

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 828**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.2007** **E 14198829 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018** **EP 2898887**

54 Título: **Inhibidor de telomerasa y gemcitabina combinados para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

30.10.2006 US 855583 P

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

18.01.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GO, NING y
TRESSLER, ROBERT J.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 696 828 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

Inhibidor de telomerasa y gemcitabina combinados para el tratamiento del cáncer

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un tratamiento contra el cáncer y, en particular, a la inhibición del crecimiento tumoral o de la proliferación de células cancerosas mediante el tratamiento con un inhibidor de telomerasa combinado con gemcitabina.

10

Antecedentes

Aunque muchos tipos de cáncer se pueden curar mediante resección quirúrgica, a menudo se utiliza la quimioterapia como un complemento de la terapia quirúrgica y se utiliza extensivamente en el tratamiento de neoplasias metastásicas o inoperables. Teniendo en cuenta el continuado número elevado de muertes cada año como resultado del cáncer, sigue siendo necesario identificar regímenes terapéuticos eficaces y relativamente atóxicos para su uso en el tratamiento contra el cáncer.

15

20

Se han identificado muchos agentes quimioterapéuticos eficaces en las últimas décadas y estos se agrupan generalmente en varias categorías en función de su mecanismo de acción. Los tratamientos de terapia combinada se han vuelto más habituales, debido a la ventaja percibida de atacar la enfermedad mediante múltiples vías. En la práctica, sin embargo, muchas de estas combinaciones no proporcionan ni siquiera una simple adición de los efectos terapéuticos.

25

En teoría, una estrategia de fármacos combinados para el tratamiento del cáncer debería proporcionar una mejora significativa de la eficacia y/o una reducción significativa de los efectos secundarios no deseados, debido a una reducción de la dosis del componente más tóxico y/o una reducción en el desarrollo de resistencia a los fármacos en el cáncer que se esté tratando. Son particularmente deseables las terapias combinadas que producen resultados terapéuticos de naturaleza supraaditiva o sinérgica en relación con los efectos de los agentes individuales, con una exacerbación mínima de los efectos secundarios. Kramer *et al.*, *The Journal of Urology*, vol. 72, 2023-2028, (2004), muestran que ciertos inhibidores de telomerasa sensibilizan ciertas células cancerosas frente a la quimioterapia.

30

Compendio

35

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona el uso de una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L) en la fabricación de un medicamento para inhibir la proliferación de células cancerosas en un sujeto que se está tratando secuencial o simultáneamente con gemcitabina, en donde la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L) se administra por perfusión continua durante un periodo de aproximadamente 1-6 horas.

40

El uso de una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L) del primer aspecto de la invención puede ser para el fin de potenciar la eficacia del tratamiento antineoplásico de gemcitabina en el sujeto.

45

En dichos usos de este aspecto de la invención, el medicamento puede administrarse infundiendo la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L) por vía intravenosa al sujeto en condiciones de infusión eficaces para producir una concentración en sangre del inhibidor de entre 1 nM y 100 μM.

50

La sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L) puede administrarse en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación de células cancerosas en el sujeto cuando se administra imetelstat (GRN163L) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo solo.

55

El cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de pulmón no microcítico, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer esofágico y linfomas, cáncer de vejiga, cáncer del sistema linfático, cáncer ovárico epitelial, cáncer de los conductos biliares, cáncer de la vesícula biliar y tumores de células germinales de los ovarios y testículos.

60

En la presente invención, dicha administración proporciona un efecto inhibidor supraaditivo en relación con los efectos de la gemcitabina individual y los agentes inhibidores de la telomerasa.

65

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L), para su uso en el tratamiento de cáncer en un sujeto que se está tratando con gemcitabina.

Según un tercer aspecto de la invención, se proporciona una composición que contiene una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L), y gemcitabina como una preparación combinada para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del cáncer.

5 Según un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una composición que contiene un inhibidor de telomerasa que comprende un oligonucleótido caracterizado por:

- (i) uniones entre nucleósidos de N3'→P5' fosforamidato o N3'→P5' tiofosforamidato;
- (ii) tener la secuencia identificada como SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13; y
- 10 (iii) un resto de palmitoílo seleccionado del grupo que consiste en ácidos grasos, esteroides y derivados de los mismos unidos covalentemente a un extremo del nucleótido;

y gemcitabina como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencia en la inhibición de la proliferación de células cancerosas.

15 En la composición del cuarto aspecto de la invención, el inhibidor de telomerasa puede ser una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L). La sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L) puede administrarse por perfusión continua durante un periodo de aproximadamente 1-6 horas.

20 Según un quinto aspecto de la invención se proporciona un kit que comprende

- (a) una dosis de gemcitabina en una cantidad eficaz, cuando se administra sola, para inhibir la proliferación de células cancerosas en un sujeto y
- 25 (b) una dosis de un inhibidor de telomerasa oligonucleotídico que comprende un oligonucleótido caracterizado por:

- (i) uniones entre nucleósidos de N3'→P5' tiofosforamidato;
- (ii) tener la secuencia identificada como SEQ ID NO: 12; y
- 30 (iii) un resto de palmitoílo (C16) unido al extremo 5' del oligonucleótido mediante un conector de glicerol o aminoglicerol

en una cantidad eficaz, cuando se administra solo, para inhibir la proliferación de células cancerosas en el sujeto, en donde dicho kit comprende (a) y (b) como una preparación combinada para inhibir la proliferación de células cancerosas en la que dichas células cancerosas se exponen a (a) antes, después o junto con exposición de dichas células a (b).

