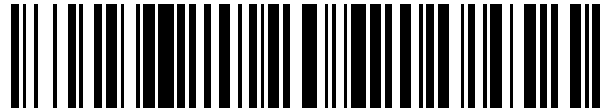


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 872**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2009 E 15202042 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 3029154**

54 Título: **Método para la identificación de la sensibilidad de un paciente a la terapia de inhibición de la telomerasa**

30 Prioridad:

**17.10.2008 US 106491 P**

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

**11.12.2017**

73 Titular/es:

**GERON CORPORATION (100.0%)  
149 Commonwealth Drive  
Menlo Park, CA 94025, US**

72 Inventor/es:

**HARLEY, CALVIN, B.;  
ELIAS, LAURENCE;  
SMITH, JENNIFER;  
RATAIN, MARK, J. y  
BENEDETTI, FABIO**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 645 872 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

Método para la identificación de la sensibilidad de un paciente a la terapia de inhibición de la telomerasa

## 5 Campo de la invención

La invención se refiere en general al campo de la identificación de pacientes que son sensibles a agentes inhibidores de la telomerasa. En particular, la invención proporciona métodos para la detección de pacientes que deberían limitar o modificar el uso de inhibidores de la telomerasa debido a que están en una categoría de riesgo de desarrollar sensibilidad limitante tal como trombocitopenia.

## Antecedentes

Los telómeros son elementos genéticos localizados en los extremos de todos los cromosomas eucariotas que conservan la estabilidad del genoma y la viabilidad celular mediante la prevención de la recombinación y la degradación aberrantes del ADN (McClintock, 1941, *Genetics* vol. 26, (2) págs. 234-282; Müller, 1938) *The collecting net*, vol. 13, (8) págs. 181-198). En los seres humanos, la secuencia telomérica está compuesta por 10-20 kilobases de repeticiones TTAGGG (Harley et al., 1990) *Nature* vol. 345 págs. 458-460; Blackburn, (1991) *Nature* vol. 350 págs. 569-573; de Lange et al., (1990) *Mol. Cell. Biol.* Vol. 10, (2) págs. 518-527). Existen pruebas crecientes de que la pérdida gradual de secuencias de repetición teloméricas (TTAGGG) puede ser un mecanismo de sincronización ("reloj") que limita el número de divisiones celulares en las células humanas normales (Allsopp et al., (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 89, págs. 10114-10118; Harley et al., (1990) *Nature*, vol. 345, págs. 458-460; Hastie et al., (1990) *Nature*, vol. 346, págs. 866-868; Vaziri et al., (1993) *Amer. J. Hum. Genet.*, vol. 52, págs. 661-667). Por el contrario, las células inmortales son capaces de mantener una longitud telomérica estable por regulación creciente o reactivación de la telomerasa, una ribonucleoproteína enzimática que es capaz de añadir repeticiones teloméricas a los extremos de los cromosomas (Greider y Blackburn (1985) *Cell*, vol. 43, págs. 405-413; Greider y Blackburn, (1989) *Nature*, vol. 337, págs. 331-337; Morin (1989) *Cell*, vol. 59, págs. 521-529).

La telomerasa es una enzima que añade nucleótidos a los telómeros en los extremos de los cromosomas, ayudando a prevenir el acortamiento telomérico hasta longitudes críticas. Estructuralmente, la telomerasa es un complejo macromolecular singular que incorpora una cadena de ARN en su sitio activo. Este ARN incluye una secuencia telomérica complementaria (3'-AUCCCAAUC-5'), que actúa para anclar la telomerasa al telómero y como molde para añadir repeticiones al extremo del cromosoma. La telomerasa está activa esencialmente en todos los cánceres, pero generalmente está presente a niveles muy bajos o no detectables en el tejido adulto normal. Por tanto, la longitud media de los telómeros de las células normales varía entre los sujetos y disminuye con la edad (véase la Figura 7). El acortamiento de los telómeros en los tejidos normales puede acelerarse también por estrés oxidante, fisiológico o inmunológico y por exposición a agentes tóxicos.

Las células cancerosas generalmente experimentan tandas repetidas de división celular y tienen telómeros que son estables, pero más cortos que los de las células normales. La activación de la telomerasa es necesaria para que la mayoría de las células cancerosas se repliquen indefinidamente y hace posible con ello el crecimiento y la metástasis de los tumores. (Kim et al., *Science* vol. 266 págs. 2011-2015; Greider CW, Blackburn EH. *Sci Am Feb*: 92-97, 1996; Shay JW y Wright WE. "*Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase*" *Carcinogenesis* 26:867-74, 2005). Por tanto, la inhibición de la telomerasa se considera una estrategia de tratamiento prometedora para una gran diversidad de tipos de tumores sólidos y enfermedades hemáticas malignas (Harley CB, *Nature Rev. Cancer*, vol. 8 págs. 167-179; 2008).

GRN163L es un oligonucleótido de tio-fosforamido con una "cola" de 5'-palmitoílo. El mismo inhibe la actividad de la telomerasa intracelular por unión a la región molde del componente de ARN de la holoenzima telomerasa. (Shea-Herbert et al., *Oncogene* 24:5262-8, 2005). GRN163L ha demostrado inhibición de la telomerasa y efectos de inhibición del crecimiento de las células cancerosas tanto *in vitro* como *in vivo* (Dikmen ZG, et al. *Cancer Res.* 65:7866-73, 2005; Djojsoobroto MW et al. *Hepatology* 42:1-11, 2005; Hochreiter AE, et al. *Clin Cancer Res* 12:3184-92 2006). GRN163L se encuentra actualmente en ensayos clínicos en cánceres de tumores sólidos y hemáticos.

En cualquier tratamiento del cáncer, la toxicidad inducida por la quimioterapia puede dar como resultado reducciones en la intensidad de dosis relativa de la quimioterapia. Las toxicidades inducidas por el tratamiento pueden incluir anemia, neutropenia, leucopenia y trombocitopenia. La trombocitopenia es una toxicidad inducida por quimioterapia que se presenta normalmente en la primera tanda de tratamiento con quimioterapia y puede llegar a ser más grave durante tandas de tratamiento repetidas. Los fármacos que dan como resultado toxicidades pueden tener aplicaciones limitadas debido a la intensidad reducida de la dosis (IRD), retardos de dosis y reducciones relativas de dosis. Dichas reducciones de dosis, intensidad reducida de la dosis y retardo de dosis utilizados como medios de disminución de la toxicidad pueden socavar el control de la enfermedad y la supervivencia global, en particular en pacientes con enfermedades malignas potencialmente curables. En general se recomienda que a fin de obtener la relación beneficio/riesgo máxima de la quimioterapia, la dosis prescrita debería individualizarse de acuerdo con la meta de la terapia y la respuesta.

El tratamiento de la trombocitopenia está determinado por la etiología y la gravedad de la enfermedad. El concepto principal en el tratamiento de la trombocitopenia es eliminar el problema subyacente, tanto si significa la interrupción de fármacos sospechosos de causar trombocitopenia, como el tratamiento de la contribución de factores inmunológicos o inflamatorios. Los pacientes con trombocitopenia grave pueden tratarse con transfusiones de plaquetas de un donante durante cierto periodo de tiempo. Además, se ha aprobado la Oprelvekina (NEU-MEGA™, Wyeth) para la prevención de la trombocitopenia grave posterior a la quimioterapia mielosupresora en pacientes adultos con enfermedades malignas no mieloides. Otro fármaco, Romiplostina (NPLATE™, Amgen Inc.) se ha aprobado para el tratamiento de la púrpura trombocitopénica idiopática crónica (PTI).

En este contexto, un ensayo altamente predictivo para pacientes que son sensibles al desarrollo de toxicidad inducida por la terapia de inhibición de la telomerasa podría proporcionar una reducción significativa en la carga total de toxicidad asociada a la terapia de inhibición de la telomerasa, y haría posible el uso más seguro de la terapia de inhibición de la telomerasa sin denegación inadecuada de acceso a su uso.

La presente invención busca presentar un método para la determinación de la susceptibilidad de los pacientes de cáncer a desarrollar toxicidades limitantes del tratamiento, tales como trombocitopenia, a partir de la terapia de inhibición de la telomerasa.

#### Sumario de la Invención

La invención proporciona métodos de determinación de la susceptibilidad de los pacientes de cáncer a desarrollar toxicidades si se tratan con un fármaco inhibidor de la telomerasa. La invención requiere la medición de las longitudes de los telómeros en células apropiadas del paciente antes del inicio del tratamiento inhibidor de la telomerasa y la correlación de la medición de la longitud de los telómeros con la susceptibilidad a la trombocitopenia. En una realización, se proporciona un algoritmo para ayudar con la correlación.

La invención proporciona un método de control de un paciente para detectar un evento adverso relacionado con la terapia de inhibición de la telomerasa en el que el método comprende someter a ensayo una muestra biológica del paciente para determinar la longitud o la distribución de la longitud de los telómeros. El método puede comprender adicionalmente la etapa de identificar la probabilidad de que un sujeto mamífero presente una reacción adversa al tratamiento con una terapia de inhibición de la telomerasa.

La invención incluye un método para identificar la probabilidad de que un sujeto mamífero presente una reacción adversa a la terapia de inhibición de la telomerasa que comprende,

- (a) la determinación del promedio o la mediana de la longitud de los telómeros en una muestra biológica que comprende células obtenidas del sujeto mamífero antes o en el momento del tratamiento con una terapia de inhibición de la telomerasa y la multiplicación del promedio o la mediana de la longitud de los telómeros por un coeficiente para llegar a un componente de la longitud de los telómeros;
- (b) la multiplicación de la dosis de tratamiento prevista por un coeficiente para llegar a un componente de dosificación;
- (c) el cálculo de la suma del componente telómero, el componente de dosificación y una constante; y
- (d) la determinación de la probabilidad esperada de una reacción adversa en el sujeto mamífero a partir del tratamiento con la terapia de inhibición de la telomerasa.

En un aspecto del método, el sujeto mamífero es un ser humano.

En un aspecto del método, la reacción adversa se selecciona entre trombocitopenia, anemia, leucopenia, o neutropenia.

El método en el que la reacción adversa es la trombocitopenia y la suma del componente telómero, el componente de dosificación y la constante determina la disminución porcentual del número de plaquetas del sujeto mamífero a partir del número de plaquetas basal del sujeto antes del tratamiento. El método en el que la reacción adversa es cualquier grado de trombocitopenia. El método en el que la reacción adversa es trombocitopenia de grados 3 o 4.

En un aspecto del método, la muestra biológica es células sanguíneas obtenidas del sujeto mamífero. En un aspecto, las células sanguíneas son leucocitos. El método en el que los leucocitos se seleccionan entre granulocitos o linfocitos. En un aspecto, las células sanguíneas son granulocitos. Los granulocitos se seleccionan entre neutrófilos, basófilos o eosinófilos. En otro aspecto, las células sanguíneas son linfocitos. En otro aspecto, las células sanguíneas son monocitos o macrófagos.

En un aspecto del método, el sujeto mamífero se trata con el inhibidor de la telomerasa para tratar un cáncer. En un aspecto del método, el inhibidor de la telomerasa es un oligonucleótido. En un aspecto del método, el inhibidor de la telomerasa es GRN163L.

- 5 En un aspecto del método, el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal, cáncer de faringe, cáncer de recto, cáncer de páncreas, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de cerebro, leucemia, mieloma y linfoma.
- En un aspecto del método, el componente de longitud de los telómeros es un componente positivo cuando se calcula el cambio porcentual.
- 10 En un aspecto del método, el componente de dosificación es un componente negativo cuando se calcula el cambio porcentual.
- En un aspecto del método, el método comprende adicionalmente la etapa de asignar al sujeto la probabilidad de tener una reacción adversa al tratamiento con el inhibidor de la telomerasa.
- 15 En un aspecto del método, las longitudes basales más cortas de los telómeros se asocian a un riesgo aumentado de una reacción adversa.
- En un aspecto del método, la dosificación incrementada se asocia a un riesgo aumentado de reacción adversa.
- 20 En un aspecto del método, la longitud basal de los telómeros se determina por análisis por FISH, análisis por transferencia Southern, análisis por PCR o análisis por STELA.
- En un aspecto del método, la longitud basal de los telómeros se determina por análisis por FISH.
- 25 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de determinación de la probabilidad de que un sujeto mamífero experimente trombocitopenia relacionada con la terapia de inhibición de la telomerasa, en el que el método comprende,
- 30 (a) la determinación del promedio o la mediana de la longitud de los telómeros en una muestra biológica que comprende células obtenidas del sujeto mamífero antes o en el momento del tratamiento con una terapia de inhibición de la telomerasa y la multiplicación del promedio o la mediana de la longitud de los telómeros por un coeficiente para llegar a un componente de la longitud de los telómeros;
- 35 (b) la multiplicación de la dosis de tratamiento prevista por un coeficiente para llegar a un componente de dosificación;
- (c) el cálculo de la suma del componente telómero y el componente de dosificación y el logaritmo del número basal de plaquetas del sujeto para determinar el nadir de plaquetas previsto durante las primeras semanas de tratamiento; y
- 40 (d) la determinación de la probabilidad esperada de trombocitopenia en el sujeto mamífero a partir del tratamiento con la terapia de inhibición de la telomerasa.
- De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de identificación de un paciente que potencialmente requiere un nivel de dosis de inhibidor de la telomerasa por debajo del nivel de dosis máxima recomendada, en el que el método comprende
- 45 (a) la determinación del promedio o la mediana de la longitud de los telómeros en una muestra biológica que comprende células obtenidas del sujeto mamífero antes o en el momento del tratamiento con una terapia de inhibición de la telomerasa y la multiplicación del promedio o la mediana de la longitud de los telómeros por un coeficiente para llegar a un componente de la longitud de los telómeros;
- 50 (b) la multiplicación de la dosificación de tratamiento prevista por un coeficiente para llegar a un componente de dosificación;
- (c) el cálculo de la suma del componente telómero y el componente de dosificación y el logaritmo del número basal de plaquetas del sujeto para determinar el nadir de plaquetas previsto durante las primeras semanas de tratamiento;
- 55 (d) la determinación de la probabilidad esperada de trombocitopenia en el sujeto mamífero a partir del tratamiento con la terapia de inhibición de la telomerasa; y
- (e) la administración de una dosis reducida del inhibidor de la telomerasa o una posología de dosificación reducida del inhibidor de la telomerasa.
- 60 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método de identificación de un sujeto mamífero que requiere un producto farmacéutico mejorador administrado en conjunción con un inhibidor de la telomerasa en el que el método comprende
- 65 (a) la determinación del promedio o la mediana de la longitud de los telómeros en una muestra biológica que comprende células obtenidas del sujeto mamífero antes o en el momento del tratamiento con una terapia de

inhibición de la telomerasa y la multiplicación del promedio o la mediana de la longitud de los telómeros por un coeficiente para llegar a un componente de la longitud de los telómeros;

(b) la multiplicación de la dosificación de tratamiento prevista por un coeficiente para llegar a un componente de dosificación; y

5 (c) el cálculo de la suma del componente telómero y el componente de dosificación y el logaritmo del número basal de plaquetas del sujeto para determinar el nadir de plaquetas previsto durante las primeras semanas de tratamiento; y

(d) la determinación de la probabilidad esperada de trombocitopenia en el sujeto mamífero a partir del tratamiento con la terapia de inhibición de la telomerasa

10 (e) la administración de una dosificación apropiada de un producto farmacéutico mejorador en conjunto con el inhibidor de la telomerasa.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la identificación de un sujeto mamífero en terapia de inhibición de la telomerasa que requiere el control del evento adverso que comprende someter a ensayo una muestra biológica no cancerosa del sujeto mamífero para determinar la longitud de los telómeros antes de la terapia de inhibición de la telomerasa.

