpación del tumor de los costados de ratones. Se incuban los extractos con PO₄ 50 mM, 6-metilpurina-2'-desoxirribosida 100 μM (MeP-dR) y tampón HEPES 100 mM (pH 7,4) a una concentración de extracto que dio como resultado una reacción lineal a lo largo del periodo de incubación. La formación de MeP se monitoriza usando HPLC de fase inversa. Por convención, una unidad de actividad de PNP se define como la cantidad de extracto necesaria para escindir 1 nmol de MeP-dR por mg de proteína en un periodo de 1 hora.

10 Ejemplo 3. Monitorización del metabolismo intratumoral de F-araAMP. Se determina la radiactividad total tras la inyección de 3 mg de [8-³H]F-araAMP (10 μCi) en tumores de los costados D54 de 300 mg. Se obtiene [8-³H]F-araAMP de Moravek Biochemicals Inc. (Brea, CA). Se extirpan tumores de los ratones a los 10 minutos o 4 horas tras la inyección y se disuelven en 1 ml de Soluene 350 (Packard Instrument, Meriden, CT) incubando a 55°C durante 4 horas. Se mezcla una porción de cada extracto con fluido de centelleo y se determina la radiactividad.

15 Ejemplo 4. Efecto de diferentes programas de fosfato de fludarabina (F-araAMP) sobre tumores D54 que expresan PNP de *E. coli* en el 5% de las células. Se mezclan células tumorales D54 parentales con células tumorales D54 transducidas de manera estable con PNP de *E. coli* mediante un lentivirus de modo que el 5% de la mezcla expresaba el transgén de PNP. Se inyecta por vía subcutánea esta mezcla 95/5 en los costados de ratones desnudos. El tratamiento intraperitoneal con F-araAMP (250 mg/kg una vez al día durante 3 días consecutivos; 167 mg/kg 3 veces al día durante 3 días consecutivos; 100 mg/kg 5 veces al día durante 3 días consecutivos; o control de vehículo 5 veces al día x 3 días) empezó el día 17 cuando los tumores son de aproximadamente 250 mg. La actividad de PNP de *E. coli* en los tumores en el momento del tratamiento (día 17) es de 2.500 ± 400 unidades. El crecimiento tumoral en todos los grupos de tratamiento con F-araAMP es significativamente diferente que en el grupo tratado con vehículo P < 0,001. (Figura 1).

20 La figura 1 representa la actividad antitumoral de PNP de *E. coli* más fosfato de fludarabina (F-araAMP) cuando el 5% de las células tumorales (transducidas con el gen antes de la implantación) expresan la enzima recombinante. La administración intraperitoneal (sistémica) de F-araAMP (100 mg/kg administrados 15 veces, 167 mg/kg administrados 9 veces o 250 mg/kg administrados 3 veces) conduce a regresiones completas de todos los tumores y cura a todos los ratones. Se ha demostrado previamente que los tumores D54 parentales (es decir sin PNP de *E. coli*) no son sensibles al tratamiento con F-araAMP y que las regresiones tumorales con F-araAMP en este entorno presentan dependencia de la dosis en la fracción de células tumorales que expresan PNP de *E. coli* (Hong *et al.* Cancer Res. 2004; 64: 6610-6615; Parker *et al.* Human Gene Therapy 1997; 8: 1637-1644; véase también a continuación). Tumores en los que el 100% de células se transducen con PNP de *E. coli* y tumores no transducidos (parentales) crecen a velocidades similares (Hong *et al.* Cancer Res. 2004; 64: 6610-6615), lo que sugiere que un ~5% del nivel de transducción se mantendría en toda la expansión del modelo de tumor. Para verificar esta afirmación, se preparan extractos de tumor a partir de tres tumores representativos tomados de ratones el primer día de tratamiento farmacológico y se determinaron que los niveles de PNP de *E. coli* eran de 2.500 ± 400 unidades. La actividad de PNP de *E. coli* de 126.000 unidades está presente en tumores compuestos por el 100% de células que expresan PNP de esta línea celular (Hong *et al.* Cancer Res. 2004; 64: 6610-6615). Los hallazgos sugieren, por tanto, que en este experimento particular las células parentales (sin expresión de PNP) crecieron ligeramente más rápido que la línea transducida con PNP *in vivo*, y confirman que el porcentaje de transducción descrito en la figura 1 es ≤ 5%, y quizás más próximo al 2-3%.

25 Los resultados mostrados en la figura 1 establecen que pueden lograrse de manera segura regresiones completas o curas de grandes tumores (aproximadamente el 1% del peso corporal total del animal) mediante una estrategia basada en GDEPT de PNP intraperitoneal. Los hallazgos también demuestran excelente actividad vecinal *in vivo*. Tan solo tres inyecciones intraperitoneales (IP) de F-araAMP instantáneas (liberación no sostenida) conducen a destrucción de tumores grandes, aunque ≤ 5% de las células expresan el gen de activación. Además, el tratamiento con F-araAMP da como resultado sólo de un 10 a un 20% de disminución del peso corporal, que se recupera rápidamente después de que se complete el programa de F-araAMP. No hay daño tisular macroscópico en la región inmediatamente circundante al tumor u otra evidencia de secuelas no deseadas a pesar de una prolongación sustancial de la vida. Una única inyección por vía i.p. de 3x dosis de F-araAMP al 30% en peso en microesferas de poli(ácido láctico) logra un efecto similar.

Ejemplo 5. Inyección intratumoral de F-araAMP en tumores D54. En la figura 2A, se mezclan células tumorales D54 parentales con células tumorales D54 que se habían transducido con PNP de *E. coli* hasta una proporción final en la que el 10% expresan el transgén. Se inyecta por vía subcutánea esta mezcla 90/10 en los costados de ratones desnudos. Se inyectan los tumores una vez al día durante 3 días consecutivos empezando el día 14 con 150 μ l de solución salina, 1,5 mg de F-araAMP disueltos en solución salina o 3 mg de F-araAMP se disuelven en solución salina. La actividad de PNP de *E. coli* en los tumores en el momento del tratamiento (día 14) es de 14.300 ± 2.600 unidades. El crecimiento tumoral en el grupo de tratamiento con 3 mg es significativamente diferente que el del grupo tratado con vehículo ($P < 0,001$) pero no es significativamente diferente que el del grupo de tratamiento con 1,5 mg ($P = 0,458$). En la figura 2B, se inyectan por vía subcutánea células tumorales D54 parentales (sin expresión de PNP de *E. coli*) en los costados de ratones desnudos. Se inoculan los tumores una vez al día durante 3 días consecutivos empezando el día 14 con 150 μ l de solución salina, 3 mg de F-araAMP se disuelven en solución salina, 0,15 mg de F-Ade disueltos en solución salina, 1,26 mg de F-Ade disueltos en 150 ml de DMSO, 0,63 mg de F-Ade disueltos en DMSO o DMSO. Este experimento se repite con una única inyección de 9 mg de F-araAMP al 30% en peso en microesferas de poli(ácido láctico) en solución salina con resultados similares. El crecimiento tumoral en ratones tratados con 0,63 ó 1,26 mg de F-Ade disuelto en DMSO es significativamente diferente que el del grupo de tratamiento con vehículo DMSO ($P = 0,011$ y $0,002$, respectivamente).

En la figura 2A, se muestra que la inyección de F-araAMP en tumores en los que el 10% de las células expresan PNP de *E. coli* tiene un fuerte efecto antitumoral. Obsérvese que la dosis de F-araAMP en este experimento está considerablemente por debajo de la dosis máxima tolerada y que se realizan inyecciones adicionales con mayor actividad antitumoral. En la dosis baja de F-araAMP, la actividad de PNP en los tumores 45 días tras el tratamiento con F-araAMP es de 1.250 unidades, mientras que en el momento del tratamiento la actividad de PNP en los tumores es de 14.300 unidades. Este resultado indica que el tratamiento con F-araAMP destruyó preferiblemente células que expresan PNP de *E. coli*, lo que sugiere que la actividad antitumoral depende de la expresión de PNP de *E. coli*. La cantidad de F-araAMP inyectada es de 120 mg/kg que es mucho menor que la dosis máxima tolerada en este programa (750 mg/kg, qldx3). Se observan mejores resultados a dosis superiores de F-araAMP cuando se disuelve en DMSO; figura 2C.

Ejemplo 6. Inyección intratumoral de F-araAMP en células tumorales D54 con y sin PNP. En las figuras 2B, 2D y 3 se muestra que la inyección intratumoral directa de F-araAMP en tumores en los que ninguna célula expresa actividad de PNP de *E. coli* no tiene efecto de crecimiento tumoral. Este resultado indica que la actividad antitumoral de F-araAMP mostrada en las figuras 2A, 2C y 4 se debe a la expresión de PNP de *E. coli* en un subconjunto de las células tumorales. La actividad antitumoral de F-Ade (el metabolito activo de F-araAMP) también se inyecta en tumores de la misma manera que F-araAMP. 0,15 ml de F-Ade 1 mg/ml disueltos en agua (límite de solubilidad) no muestra efecto antitumoral. Se inyectan en tumores 0,15 ml de F-Ade 8,6 mg/ml disueltos en DMSO; se observa un efecto antitumoral moderado.

Estos resultados indican que un producto que contiene tanto un vector (para administrar PNP de *E. coli*) como F-araAMP de liberación temporal es eficaz en el tratamiento de cánceres locales que serían de otro modo intratables. Al menos una inyección de este producto inhibiría el metabolismo o incluso destruiría cualquier célula que exprese PNP de *E. coli* más muchas células vecinales con toxicidades sistémicas reducidas asociadas con F-araAMP. Esto se repite tantas veces como sea necesario para suprimir una masa tumoral. Por ejemplo, a un paciente se le inyecta una vez por semana de manera ambulatoria con toxicidad reducida hasta que el tumor se elimina completamente. Múltiples inyecciones intratumorales de F-araAMP dieron como resultado mayor actividad antitumoral (figura 4).