35 En un kit de la invención, el inhibidor de telomerasa oligonucleotídico puede ser una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L).

40 También se describe en el presente documento un método para inhibir la proliferación de células cancerosas, por las etapas de: (a) exponer las células a gemcitabina y (b) antes, después o junto con la etapa (a), exponer las células a un inhibidor de telomerasa oligonucleotídico del tipo compuesto de un oligonucleótido que tiene enlaces intersubunitarios resistentes a nucleasa y una secuencia oligonucleotídica eficaz para unir mediante hibridación específica de secuencia con una región molde de hTR.

45 Las uniones entre nucleósidos en el oligonucleótido pueden seleccionarse de uniones entre nucleósidos de N3'→P5' fosforamidato y N3'→P5' tiofosforamidato. El inhibidor de telomerasa puede incluir un resto lipídico (i) seleccionado del grupo que consiste en ácidos grasos, esteroides y derivados de los mismos y (ii) unido covalentemente con un extremo del oligonucleótido. El oligonucleótido puede ser de 10-20 bases de longitud. Un inhibidor de telomerasa oligonucleotídico ejemplar se caracteriza por:

- (i) uniones entre nucleósidos de N3'→P5' tiofosforamidato;
- (ii) tener la secuencia identificada como SEQ ID NO: 12 y
- 55 (iii) un resto de palmitoílo (C16) unido al extremo 5' del oligonucleótido mediante un conector de glicerol o aminoglicerol.

60 El compuesto puede ser el diseñado en la presente como GRN163L o imetelstat, donde el paso (b) del método puede incluir infundir el inhibidor de telomerasa por vía intravenosa en el sujeto en condiciones de infusión eficaces para producir una concentración en sangre del inhibidor comprendida entre 1 nM y 100 μM.

Cada paso de exposición (a) y (b) puede incluir la administración de gemcitabina y el inhibidor de telomerasa al sujeto en una cantidad eficaz, cuando cada a gente se administra por sí solo, para inhibir la proliferación de células cancerosas en el sujeto.

65

El inhibidor de telomerasa y la gemcitabina se pueden administrar a un sujeto al cual se le ha diagnosticado un cáncer seleccionado del grupo constituido por cáncer de pulmón no microcítico, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de esófago y linfomas, cáncer de vejiga, cáncer del sistema linfático, cáncer de ovario epitelial, cáncer de los conductos biliares, cáncer de vesícula y tumores de células germinales.

El método puede proporcionar un efecto inhibidor supraaditivo en relación con los efectos de los agentes individuales gemcitabina e inhibidor de telomerasa.

En otro aspecto, la invención incluye mejorar la eficacia del tratamiento contra el cáncer de la gemcitabina administrada a un sujeto, mediante la administración al sujeto, antes, durante o después de la administración de gemcitabina, de un inhibidor de telomerasa oligonucleotídico que se ha descrito anteriormente.

El inhibidor de telomerasa se puede administrar en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación de células cancerosas en el sujeto, cuando el inhibidor de telomerasa se administra por sí solo. La mejora de la eficacia del tratamiento se puede poner de manifiesto mediante un incremento del tiempo de supervivencia del sujeto, una inhibición del crecimiento tumoral en el sujeto o una combinación de ambos. El inhibidor de telomerasa y la gemcitabina se pueden administrar al sujeto como una composición que contenga ambos inhibidores.

También se describe un kit para su uso en la terapia del cáncer, que comprende (a) una dosis de gemcitabina en una cantidad eficaz, cuando se administra por sí sola, para inhibir la proliferación de células cancerosas en un sujeto, y (b) una dosis de un inhibidor de telomerasa oligonucleotídico que se ha descrito anteriormente.

En otros aspectos más, la invención incluye el uso de una gemcitabina y el inhibidor de telomerasa oligonucleotídico en la elaboración de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto, y el uso del inhibidor de telomerasa oligonucleotídico en la elaboración de un medicamento para tratar el cáncer en un sujeto que se está tratando con una gemcitabina, con el fin de mejorar la eficacia contra el cáncer de la gemcitabina en el sujeto.

Estos y otros objetos y características de la invención se esclarecerán más completamente cuando se lea la siguiente descripción detallada de la invención conjuntamente con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es una gráfica del volumen tumoral medio (VT) para células tumorales A549 inyectadas por vía subcutánea en ratones después del tratamiento, durante un periodo de 60 días, con vehículo por sí solo (rombos oscuros), gemcitabina por sí sola (cuadrados oscuros), GRN 163L por sí solo (círculos) y una combinación de GRN 163L más gemcitabina (cuadrados claros).

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Los términos que se exponen a continuación tienen los siguientes significados, a menos que se indique de otro modo.