15 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la identificación de un sujeto mamífero en terapia de inhibición de la telomerasa que requiere el control del evento adverso que comprende someter a ensayo una muestra biológica no cancerosa del sujeto mamífero para determinar la longitud de los telómeros antes de la terapia de inhibición de la telomerasa.

Preferentemente, el método comprende adicionalmente el control del sujeto mamífero para determinar una reacción adversa relacionada con el tratamiento con el inhibidor de la telomerasa.

20 Preferentemente, el método comprende adicionalmente el control del sujeto mamífero para determinar una reacción adversa relacionada con el tratamiento con el inhibidor de la telomerasa.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un medio accesible por ordenador que comprende una base de datos que incluye una pluralidad de registros, en el que cada registro asocia (a) información que identifica un sujeto mamífero, con (b) información que indica si el sujeto tiene telómeros acortados y en el que cada registro asocia adicionalmente (a) con (c) información que identifica la presencia o ausencia de un evento adverso resultado de la administración de un inhibidor de la telomerasa al sujeto.

25 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un medio accesible por ordenador que comprende una base de datos que incluye una pluralidad de registros, en el que cada registro asocia (a) información que identifica un sujeto mamífero, con (b) información que indica si el sujeto tiene telómeros acortados y en el que cada registro asocia adicionalmente (a) con (c) información que identifica la presencia o ausencia de un evento adverso resultado de la administración de un inhibidor de la telomerasa al sujeto.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la administración de GRN163L que comprende la administración de aproximadamente 1,6 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de GRN163L el día 1 y en aproximadamente el día 8 de un ciclo de 21 días.

30 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la administración de GRN163L que comprende la administración de aproximadamente 1,6 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de GRN163L el día 1 y en aproximadamente el día 8 de un ciclo de 21 días.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la administración de GRN163L que comprende la administración de aproximadamente 1,6 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de GRN163L el día 1 y en aproximadamente el día 15 de un ciclo de 28 días.

35 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la administración de GRN163L que comprende la administración de aproximadamente 1,6 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de GRN163L el día 1 y en aproximadamente el día 15 de un ciclo de 28 días.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la administración de GRN163L que comprende la administración de aproximadamente 1,6 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de GRN163L dos veces en la primera semana en un ciclo de 14 días.

40 De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para la administración de GRN163L que comprende la administración de aproximadamente 1,6 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de GRN163L dos veces en la primera semana en un ciclo de 14 días.

Otros aspectos y ventajas de la invención resultarán más claramente evidentes cuando la descripción detallada siguiente de la invención se lee junto con los dibujos acompañantes.

45 Otros aspectos y ventajas de la invención resultarán más claramente evidentes cuando la descripción detallada siguiente de la invención se lee junto con los dibujos acompañantes.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico que muestra los niveles de plaquetas a lo largo del tiempo para pacientes individuales en las cohortes 1-3 del estudio. Las líneas discontinuas horizontales muestran los intervalos para niveles diferentes de trombocitopenia. Los círculos en los puntos temporales indican que los pacientes recibieron una dosis de GRN163L y se recogieron las plaquetas.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los niveles de plaquetas a lo largo del tiempo para pacientes individuales en la cohorte 4 del estudio. Las líneas discontinuas horizontales muestran los intervalos para niveles diferentes de trombocitopenia. Los círculos en los puntos temporales indican que los pacientes recibieron una dosis de GRN163L y se recogieron las plaquetas.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra los niveles de plaquetas a lo largo del tiempo para pacientes individuales en la cohorte 5 del estudio. Las líneas discontinuas horizontales muestran los intervalos para niveles diferentes de trombocitopenia. Los círculos en los puntos temporales indican que los pacientes recibieron una dosis de GRN163L y se recogieron las plaquetas.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra los niveles de plaquetas a lo largo del tiempo para pacientes individuales en la cohorte 6 del estudio. Las líneas discontinuas horizontales muestran los intervalos para niveles diferentes de trombocitopenia. Los círculos en los puntos temporales indican que los pacientes recibieron una dosis de GRN163L y se recogieron las plaquetas.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra el cambio en los niveles de plaquetas en el nadir a las 5 semanas frente a la longitud basal de los telómeros de granulocitos en los pacientes del estudio. Los círculos indican pacientes dosificados con 0,4, 0,8 y 1,5 mg/kg. Los triángulos indican pacientes dosificados con 4,8 mg/kg.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra el cambio en la longitud basal de los telómeros de granulocitos en el nadir a las 5 semanas frente al número de posologías citotóxicas experimentadas por los pacientes antes de la inclusión en este estudio.

La Fig. 7 es un gráfico que muestra el cambio en la longitud de los telómeros en función de la edad.

Descripción detallada de la invención

Los expertos en la materia apreciarán que la invención descrita en el presente documento es susceptible de variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente, incluyendo la adición de otros componentes de factores de riesgo que pueden ser relevantes para diferentes poblaciones de pacientes o combinaciones de terapia de inhibición de la telomerasa con otros tratamientos. Debe entenderse que la invención incluye la totalidad de dichas variaciones y modificaciones. La invención incluye también la totalidad de las etapas, características, composiciones y compuestos a los que se hace referencia o que se indican en la memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualesquiera y la totalidad de las combinaciones de dos cualesquiera o más de las etapas o características.

La presente invención no debe considerarse limitada en alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento, que se exponen solamente con propósitos de ejemplificación.

A. Definiciones

Los términos que siguen tienen los significados siguientes a no ser que se indique otra cosa.

Un "sujeto mamífero", "sujeto" o "paciente" hace referencia a un mamífero. Para los propósitos de esta invención, los mamíferos incluyen humanos; mamíferos importantes en agricultura, tales como ganado, caballos, ovejas; y/o mamíferos veterinarios, tales como gatos, conejos, roedores y perros. Un "paciente" significa un sujeto que está recibiendo tratamiento médico o veterinario.

Una "dosis" significa una cantidad que se ha de administrar de una vez, tal como una cantidad de medicación especificada. Para GRN163L, la dosis inicial de un adulto es de aproximadamente 0,8 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg; de aproximadamente 1,6 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. La dosis de un adulto para GRN163L es de aproximadamente 1,6 mg/kg; o aproximadamente 3,2 mg/kg; o aproximadamente 4,8 mg/kg; o aproximadamente 6,2 mg/kg; o aproximadamente 7,2 mg/kg; o aproximadamente 9 mg/kg; o aproximadamente 12 mg/kg; hasta aproximadamente 20 mg/kg. La dosis puede administrarse dos veces por semana, una sola vez por semana o con otros regímenes de administración. Pueden requerirse dosis mayores para producir la remisión deseada en algunos pacientes. Las dosis pueden administrarse por una infusión de 2-24 horas, más preferentemente por una infusión de 2-4 horas.

El término "longitud basal de telómero" o "longitud media o mediana de telómero" significa la longitud media o mediana de los telómeros del paciente en las células apropiadas antes de o al mismo tiempo que el paciente recibe el primer tratamiento del inhibidor de la telomerasa.

El término "nadir de plaquetas durante las primeras semanas de tratamiento" significa el número de plaquetas presentes en la sangre del paciente o pacientes en el punto mínimo en las primeras semanas después del tratamiento. Las primeras semanas de tratamiento significa las semanas 1-12 de tratamiento, preferentemente 1-8 de tratamiento, más preferentemente 1-6 de tratamiento, y más preferentemente 1-4 de tratamiento.

"Evento adverso" o "reacción adversa" significa el desarrollo de una condición médica indeseable o el deterioro de una condición médica preexistente siguiente o durante la exposición a un fármaco. Una reacción adversa puede seleccionarse entre trombocitopenia, anemia, leucopenia, o neutropenia. Cuando la reacción adversa es trombocitopenia y la suma del componente telómero y el componente de dosificación y una constante determina la disminución porcentual del recuento de plaquetas en el sujeto mamífero con respecto al recuento de plaquetas del sujeto antes del tratamiento. Cuando la reacción adversa es trombocitopenia, la reacción adversa puede ser cualquier grado de trombocitopenia. La reacción adversa puede ser trombocitopenia de grados 3 o 4.

La trombocitopenia ha sido clasificada en grados diferentes dependiendo del número de plaquetas en la sangre del sujeto mamífero.

Grado de Trombocitopenia	Número de plaquetas/microlitro
Grado 1	75-150.000
Grado 2	50-75.000
Grado 3	25-50.000
Grado 4	<25.000

El término "neutropenia" significa la presencia de números anormalmente bajos de neutrófilos en la sangre.

El término "leucopenia" significa un número anormalmente bajo de leucocitos en la sangre.

El término "anemia" significa una deficiencia en el componente portador de oxígeno en la sangre, medido en concentraciones unitarias en volumen de hemoglobina, volumen de eritrocitos de la sangre o número de eritrocitos de la sangre.

5 La expresión "número de plaquetas basales" significa el número de plaquetas por microlitro de sangre del sujeto mamífero antes del tratamiento con el inhibidor de la telomerasa. "Relación beneficio/riesgo" significa la relación entre los riesgos y beneficios de un tratamiento o procedimiento dado. Un riesgo aceptable se relaciona con el potencial para sufrir enfermedad o lesión que sería tolerada por un sujeto a cambio de los beneficios del uso de una sustancia o proceso que causará dicha enfermedad o lesión. La aceptabilidad de un riesgo depende de datos científicos, factores sociales y económicos, y de los beneficios percibidos originados por un producto químico o fármaco que crea el o los riesgos en cuestión.

15 Una "muestra biológica" es una muestra de sangre o muestra de tejido del sujeto mamífero. En un aspecto, la muestra biológica es sangre que contiene leucocitos. En un aspecto, los leucocitos son granulocitos. Los granulocitos son uno o más de neutrófilos, basófilos o eosinófilos. En otro aspecto, los leucocitos son uno o más de linfocitos, monocitos o macrófagos. Preferentemente, las células son células no cancerosas o normales.

20 Un "inhibidor de la telomerasa" es un compuesto que inhibe o bloquea directa o indirectamente la expresión o actividad de la telomerasa. Se dice que un inhibidor de la telomerasa inhibe o bloquea la telomerasa si la actividad de la telomerasa en presencia del compuesto es menor que la observada en ausencia del compuesto. Preferentemente, la telomerasa es telomerasa humana. Preferentemente, el inhibidor de la telomerasa es un inhibidor del sitio activo. Más preferentemente, el inhibidor de la telomerasa es un antagonista del molde de hTR.

25 Un "polinucleótido" o "oligonucleótido" se refiere a un polímero u oligómero subunidad de nucleósido de ribosa y/o desoxirribosa que tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 200 subunidades contiguas, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 subunidades contiguas, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 subunidades. Las subunidades de nucleósido pueden estar unidas por una diversidad de enlaces intersubunidad que incluyen, pero sin limitación, enlaces fosfodiéster, fosfotriéster, metilfosfonato, P3' → N5' fosforamidato, N3' → P5' fosforamidato, N3' → P5' tiofosforamidato, y fosforotioato. El término incluye también dichos polímeros u oligómeros que tienen modificaciones, conocidas por un experto en la materia, en el azúcar (por ejemplo, sustituciones 2'), la base (véase la definición de "nucleósido" más adelante), y los términos 3' y 5'. En realizaciones en las que el resto de oligonucleótido incluye una pluralidad de enlaces intersubunidad, cada enlace puede formarse utilizando la misma química, o puede utilizarse una mezcla de químicas de enlace. Cuando un oligonucleótido se representa por una secuencia de letras, tal como "ATGUCCTG", se entenderá que los nucleótidos están dispuestos en orden 5' → 3' de izquierda a derecha. La representación de la secuencia de bases del oligonucleótido de esta manera no implica el uso de tipo particular alguno de subunidad internucleosídica o modificaciones en el componente base o en cualquier otra parte del oligonucleótido.