Puesto que sólo una fracción de F-araAMP inyectado por vía i.p. perfunde realmente en un tumor maligno *in vivo*, se somete a prueba si inyectar F-araAMP directamente en la masa tumoral podría potenciar la eficacia. Se muestra un estudio inicial (y se presentó anteriormente) para tumores en los que el 10% de células expresaban PNP de *E. coli* (figura 2A). La inyección intratumoral de 3 mg de F-araAMP por inyección (3 inyecciones totales) confiere efectos antitumorales significativos ($p < 0,001$ con poca o ninguna pérdida de peso (menos del 4%); mientras que F-araAMP no tiene efecto cuando se inyecta en tumores parentales (sin expresión de PNP de *E. coli*) (figura 2B). Debido a que el peso de un ratón es de aproximadamente 0,025 kg, la inyección de 3 mg de F-araAMP es equivalente a una dosis de F-araAMP 120 mg/kg, que es del 25 al 50 por ciento de las cantidades sistémicas totales estudiadas en la figura 1. La inyección de F-Ade (el metabolito activo de F-araAMP) en tumores tampoco provoca actividad antitumoral cuando se somete a prueba a la solubilidad más alta posible en solución salina (figura 2B). F-Ade también se disuelve en DMSO, y tres inyecciones de 1,26 mg de F-Ade (el equivalente molar aproximado de F-Ade en una inyección de 3 mg de F-araAMP) en el tumor dieron como resultado actividad antitumoral mínima (figura 2B; $p = 0,011$ con respecto a ratones a los que se les inyectó vehículo DMSO), pero provocaron una disminución del 10% en el peso corporal. Tres inyecciones intratumorales de o bien 2,5 o bien 5 mg de F-Ade (disuelto en DMSO) condujeron a muerte en 3 de 6 y 4 de 6 ratones, respectivamente, lo que indicó que 1,26 mg está muy cerca de su dosis máxima tolerada (MTD). Los resultados, por tanto, demuestran que al contrario que F-araAMP intratumoral tras expresión intratumoral de PNP de *E. coli*, la inyección intratumoral directa de F-Ade tiene poca eficacia antitumoral.

Tal como se indicó anteriormente, la cantidad de F-araAMP administrada de manera intratumoral (en la figura 2A) es menos que la dosis intraperitoneal total descrita en la figura 1. Con el fin de investigar el impacto de dosis mayores de F-araAMP, el F-araAMP se disuelve en DMSO, y se administra a concentraciones bien toleradas de manera

intratumoral, pero muy por encima de la dosis máxima tolerada si se administra por vía i.p. (Hong *et al.* Cancer Res. 2004; 64: 6610-6615). Se administran tres dosis de 6 ó 24 mg mediante inyección intratumoral a tumores en los que el 10% de las células expresaban PNP de *E. coli* (figura 2C). Se inyectan por vía subcutánea células tumorales D54 parentales o mezclas de células tumorales D54 en las que el 10% de las células expresan PNP de *E. coli* en los costados de ratones desnudos. Se inyectan los tumores una vez al día durante 3 días consecutivos empezando el día 17 con 150 μ l de DMSO, 24 mg de F-araAMP en DMSO o 6 mg de F-araAMP en DMSO. La actividad de PNP de *E. coli* en los tumores D54 en los que el 10% de las células expresan PNP de *E. coli* (el día 17) es de 8.600 ± 620 unidades. El crecimiento tumoral en los ratones que portan tumores con PNP y tratados con 6 ó 24 mg de F-araAMP es significativamente diferente al del grupo tratado con vehículo ($P = 0,014$ y $< 0,001$, respectivamente), pero no son significativamente diferentes entre sí en este experimento. Tres de los 6 tumores tratados con 24 mg de F-araAMP se ulceraron (días 17, 21 y 24), requiriendo el sacrificio de los animales de estudio. Los 3 tumores restantes remitieron completamente y los ratones permanecieron libres de tumores hasta que el experimento se terminó el día 70. No hubo ulceraciones en los tumores tratados con 6 mg de F-araAMP, y un único transcurso de este tratamiento condujo a regresiones robustas del tumor y un efecto antitumoral prolongado. La inyección de F-araAMP a la dosis más alta dio como resultado una disminución moderada (7%) del peso corporal, que se recuperó rápidamente tras la finalización del tratamiento farmacológico. La inyección de F-araAMP a estas dosis en tumores parentales (sin expresión de PNP) no dio como resultado actividad antitumoral.

Ejemplo 7. Efecto de F-araAMP y Ad/PNP intratumoral sobre tumores D54. Se ha demostrado actividad antitumoral moderada tras inyección intratumoral (IT) de un vector adenoviral de replicación deficiente que expresa PNP de *E. coli* (Ad/PNP) seguido por tratamiento sistémico con F-araAMP (Hong *et al.* Cancer Res. 2004; 64: 6610-6615). Basándose en la robusta actividad demostrada en la figura 2C cuando se administran altas dosis de F-araAMP de manera intratumoral, se investiga la actividad antitumoral de Ad/PNP más F-araAMP cuando ambos de estos componentes se inoculan directamente en una masa tumoral (figura 5A). En el experimento mostrado, se administran 2×10^{11} VP de Ad/PNP de manera intratumoral dos veces al día durante 3 días (días 15, 16 y 17) para un total de 6 inyecciones. Los tumores se inoculan posteriormente con 24 mg de F-araAMP una vez al día los días 20, 21 y 22. La actividad de PNP de *E. coli* en los tumores el día 20 (el primer día de tratamiento con F-araAMP) es de 7.500 ± 2.000 unidades, que es similar a lo observado para tumores en los que del 5 al 10% de las células expresaban de manera estable la enzima (2.500, 14.300 u 8.600 unidades) y dentro del intervalo para el cual se espera actividad antitumoral robusta atribuible a F-araAMP intratumoral. Aunque 2 de 10 ratones tratados con Ad/PNP más F-araAMP murieron, hay un excelente efecto antitumoral en los 8 ratones supervivientes que experimentaron un 17% de pérdida de peso durante el tratamiento que después se resolvió. Debido a la evidencia de toxicidad observada en el experimento mostrado en la figura 5A, el estudio se repite a una dosis reducida de F-araAMP (18 mg/inyección). Con este esquema, no hubo muertes relacionadas con el fármaco en el grupo de tratamiento, y aunque los pesos corporales murinos no disminuyeron, se observa actividad antitumoral prolongada hasta el día 71 tras el implante (figura 5B). La actividad de PNP de *E. coli* en los tumores de este experimento es de 1.900 ± 1.500 unidades. Los resultados establecen que la inyección intratumoral de Ad/PNP seguida por F-araAMP intratumoral puede provocar un efecto de remisión sustancial sobre tumores sólidos por lo demás resistentes que es superior al observado tras inyección intratumoral de Ad/PNP seguida por F-araAMP intraperitoneal (Hong *et al.* Cancer Res. 2004; 64: 6610-6615).

La inyección de tumores con tanto Ad/PNP más dosis superiores de F-araAMP tuvo un efecto drástico sobre el crecimiento tumoral (figuras 5A y 5B), que es superior a Ad/PNP más F-araAMP sistémico.

Ejemplo 8. Efecto de F-dAdo frente a F-araAMP. Se inyecta F-dAdo o F-araAMP 3 veces en tumores D54 en volúmenes de 150 μ l en 8 inyecciones diferenciadas de aproximadamente 20 μ l cada una. En la figura 5A, se tratan de manera intratumoral tumores de glioma humano D54 parentales con vehículo (círculos negros), Ad/PNP (círculos blancos), F-araAMP (triángulos rellenos) o Ad/PNP más F-araAMP (triángulos blancos). Se inyecta Ad/PNP (2×10^{11} VP) dos veces al día durante 3 días consecutivos empezando el día 15. Se inyectan veinticuatro mg de F-araAMP disueltos en DMSO en tumores una vez al día durante 3 días consecutivos empezando el día 20. Los tumores en ratones tratados con vehículo se inyectan 6 veces con solución salina seguido por 3 inyecciones de DMSO (por lo demás tal como se describió anteriormente). La actividad de PNP de *E. coli* en los tumores D54 (el día 20) es de 7.500 ± 2.000 unidades de PNP. Cada rama de tratamiento contiene 10 ratones. En la rama de tratamiento combinado, dos de diez ratones se pierden antes de la finalización. Cuatro de los ocho ratones restantes están libres de tumores el día 65, dos ratones tienen pequeños tumores (63 y 288 mg) y dos ratones tenían tumores en crecimiento (1666 y 1584 mg). El crecimiento tumoral en ratones tratados con Ad/PNP más F-araAMP es significativamente diferente que el de ratones tratados con F-araAMP o Ad/PNP sólo ($P = 0,010$ y $0,002$, respectivamente). En la figura 5B, los ratones se tratan tal como se describe en la figura 5A excepto porque la dosis de F-araAMP es de 18 mg por inyección. La actividad de PNP de *E. coli* el día 18 en este experimento es de 1900 ± 1500 unidades de PNP. El crecimiento tumoral en ratones tratados con Ad/PNP más F-araAMP es significativamente diferente del de ratones tratados con F-araAMP o Ad/PNP sólo ($P = 0,001$ y $0,011$, respectivamente). Se muestran los datos que usan una fuente alternativa de (Tv)-PNP de *T. vaginalis* en la figura 5C.

Se observan mejores resultados con F-araAMP que con F-dAdo (figuras 6A y 6B) aunque F-dAdo es un sustrato mucho mejor para PNP de *E. coli* que F-araA cuando las células expresan PNP.

Ejemplo 9. Efecto de F-araAMP y Ad/PNP intratumorales sobre tumores DU145 (próstata humana) y tumores NCI-H322M (de pulmón de adenocarcinoma de células no pequeñas humanos). Se realizan inyecciones de F-araAMP y Ad/PNP tal como se detalló anteriormente, con la excepción de que los tumores son ahora DU145 con resultados similares. (Figura 7A). Se realizan inyecciones de F-araAMP y Ad/PNP tal como se detalló anteriormente, con la excepción de que los tumores son ahora H322M con resultados similares. (Figura 7B).