Un "polinucleótido" u "oligonucleótido" se refiere a un polímero u oligómero de subunidades de nucleósidos de ribosa y/o desoxirribosa que contiene entre aproximadamente 2 y aproximadamente 200 subunidades contiguas. Las subunidades de nucleósidos se pueden enlazar mediante varias uniones entre las subunidades, que incluyen, sin carácter limitante, uniones de tipo fosfodiéster, fosfotriéster, metilfosfonato, P3'→N5' fosforamidato, N3'→P5' fosforamidato, N3'→P5' tiofosforamidato y fosforotioato. El término también incluye tales polímeros u oligómeros que contienen modificaciones, conocidas por un experto en la técnica, en el azúcar (p. ej., sustituciones en la posición 2'), la base (remítase a la definición de "nucleósido" más adelante) y los extremos 3' y 5'. En realizaciones en las que el resto oligonucleotídico incluye una pluralidad de uniones entre las subunidades, cada unión se puede formar utilizando la misma estrategia química o se puede utilizar una mezcla de estrategias químicas de unión. Cuando se representa un oligonucleótido mediante una secuencia de letras, tal como "ATGUCCTG," se sobreentenderá que los nucleótidos están en orden 5'→3' de izquierda a derecha. La representación de la secuencia de bases del oligonucleótido de este modo no implica el uso de ningún tipo particular de subunidad entre los nucleósidos del oligonucleótido.

El término "nucleósido" incluye los nucleósidos naturales, incluidas las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, p. ej., según se describen en Komberg y Baker, *DNA Replication*, 2.^a Ed. (Freeman, San Francisco, 1992), y análogos. Los "análogos", cuando hacen referencia a los nucleósidos, incluyen nucleósidos sintéticos que contienen restos de bases nucleotídicas modificadas (remítase a la definición de "base nucleotídica" más adelante) y/o restos de azúcares modificados, p. ej., descritos en general por Scheit, *Nucleotide Analogs* (John Wiley, Nueva York, 1980). Estos análogos incluyen nucleósidos sintéticos diseñados para mejorar las propiedades de unión, p. ej., estabilidad, especificidad o similares, tales como los descritos por Uhlmann y Peyman (*Chemical Reviews* 90:543-584, 1990). Un

oligonucleótido que contenga tales nucleósidos, y el cual contiene normalmente uniones sintéticas entre nucleósidos resistentes a nucleasas, se puede denominar en sí un “análogo”.

5 Una “base nucleotídica” incluye (i) bases nucleotídicas de ARN y ADN nativo (uracilo, timina, adenina, guanina y citosina), (ii) bases nucleotídicas modificadas o análogos de bases nucleotídicas p. ej., (5-metilcitosina, 5-bromouracilo o inosina) y (iii) análogos de bases nucleotídicas. Un análogo de una base nucleotídica es un compuesto cuya estructura molecular imita la de una base típica del ARN o ADN.

10 El término “lípidos” se utiliza extensamente en la presente para englobar sustancias que son solubles en disolventes orgánicos, pero que son poco solubles, o no son solubles en absoluto, en agua. El término “lípidos” incluye, sin carácter limitante, hidrocarburos, aceites, grasas (tales como ácidos grasos y glicéridos), esteroides, esteroides y formas derivadas de estos compuestos. Los lípidos preferidos son los ácidos grasos y sus derivados, hidrocarburos y sus derivados, y esteroides tales como el colesterol.

15 Los ácidos grasos contienen normalmente números pares de átomos de carbono en una cadena lineal (habitualmente 12-24 carbonos) y pueden ser saturados o insaturados, y pueden contener, o se pueden modificar para que contengan, una variedad de grupos sustituyentes. Por motivos de simplicidad, la expresión “ácido graso” también engloba derivados de ácidos grasos tales como ésteres grasos.

20 El término “hidrocarburo” engloba compuestos constituidos únicamente por hidrógeno y carbono, unidos mediante enlaces covalentes. El término engloba hidrocarburos de cadena abierta (alifáticos), incluidos los hidrocarburos ramificados y de cadena lineal, e hidrocarburos saturados así como también mono- y poliinsaturados. El término también engloba hidrocarburos que contienen uno o más anillos aromáticos.

25 El término “lípidos”, tal como se utiliza en la presente, también incluye compuestos anfifáticos que contienen restos tanto lipídicos como hidrófilos.

30 El término “sustituido” se refiere a un compuesto que ha sido modificado intercambiando un átomo o resto por otro, normalmente una sustitución de hidrógeno por un átomo o resto diferente. En particular, el término se utiliza haciendo referencia a ácidos grasos e hidrocarburos halogenados, particularmente aquellos en los que se han sustituido uno o más átomos de hidrógeno por flúor.

35 Un “inhibidor de telomerasa oligonucleotídico” se refiere a un inhibidor de telomerasa compuesto por un oligonucleótido que contiene uniones entre subunidades resistentes a nucleasas y una secuencia de oligonucleótido eficaz para unirse mediante una hibridación específica de la secuencia a una región modelo del componente de ARN de la telomerasa humana. Un “inhibidor del modelo de hTR” es un inhibidor de telomerasa oligonucleotídico que bloquea la región modelo (la región que abarca los nucleótidos 30-67 de la SEQ ID NO: 1 de la presente) del componente de ARN de la telomerasa humana y de este modo inhibe la actividad de la enzima. Normalmente, el inhibidor es un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con esta región. Preferentemente, el oligonucleótido incluye una secuencia eficaz para hibridarse con una porción más específica de esta región, que presenta la secuencia 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID NO: 12), la cual abarca los nucleótidos 46-56 de la SEQ ID NO: 1 de la presente.