40 El término "nucleósido" incluye los nucleósidos naturales incluyendo formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Komberg y Baker, *DNA Replication*, 2ª edición (Freeman, San Francisco, 1992), y análogos. "Análogos", con referencia a nucleósidos, incluye nucleósidos sintéticos que llevan restos de nucleobases modificados (véase definición de "nucleobase" más adelante) y/o restos azúcar modificados, por ejemplo, como se describe generalmente por Scheit, *Nucleotide Analogs* (John Wiley, Nueva York, 1980). Dichos análogos incluyen nucleósidos sintéticos diseñados para mejorar las propiedades de unión, por ejemplo, estabilidad, especificidad, o análogas, tal como se describió por Uhlmann y Peyman (*Chemical Reviews* 90:543-584, 1990). Un oligonucleótido que contenga dichos nucleósidos, y que contiene normalmente enlaces internucleosídicos sintéticos resistentes a las nucleasas, puede designarse en sí mismo como un "análogo".

50 Una "nucleobase" incluye (i) nucleobases nativas de ADN y ARN (uracilo, timina, adenina, guanina, y citosina), (ii) nucleobases o análogos de nucleobases modificadas(os) (por ejemplo, 5-metilcitosina, 5-bromouracilo, o inosina) y (iii) análogos de nucleobases. Un análogo de nucleobase es un compuesto cuya estructura molecular imita la de una base de ADN o ARN típica.

55 Un oligonucleótido que tiene "enlaces resistentes a las nucleasas" se refiere a uno cuya cadena principal tiene enlaces subunidad que son sustancialmente resistentes a la escisión por las nucleasas, en forma no hibridada o hibridada, por las nucleasas extracelulares e intracelulares comunes en el cuerpo; es decir, el oligonucleótido presenta poca o ninguna escisión por las nucleasas en las condiciones de nucleasas normales en el cuerpo al que está expuesto el oligonucleótido. Los enlaces N3' → P5' fosforamidato (NP) o N3' → P5' tiofosforamidato (NPS) descritos más adelante son resistentes a las nucleasas.

60 El término "lípidos" se utiliza ampliamente en el presente documento para abarcar sustancias que son solubles en disolventes orgánicos, pero escasamente solubles, si acaso, en agua. El término lípidos incluye, pero sin limitación, hidrocarburos, aceites, grasas (tales como ácidos grasos y triglicéridos), esteroides, esteroides y formas derivadas de estos compuestos. Lípidos preferidos son ácidos grasos y sus derivados, hidrocarburos y sus derivados, y esteroides, tales como colesterol.

65

Los ácidos grasos contienen por lo general números pares de átomos de carbono en una cadena lineal (comúnmente 12-24 carbonos) y pueden ser saturados o insaturados, pudiendo contener, o estar modificados de modo que contengan, una diversidad de grupos sustituyentes. Por simplicidad, la expresión "ácido graso" abarca también derivados de ácidos grasos, tales como grasas o ésteres.

El término "hidrocarburo" abarca compuestos que consisten exclusivamente en hidrógeno y carbono, unidos por enlaces covalentes. El término abarca hidrocarburos de cadena abierta (alifáticos), que incluyen hidrocarburos de cadena lineal y ramificada, e hidrocarburos tanto saturados como mono- y poli-insaturados. El término abarca también hidrocarburos que contienen uno o más anillos aromáticos.

Como se utiliza en el presente documento, el término "lípidos" incluye también compuestos anfipáticos que contienen a la vez restos lipídicos e hidrófilos.

El término "tumor", como se utiliza en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, sea maligno o benigno, y todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos.

Un "fármaco mejorador" es un fármaco que puede aminorar o eliminar el riesgo del desarrollo de la reacción adversa. Por ejemplo, la Oprelvekin (NEUMEGA™, Wyeth) está aprobada para la prevención de la trombocitopenia grave posterior a la quimioterapia mielosupresora en pacientes adultos con enfermedades malignas no mieloides. Otro fármaco, la Romiplostina (NPLATE™, Amgen Inc.) se ha aprobado para el tratamiento de la púrpura trombocitopénica idiopática crónica (PTI).

Un "cáncer" puede ser un tumor maligno. Al menos el 80 % de todos los cánceres son carcinomas, e incluyen, pero sin limitación, cáncer de mama, carcinomas tanto ductales como lobulares de la mama; cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal, cáncer de faringe, cáncer de recto, cáncer pancreático, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado (incluyendo carcinoma hepatocelular), cáncer de vejiga, cáncer del tracto mamario, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer de piel (incluyendo carcinoma de células basales, el carcinoma de piel más común distinto del melanoma y carcinoma de células escamosas, una forma común de cáncer de piel), y cáncer de cerebro. Las células cancerosas que constituyen un carcinoma se conocen como "células de carcinoma". En el término "cáncer" se incluyen también cánceres de las células sanguíneas tales como leucemias, linfomas y mielomas, y cánceres de otros tipos de tejido tales como sarcomas, mesotelioma, gliomas, melanoma, neuroblastoma, etc.

Una "prognosis" se utiliza en el presente documento para hacer referencia a la predicción de la probabilidad de una reacción adversa al tratamiento con un inhibidor de la telomerasa. El término "predicción" se utiliza en el presente documento para hacer referencia a la probabilidad de que un sujeto o paciente mamífero responda favorable o desfavorablemente a un fármaco o un conjunto de fármacos, y también a la extensión de dichas respuestas.

La expresión "terapia adyuvante" se utiliza generalmente para hacer referencia a un tratamiento que se proporciona adicionalmente a un tratamiento primario (inicial). En el tratamiento del cáncer, la expresión "terapia adyuvante" se utiliza para hacer referencia a la quimioterapia, la terapia hormonal y/o la radioterapia siguiente a la eliminación quirúrgica del tumor, con la finalidad primaria de reducir el riesgo de la reaparición del cáncer.

#### B. Descripción Detallada

La práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique otra cosa, métodos convencionales de biología molecular, microbiología, biología celular y bioquímica que están dentro de la experiencia en la técnica. Dichos métodos se explican detalladamente en la bibliografía, tal como "*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*", 2ª edición (Sambrook et al., 1989); "*Oligonucleotide Synthesis: A practical Approach*" (M.J. Gait editor, 1984); "*Current Protocols in Molecular Biology*" (F.M. Ausubel et al., editores, 1987) y "*PCR: The Polymerase Chain reaction*" (Mullis et al., editores, 1994).

La presente descripción invención proporciona un algoritmo para la determinación de la probabilidad de una reacción adversa al tratamiento con un inhibidor de la telomerasa. El método está basado en la identificación de (1) la longitud media o mediana de telómeros en una célula de un paciente y la dosificación del inhibidor de la telomerasa recibida pueden servir para determinar la probabilidad de que el paciente sufra una reacción adversa a la terapia con el inhibidor de la telomerasa, (2) ciertos pesos asignados a la longitud y la dosis media o mediana del telómero reflejan su valor en la predicción de la respuesta a la terapia y se utilizan en una fórmula; y (3) determinación de valores umbral utilizados para dividir los pacientes en grupos con grados variables de riesgo de desarrollar una reacción adversa, tales como grupos de riesgo bajo, medio y alto o grupos en los cuales la probabilidad de una reacción adversa a los inhibidores de la telomerasa es baja, media o alta. El algoritmo proporciona un registro numérico que puede utilizarse para tomar decisiones de tratamiento concernientes a la terapia de los pacientes de cáncer.



## 1. Técnicas para la determinación de la longitud de los telómeros

Están disponibles varios métodos para medida de la longitud de las repeticiones teloméricas en las células. Generalmente, las células cuyos telómeros deben medirse se aíslan de la muestra biológica del paciente. El ADN se aísla de las células por métodos conocidos en la técnica, tales como por ejemplo los protocolos de proteinasa K, ARNasa A y fenol/cloroformo (Sambrook et al. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2ª edición (1989) o el uso de kits de purificación de ADN disponibles en el mercado.

### A. Análisis por transferencia Southern

Un método para el análisis de las longitudes de telómeros consiste en medir la longitud del fragmento de restricción terminal (FRT) por análisis por transferencia Southern. En este método, el ADN celular se digiere con las enzimas de restricción tales como Hinf 1 y RsaI y se hace pasar en geles de agarosa para transferencia a filtros Nytran. Los filtros se hibridan con una sonda específica de telómeros tal como (TTAGGG)<sub>3</sub>. Se generan autorradiografías sin pantalla de intensificación utilizando el intervalo de respuesta lineal de la película y se exploran con un densitómetro. La salida se digitaliza. La longitud media del telómero se define como  $\Sigma(DO_i)/\Sigma(DO_i/L_i)$  donde  $DO_i$  es la salida del densitómetro (unidades arbitrarias) y  $L_i$  es la longitud del ADN en la posición  $i$ . Se calculan las sumas a lo largo del intervalo de 3-17 KB. Este cálculo supone que el ADN se transfiere con eficiencia igual desde todos los puntos en el gel y que el número de secuencias diana (repeticiones teloméricas) por fragmento de ADN es proporcional a la longitud del ADN. La señal de los geles puede normalizarse para la señal de otras transferencias Southern utilizando una sonda de control a fin de estimar la cantidad total de ADN telomérico así como su longitud. (Harley et al., *Nature* 345:458-460 (1990), Englehardt et al., *Leukemia* 12:13-24 (1998)). Este método proporciona también la distribución de tamaños de las longitudes de los telómeros en la población de células de la cual se aisló el ADN. Dado que los telómeros cortos son particularmente susceptibles a la disfunción telomérica, las modificaciones de la presente invención podrían incluir cálculos basados en la longitud telomérica media o mediana de los telómeros cortos (por ejemplo, para el cuartil de telómeros más corto).

### B. Reacción en cadena de la polimerasa

Se han desarrollado métodos de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para medir las longitudes medias de los telómeros y específicas de los cromosomas. El primer método proporciona una medida del ADN telomérico con relación al ADN genómico (normalmente un gen de una sola copia) como valor de relación simple de una muestra de ADN genómico (Cawthon RM, *Nucl. Acids Res.* Vol. 30, págs. e47).

En el Análisis de la longitud de los telómeros Simples (STELA, del inglés *Single Telomere Length Analysis*), se determinan las longitudes de los telómeros de cromosomas individuales (Baird et al., *Nature Genetics* 33 203-207 (2003)). En este proceso, el ADN se digiere con una enzima de restricción tal como EcoRI y se cuantifica por fluorometría de Hoechst. Un enlazador o "telorette" que comprende varias bases complementarias a la región monocatenaria TTAGGG del cromosoma, precedido en el extremo 5' por 20 nucleótidos de ADN de secuencia singular. Este telorette se hibrida con el saliente TTAGGG en el extremo del telómero y se liga al extremo 5' de la cadena complementaria rica en C del cromosoma. Esto marca eficazmente el extremo del telómero con una cola de telorette que tiene una secuencia singular capaz de fijarse a uno de los cebadores de la PCR. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) se realiza luego utilizando un cebador ("teltail") que es complementario a la cola del telorette junto con un cebador que corresponde a la región del cromosoma adyacente al telómero. El cebador correspondiente a la región del cromosoma adyacente al telómero puede hacerse también específico del cromosoma aprovechando los polimorfismos cromosómicos. Después de la PCR. Los fragmentos de ADN se resuelven por electroforesis en gel de agarosa y se detectan por hibridación de transferencias Southern con una sonda adyacente al telómero cebado aleatoriamente. El tamaño de los fragmentos hibridados puede determinarse a partir de patrones de tamaño en el gel y utilizarse para calcular la longitud de los telómeros individuales. Este método proporciona también la distribución de tamaño de los telómeros del cromosoma específico elegido como objetivo en la población de células de la que se aisló el ADN. Dado que la PCR sesga la amplificación de los fragmentos cortos del ADN, STELA es particularmente útil para análisis de los telómeros más cortos en una célula. Esto tiene aplicación en la presente invención como se ha descrito arriba.

### C. Citometría de flujo y análisis por FISH

Le promedio o la mediana de la longitud de las repeticiones teloméricas en las células puede determinarse también utilizando hibridación in situ fluorescente (FISH, del inglés *fluorescent in situ hybridization*) con sondas marcadas de ácido nucleico peptídico (ANP) específicas para repeticiones teloméricas en combinación con medidas de fluorescencia por citometría de flujo (Flow-FISH). (Véase Baerlocher et al., *Nature Protocols* vol. 1, 2365-2376 (2006)). La ventaja de Flow-FISH radica en proporcionar información multiparamétrica acerca de la longitud de las repeticiones teloméricas en miles de células individuales. La Flow-FISH multicolor automatizada es uno de los métodos más rápidos y más sensibles disponibles para medir el promedio o la mediana de la longitud de los telómeros en granulocitos, linfocitos T indiferenciados, linfocitos T de memoria, células B y linfocitos citotóxicos naturales (NK) en la sangre humana. (Baerlocher y Lansdorp, *Methods in Cell Biol.* 75, 719-750 (2004).

En Flow-FISH se centrifuga sangre entera, se lisan los eritrocitos y el lisado de eritrocitos se separa del sedimento de células constituido por granulocitos, monocitos, linfocitos, plaquetas y cualesquiera eritrocitos restantes. El sedimento de leucocitos de la sangre se resuspende en un tampón de hibridación y se somete a recuento. Los leucocitos humanos nucleadas de la sangre se mezclan con timocitos de bovino, incluidos como control interno puesto que estas células se obtienen fácilmente y debido a que la longitud de los telómeros en los timocitos de bovino es aproximadamente 2-3 veces mayor que el valor medido normalmente en las células humanas. En consecuencia, estas células de control se distinguen fácilmente de las células de ensayo humanas y proporcionan un punto de referencia para medidas de la fluorescencia de los telómeros. La mezcla de células humanas y timocitos de bovino se hibrida con la sonda de ANP (ácido nucleico peptídico) marcada con Cy5 o con fluoresceína, que es complementaria a la secuencia de repetición de los telómeros. Una segunda mezcla de las células no se hibrida con la sonda. Esta último es necesario para medir el nivel de autofluorescencia en las células de interés y hacer posible el cálculo de la longitud de los telómeros a partir de la hibridación específica del ANP. La sonda de ANP marcada con fluoresceína o Cy5 está disponible en el mercado. Después de la hibridación, las células se reducen a un sedimento y se lava el sedimento de células. Las células pueden someterse a contratinción con concentraciones no saturantes de un tinte de ADN y diversos anticuerpos. Las muestras de células se analizan en un citómetro de flujo.