Ejemplo 10. Efecto de la inyección intratumoral de F-araAMP más radiación sobre tumores D54. Los tumores sólidos localmente avanzados a menudo se vuelven resistentes a la radioterapia. Como prueba de PNP de *E. coli* adyuvante en este entorno, se investiga la inyección de F-araAMP junto con radiación de rayos externa. En la figura 8A, a los tumores en los que el 10% de las células expresan PNP de *E. coli* se les administra radiación (determinada previamente para conferir un efecto medible sobre el crecimiento de tumores D54) con o sin tres inyecciones intratumorales de 3 mg de F-araAMP (una dosis que dio como resultado supresión tumoral pero no supervivientes libres de tumores, figura 2A). En la figura 8B, a los tumores en los que el 10% de las células expresan PNP de *E. coli* se les administra radiación (determinada previamente para conferir un efecto medible sobre el crecimiento tumoral D54) con o sin tres inyecciones intraperitoneales sistémicas de 3 mg de F-araAMP (una dosis que dio como resultado supresión tumoral pero no supervivientes libres de tumores, figura 2A). Combinar PNP de *E. coli*/F-araAMP con radioterapia dio como resultado una actividad antitumoral pronunciada, que es mucho mayor que el tratamiento solo. Se observa del diez al catorce por ciento de pérdida de peso en todos los grupos de tratamiento (que se resuelve rápidamente tras la terminación del tratamiento), indicando que las toxicidades de las dos intervenciones no son aditivas. Se obtienen resultados similares con el F-araAMP de liberación sostenida del ejemplo 5.

Se inyectan por vía subcutánea células tumorales D54 en las que el 10% de las células expresaron PNP de *E. coli* en los costados de ratones desnudos. Los tumores se tratan con radiación, F-araAMP o F-araAMP más radiación. En dos grupos de tratamiento, se inyectan en los tumores una vez al día durante 3 días consecutivos 150 μ l de o bien solución salina o bien 3 mg de F-araAMP disueltos en solución salina. En los otros dos grupos de tratamiento, se administra radiación (4 Gy) una vez al día durante 3 días consecutivos 3 horas después de la inyección de 150 μ l de o bien solución salina (cuadrados rellenos) o bien 3 mg de F-araAMP disuelto en solución salina (cuadrados blancos). La actividad de PNP de *E. coli* en los tumores D54 (el día 16) es de 12.000 ± 3.000 unidades. El crecimiento tumoral en ratones tratados con radiación más F-araAMP es significativamente diferente que el de ratones tratados con F-araAMP o radiación sólo ($P = 0,004$ y $< 0,001$, respectivamente) y superior para inyección intratumoral (figura 8A), en comparación con inyección intraperitoneal sistémica (figura 8B).

Ejemplo 11. Radiactividad en tumores D54 tras inyección intratumoral de F-araAMP. En un esfuerzo por comprender la farmacodinámica de F-araAMP intratumoral (IT), se monitorizan los niveles de activación de profármaco en tumores parentales (D54) y tumores en los que el 10% de las células expresaban PNP de *E. coli* (tabla 1). Se recoge tejido tumoral 10 minutos o 4 horas tras la inyección intratumoral de 3 mg de [3 H]-F-araAMP y se determina la cantidad de radiactividad que permanece en la masa tumoral. Diez minutos tras la inyección con F-araAMP, no hay diferencias entre tumores parentales y D54 en los que el 10% de las células expresan PNP de *E. coli*. En 4 horas, la radiactividad en tumores D54 que expresaban PNP de *E. coli* es sustancialmente mayor que la de tumores parentales, lo que representa la cantidad de F-araAMP convertida en metabolitos de F-Ade. El experimento indicó que se generan 190 nmoles de metabolitos de F-Ade y se conservan por gramo de tejido tumoral tras la inyección intratumoral de 3 mg de F-araAMP. Tres mg de F-araAMP es igual a 8200 nmoles, y puesto que los tumores en este experimento son de aproximadamente 0,3 gramos, se conservan aproximadamente 57 nmoles de F-Ade en el tejido tumoral en este experimento, o el 0,7% del F-araAMP total inyectado en el tumor.

Tabla 1

Radiactividad en tumores D54 tras inyección intratumoral de F-araAMP

	nmoles de F-araAMP/gramo de tejido	
	10 min	4 horas
Tumores D54	980 ± 730	31 ± 6
Tumores D54 con el 10% de PNP	1100 ± 990	$220 \pm 75^*$

Se inyectan tres mg (8.200 nmoles) de [3 H]-F-araAMP (10 μ Ci/inyección) en tumores D54 o tumores D54 en los que el 10% de las células expresan PNP de *E. coli* tal como se describe en la figura 2. Se extirpan los tumores (aproximadamente 300 mg) 10 minutos y 4 horas tras la inyección con F-araAMP y se determina la cantidad de radiactividad en cada tumor. Hay 4 tumores por grupo. Este experimento se ha repetido con resultados similares. * Significativamente diferente de tumores D54: $p < 0,02$, prueba de la t de Student apareada.

REIVINDICACIONES

1. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso en la inyección de profármacos para potenciar la eficacia de la radioterapia en el tratamiento de cáncer en el compartimento que no experimenta ciclos de una neoplasia maligna sólida mediante inhibición funcional o destrucción de células seleccionadas como diana que se replican o que no se replican, en la que las células diana definen un tumor.
2. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa se entremezcla con dicho profármaco.
3. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa se administra con un vector viral que contiene un ácido nucleico que codifica para dicha purina nucleósido fosforilasa o dicha nucleósido hidrolasa.
4. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según la reivindicación 3, en la que dicho vector viral es un vector adenoviral.
5. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha purina nucleósido fosforilasa se deriva de *E. coli* o *T. vaginalis*.
6. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha purina nucleósido fosforilasa es un mutante de *E. coli*.
7. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según la reivindicación 6, en la que dicho mutante es un mutante con cola.
8. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho profármaco es fosfato de fludarabina.
9. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho profármaco se formula con un portador de liberación sostenida.
10. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según la reivindicación 9, en la que dicho profármaco se formula con que comprende un portador de liberación sostenida de un gel, pasta o una micropartícula.
11. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho profármaco se inyecta de manera intratumoral en dicho tumor.
12. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según la reivindicación 1, en la que el profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa se inyecta directamente en proximidad a las células seleccionadas como diana para liberar una base de purina citotóxica para las células seleccionadas como diana para destruir o inhibir las células seleccionadas como diana.
13. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además inhibir el crecimiento de células vecinales a las células seleccionadas como diana.
14. Purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa o vector que codifica para la expresión de las mismas y profármaco escindido mediante dicha purina nucleósido fosforilasa o nucleósido hidrolasa para su uso según la reivindicación 1, en la que la radioterapia es radiación de rayos X.