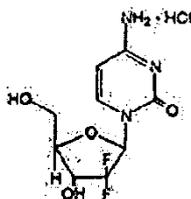
45 Se dice que un compuesto “inhibe la proliferación de células cancerosas” si la proliferación de las células en presencia del compuesto es inferior a la observada en ausencia del compuesto. Es decir, la proliferación de las células se ralentiza o detiene en presencia del compuesto. La inhibición de la proliferación de células cancerosas se puede poner de manifiesto, por ejemplo, mediante la reducción del número de células o la tasa de expansión de las células, la reducción de la masa tumoral o la tasa de crecimiento tumoral, o el incremento de la tasa de supervivencia de un sujeto que esté siendo tratado.

50 La administración de un inhibidor de telomerasa a un sujeto es eficaz para “mejorar la eficacia del tratamiento contra el cáncer de una gemcitabina” si el sujeto muestra una reducción de la tasa de crecimiento tumoral y/o una mejora de la tasa de supervivencia con la terapia combinada en comparación con la terapia con gemcitabina por sí sola.

55 Un oligonucleótido con “uniones resistentes a nucleasas” se refiere a un oligonucleótido cuyo esqueleto contiene uniones de las subunidades que son sustancialmente resistentes a la escisión por parte de nucleasas, en forma hibridada o no hibridada, mediante nucleasas intracelulares y extracelulares comunes del cuerpo, es decir, el oligonucleótido presenta una escisión pequeña o nula por parte de nucleasas en las condiciones normales de las nucleasas en el cuerpo a las que el oligonucleótido está expuesto. Las uniones de tipo N3'→P5' fosforamidato (NP) o N3'→P5' tiosforamidato (NPS) que se describen a continuación son resistentes a las nucleasas.

II. Tratamiento del cáncer con una gemcitabina

65 La “gemcitabina”, en forma de gemcitabina·HCl, es el monohidrato de la 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina (isómero beta). La fórmula estructural es la siguiente:



La formulación clínica se suministra en una forma estéril para uso intravenoso. La gemcitabina se vende con el nombre comercial Gemzar™ y los viales de Gemzar™ contienen 200 mg o 1 g de gemcitabina·HCl (expresada como la base libre) formulada con manitol (200 mg o 1 g, respectivamente) y acetato de sodio (12,5 mg o 62,5 mg, respectivamente) como un polvo liofilizado estéril. Se puede añadir ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio para ajustar el pH. El término “gemcitabina”, tal como se utiliza en la presente, incluye ácidos y sales farmacéuticamente activos del compuesto, así como también profármacos de gemcitabina que se pueden convertir en gemcitabina *in vivo*.

Por lo general, se acepta que la gemcitabina actúa reemplazando uno de los bloques estructurales de los ácidos nucleicos, en este caso la citidina, durante la replicación del ADN. El proceso detiene el crecimiento tumoral, ya que no se pueden unir nuevos nucleósidos al nucleósido “defectuoso”, lo cual provoca la apoptosis (“suicidio” celular). Datos recientes indican que la gemcitabina puede interferir con la actividad de reparación por escisión de los nucleótidos del *complemento cruzado de reparación por escisión 1 (ERCC1)*.

La gemcitabina se utiliza en varios carcinomas: cáncer de pulmón no microcítico, cáncer pancreático y cáncer de mama, y resulta prometedora desde el punto de vista clínico o experimental para el cáncer de esófago, linfomas y otros tipos diferentes de tumores, tales como los constituidos por cáncer de vejiga, cáncer del sistema linfático, cáncer de ovario epitelial, cáncer de los conductos biliares, cáncer de vesícula y tumores de células germinales de los ovarios y los testículos. Para su uso en el tratamiento del cáncer combinada con un inhibidor de telomerasa oligonucleotídico, de acuerdo con la presente invención, la gemcitabina se puede administrar con las dosis recomendadas en el prospecto del producto. Sin embargo, una ventaja de la presente invención consiste en que la gemcitabina, cuando se administra combinada con el inhibidor de telomerasa, se puede administrar con dosis inferiores a las dosis del agente único, con lo cual se reducen los efectos secundarios y la toxicidad global del compuesto, a la vez que se consiguen unos efectos del tratamiento contra el cáncer comparables o superiores.

III. Tratamiento del cáncer con un inhibidor de telomerasa

La telomerasa es una ribonucleoproteína que cataliza la adición de secuencias de repetición teloméricas (que presentan la secuencia 5'-TTAGGG-3' en seres humanos) a los extremos del cromosoma. Remítase, p. ej., a Blackburn, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61:113-129. La enzima se expresa en la mayoría de células cancerosas, pero no en células somáticas maduras. La pérdida de ADN telomérico puede desempeñar una función en el desencadenamiento de la senescencia celular; remítase a Harley, 1991, *Mutation Research* 256:271-282. Se ha demostrado que varias células cancerosas son positivas para la telomerasa, incluidas las células del cáncer de piel, tejido conectivo, adiposo, de mama, pulmón, estómago, páncreas, ovario, cuello uterino, útero, riñón, vejiga, colon, próstata, sistema nervioso central (SNC), retina y tumores hematológicos (tales como mieloma, leucemia y linfoma). El hecho de actuar sobre la telomerasa puede resultar eficaz a la hora de proporcionar tratamientos que discriminen entre células malignas y normales en un alto grado, lo cual evitaría muchos de los efectos secundarios perjudiciales que pueden acompañar a los regímenes quimioterapéuticos que actúan indiscriminadamente sobre células que se están dividiendo.