El primer paso en el análisis posterior es identificar las células utilizando luz directa y dispersión lateral en una gráfica de puntos bivalente. Pueden observarse tres poblaciones de células. Los timocitos de bovino pueden distinguirse de los linfocitos humanos, los cuales pueden distinguirse a su vez de los granulocitos. Por combinación de la fluorescencia en los gráficos de contorno pueden obtenerse histogramas de fluorescencia de las diferentes poblaciones de células, que se utilizan para cálculos posteriores de la longitud de los telómeros. Pueden utilizarse anticuerpos específicos para células CD45RA y CD20 a fin de realizar el análisis de la longitud de los telómeros de poblaciones específicas dentro de la población de linfocitos. La longitud media de telómero puede determinarse sustrayendo la fluorescencia de las poblaciones de leucocitos de la sangre sin teñir del nivel de fluorescencia de las células ANP teñidas. Este método recoge una señal media de los telómeros de cada célula individual, por lo que puede obtenerse la distribución de tamaños de telómero de la población global, y podría analizarse el subconjunto de células con telómeros cortos. Esto tiene aplicación en la presente invención como se ha descrito arriba.

2. Algoritmo para predecir los niveles de plaquetas, o cambios después de la terapia de inhibición de la telomerasa y para generar la probabilidad de reacción adversa

Un aspecto de la presente invención es utilizar la longitud media medida de los telómeros en las células del paciente para proporcionar información concerniente a la probabilidad de una reacción adversa a un inhibidor de la telomerasa antes de la administración de un inhibidor de la telomerasa. En la etapa siguiente, la longitud media medida de los telómeros se multiplica por un coeficiente que refleja su contribución con relación al riesgo de la reacción adversa al tratamiento con un inhibidor de la telomerasa a fin de determinar el componente de longitud de los telómeros.

La etapa siguiente consiste en tomar la dosis prevista del inhibidor de la telomerasa y multiplicar la dosis por un coeficiente que refleja su contribución con relación al riesgo de reacción adversa al tratamiento con un inhibidor de la telomerasa para determinar el componente de dosificación. El componente de longitud de los telómeros y el componente de dosificación se suman con un factor de intersección para determinar la probabilidad de la reacción adversa.

Por ejemplo, la ecuación para describir el número predicho de plaquetas en el nadir de plaquetas en un paciente después de 4 semanas completas de tratamiento es como se indica a continuación:

$$n.^{\circ} \text{ predicho de plaquetas} = \text{número basal de plaquetas} - (\text{número basal de plaquetas} \times \% \text{ de cambio en plaquetas}/100)$$

$$\% \text{ de cambio en el } n.^{\circ} \text{ de plaquetas} = (-73,8) - 6,6 \times \text{dosis de inhibidor (mg/kg)} + 11,2 \times \text{promedio de la longitud de los telómeros (kpb)}$$

La ecuación para describir el número predicho de plaquetas en el nadir de plaquetas en un paciente durante las primeras 4 semanas de tratamiento es como se indica a continuación:

$$n.^{\circ} \text{ predicho de plaquetas} = e^{[(-0,38) - 0,13 \times \text{dosis de inhibidor (mg/kg)} + 0,25 \times \text{longitud media de los telómeros (kpb)} + 0,80 \times \log \text{ del número basal de plaquetas}]}$$

Pueden calcularse intervalos de predicción, por ejemplo, para predecir el cambio porcentual probable en los niveles de plaquetas o el nadir de plaquetas para pacientes o sujetos con un conjunto particular de valores basales y de tratamiento, por ejemplo, longitud de los telómeros, plaquetas basales y nivel de dosis. La ecuación de regresión proporciona el valor esperado para un sujeto futuro con covariantes especificadas (J. Neter et al. *Applied linear statistical models: regression, analysis of variance, and experimental designs*, 3ª edición, págs. 81-83 (1990)). Sin embargo, debido al error de distribución del muestreo, así como a la variabilidad interindividual, un paciente puede tener niveles de plaquetas que caen por encima o por debajo del valor predicho. Puede generarse una serie de

intervalos de predicción con cobertura decreciente. Por ejemplo, puede generarse un intervalo de predicción del 99 % con límites superior e inferior  $P_{S99}$  y  $P_{I99}$  que contendría, por término medio, 99 % de los niveles de plaquetas observados en los pacientes; y puede generarse también un intervalo de predicción del 90 % con niveles superior e inferior  $P_{S90}$  ( $< P_{S99}$ ) y  $P_{I90}$  ( $> P_{I99}$ ) que contendría, por término medio, el 90 % de los niveles de plaquetas observados futuros. Esto hace posible determinar la probabilidad de que el paciente pudiera desarrollar una trombocitopenia de grado 3 o 4.

La probabilidad de riesgo de una reacción adversa, como se determina por el algoritmo de la presente invención, proporciona instrumentos valiosos para que el médico clínico tome decisiones de tratamiento críticas. Por tanto, si el riesgo de un paciente particular es bajo, el médico podría decidir que después de la eliminación quirúrgica del cáncer, el paciente pueda tratarse agresivamente con dosis altas y frecuencia elevada de administración del inhibidor de la telomerasa. Si, por el contrario, se determina que el nivel de riesgo es alto, puede utilizarse esta información para decidir el nivel de dosificación del inhibidor de la telomerasa a administrar y la posología de dosificación que se ha de utilizar, incluyendo el uso de semanas sin dosis administrada alguna, denominadas semanas "de descanso". El médico puede decidir controlar más estrechamente al paciente respecto a reacciones adversas, tales como trombocitopenia. El médico puede decidir administrar un agente farmacéutico mejorador simultáneamente con el inhibidor de la telomerasa. Si el riesgo del paciente respecto a una reacción adversa es alto, pueden utilizarse otras modalidades de tratamiento para combatir el cáncer en dicho paciente particular. Otras modalidades de tratamiento para un cáncer particular incluyen, por ejemplo, otras quimioterapias tales como tratamientos basados en antraciclina y/o taxano, inhibidores HER, inhibidores EGFR y/u otras opciones de tratamiento, tales como radioterapia sola, antes o después de la quimioterapia.

### 3. Inhibidores de la telomerasa y tratamiento del cáncer con un inhibidor de la telomerasa

La telomerasa es una ribonucleoproteína que cataliza la adición de secuencias de repetición teloméricas (que tienen la secuencia 5'-TTAGGG-3' en humanos) a los extremos de los cromosomas. Se ha demostrado que una diversidad de células cancerosas son telomerasa-positivas, incluyendo células tumorales de cáncer de piel, tejido conectivo, adiposo, de mama, de pulmón, de estómago, de páncreas, de ovario, de cérvix, de útero, de riñón, de vejiga, de colon, de próstata, del sistema nervioso central (CNS), de retina y hemáticos (tales como mieloma, leucemia y linfoma). El direccionamiento de la telomerasa puede ser eficaz para proporcionar tratamientos que discriminen entre células malignas y normales en alto grado, evitando muchos de los efectos secundarios perjudiciales que pueden acompañar a las posologías quimioterápicas dirigidas indiscriminadamente a las células en división.

Los inhibidores de la telomerasa identificados hasta la fecha incluyen oligonucleótidos, preferentemente oligonucleótidos que tienen enlaces resistentes a las nucleasas, así como compuestos de molécula pequeña.

#### A. Compuestos de molécula pequeña

Inhibidores de molécula pequeña de la telomerasa incluyen, por ejemplo, BRACO19 ((9-(4-(N,N-dimetilamino)fenilamino)-3,6-bis(3-pirrolidino-propionamido)acridina (véase *Mol. Pharmacol.* 61 (5): 1154-62, 2002); DDOD (dietiloxadicarbocianina), y telomestatina. Estos compuestos pueden actuar como estabilizadores de G cuádruple, que promueven la formación de una configuración de G cuádruple inactiva en el componente ARN de la telomerasa. Otros inhibidores de la telomerasa de molécula pequeña incluyen BIBR1532 (ácido 2-[(E)-3-naften-2-il-but-2-enoilamino]benzoico) (véase Ward y Autexier, *Mol. Pharmacol.* 68:779-786, 2005; también *J. Biol. Chem.* 277 (18): 15566-72, 2002); AZT y otros análogos de nucleósidos, tales como ddG y ara-G (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. número 5.695.932 y 6.638.789), y ciertos derivados de tiopiridina, benzo[b]tiofeno, y pirido[b]tiofeno, descritos por Gaeta et al. en las Patentes de los EE.UU. número 5.767.278, 5.770.613, 5.863.936, 5.656.638 y 5.760.062. Un ejemplo es 3-clorobenzo[b]tiofeno-2-carboxi-2'-[(2,5-diclorofenil-amino)tia]hidrazina, descrito en la Patente de los EE.UU. N.º 5.760.062.

#### B. Inhibidores de la telomerasa basados en oligonucleótidos: secuencia y composición

Los genes que codifican tanto la proteína como los componentes de ARN de la telomerasa humana han sido clonados y secuenciados (véanse las Patentes de los EE.UU. número 6.261.836 y 5.583.016, respectivamente). Pueden direccionarse oligonucleótidos contra el ARNm que codifica el componente proteínico de la telomerasa (cuya forma humana se conoce como transcriptasa inversa de la telomerasa humana, o hTERT) o el componente ARN de la holoenzima de la telomerasa (cuya forma humana se conoce como ARN de la telomerasa humana, o hTR). Patentes de los EE.UU. número 5.583.016; 5.776.679; y 5.837.857.

La secuencia molde del componente ARN de la telomerasa está localizada en la región definida por los nucleótidos 46-56 (5'-CUAACCCUAAC-3') (SEQ ID NO: 1), que es complementaria a una secuencia telomérica compuesta de aproximadamente una y dos tercios de unidades de repeticiones teloméricas. La región molde actúa para especificar la secuencia de las repeticiones teloméricas que añade la telomerasa a los extremos de los cromosomas y es esencial para la actividad de la enzima telomerasa (véase por ejemplo Chen et al., *Cell* 100:503-514, 2000; Kim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (14): 7982-7987, 2001). El diseño de agentes antisentido, ribozima o ARN de interferencia pequeño (ARNip) para inhibir o causar la destrucción de ARNm es muy conocido (véase, por ejemplo,

Lebedeva, I, et al. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, vol. 41: 403-419, abril 2001; Macejak, D, et al., *Journal of Virology*, vol. 73 (9): 7745-7751, septiembre 1999, y Zeng, Y. et al., PNAS vol. 100 (17) p. 9779-9784, 19 de agosto, 2003), y dichos agentes pueden diseñarse para direccionar el ARNm de hTERT e inhibir con ello la producción de la proteína hTERT en una célula diana, tal como una célula de cáncer (véanse, por ejemplo, las

5 Patentes de los EE.UU. número 6.444.650 y 6.331.339).  
Los oligonucleótidos que dirigen hTR (es decir, el componente de ARN de la enzima) actúan como inhibidores de la actividad de la enzima telomerasa por bloqueo o interferencia de otro tipo con la interacción de hTR con la proteína hTERT, interacción que es necesaria para la función de la telomerasa. Véase, por ejemplo, Villeponteau et al., Patente de los EE.UU. N.º 6.548.298.

10 Una región diana preferida de hTR es la región molde, que abarca los nucleótidos 30-67 del componente de ARN de la telomerasa humana. A los oligonucleótidos dirigidos a esta región se hace referencia en el presente documento como "inhibidores del molde de hTR" (véase, por ejemplo, Herbert et al., *Oncogene* 21(4): 638-42 (2002)). Preferentemente, un oligonucleótido de este tipo incluye una secuencia que es complementaria o cuasi-complementaria a cierta porción de la región de 11 nucleótidos que tiene la secuencia 5'-CUAACCCUAAAC-3' (SEQ ID NO: 1), abarcando los nucleótidos 46-56 del componente ARN de la telomerasa humana (hTR).

15 Otra región diana preferida es la región que abarca los nucleótidos 137-179 de la telomerasa humana (hTR) (véase Pruzar et al., *Nucl. Acids Research*, 30:559-568, 2002). Dentro de esta región, la secuencia que abarca 141-153 es una diana preferida. La publicación PCT WO 98/28442 describe el uso de oligonucleótidos de al menos 7 nucleótidos de longitud para inhibir la telomerasa, donde los oligonucleótidos están diseñados de modo que sean complementarios a porciones accesibles de la secuencia de hTR fuera de la región molde, que incluye los nucleótidos 137-196, 290-319, y 350-380 de hTR.

20 La región del oligonucleótido terapéutico que se dirige a la secuencia hTR es preferentemente exactamente complementaria a la secuencia hTR correspondiente. Si bien pueden tolerarse desapareamientos en ciertos casos, cabe esperar que los mismos disminuyan la especificidad y actividad del conjugado oligonucleotídico resultante. En realizaciones particulares, la secuencia de bases del oligonucleótido se selecciona por tanto de modo que incluya una secuencia de al menos 5 nucleótidos exactamente complementarios al hTR diana, pudiendo obtenerse una inhibición mejorada de la telomerasa si se emplean longitudes crecientes de secuencia complementaria, tales como al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 13 o al menos 15 nucleótidos exactamente complementarios del hTR diana. En otras realizaciones, la secuencia del oligonucleótido incluye una secuencia de al menos 5 a 20, de al menos 8 a 20, de al menos 10 a 20 o de al menos 10 a 15 nucleótidos exactamente complementarios a la secuencia hTR diana.

25 Puede obtenerse una actividad óptima de inhibición de la telomerasa cuando la longitud total del oligonucleótido se selecciona entre modo que sea complementaria a la secuencia de hTR diana. Sin embargo, no es necesario que la longitud total del oligonucleótido sea exactamente complementaria a la secuencia diana, y la secuencia de oligonucleótidos puede incluir regiones que no son complementarias a la secuencia diana. Dichas regiones pueden añadirse, por ejemplo, para conferir otras propiedades al compuesto, tales como secuencias que facilitan la purificación. Como alternativa, un oligonucleótido puede incluir repeticiones múltiples de una secuencia complementaria a una secuencia de hTR diana.