Figura 1

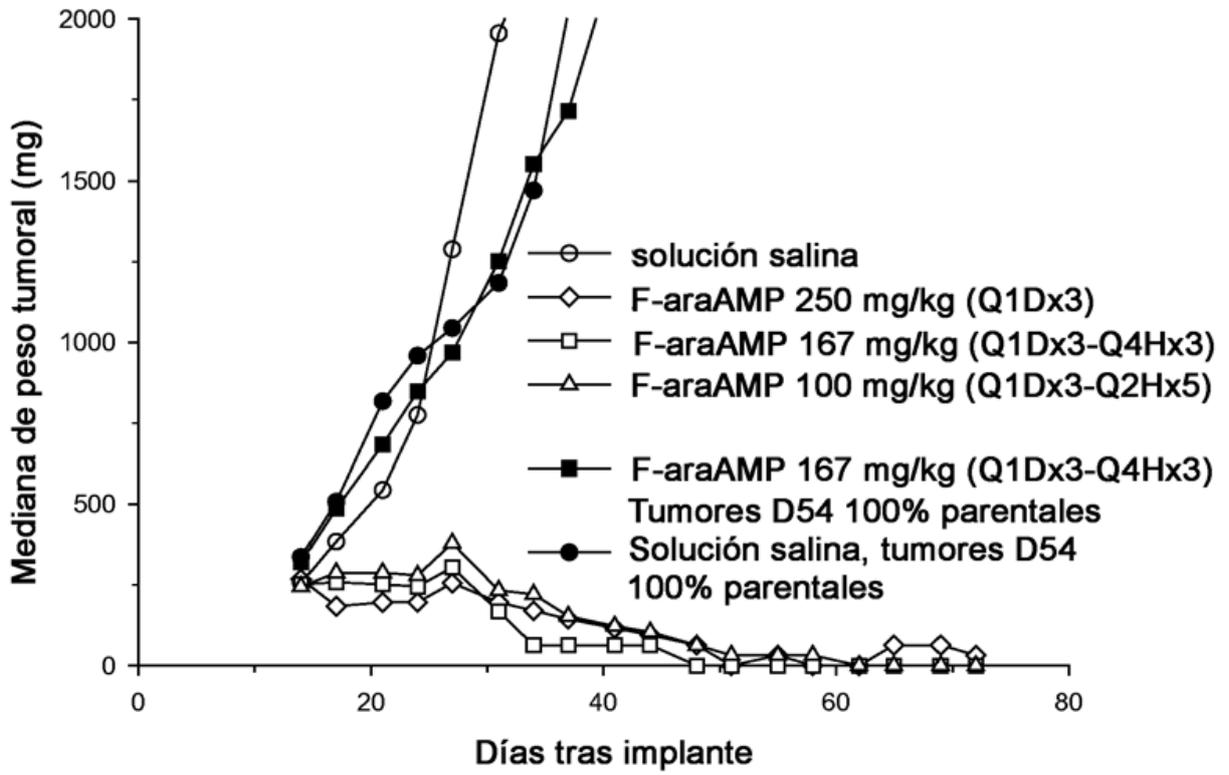


Figura 2A

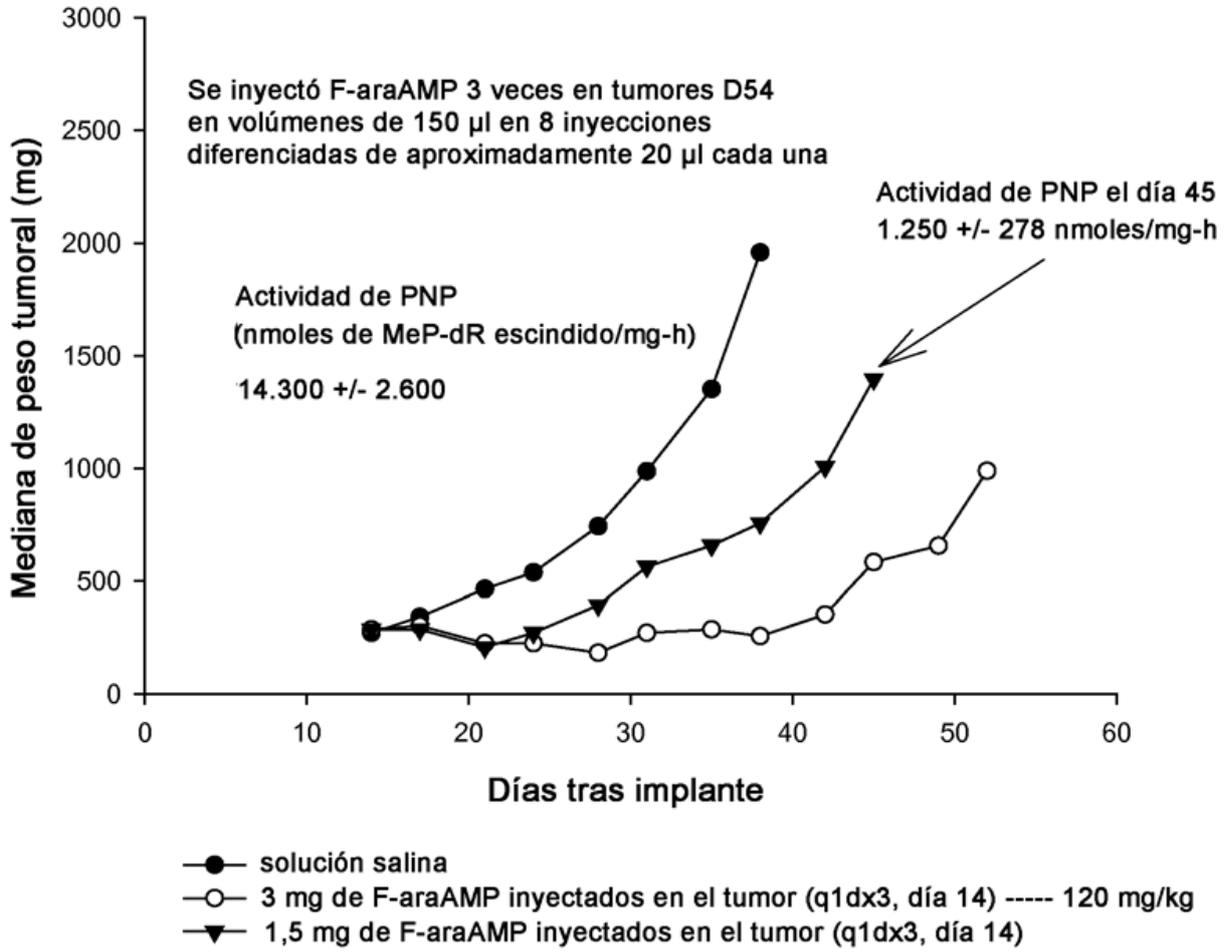


Figura 2B

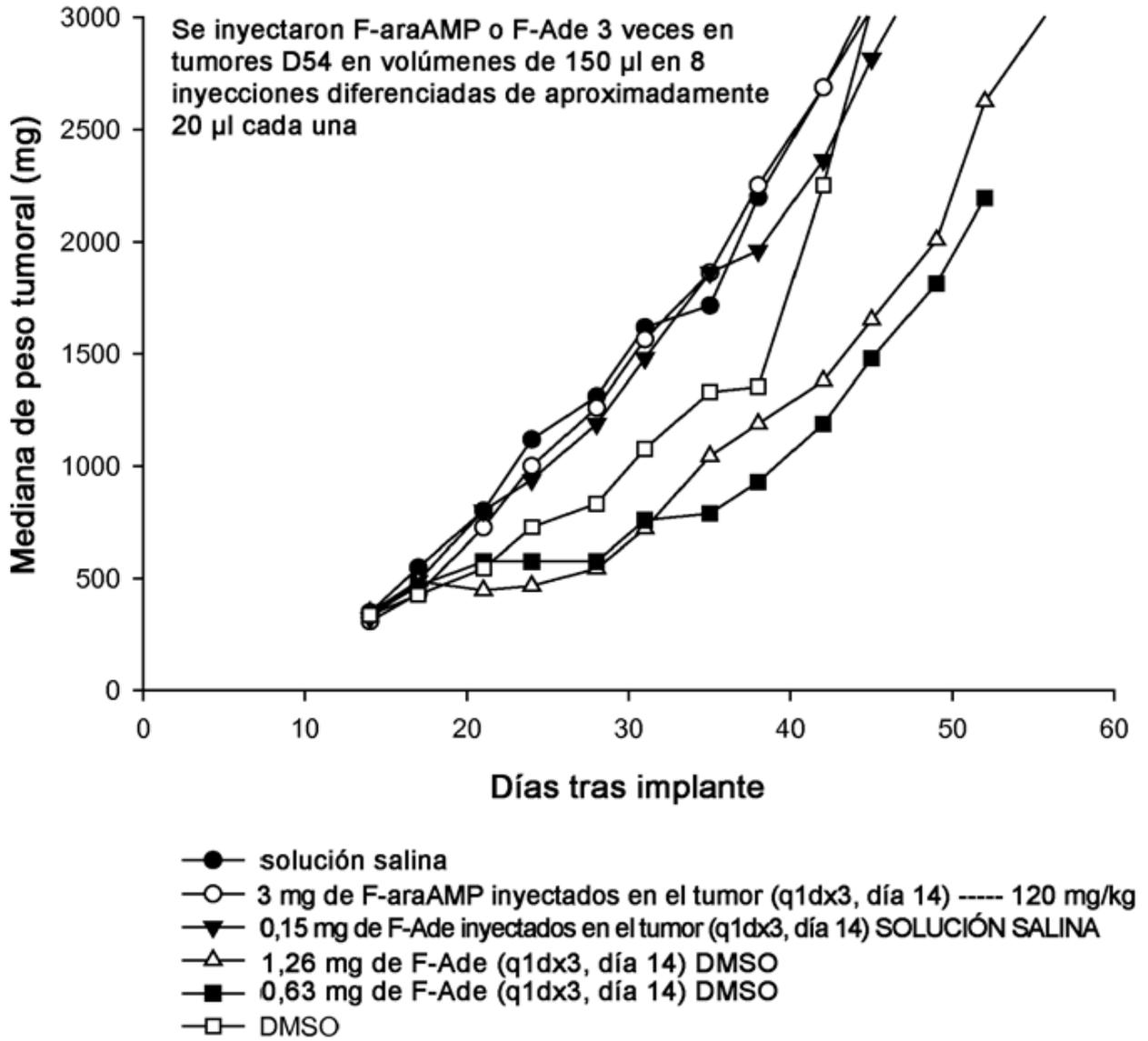


Figura 2C

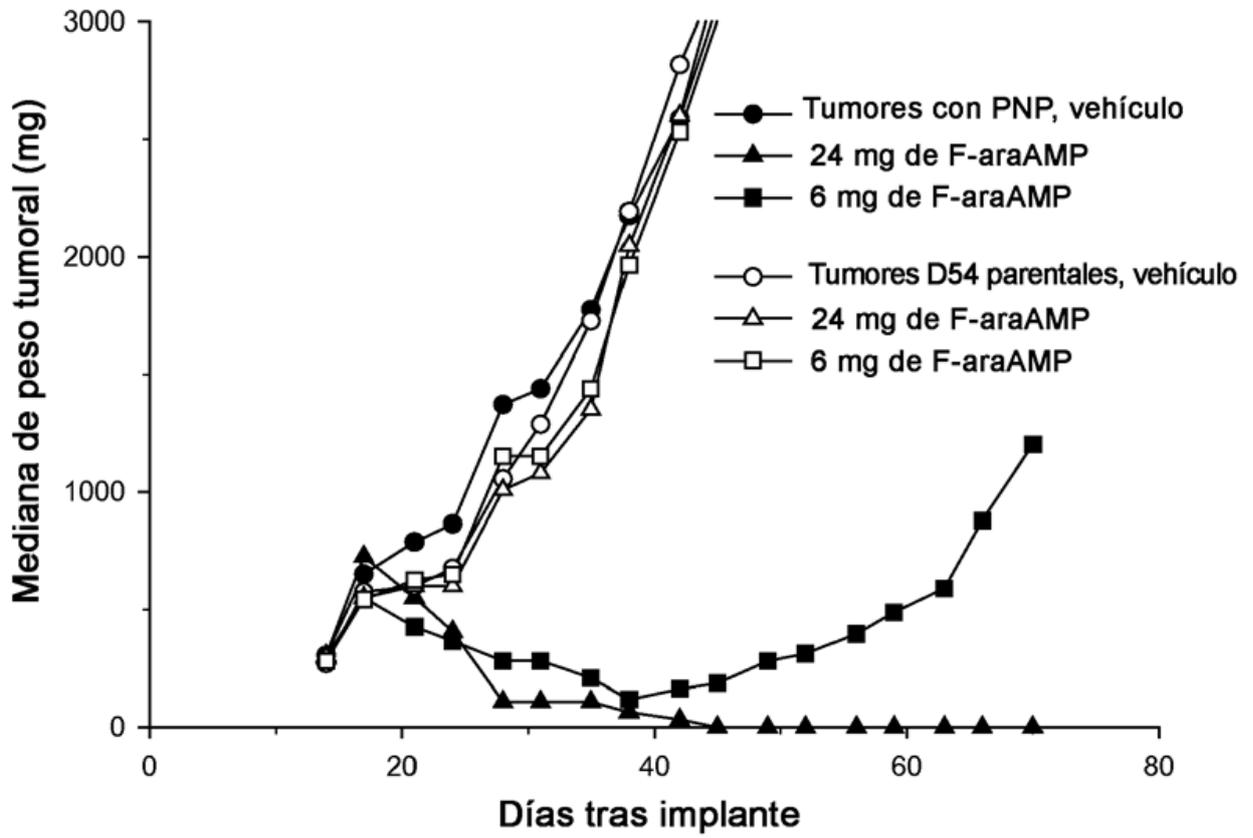


Figura 2D

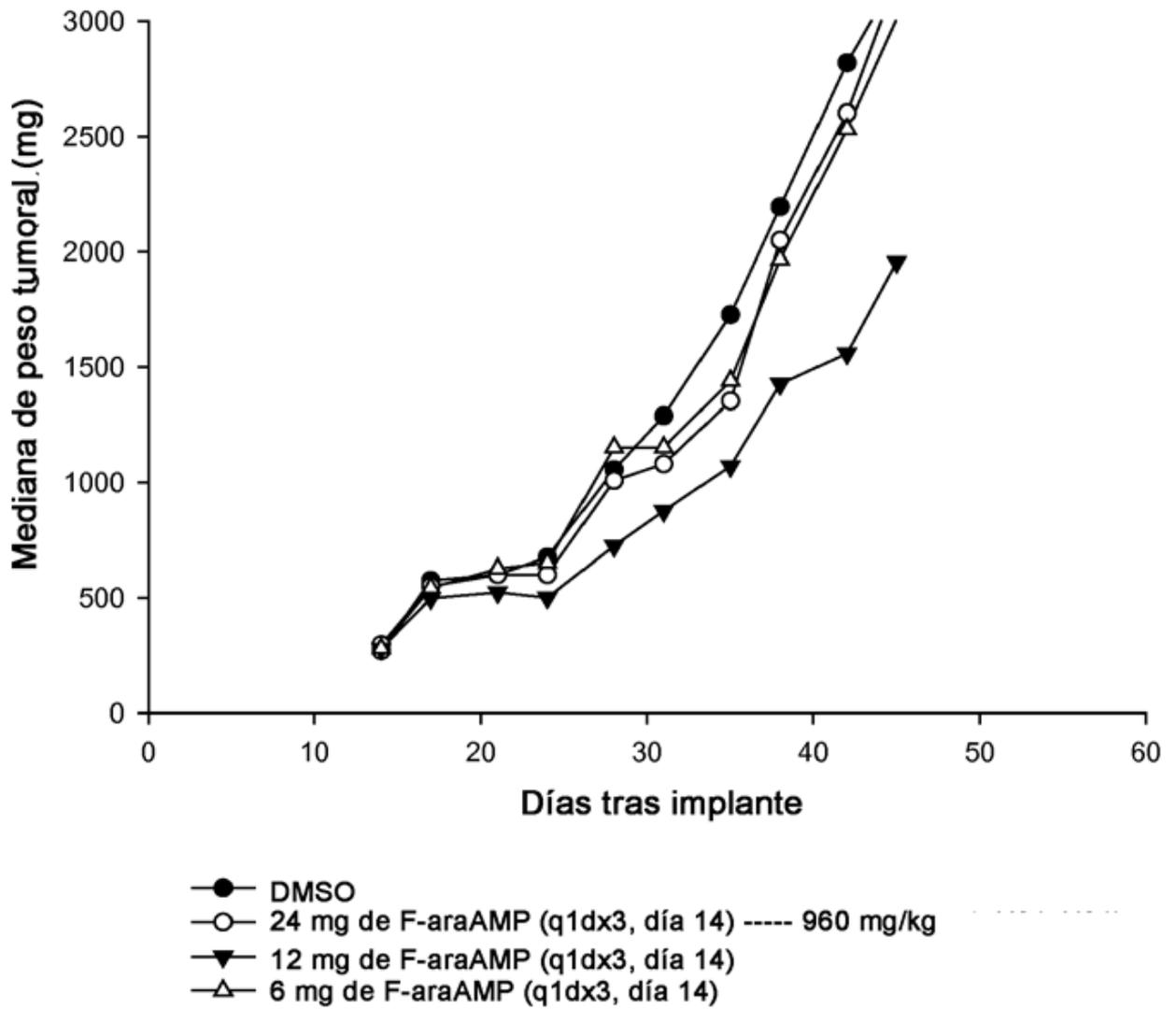


Figura 3

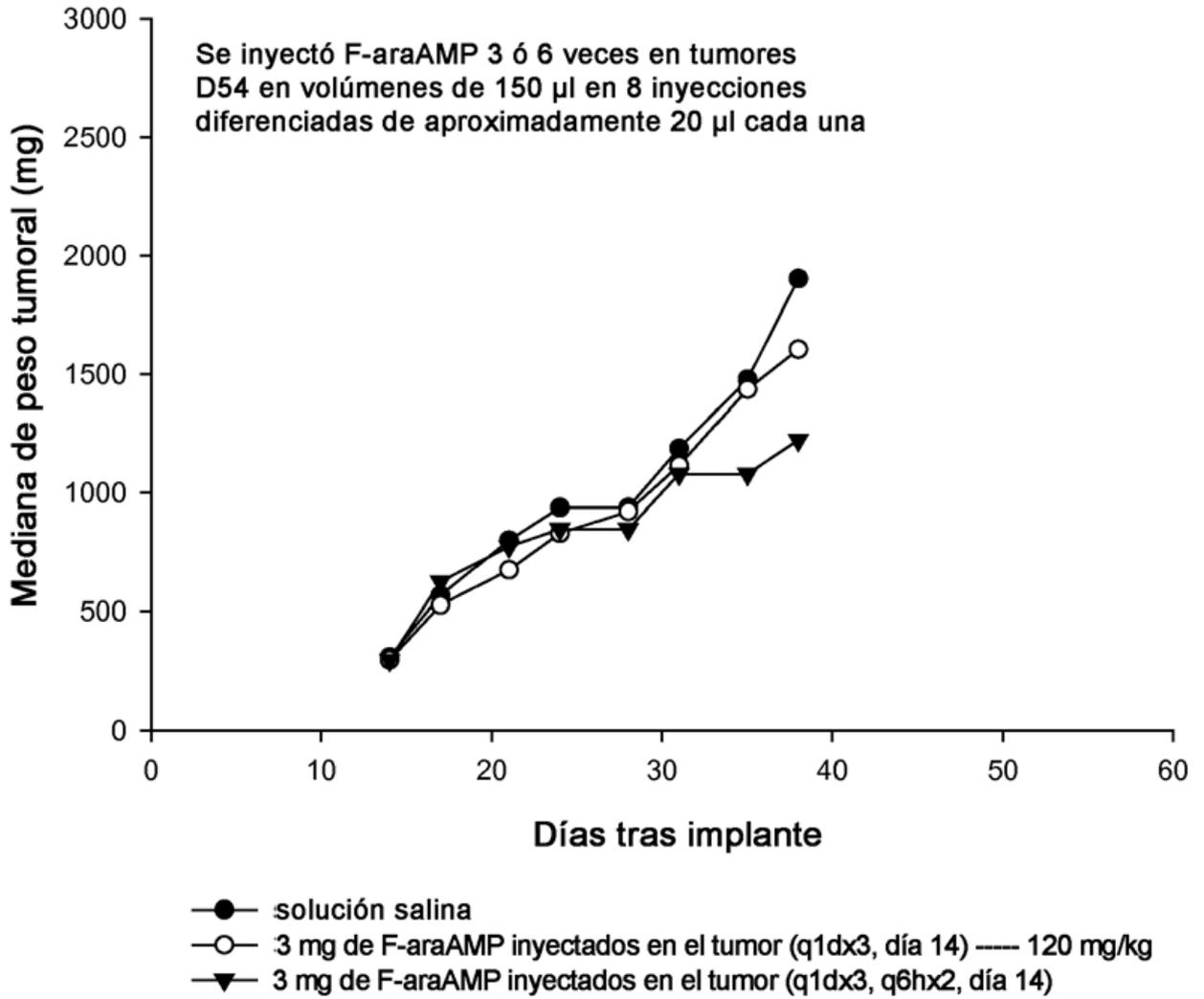