Los inhibidores de telomerasa identificados hasta la fecha incluyen oligonucleótidos, preferentemente oligonucleótidos con uniones resistentes a nucleasas, así como también compuestos que son moléculas de bajo peso molecular.

Inhibidores de telomerasa basados en oligonucleótidos: secuencia y composición

Los genes que codifican los componentes tanto proteicos como de ARN de la telomerasa humana han sido clonados y secuenciados (remítase a las Patentes de EE. UU. N.ºs 6.261.836 y 5.583.016, respectivamente, las cuales se incorporan a la presente por referencia). Los oligonucleótidos pueden actuar sobre el ARNm que codifica el componente proteico de la telomerasa (la forma humana del cual se conoce como transcriptasa inversa de la telomerasa humana o hTERT) o el componente de ARN de la holoenzima telomerasa (la forma humana del cual se conoce como ARN de la telomerasa humana o hTR).

La secuencia de nucleótidos del componente de ARN de la telomerasa humana (hTR) se muestra en la Lista de secuencias más adelante (SEQ ID NO: 1), en la dirección 5'→3'. La secuencia se muestra utilizando las abreviaturas estándar para los ribonucleótidos; los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia también representa la secuencia del ADNc, en la cual los ribonucleótidos se reemplazan por desoxirribonucleótidos, reemplazándose la uridina (U) por timidina (T). La secuencia modelo del componente de ARN se localiza en la región definida por los

nucleótidos 46-56 (5'-CUAACCCUAAC-3'), la cual es complementaria respecto a la secuencia telomérica compuesta por aproximadamente una y dos tercios de unidades de repetición teloméricas. La región modelo actúa especificando la secuencia de las repeticiones teloméricas que la telomerasa añade a los extremos del cromosoma y es esencial para la actividad de la enzima telomerasa (remítase, p. ej., a 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 de ARN interferente pequeño (ARNip), ribozimas o agentes antisentido para inhibir o provocar la destrucción de ARNm está bien establecido (remítase, por ejemplo, a Lebedeva *et al.* *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 41: 403-419, abril de 2001; Macejak, D. *et al.*, *Journal of Virology*, Vol. 73 (9): págs. 7745-7751, septiembre de 1999, y Zeng, Y. *et al.*, *PNAS* Vol. 100(17) págs. 9779-9784, 19 de agosto de 2003) y tales agentes se pueden diseñar para que actúen sobre el ARNm de hTERT y de este modo inhiban la producción de la proteína hTERT en una célula diana tal como una célula cancerosa (remítase, por ejemplo, a las Patentes de EE. UU. N.ºs 6.444.650 y 6.331.399).

Los oligonucleótidos que actúan sobre hTR (es decir, el componente de ARN de la enzima) actúan como inhibidores de la actividad de la enzima telomerasa bloqueando o interfiriendo de otro modo con la interacción de hTR con la proteína hTERT; dicha interacción es necesaria para la función de la telomerasa. Remítase, por ejemplo, a Villeponteau *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 6.548.298.

Una región diana preferida de hTR es la región modelo, que abarca los nucleótidos 30-67 de la SEQ ID NO: 1. Los oligonucleótidos que actúan sobre esta región se denominan en la presente "inhibidores del modelo de hTR" (remítase, p. ej., a Herbert *et al.*, *Oncogene* 21(4):638-42 (2002)). Preferentemente, un oligonucleótido de este tipo incluye una secuencia que es complementaria o casi complementaria respecto a cierta porción de la región de 11 nucleótidos que presenta la secuencia 5'-CUAACCCUAAC-3', la cual abarca los nucleótidos 46-56 de la SEQ ID NO: 12.

Otra región diana preferida es la región que abarca los nucleótidos 137-179 de hTR (remítase a Pruzan *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 de PCT WO 98/28442 describe el uso de oligonucleótidos con una longitud de al menos 7 nucleótidos para inhibir la telomerasa, donde los oligonucleótidos se diseñan para que sean complementarios respecto a porciones accesibles de la secuencia de hTR fuera de la región modelo, incluidos los nucleótidos 137-196, 290-319 y 350-380 de hTR. Más adelante se proporcionan las secuencias preferidas que actúan sobre hTR y se identifican como las SEQ ID NOS: 2-22.