30 El método incluye la administración al sujeto de un inhibidor oligonucleotídico de la telomerasa del tipo compuesto por un oligonucleótido que tiene enlaces intersubunidad resistentes a las nucleasas y una secuencia de oligonucleótido eficaz para fijar la hibridación específica de secuencia a una región molde de hTR. Preferentemente, la cantidad del inhibidor de la telomerasa es eficaz para inhibir la proliferación de células cancerosas en el sujeto cuando el inhibidor de la telomerasa se administra solo.

35 El oligonucleótido puede tener una longitud de 10-20 bases. Preferentemente, el oligonucleótido tiene una longitud de 13-20 bases e incluye la secuencia (5'-TAGGGTTAGACAA-3') (SEQ ID NO: 2). Un inhibidor de la telomerasa ilustrativo es el compuesto identificado como GRN163L, o un análogo del mismo. Este compuesto tiene (i) enlaces internucleosídicos N3'→P5'-tiofosforamidato; (ii) la secuencia 5'-TAGGGTTAGACAA-3' (SEQ ID NO: 2); y (iii) un resto palmitoilo (C16) enlazado al extremo 5' del oligonucleótido a través de un enlazador glicerol o aminoglicerol.

40 Los enlaces internucleosídicos en el oligonucleótido pueden incluir cualquiera de las químicas de oligonucleótidos disponibles, por ejemplo, fosfodiéster, fosfotriéster, metilfosfonato, P3'→N5'-fosforamidato, N3'→P5'-fosforamidato, N3'→P5'-tiofosforamidato, y fosforotioato. Normalmente, pero no necesariamente, la totalidad de los enlaces internucleosídicos dentro del oligonucleótido serán del mismo tipo, aunque el componente oligonucleotídico puede sintetizarse utilizando una mezcla de enlaces diferentes.

45 En realizaciones preferidas, el oligonucleótido tiene al menos un enlace N3'→P5'-fosforamidato (NP) o N3'→P5'-tiofosforamidato (NPS), enlace que puede representarse por la estructura: 3'-(-NH-P(=O)(-XR)-O-(-5')), en la que X es O o S y R se selecciona entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo, y arilo; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, cuando XR es OH o SH. Más preferentemente, la totalidad de los enlaces del oligonucleótido son enlaces NP o, mucho más preferentemente, la totalidad de enlaces son NPS.

Una secuencia particularmente preferida para un oligonucleótido inhibidor del molde hTR es la secuencia complementaria a los nucleótidos 42-54 del hTR. El oligonucleótido que tiene esta secuencia de enlaces (TAGGGTTAGACCA) (SEQ ID NO: 2) y N3'→P5'-tiofosforamido (NPS) se designa en el presente documento como GRN163. Véase, por ejemplo, Asai et al., *Cancer Research* 63:3931-3939 (2003); Gryaznov et al., *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22(5-8): 577-81 (2003).

Estos compuestos pueden prepararse como se describe, por ejemplo, en McCurdy et al., *Tetrahedron Letters* 38:207-210 (1997) o Pongracz y Gryaznov, *Tetrahedron Letters* 49:7661-7664 (1999). Los monómeros 3'-amino-nucleósido de partida pueden prepararse como se describe en Nelson et al., *J. Org. Chem.* 62:7278-7287 (1997) o por los métodos descritos en Gryaznov et al., Publicación de Solicitud de los EE.UU. N.º 2006/0009636.

Puede utilizarse una diversidad de enfoques de síntesis para conjugar un resto lipídico L al oligonucleótido, dependiendo de la naturaleza del enlace seleccionado; véase, por ejemplo, Mishra et al., *Biochim. et Biophys. Acta* 1264:229-237 (1995), Shea et al., *Nucleic Acids Res.* 18:3777-3783 (1995), o Rump et al., *Bioconj. Chem.* 9:341-349 (1995). Normalmente, la conjugación se realiza utilizando grupos funcionales adecuados en un término oligonucleotídico. Por ejemplo, el grupo 3'-amino presente en el término 3' de los oligonucleótidos NP y NPS puede hacerse reaccionar con ácidos carboxílicos, cloruros de ácido, anhídridos y ésteres activos, utilizando catalizadores adecuados de acoplamiento, para formar un enlace amídico. Los grupos tiol son adecuados también como grupos funcionales (véase Kupihar et al., *Bioorg. Med. Chem.* 9:1241-1247 (2002)). Diversos modificadores funcionalizados con amino y tiol de longitudes de cadena diferentes están disponibles en el mercado para síntesis de oligonucleótidos.

Los enfoques específicos para la preparación de grupos lipídicos a un término de un oligonucleótido NP o NPS incluyen los descritos en la Publicación de Solicitud de los EE.UU. N.º 2005/0113325. Además de los enlaces amida arriba indicados, por ejemplo, los lípidos pueden unirse también a la cadena del oligonucleótido utilizando un derivado fosforamido del lípido, para producir un enlace fosforamido o tiofosforamido que conecta el lípido y el oligonucleótido. El grupo 3'-amino libre del oligonucleótido totalmente protegido fijado al soporte puede hacerse reaccionar también con un aldehído lipídico adecuado, seguido por reducción con cianoborohidruro de sodio, que produce un enlace amina.

El oligonucleótido GRN163 administrado solo ha demostrado actividad inhibidora *in vitro* en cultivo de células, incluyendo células de carcinoma epidermoide, epitelio de mama, carcinoma renal, adenocarcinoma renal, pancreático, de cerebro, colon, próstata, leucemia, linfoma, mieloma, epidérmico, cervical, de ovario y de cáncer hepático.

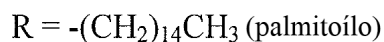
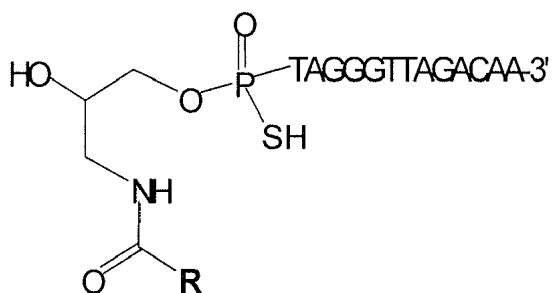
El oligonucleótido GRN163 ha sido ensayado también y ha demostrado ser terapéuticamente eficaz en una diversidad de modelos de tumores animales, incluyendo células de ovario y de pulmón, tanto de células microcíticas como de células no microcíticas.

### C. Conjugados lípido-oligonucleótido

Preferentemente, el inhibidor enzimático basado en oligonucleótidos incluye al menos un grupo lipídico enlazado covalentemente (véase la Publicación de los EE.UU. N.º 2005/0113325). Esta modificación proporciona propiedades excelentes de captura celular, tales que puede obtenerse un efecto biológico equivalente utilizando cantidades menores del oligonucleótido conjugado comparado con la forma no modificada. Cuando se aplica al escenario terapéutico humano, esto puede traducirse en riesgos de toxicidad reducidos, y ahorro de costes.

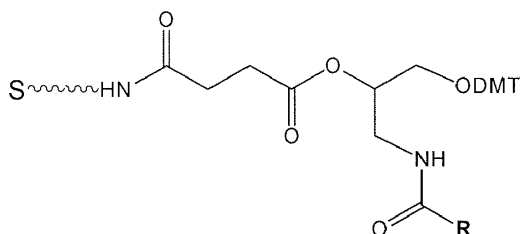
El grupo lipídico L es normalmente un hidrocarburo o ácido graso alifático, incluyendo derivados de hidrocarburos y ácidos grasos, siendo ejemplos los compuestos de cadena lineal saturados que tienen 14-20 carbonos, tales como ácido mirístico (tetradecanoico), ácido palmítico (hexadecanoico), y ácido esteárico (octadecanoico), y sus formas de hidrocarburos alifáticos correspondientes, tetradecano, hexadecano y octadecano. Ejemplos de otros grupos lipídicos adecuados que pueden emplearse son esteroides, tales como colesterol, y ácidos grasos e hidrocarburos sustituidos, particularmente formas polifluoradas de estos grupos. El alcance del grupo lipídico L incluye derivados tales como derivados amina, amida, éster y carbamato. El tipo de derivado viene determinado a menudo por el modo de enlace al oligonucleótido, como se ilustra más adelante.

En una estructura ilustrativa, el resto lipídico es palmitoil-amida (derivado de ácido palmítico), conjugada a través de un enlazador aminoglicerol al grupo 5'-tiofosfato de un oligonucleótido enlazado por NPS. El NPS-oligonucleótido que tiene la secuencia representada por GRN163 y conjugada de esta manera (como se muestra más adelante) se designa GRN163L en el presente documento. En una segunda estructura ilustrativa, el lípido, como una palmitoil-amida, está conjugado por el grupo terminal 3'-amino de un oligonucleótido NPS.

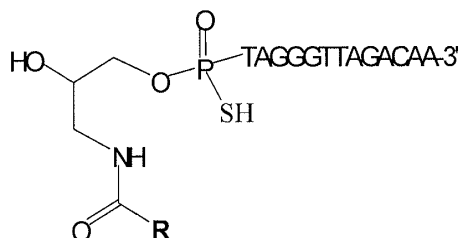


GRN163L

Para la unión de un lípido al término 5', como se describe también en la Publicación de Solicitud de los EE.UU. N.º 2005/0113325, el oligonucleótido puede sintetizarse utilizando un soporte sólido modificado que contiene lípido. La reacción de 3-amino-1,2-propanodiol con un cloruro de acilo graso (RC(O)Cl), seguida por dimetoxitritilación del alcohol primario y succinilación del alcohol secundario, proporciona un compuesto intermedio que se acopla después, por la vía del grupo succinil-carboxilo libre, al soporte sólido. Un ejemplo de un soporte modificado se muestra a continuación, donde S- representa un soporte CPG de alquilamina de cadena larga, y R representa un lípido.



Este procedimiento va seguido por la síntesis del oligonucleótido en la dirección 5' a 3', como se describe, por ejemplo, en Pongracz y Gryaznov (1999), que comienza con la desprotección y fosfitilación del grupo -DMT. Esto es eficaz para producir, por ejemplo, la estructura siguiente, después de escisión del soporte sólido:



La estructura anterior, cuando -R es  $-(CH_2)_{14}CH_3$  (palmitoilo), se designa en el presente documento como GRN163L.

#### IV. Administración

El cáncer sería también uno que es sensible a la inhibición de las células cancerosas por inhibición de la telomerasa. Como se ha indicado arriba, los inhibidores de la oligonucleótido-telomerasa, como se ilustran por GRN163 y GRN163L, han demostrado actividad inhibidora *in vitro* contra las células cancerosas humano de riñón, pulmón, páncreas, cerebro, colon, próstata, mama, leucemia, linfoma, mieloma, epidérmico, cervical, de ovario y de hígado, e *in vivo*, por administración local y sistémica, contra las células de cáncer humano de cerebro, próstata, linfoma, mieloma, cervical, de pulmón, y de hígado. Otras dianas preferidas incluyen cánceres de pulmón microcítico, de esófago, de cabeza y cuello, y de estómago. La dosis administrada y la pauta de dosificación seguirán, por ejemplo, dosis conocidas o recomendadas para el inhibidor empleado, como se indica, por ejemplo, en los prospectos de productos farmacéuticos o en datos clínicos o de modelos animales publicados. Para GRN163L, la dosis inicial de adultos es de aproximadamente 0,8 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg; de aproximadamente 1,6 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. La dosis de adultos para GRN163L es de aproximadamente 1,6 mg/kg; o de aproximadamente 3,2 mg/kg; o de aproximadamente 4,8 mg/kg; o de aproximadamente 6,2 mg/kg; o de aproximadamente 7,2 mg/kg; o de aproximadamente 9 mg/kg; o de aproximadamente 12 mg/kg; a aproximadamente 20 mg/kg. La dosis puede administrarse dos veces por semana, una vez por semana o con otras posologías de administración. Pueden requerirse dosis mayores para producir la remisión deseada en algunos pacientes.

El GRN163L puede administrarse a un paciente a una dosis de al menos aproximadamente 4,8 mg/kg de GRN163L el día 1 y aproximadamente el día 8 de un ciclo de 21 días. Como alternativa, el mismo puede administrarse a una dosis de al menos aproximadamente 4,8 mg/kg de GRN 163L el día 1 y aproximadamente el día 15 en un ciclo de 28 días. Como alternativa, GRN163L puede administrarse a un paciente a una dosis de al menos aproximadamente 1,6 mg/kg de GRN163L dos veces en la primera semana de un ciclo de 14 días.

El protocolo terapéutico para administración del inhibidor de la telomerasa en la terapia dependerá de diversos factores que incluyen, pero sin limitación, el tipo de cáncer, la edad y el estado general de salud del paciente, la agresividad de progresión de la enfermedad, la longitud de los telómeros y actividad de la telomerasa de las células enfermas que se han de tratar, y la capacidad del paciente para tolerar los agentes de comprenden la combinación, lo cual puede depender de la actividad de la telomerasa y la longitud de los telómeros en diversas células normales, en particular las células normales en tejidos altamente proliferativos, en particular, pero sin limitación, la médula ósea.

En general, se contempla el tratamiento de todos los tipos de cáncer y malignidades hemáticas. En realizaciones seleccionadas, la enfermedad diana comprende un tumor sólido; en otras realizaciones, la enfermedad diana comprende una malignidad hemática. Un curso ilustrativo de tratamiento implica dosis múltiples. La secuencia de tratamientos de combinación estará determinada por criterios de cumplimiento clínico y/o datos preclínicos o clínicos que soportan estrategias de optimización de la dosis para aumentar la eficacia o reducir la toxicidad del tratamiento de combinación. El tiempo entre dosis puede ser durante un periodo de aproximadamente 1-6 horas, a aproximadamente 6-12 horas, a aproximadamente 12-24 horas, a aproximadamente 1-2 días, a aproximadamente 1-2 semanas o periodos más largos después de la iniciación del tratamiento. Durante un curso de tratamiento, puede re-evaluarse la necesidad de completar las dosis planificadas.