Figura 4

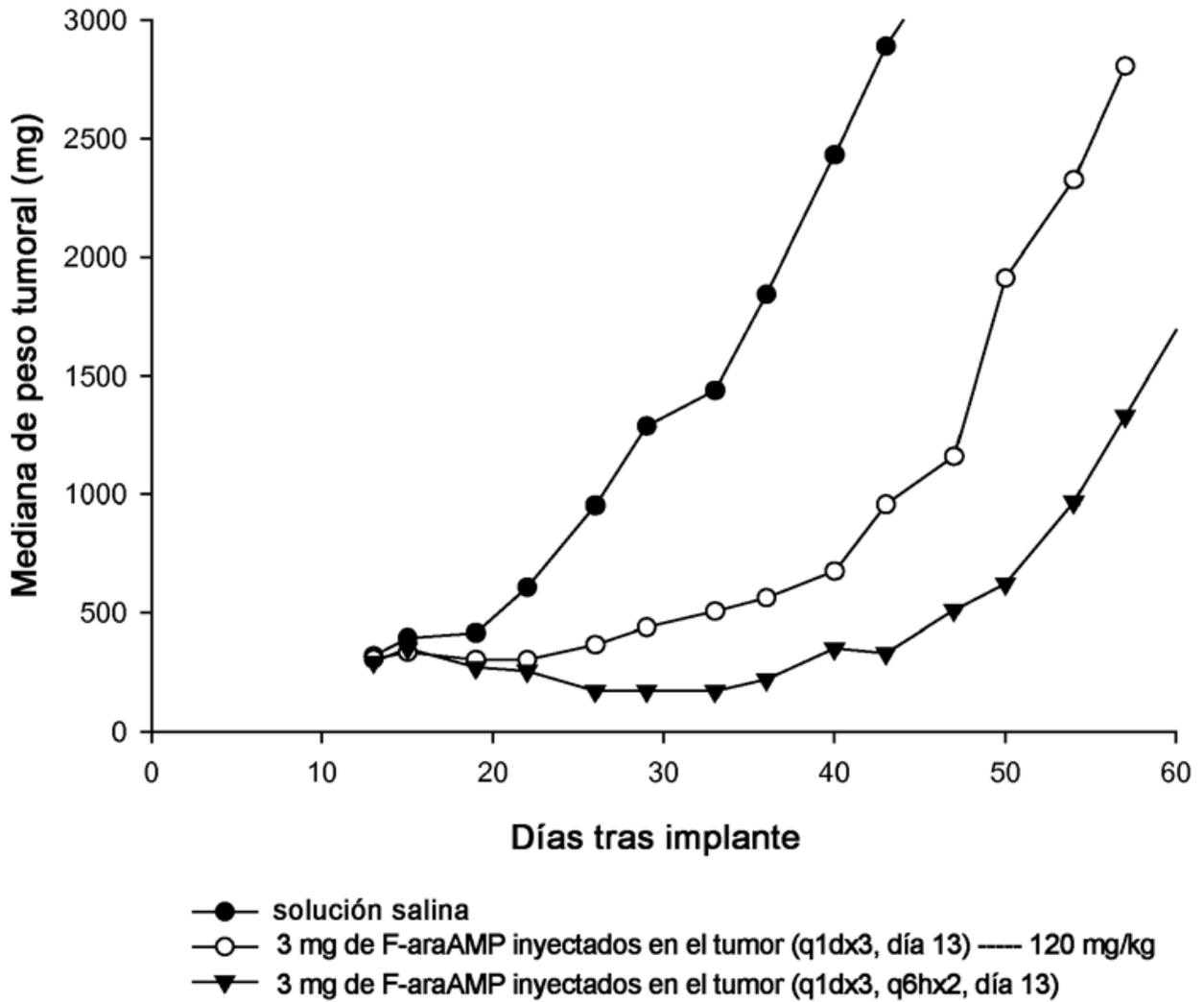


Figura 5A

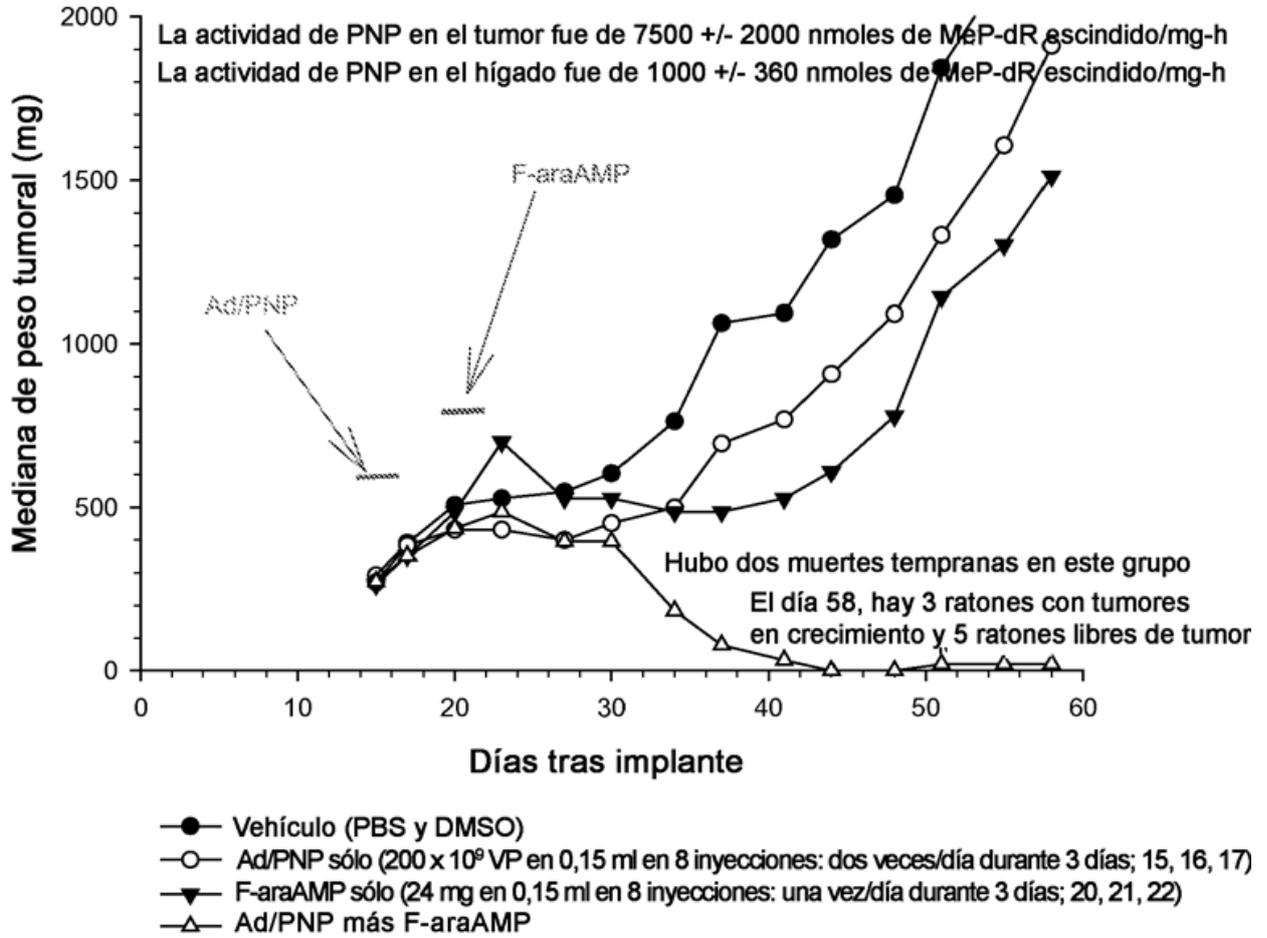
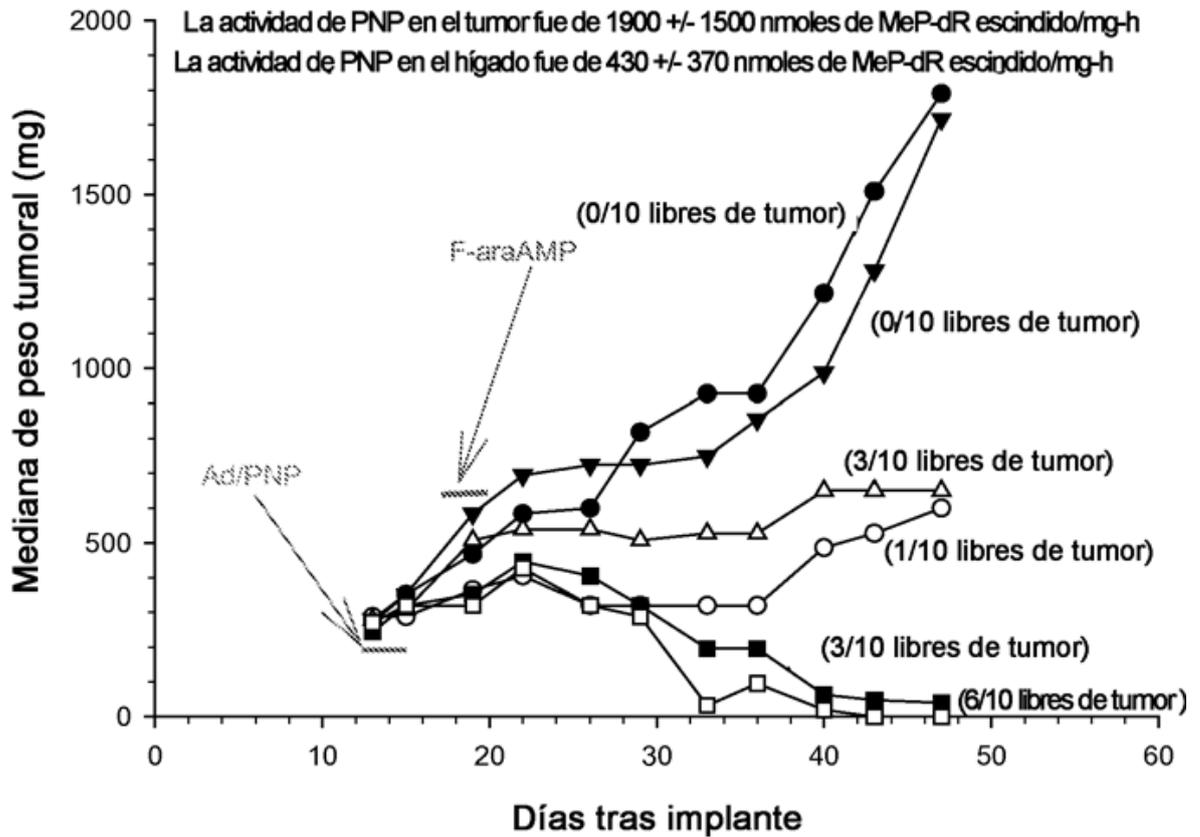


Figura 5B

Efecto de F-araAMP y Ad/PNP intratumorales sobre tumores D54 PNP 429



- Vehículo (PBS y DMSO)
- Ad/PNP sólo (200 x 10⁹ VP en 0,15 ml en 8 inyecciones: dos veces/día durante 3 días; 13, 14, 15)
- ▼ F-araAMP sólo (18 mg en 0,15 ml en 8 inyecciones: una vez/día durante 3 días; 18, 19, 20)
- △ F-araAMP sólo (12 mg en 0,15 ml en 8 inyecciones: una vez/día durante 3 días; 18, 19, 20)
- Ad/PNP más F-araAMP (18 mg)
- Ad/PNP más F-araAMP (12 mg)