Preferentemente, la región del oligonucleótido terapéutico que actúa sobre la secuencia de hTR es exactamente complementaria respecto a la secuencia de hTR correspondiente. Aunque se pueden tolerar apareamientos incorrectos en ciertos casos, cabe esperar que estos reduzcan la especificidad y la actividad del conjugado oligonucleotídico resultante. En realizaciones particulares, la secuencia de bases del oligonucleótido se selecciona, por lo tanto, para que incluya una secuencia de al menos 5 nucleótidos exactamente complementaria respecto a la diana de hTR y se puede obtener una mejora de la inhibición de la telomerasa si se emplean longitudes cada vez mayores de la secuencia complementaria, tales como de al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 13 o al menos 15 nucleótidos exactamente complementarios respecto a la diana de hTR. En otras realizaciones, la secuencia del oligonucleótido incluye una secuencia de desde al menos 5 hasta 20, desde al menos 8 hasta 20, desde al menos 10 hasta 20 o desde al menos 10 hasta 15 nucleótidos exactamente complementarios respecto a la secuencia diana de hTR.

Se puede obtener una actividad inhibidora de la telomerasa óptima cuando la longitud completa del oligonucleótido se selecciona de modo que sea complementaria respecto a la secuencia diana de hTR. Sin embargo, no es necesario que la longitud completa del oligonucleótido sea exactamente complementaria respecto a la secuencia diana y la secuencia del oligonucleótido puede incluir regiones que no sean complementarias respecto a la secuencia diana. Tales regiones se pueden añadir, por ejemplo, para conferir otras propiedades al compuesto, tales como secuencias que facilitan la purificación. Como alternativa, un oligonucleótido puede incluir múltiples repeticiones de una secuencia complementaria respecto a una secuencia diana de hTR.

Si el oligonucleótido ha de incluir regiones que no sean complementarias respecto a la secuencia diana, tales regiones se sitúan normalmente en uno o ambos de los extremos 5' o 3'. Las secuencias ilustrativas que actúan sobre el ARN de la telomerasa humana (hTR) incluyen las siguientes:

Secuencia que actúa sobre hTR	Región de la SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:
ACATTTTTTGTGGCTCTAG	160-179	2
GCTCTAGAATGAACGGTGAAGGCGGCAGG	137-166	3
GTGGAGGCGGCAGG	137-151	4
GGAAGGCGGCAGG	137-149	5
GTGGAAGGCGGCA	139-151	6
GTGGAAGGCGG	141-151	7
CGGTGGAAGGCGG	141-153	8
ACGGTGAAGGCG	142-154	9

Secuencia que actúa sobre hTR	Región de la SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO:
AACGGTGAAGGCGGC	143-155	10
ATGAACGGTGAAGGCGG	144-158	11
TAGGGTTAGACAA	42-54	12
CAGTTAGGGTTAG	46-58	13
TAGGGTTAGACA	42-53	14
TAGGGTTAGAC	42-52	15
GTTAGGGTTAG	46-56	16
GTTAGGGTTAGAC	44-56	17
GTTAGGGTTAGACAA	42-56	18
GGGTTAGAC	44-52	19
CAGTTAGGG	50-58	20
CCCTTCTCAGTT	54-65	21
CGCCCTTCTCAG	56-67	22

5 Las uniones entre nucleósidos del oligonucleótido pueden incluir cualquiera de los conectores químicos para oligonucleótidos disponibles, p. ej., fosfodiéster, fosfotriéster, metilfosfonato, P3'→N5' fosforamidato, N3'→P5' fosforamidato, N3'→P5' tiofosforamidato y fosforotioato. Normalmente, aunque no necesariamente, todas las uniones entre nucleósidos dentro del oligonucleótido serán del mismo tipo, aunque el componente oligonucleotídico se puede sintetizar utilizando una mezcla de diferentes uniones.

10 En realizaciones preferidas, el oligonucleótido tiene al menos una unión de tipo N3'→P5' fosforamidato (NP) o N3'→P5' tiofosforamidato (NPS), dicha unión se puede representar mediante la estructura 3'-(-NH-P(=O)(-XR)-O-)-5', donde X es O o S y R se selecciona del grupo constituido por hidrógeno, alquilo y arilo; y sus sales farmacéuticamente aceptables, donde XR es OH o SH. Más preferentemente, el oligonucleótido incluye todas las uniones NP o, de la forma más preferida, todas las uniones NPS.

15 Una secuencia particularmente preferida para un oligonucleótido inhibidor del modelo de hTR es la secuencia complementaria respecto a los nucleótidos 42-54 de la SEQ ID NO: 12 anterior. El oligonucleótido que presenta la secuencia (TAGGGTTAGACA) y uniones de tipo N3'→P5' tiofosforamidato (NPS) se denomina en la presente GRN163. Remítase, por ejemplo, a Asai *et al.*, *Cancer Research* 63:3931-3939 (2003); Gryaznov *et al.*, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22(5-8):577-81 (2003).

20 Según se muestra en la Tabla 1 a continuación, este oligonucleótido (primera fila de la tabla) inhibe la telomerasa con concentraciones bajas en un ensayo bioquímico (FlashPlate™; remítase a la Sección experimental). Un oligonucleótido alternativo de 13 mer, con la secuencia CAGTTAGGGTTAG, complementario respecto a los nucleótidos 46-58 de la SEQ ID NO: 1 (quinta fila de la tabla), presentó una actividad casi equivalente en el ensayo FlashPlate™. El oligonucleótido unido mediante NP correspondiente y oligonucleótidos más cortos (de 11 y 12 mer) que actuaban sobre la misma región (complementarios respecto a los nucleótidos 42-53 y 42-42, respectivamente, de la SEQ ID NO: 1), presentaron una actividad moderada. Sin lugar a dudas, el efecto es específico en función de la secuencia, según muestran las secuencias que no actúan sobre la diana y con apareamientos incorrectos de la tabla.