Los compuestos se pueden administrar por inyección directa de un tumor o su vasculatura. Como alternativa, el tumor puede infundirse o perfundirse con los compuestos terapéuticos utilizando cualquier vehículo de administración adecuado. Los compuestos se pueden administrar localmente a un órgano afectado. Pueden realizarse también administración sistémica. En caso apropiado puede aplicarse administración continua; por ejemplo, donde un tumor ha sido escindido y se trata el lecho del tumor para eliminar la enfermedad residual. Se prefiere la administración mediante jeringuilla o cateterización. Dicha perfusión continua puede tener lugar durante un periodo de aproximadamente 1-6 horas, a aproximadamente 6-12 horas, a aproximadamente 12-24 horas, a aproximadamente 1-2 días, a aproximadamente 1-2 semanas o más larga después de la iniciación del tratamiento. Generalmente, la dosis de la composición terapéutica por perfusión continua será equivalente a la proporcionada por una sola inyección o inyecciones múltiples, ajustada o ajustadas a lo largo de un periodo de tiempo durante el cual tiene lugar la perfusión.

Los agentes terapéuticos se administran a un sujeto, tal como un paciente humano, en una formulación y en una cantidad eficaces para alcanzar un resultado clínicamente deseable. Para el tratamiento del cáncer, los resultados deseables incluyen reducción en la masa tumoral (como se determina por palpación u obtención de imágenes; por ejemplo, por radiografía, exploración con radionucleótidos, exploración TAC, o IRM), reducción en la velocidad de crecimiento del tumor, reducción en la velocidad de formación de metástasis (como se determina por ejemplo, por análisis histoquímico de especímenes de biopsia), reducción en los marcadores bioquímicos (incluyendo marcadores generales tales como ESR, y marcadores específicos de tumor tales como PSA de suero), y mejora en la calidad de vida (como se determina por evaluación clínica, por ejemplo, registro de Karnofsky), tiempo aumentado para la progresión, supervivencia exenta de enfermedad y supervivencia global. La cantidad de cada agente por dosis y el número de dosis requeridas para alcanzar dichos efectos variarán dependiendo de muchos factores que incluyen la indicación de la enfermedad, características del paciente que se ha de tratar y el modo de administración. Normalmente, la formulación y la vía de administración proporcionarán una concentración local en el sitio de enfermedad comprendida entre 1 nM y 100  $\mu$ M de cada agente. El médico podrá variar la cantidad de los compuestos, el portador, la frecuencia de dosificación, y análogos, teniendo en cuenta factores tales como el estado de enfermedad neoplásica particular y su gravedad; el estado general del paciente; la edad, el sexo, y el peso del paciente; el modo de administración; la idoneidad de administrar simultáneamente agentes anti-toxicidad sistémicos; la monitorización de las funciones orgánicas vitales del paciente; y otros factores controlados normalmente durante la quimioterapia del cáncer. En general, los compuestos se administran a una concentración que proporciona resultados eficaces sin provocar efectos secundarios perjudiciales o nocivos excesivos.

Los modos de administración y formulación pueden ser dependientes del fármaco y su modo de administración aprobado. Cuando el inhibidor de la telomerasa es GRN163L, la formulación de cloruro de sodio al 0,9 % (solución salina normal) y administración por vía intravenosa es una ruta preferida, preferentemente por infusión durante 1 a 24 horas, más preferentemente durante 2 a 8 horas, por ejemplo, una infusión durante 6 horas. Si bien los oligonucleótidos conjugados a lípidos descritos en el presente documento, tales como GRN163L tienen características excelentes de penetración celular y tisular, estos y otros compuestos pueden formularse para proporcionar un beneficio adicional en esta área. Otros adyuvantes útiles incluyen sustratos para migración transendotelial, tales como sistemas de captura de glucosa para facilitar la salida del espacio vascular al microentorno del tumor.

Los ejemplos que siguen se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

**Ejemplos**

5 Ejemplo 1: Estudio de diversos parámetros en pacientes a los que se les han prescrito inhibidores de la telomerasa

Se diseñó y realizó un estudio para determinar la probabilidad de desarrollo de trombocitopenia en una población de pacientes de cáncer con tumores sólidos que estaban siendo tratados con el inhibidor de la telomerasa GRN163L. GRN163L es un inhibidor de la actividad de la telomerasa oligonucleotídico 13-mérico. El estudio utilizaba células sanguíneas archivadas como fuente de la longitud de los telómeros celulares antes del estudio y registros de pacientes archivados coincidentes.

Diseño del estudio

15 Los pacientes aceptados eran adultos con tumores sólidos refractarios avanzados y tratados con GRN163L en un ensayo clínico de fase I. GRN163L se administraba por dosificación intravenosa semanal continua. Adicionalmente, se presentan datos provisionales correspondientes a una cohorte 6 tratada con una posología de dosificación alternativa diseñada para reducir el potencial para trombocitopenia. Éste era un ensayo clínico multicentro de Fase I con cohortes secuenciales de aumento progresivo de la dosis. Los pacientes se inscribieron en cohortes sucesivas a 20 0,4 a 4,8 mg/kg. Las cohortes 1-5 recibieron semanalmente infusiones intravenosas de 2 horas de GRN163L. La cohorte 6 recibió un protocolo de dosificación intermitente de infusiones intravenosas semanales de GRN163L (4,8 mg/kg) x 2, seguidas de un descanso de 13 días. Se necesitaba la culminación de 1 ciclo (4 infusiones semanales) para la evaluación de la Toxicidad Limitante de la Dosis (TLD).

25 Los pacientes se excluyeron del estudio si alguno de ellos tenía una malignidad primaria o metástasis activa en el Sistema Nervioso Central; malignidades hemáticas; hemoglobina < 9,0 g/dL ANC < 1500/mm<sup>3</sup>; recuento de plaquetas < 100.000/mm<sup>3</sup>; o una anomalía en la química sérica (bilirrubina, AST, ALT, albúmina, creatinina).

30 La población de pacientes incluía 28 pacientes. Los pacientes habían recibido hasta 9 terapias previas para este tumor; más de la mitad recibieron 4 o más. Véase la Tabla 1.

Tabla 1. Datos demográficos basales

n.º de Pacientes	28	Sitio del Tumor Primario		Sitio del Tumor Primario	
Varón	20	Pulmón		Otro	
Mujer	8	Pulmón	3	Hueso	1
Edad; Mediana (años)	63	Pleura	2	Mama	1
Intervalo 31	76	Gastro		Orofaringe	1
Karnofsky	Estado	Esófago	1	Paratiroides	1
70-80	16	Estómago	1	Próstata	1
90-100	12	Páncreas	4	Piel	1
Fase 3	1	Hígado	2	Testicular	1
Fase 4	26	Colon	5		
Desconocida	1	Rectal	3		

35 Los 28 pacientes de las cohortes 1-5 recibieron al menos 1 infusión de GRN163L. Se administraron un total de 177 dosis. Véase la Tabla 2. La totalidad de los 28 pacientes interrumpieron el estudio; las razones para la interrupción incluyeron enfermedad progresiva (22/28; 68 %), muerte (3/28; 22 %) y trombocitopenia (3/28; 11 %).

Tabla 2. Dosificación

Grupos	1	2	3	4	5	Total
Dosis (mg/kg)	0,4	0,8	1,6	3,2	4,8	--
n.º de Pacientes	2	2	2	8	14	28
Mediana n.º de ciclos/paciente	3,0	3,0	1,5	1,5	2,0	2,0
Mediana n.º de dosis/paciente	11,5	12,0	5,5	5,5	5,5	7,0
Porcentaje de dosis recibidas	100 %	100 %	100 %	81 %	84 %	88 %

40 Se tomaron muestras de sangre de los pacientes en momentos diferentes durante el estudio. Las Figuras 1-4 muestran los niveles de plaquetas en los pacientes a lo largo del tiempo en las diversas cohortes.

Materiales y Métodos:

45 Se tomaron muestras de sangre de cada paciente antes del comienzo del tratamiento. La longitud mediana de los telómeros fue determinada por Repeated Diagnostics, Vancouver, Canadá utilizando el método Flow-FISH, con discriminación de las poblaciones de granulocitos y linfocitos por el método descrito en Baerlocher et al., "Flow



*cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (Flow FISH) Nature Protocols* vol. 1, No. 5: 2365-2376 (2006).

5 Brevemente, se tomó sangre entera de los 28 pacientes. El sobrenadante se aspiró sin alterar el sedimento de eritrocitos o leucocitos de la sangre. Las células se mezclaron con NH<sub>4</sub>Cl frío para lisar los eritrocitos. Las células se centrifugaron. El sobrenadante se aspiró y se retiró el lisado de eritrocitos. Los leucocitos resultantes se suspendieron en Tampón de Hibridación (dextrosa al 5 %/Hepes 10 mM/BSA al 0/1 %). Las células se contaron y se diluyeron a aproximadamente 5 x 10<sup>6</sup> células/200 µl de Tampón de Hibridación.

10 Se aislaron timocitos de bovino de timo de bovino reciente y se fijaron en formaldehído. Los timocitos de bovino fijados se mezclaron con Tampón de Hibridación (Tris, NaCl, BSA, formamida dionizada). Para el control de hibridación sin marcar, se añadió a las células una solución madre de mezcla de hibridación sin marcar. Para la Mezcla de Hibridación Marcada, se añadió a las células una sonda de hibridación de ácido nucleico peptídico (ANP) (CCC TAA CCC TAA CCC TAA marcado con Cy5 o fluoresceína) (SEQ ID NO: 3). Las células se hibridaron con la sonda de ANP. Después de ello se centrifugaron las células y el sedimento de células se lavó para eliminar la sonda no fijada.

20 Se calibró el citómetro de flujo y las células se hicieron pasar a través del citómetro de flujo. A partir del programa de software de análisis de los datos de citometría de flujo, se utilizó el molde de análisis Flow-FISH para calcular la fluorescencia de las diversas poblaciones de células. La fluorescencia se utilizó para calcular la longitud media de los telómeros.

### Resultados

25 Se realizaron análisis univariante y multivariante para explorar los factores predictivos para disminuciones post-tratamiento en los niveles de plaquetas y la longitud basal de los telómeros. Los factores incluían edad, sexo, recuentos basales de plaquetas, tiempo desde la diagnosis del cáncer, número de posologías de quimioterapia citotóxica o mielosupresores previos, radioterapia previa, y longitud basal de los telómeros de granulocitos y linfocitos.

30 Las infusiones de GRN163L fueron en general bien toleradas. Los eventos adversos (EA) que se consideraron como relacionados o posible/probablemente relacionados con el tratamiento se consignaron en 16/28 (57,1 %) de los pacientes. Véase la Tabla 3. Los eventos adversos muy posible/probablemente relacionados eran reversibles y de Grado 1-2.

35 No se observó toxicidad limitante alguna (TLD) de la dosis en las cohortes 1-3. En la Cohorte 4 (3,2 mg/kg), un paciente que estaba tolerando satisfactoriamente la terapia murió por causa desconocida después de la 4ª dosis, y esto se consideró como una TLD. En la Cohorte 5 (4,8 mg/kg), se observaron dos TLD, ambas por trombocitopenia (una de grado 4 y una de grado 2 que provocaron un retardo > 2 semanas en el tratamiento).

40 Tabla 3: Eventos adversos comunicados relacionados (posible/probablemente) con el tratamiento en > 1 paciente †

Dosis (mg/kg)	0,4 - 1,6	3,2	4,8	Total
n.º de Pacientes	6	8	14	28
Comunicaron al menos 1 EA	2 (33,3 %)	8 (100 %)	13 (92,9 %)	23 (82,1 %)
Tiempo parcial de tromboplastina activada prolongado				
Grado 1-2	0	6 (75 %)	6 (42,9 %)	12 (42,9 %)
Grado 3	0	0	6 (42,9 %)	6 (21,4 %)
Trombocitopenia‡				
Grado 1-2	0	1 (12,5 %)	3 (21,4 %)	4 (14,3 %)
Grado 3-4	0	1 (12,5 %)	2 (14,3 %)	3 (10,7 %)
Anemia - Grado 2-3	0	1 (12,5 %)	2 (14,3 %)	3 (10,7 %)
Leucopenia- Grado 1-3	0	0	2 (14,3 %)	2 (7,1 %)
Neutropenia - Grado 2-3	0	0	2 (14,3 %)	2 (7,1 %)

† Los eventos adversos en solo 1 paciente incluyeron fobia, neuropatía periférica, velocidad de sedimentación elevada, fosfatasa alcalina aumentada, linfopenia, dolor en el cuello por encima del sitio de abertura, quemazón al orinar, candidiasis, rigidez torácica, confusión, deshidratación, AST elevada y muerte.

‡ No todas las lecturas de laboratorio coherentes con trombocitopenia se consignaron como eventos adversos.

45 Los niveles de plaquetas a lo largo del tiempo para pacientes individuales que recibieron infusiones semanales de GRN163L se muestran por cohorte de dosis en las Figuras 1-3. Los puntos de datos rodeados por un círculo indican que el paciente recibió tratamiento en dicha visita. Los niveles de plaquetas a lo largo del tiempo para 5 de 6 pacientes en el protocolo intermitente de 4,8 mg/kg de dosificación (Grupo 6) se muestran en la Figura 4.

Para comprender mejor los factores de paciente y tratamiento que inflúan potencialmente en las disminuciones (o aumentos) de plaquetas, se desarrolló un modelo a fin de identificar factores pronósticos del cambio porcentual en los niveles de plaquetas a las 4 semanas.

5 El cambio en los niveles de plaquetas después de 4 semanas de tratamiento con GRN163L se representó gráficamente con relación a la longitud basal mediana de los telómeros en cada paciente en la Figura 5.