Figura 5C

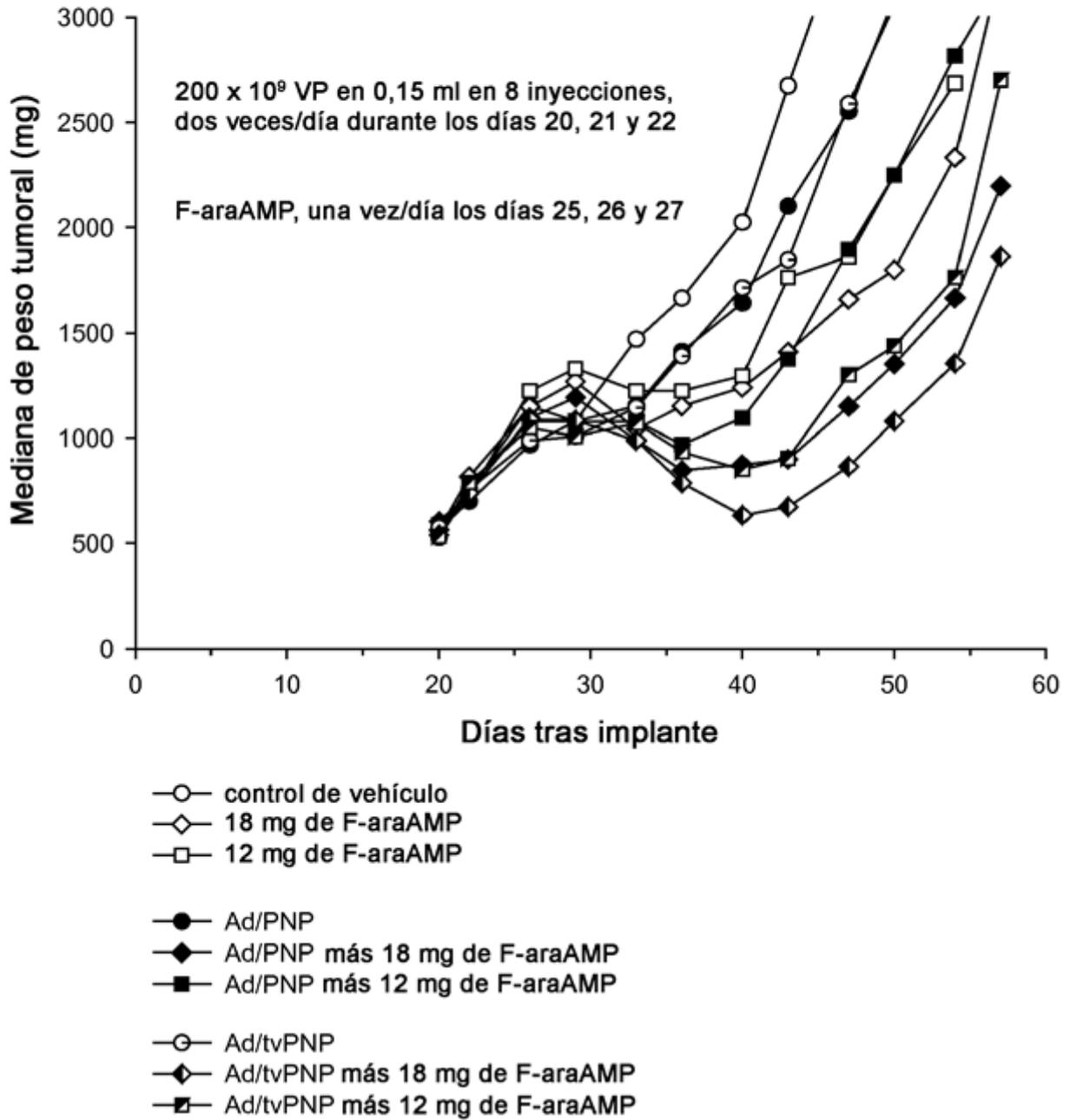
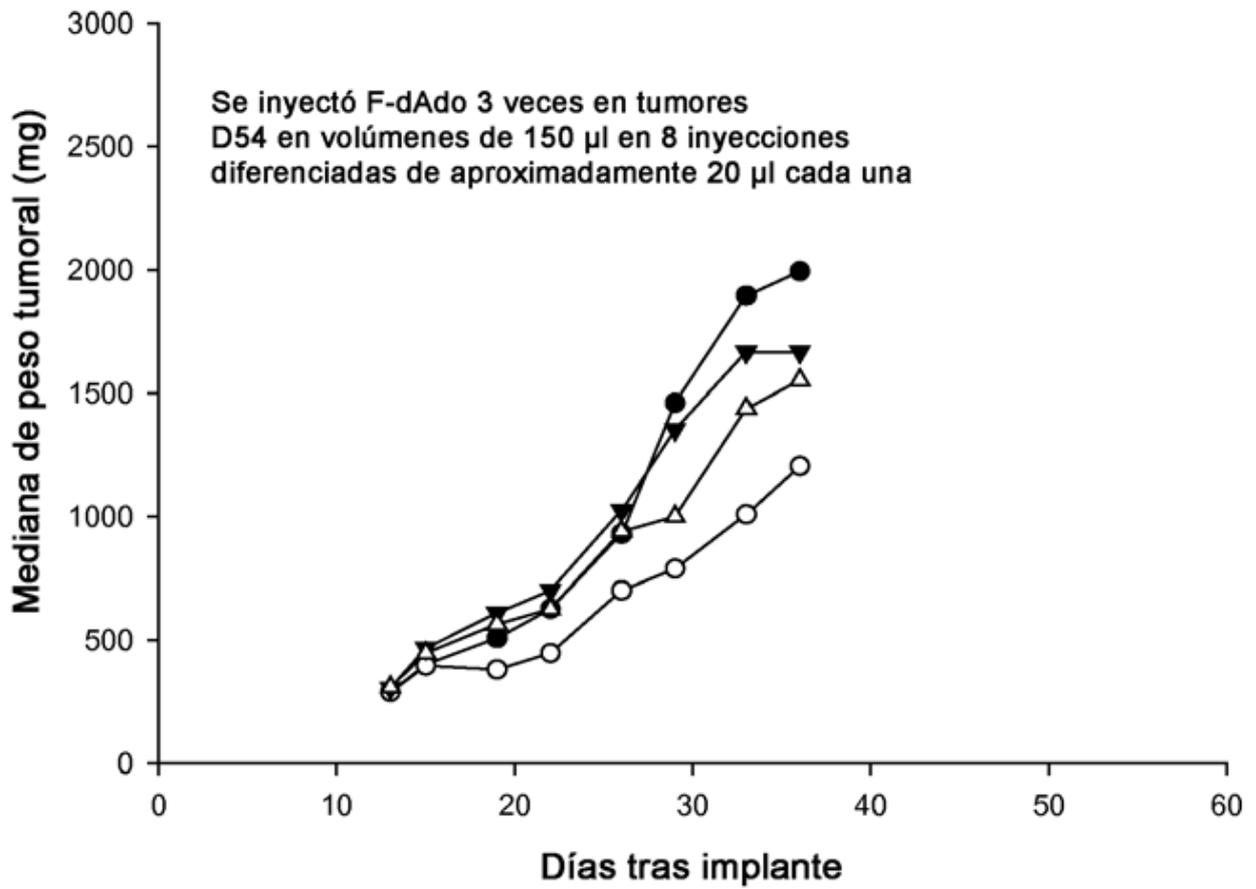


Figura 6A



- DMSO
- 13 mg de F-dAdo (q1dx3, día 13) 520 mg/kg
- ▼ 7 mg de F-dAdo (q1dx3, día 13)
- △ 2 mg de F-dAdo (q1dx3, día 13)

MTD i.p. 20 mg/kg (Q2hx5, q1dx3)