30 El oligonucleótido GRN163 administrado por sí solo presenta actividad inhibitoria *in vitro* en un cultivo celular, que incluye células de carcinoma epidermoide, epitelio de mama, carcinoma renal, adenocarcinoma renal, cáncer pancreático, cerebral, de colon, de próstata, leucemia, linfoma, mieloma, epidérmico, de cuello uterino, de ovario y hepático.

35 El oligonucleótido GRN163 también se ha evaluado y ha demostrado ser terapéuticamente eficaz en varios modelos de tumores en animales, que incluyen el de ovario y de pulmón, tanto microcítico como no microcítico.

Tabla 1. Inhibición de telomerasa por parte de oligonucleótidos NPS: ensayo bioquímico (FlashPlate)

Secuencia, de 5' a 3'	Descripción	CI ₅₀ , nM
TAGGGTTAGACAA SEQ ID NO:12	13 mer (GRN163)	0,045 ± 0,007
TAGGTGTAAGCAA (SEQ ID NO: 23)	Apareamientos incorrectos de la secuencia de GRN163	80 ± 31
TTGTCTAACCCCTA (SEQ ID NO: 24)	Complemento de la secuencia de GRN163	1000 ± 46
TAGGGTTAGACAA ATCCCAATCTGTT	Dúplex de la secuencia de GRN163	8,9 ± 3,0
CAGTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 13)	Oligonucleótido alternativo de 13 mer que actúa sobre la diana	0,049 ± 0,007

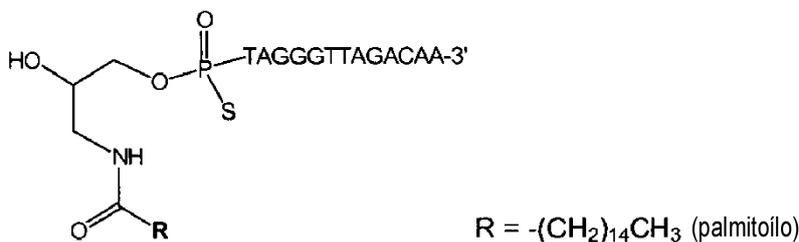
Secuencia, de 5' a 3'	Descripción	CI ₅₀ , nM
TAGGGTTAGACA (SEQ ID NO: 14)	12 mer; truncamiento de la secuencia de GRN163	0,36 ± 0,2
TAGGGTTAGAC (SEQ ID NO: 15)	11 mer; truncamiento de la secuencia de GRN163	0,85 ± 0,35
GTTAGGGTTAG (SEQ ID NO: 16)	Oligonucleótido alternativo de 11 mer que actúa sobre la diana	0,51 ± 0,13
GTTGAGTGTAG (SEQ ID NO: 25)	Apareamientos incorrectos del oligonucleótido alternativo de 11 mer que actúa sobre la diana	177 ± 93
TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO:12)	13 mer (secuencia de GRN163) con esqueleto de NP	0,7 ± 0,1
TAGGTGTAAGCAA (SEQ ID NO: 2)	Apareamientos incorrectos de la secuencia de GRN163 con esqueleto de NP	> 1000
TTAGGG (SEQ ID NO: 26)	Unidad de repetición del telómero	> 1000
TTTTTTTTTT (SEQ ID NO: 27)	Oligo-T de 10 mer	> 1000

C. Conjugados de lípido-oligonucleótido

Preferentemente, el inhibidor enzimático basado en un oligonucleótido incluye al menos un grupo lipídico unido covalentemente (remítase a la Publicación de EE. UU. N.º 2005/0113325, la cual se incorpora a la presente por referencia). Esta modificación proporciona unas propiedades de captación celular superiores, tales como el hecho de que se puede obtener un efecto biológico equivalente utilizando menores cantidades del oligonucleótido conjugado en comparación con la forma no modificada. Cuando se aplica en el contexto terapéutico humano, esto se puede traducir en una reducción de los riesgos de toxicidad y unos ahorros de costes.

El grupo lipídico L es normalmente un ácido graso o hidrocarburo alifático, incluidos los derivados de ácidos grasos e hidrocarburos, siendo algunos ejemplos los compuestos saturados de cadena lineal que contienen 14-20 carbonos, tales como el ácido mirístico (tetradecanoico), ácido palmítico (hexadecanoico) y ácido esteárico (octadecanoico), y sus formas hidrocarbonadas alifáticas correspondientes, tetradecano, hexadecano y octadecano. Algunos ejemplos de otros grupos lipídicos adecuados que se pueden emplear son los esteroides, tales como el colesterol, y ácidos grasos e hidrocarburos sustituidos, particularmente las formas polifluoradas de estos grupos. El alcance del grupo lipídico L incluye derivados tales como los derivados de tipo amina, amida, éster y carbamato. El tipo de derivado se suele determinar según el modo de unión del oligonucleótido, según se ilustra a continuación.