El primer modelo incluía 20-28 pacientes. La dosis y longitud basal de los telómeros de granulocitos eran factores pronósticos significativos. No se encontró interacción alguna de la dosis con la longitud de los telómeros.

10

Tabla 4: Análisis multivariante

Indicador	Coefficiente de Regresión	Valor P
Dosis	-7	0,034
Longitud Basal de Telómeros de Granulocitos	8	0,023

15 El modelo se extendió para incluir 8 pacientes adicionales (la totalidad de los 28 pacientes en las Cohortes 1-5). Las relaciones detectadas en el modelo anterior seguían siendo significativas. El nivel basal de la dosis de GRN163L y la mediana de la longitud basal de los telómeros de granulocitos fueron los dos factores pronósticos del % de disminución de los niveles de plaquetas durante las 4 primeras semanas de tratamiento.

Tabla 5: Análisis multivariante

Factor pronóstico	Coefficiente de regresión	Valor P
Intersección	-73,8	0,004
Dosis	-6,6	0,033
Longitud basal de telómeros de granulocitos	11,2	0,005
Modelo: R-cuadrado=0,319853		

20

La Figura 5 muestra el cambio porcentual desde la línea base al nadir de 4 semanas en los niveles de plaquetas en función de la longitud basal de los telómeros de granulocitos. Las líneas indican el cambio porcentual en función del nivel de dosis de GRN163L.

La ecuación para describir el número previsto de plaquetas en un paciente durante las 4 primeras semanas de tratamiento es como se indica a continuación:

25

$$n.^{\circ} \text{ Predicho de plaquetas} = \text{número basal de plaquetas} - (\text{número basal de plaquetas} \times \% \text{ cambio en plaquetas}/100)$$

30

$$\% \text{ de cambio en } n.^{\circ} \text{ de plaquetas} = (-73,8) - 6,6 \times \text{dosis de inhibidor (mg/kg)} + 11,2 \times \text{longitud media de los telómeros (kpb)}$$

En los análisis univariantes de los factores pronósticos del cambio porcentual en los niveles de plaquetas, únicamente la longitud de los telómeros de granulocitos fue significativa ( $p = 0,024$ ).

35

Tabla 6: Análisis univariante

Factor pronóstico	Coefficiente de Regresión	Valor p
Intersección	-84,54302	0,0018
Longitud basal de telómeros de granulocitos	9,17580	0,0241

Se desarrolló después otro modelo para identificar factores pronósticos de los niveles de plaquetas en log nadir durante las 4 primeras semanas. Este modelo dio como resultado un valor  $R^2$  mayor que indicaba un mejor ajuste a los datos.

40

Tabla 7: Análisis multivariante

Factor pronóstico	Coefficiente de Regresión (b)	Valor p
Intersección	-0,38	0,725
Dosis (mg/kg)	-0,13	0,017
Longitud basal de telómeros de granulocitos	0,25	0,001
Log de plaquetas basales	0,80	<0,001
Modelo: R-cuadrado= 0,645071		

La ecuación para describir el número previsto de plaquetas en un paciente en el nadir durante las 4 primeras semanas de tratamiento es como se indica a continuación:

45

$$n.^{\circ} \text{ Predicho de plaquetas} = e^{[(-0,38) - 0,13 \times \text{dosis de inhibidor (mg/kg)} + 0,25 \times \text{longitud media de los telómeros (kpb)} + 0,80 \times \log \text{ de número basal de plaquetas}]}$$

En los análisis multivariantes de factores pronósticos de los niveles de plaquetas en log nadir, únicamente era significativa la longitud de los telómeros de granulocitos ( $p = 0,004$ ).

Tabla 8: Análisis univariante

Factor pronóstico	Coefficiente de Regresión	Valor p
Intersección	3,42818	<,0001
Longitud basal de telómeros de granulocitos	0,27189	0,0040

5 Los intervalos de predicción pueden calcularse, por ejemplo, para predecir el cambio porcentual probable en los niveles de plaquetas o el nadir de las plaquetas para pacientes o sujetos con un conjunto particular de valores basales y de tratamiento, por ejemplo, longitud de los telómeros, plaquetas basales y nivel de dosis. La ecuación de regresión proporciona el valor esperado para un sujeto futuro con covariantes especificadas (J. Neter et al. *Applied linear statistical models: regression, analysis of variance, and experimental designs*, 3ª edición, págs.81-83 (1990)). Sin embargo, debido a error de distribución del muestreo así como a variabilidad interindividual, un paciente puede tener niveles de plaquetas que caigan por encima o por debajo de dicho valor predicho. Puede generarse una serie de intervalos de predicción con cobertura decreciente. Por ejemplo, puede generarse un intervalo de predicción del 99 % con límites superior e inferior  $P_{S99}$  y  $P_{I99}$  que podría contener, por término medio, 99 % de los niveles de plaquetas observados en los pacientes; podría generarse también un intervalo de predicción de 90 % con límites superior e inferior  $P_{S90}$  ( $< P_{S99}$ ) y  $P_{I90}$  ( $> P_{I99}$ ) que podría contener, por término medio, 90 % de los niveles de plaquetas observados futuros. Esto hace posible determinar la probabilidad de que el paciente pudiera desarrollar una trombocitopenia de grado 3 o 4.

20 La longitud media de los telómeros de las células normales difiere entre los sujetos y disminuye con la edad como se muestra por los percentiles en la Figura 7. Las longitudes de los telómeros de granulocitos en los 28 pacientes en este estudio son generalmente más cortas de lo normal, lo cual es coherente con los efectos del estrés fisiológico y la quimioterapia. Aunque la historia de quimioterapia previa como se tabula en el presente documento no era predictiva de disminuciones de plaquetas, la misma estaba fuertemente correlacionada con las longitudes basales de los telómeros en un análisis univariante. La medición de la longitud de los telómeros refleja con alta precisión los efectos de tratamientos previos junto con otras influencias hereditarias o adquiridas. La edad era también un factor pronóstico importante de la longitud de los telómeros.

30 Los resultados de este estudio demuestran una correspondencia estrecha entre los valores de longitud basal de los telómeros como se determinan por el ensayo descrito y el riesgo de que el paciente desarrollara trombocitopenia limitante de la dosis.

35 Aunque la invención se ha descrito con respecto a realizaciones y aplicaciones particulares, los expertos en la materia apreciarán la gama de aplicaciones y métodos de la invención desvelados en el presente documento, y la invención no debe considerarse limitada a dichas realizaciones.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> Geron Corporation  
Harley, Calvin  
Elias, Laurence  
Smith, Jennifer  
Ratain, Mark  
Benedetti, Fabio

45 <120> Método para la identificación de la sensibilidad de un paciente a la terapia de inhibición de la telomerasa

<130> 175/200PCT

50 <140> No asignada  
<141> 13-10-2009

<150> US 61/106.491

55 <151> 17-10-2008

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

60 <210> 1  
<211> 11  
<212> ARN  
<213> Homo sapiens

# ES 2 645 872 T3

<400> 1  
cuaaccuaa c 11

5 <210> 2  
<211> 13  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> GRN-163

<400> 2  
tagggttaga caa 13

15 <210> 3  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Sonda de ANP

<400> 3  
ccctaaccct aaccctaa 18

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para la identificación de la probabilidad de que un sujeto mamífero presente una reacción adversa a la terapia de inhibición de la telomerasa que comprende,
- 5 (a) la determinación del promedio o la mediana de la longitud de los telómeros en una muestra biológica que comprende células obtenidas del sujeto mamífero antes o en el momento del tratamiento con una terapia de inhibición de la telomerasa y la multiplicación del promedio o la mediana de la longitud de los telómeros por un coeficiente para llegar a un componente de la longitud de los telómeros;
- 10 (b) la multiplicación de la dosis de tratamiento prevista por un coeficiente para llegar a un componente de dosificación; y
- (c) producir la suma del componente telómero, el componente de dosificación y una constante; y
- (d) la determinación de la probabilidad esperada de una reacción adversa en el sujeto mamífero a partir del tratamiento con la terapia de inhibición de la telomerasa.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en el que el sujeto mamífero es un ser humano.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la reacción adversa es trombocitopenia, neutropenia o leucopenia.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en el que la reacción adversa es trombocitopenia y la suma del componente telómero, el componente de dosificación y la constante determina la disminución porcentual del número de plaquetas del sujeto mamífero a partir del número de plaquetas basal del sujeto antes del tratamiento.
5. El método de la reivindicación 4, en el que la reacción adversa es cualquier grado de trombocitopenia.
- 25 6. El método de la reivindicación 4, en el que la reacción adversa es trombocitopenia de grados 3 o 4.
7. El método de la reivindicación 1, en el que la terapia de inhibición de la telomerasa comprende la administración de un inhibidor de la telomerasa para tratar el cáncer.
- 30 8. El método de la reivindicación 7, en el que el inhibidor de la telomerasa es GRN163L.
9. El método de la reivindicación 7, en el que el cáncer se selecciona entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer hepatocelular, cáncer de estómago, cáncer gastrointestinal, cáncer de faringe, cáncer de recto, cáncer de páncreas, cáncer de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer de piel, cáncer de cerebro, carcinoma, melanoma, leucemia y linfoma.
- 35 10. El método de la reivindicación 4, en el que el componente de longitud de los telómeros es un componente positivo cuando se calcula el porcentaje de cambio.
11. El método de la reivindicación 4, en el que el componente de dosificación es un componente negativo cuando se calcula el porcentaje de cambio.
- 45 12. El método de la reivindicación 1, en el que el método comprende adicionalmente la etapa de asignar al sujeto la probabilidad de tener una reacción adversa a una terapia con inhibidores de la telomerasa.
13. El método de la reivindicación 1, en el que, las longitudes basales de los telómeros más cortas se asocian a un mayor riesgo de una reacción adversa.
- 50 14. El método de la reivindicación 1, en el que, el aumento de la dosificación se asocia a un mayor riesgo de una reacción adversa.
15. El método de la reivindicación 1, en el que, la longitud basal de los telómeros se determina mediante análisis por FISH.
- 55 16. Un método para la identificación de un paciente que requiere potencialmente un nivel de dosis de inhibidor de la telomerasa por debajo del nivel de dosis recomendada máxima, en el que el método comprende
- 60 (a) la determinación del promedio o la mediana de la longitud de los telómeros en una muestra biológica que comprende células obtenidas del sujeto mamífero antes o en el momento del tratamiento con una terapia de inhibición de la telomerasa y la multiplicación del promedio o la mediana de la longitud de los telómeros por un coeficiente para llegar a un componente de la longitud de los telómeros;
- 65 (b) la multiplicación de la dosis de tratamiento prevista por un coeficiente para llegar a un componente de dosificación; y

(c) el cálculo de la suma del componente telómero, el componente de dosificación y el log del número basal de plaquetas del sujeto para determinar el nadir de plaquetas predicho durante las primeras semanas de tratamiento; y

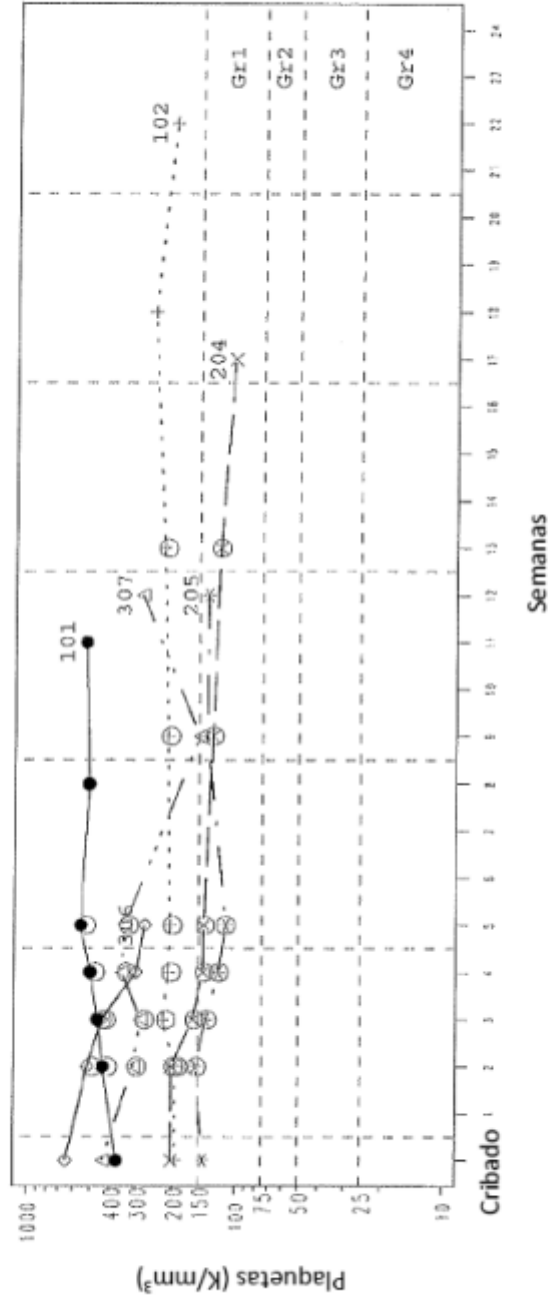
5 (d) determinar la probabilidad esperada de trombocitopenia en el sujeto mamífero a partir del tratamiento con la terapia de inhibición de la telomerasa,

en el que el inhibidor de la telomerasa es para la administración a una dosis reducida o en una posología de dosificación reducida.

10 17. El método de la reivindicación 16, que comprende adicionalmente la etapa de controlar el paciente para determinar una reacción adversa relacionada con el tratamiento con el inhibidor de la telomerasa.