Figura 6B

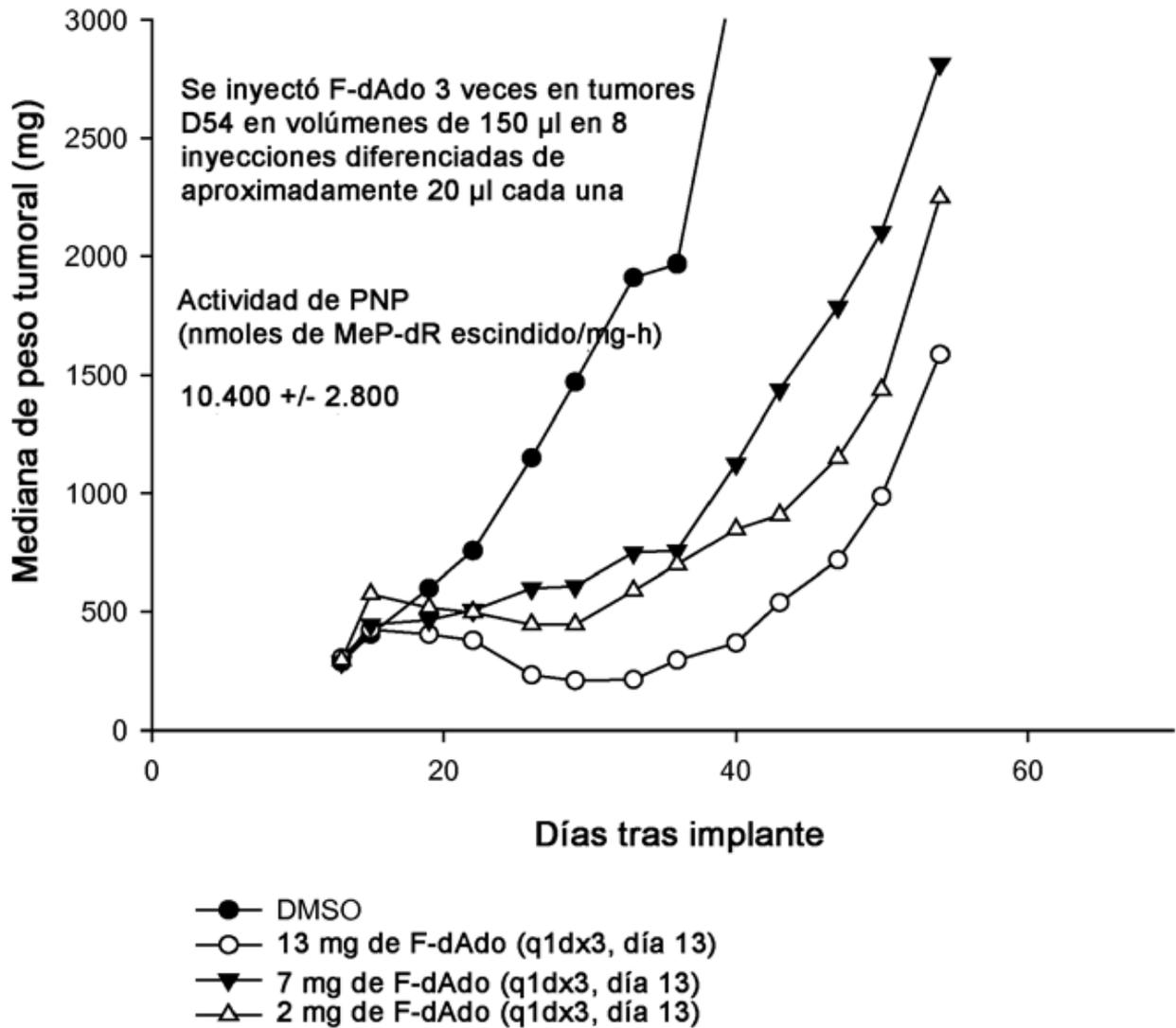


Figura 7A

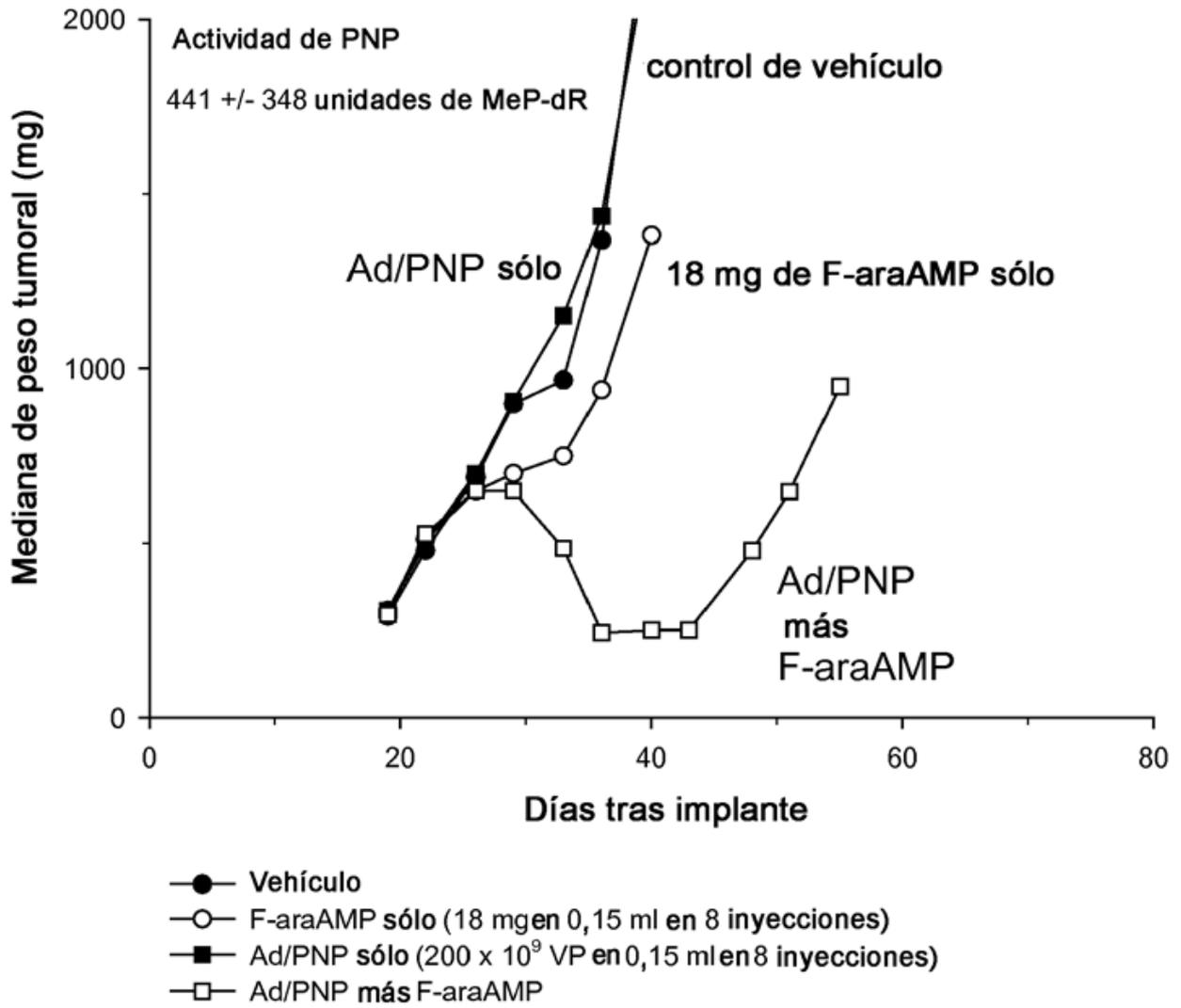


Figura 7B

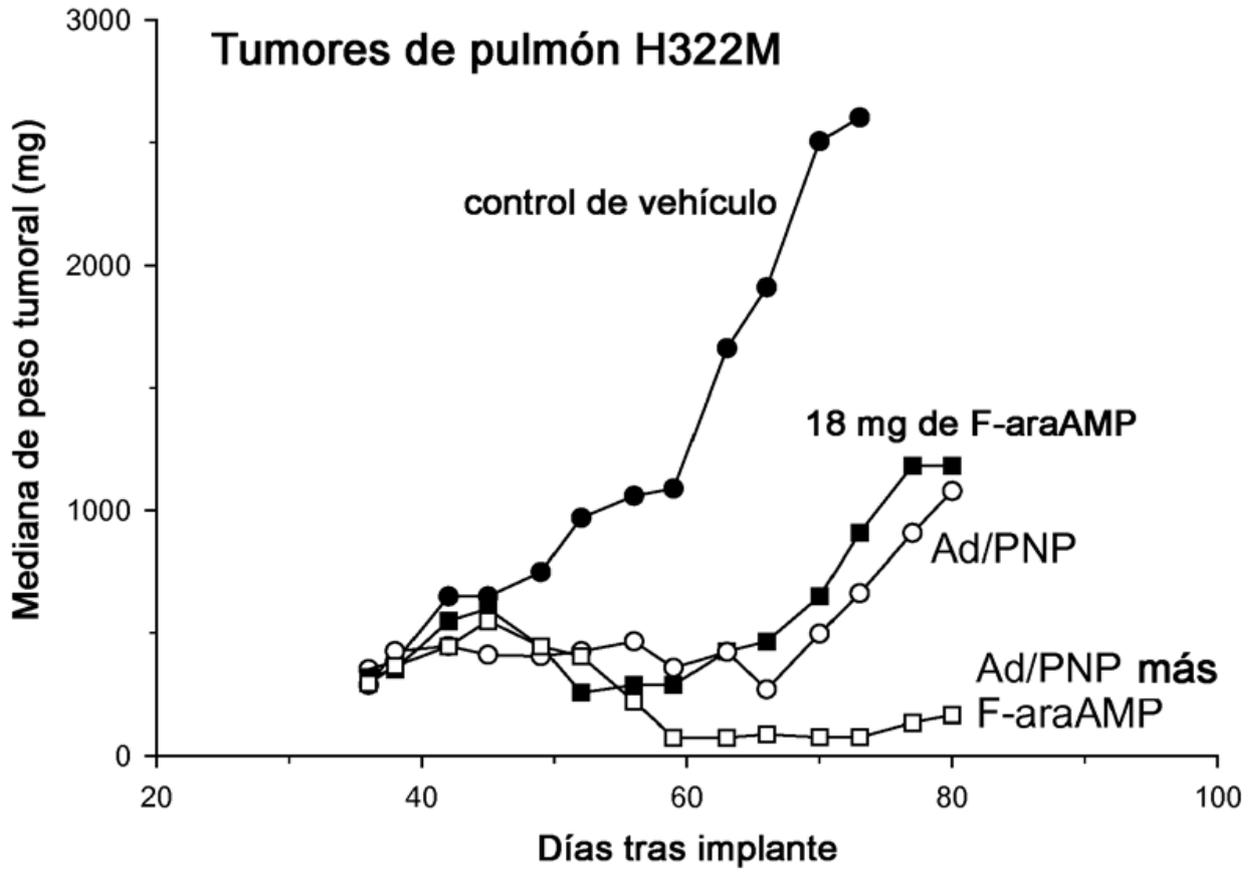
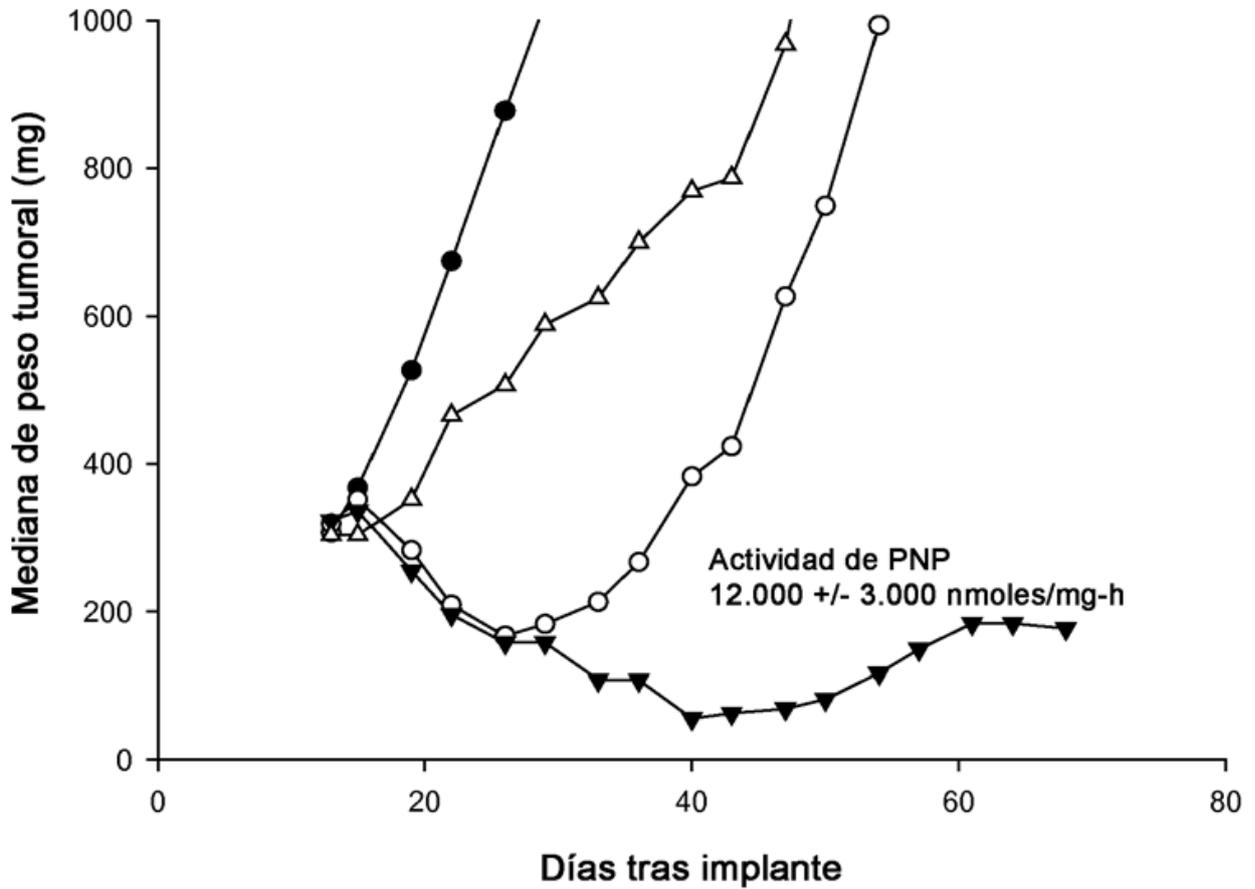


Figura 8A



- solución salina
- 3 mg de F-araAMP (q1dx3, día 13) intratumoral
- ▼ 3 mg de F-araAMP (q1dx3, día 13) intratumoral más 4Gy (q1dx3, día 13)
- △ 4 Gy, g1qx3 (día 13)

Figura 8B