FIGURA 1

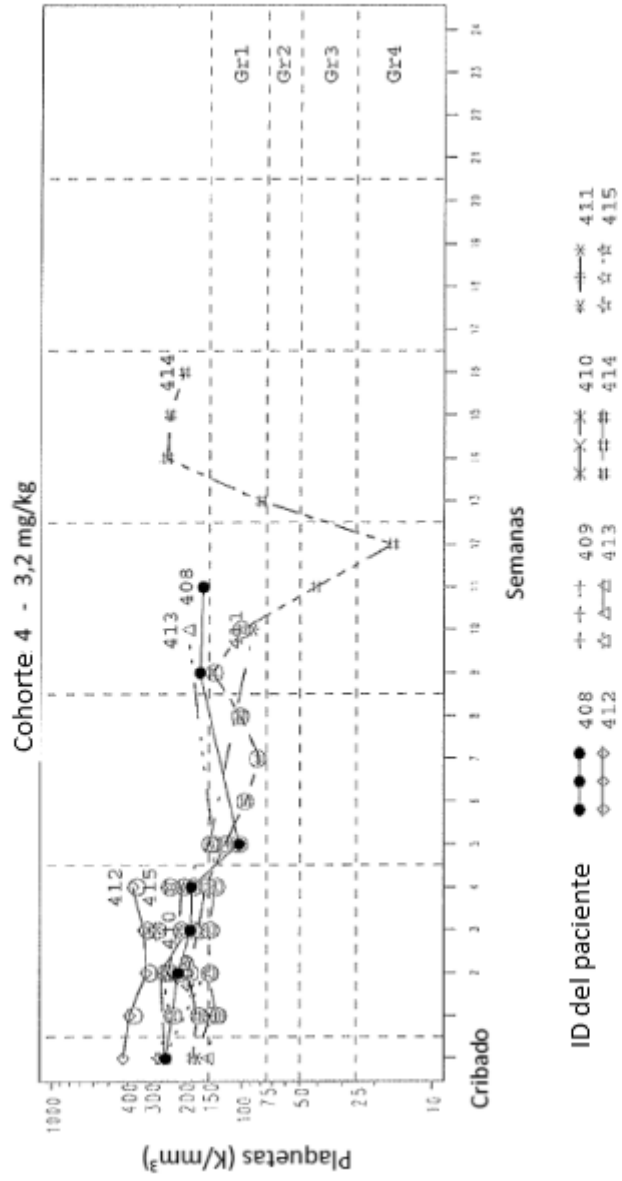
Cohortes (1-3) - 0,4 -1,6 mg/kg



ID del paciente ● 101 ● 102 ○ 204 ○ 205 ○ 306 ○ 307

○ - Dosificado y sometido al ensayo de plaquetas.

FIGURA 2

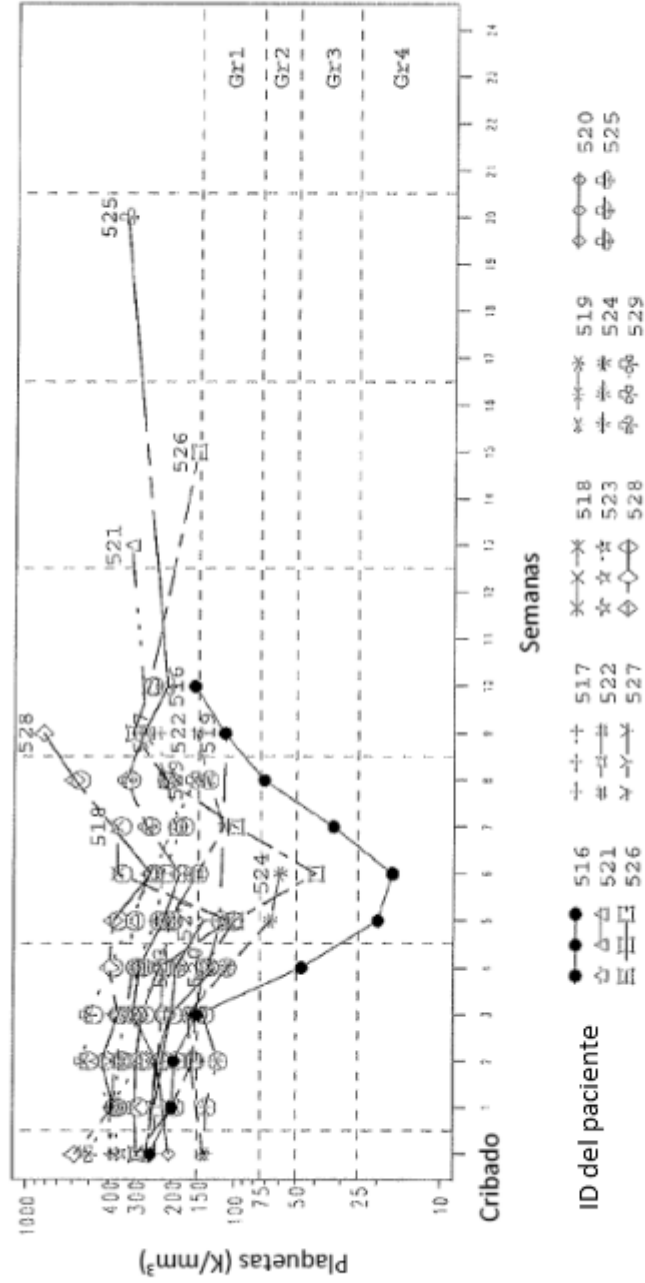


○ - Dosificado y sometido al ensayo de plaquetas.



FIGURA 3

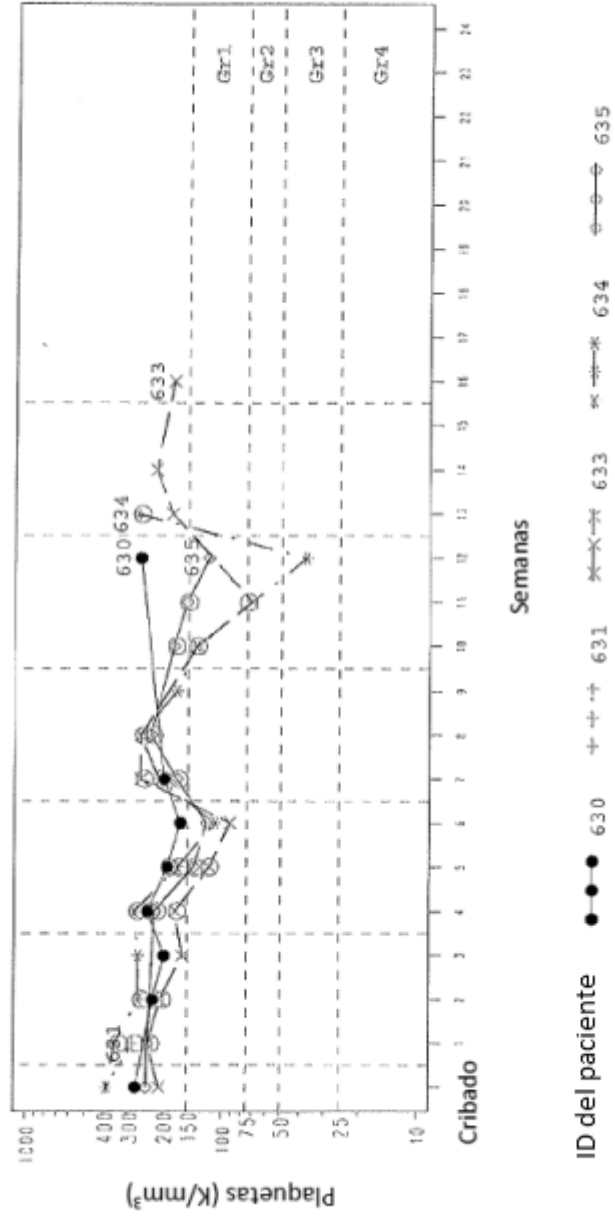
Cohorte 5 - 4,8 mg/kg



○ - Dosificado y sometido al ensayo de plaquetas.

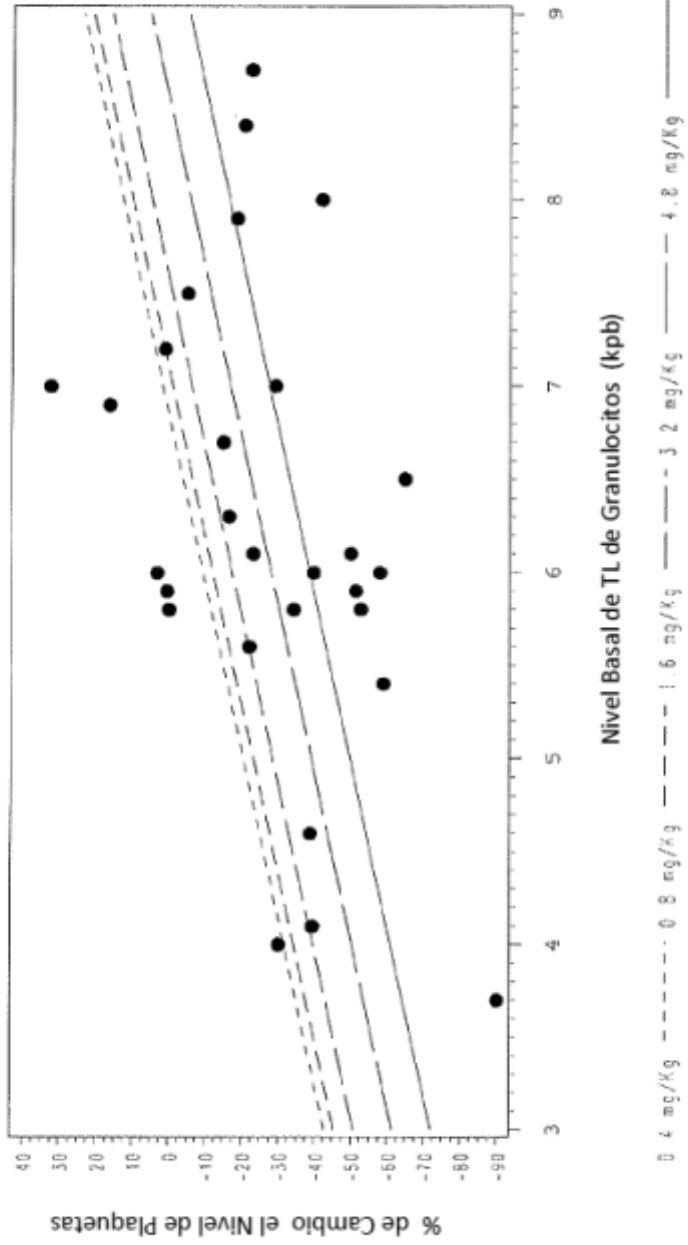
FIGURA 4

Cohorte 6 – 4,8 mg/kg Protocolo A



○ - Dosificado y sometido al ensayo de plaquetas.

FIGURA 5  
% de Cambio desde el Nivel Basal de Plaquetas hasta el Nadir a las 4 Semanas  
frente al Nivel Basal de TL de Granulocitos



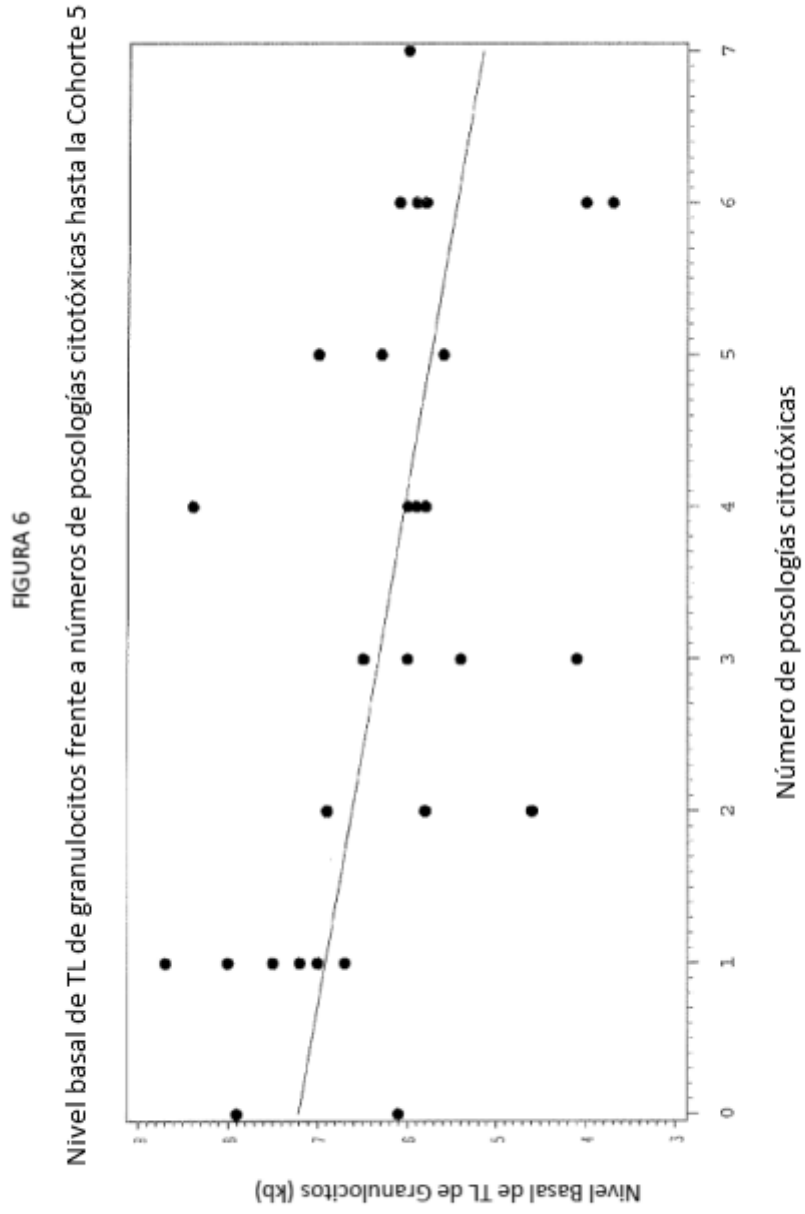


FIGURA 7  
Nivel Basal de TL de Granulocitos frente a la Edad hasta la Cohorte 6