En una estructura ilustrativa, el resto lipídico es una amida palmitoílica (derivada del ácido palmítico), conjugada mediante un conector de tipo aminoglicerol con el grupo 5'-tiofosfato del oligonucleótido con uniones NPS. El oligonucleótido NPS que tiene la secuencia mostrada para GRN163 y que está conjugado de este modo (según se muestra a continuación) se denomina en la presente GRN163L. En una segunda estructura ilustrativa, el lípido, en forma de una amida palmitoílica, se conjuga mediante el grupo amino 3' terminal de un oligonucleótido NPS.



GRN163L

Según se muestra en la Tabla 2, la conjugación de un único lípido de tipo ácido graso incrementa significativamente la actividad inhibitoria de la telomerasa en sistemas celulares con relación al oligonucleótido no conjugado.

Tabla 2. Inhibición de telomerasa por parte de oligonucleótidos NPS conjugados con un lípido (basados en GRN163)

Sustitución lipídica	Tm (°C) del dúplex con ARN	CI ₅₀ <i>in vitro</i> , células HT-3, nM
ninguna (GRN163)	70,0	1600
3'-palmítico (GRN163L)	66,5	160
3'-esteárico	67,1	140

Sustitución lipídica	T _m (°C) del dúplex con ARN	Cl ₅₀ <i>in vitro</i> , células HT-3, nM
3'-(bis)esteárico	~40	1960
3'-oleico	66,8	930
NH-C ₁₆ (palmitoilo) en el 3. ^{er} residuo 5' (G)	62,6	500
5'-palmítico	65,5	112
3'-palmítico-5'-palmítico	61,3	~10000
3'-tritilo	66,1	3000

El efecto de la conjugación lipídica sobre la farmacocinética se ilustra mediante los datos que se muestran en la Tabla 3 a continuación, para una dosis de 4 mg/kg administrada en ratas. Las concentraciones en órganos diana 6 horas después de la administración también fueron más favorables para GRN163L, ya que se detectó una concentración de aproximadamente 4-5 µM en el hígado, riñón y tejido graso, 2-3 µM en la médula ósea y el bazo, y aproximadamente 0,5 µM en los nódulos linfáticos. La distribución del oligonucleótido sin lípido, GRN163, se produjo principalmente en el riñón (aproximadamente 18 µM), con una concentración de tan solo 1 µM o inferior en los tejidos de los órganos restantes que se ha mencionado anteriormente.

La Tabla 4 presenta más datos referentes a la inhibición de telomerasa *in vitro* por parte de GRN163 (no conjugado) y GRN163L (con lípido) en varias líneas de células cancerosas.

Tabla 3.

Farmacocinética comparativa de un oligonucleótido NPS con lípido (GRN163L) y sin lípido (GRN163) (rata, dosis de 4 mg/kg)		
	GRN163	GRN163L
T _{1/2α} , min	17	20
T _{1/2β} , h	65-86	68-72
AUC _{0-∞} , µg-h/g	27	120
C _{MÁX} , µg/ml	16	58
% excretado en 24 h	45	13

Tabla 4.

Actividad inhibitoria de la telomerasa comparativa de un oligonucleótido NPS con lípido (GRN163L) y sin lípido (GRN163) <i>in vitro</i>		
Línea celular	Cl₅₀ de GRN163 (µM)	Cl₅₀ de GRN163L (µM)
HT-3 (Cuello uterino)	1,62	0,3
U251 (Glioblastoma)	1,75	0,17
U87 (Glioblastoma)	0,75	0,11
Hep3B (Hepatoma)	6,5	0,36
HepG2 (Hepatoma)	2,72	0,48
NCI-H522 (Pulmón)	2,59	0,23
RPMI 8226 (Mieloma)	2,67	0,38
Ovcar5 (Ovario)	3,74	0,92
DU 145 (Próstata)	1,4	0,15

El oligonucleótido conjugado GRN163L presentó una actividad inhibitoria de la telomerasa *in vivo* significativamente superior a la de GRN163 no conjugado, según demuestran los xenoinjertos de células de hepatoma (Fig. 1) y los xenoinjertos de tumores de mieloma CAG en el costado (Fig. 2) tras la administración i.v.

La administración de GRN163L inhibió el crecimiento tumoral en ratones (modelo de metástasis pulmonar A549-luc IV) durante al menos 4 semanas tras la inyección i.v. de células cancerosas. La dosis fue 1 µM bisemanalmente durante 5 semanas antes de la inyección de las células cancerosas, seguida de 5 mg/kg dos veces por semana después de la inyección. Los controles mostraron un crecimiento tumoral sustancial, pero no se observó ningún crecimiento tumoral en el ratón tratado con GRN163L.

IV. Terapia combinada con gemcitabina e inhibidores de telomerasa

Los beneficios terapéuticos para el tratamiento del cáncer se pueden poner de manifiesto combinando la gemcitabina con un inhibidor de telomerasa oligonucleotídico que actúe como un agente bloqueador del modelo de hTR. La combinación de gemcitabina con un inhibidor de telomerasa puede presentar un efecto supraaditivo, es decir, el beneficio combinado es superior al que cabría esperar simplemente de los efectos aditivos de las dos estrategias terapéuticas. Esto se demuestra en la presente para la combinación de un estudio con un inhibidor de telomerasa y gemcitabina en la presente.

Se ha descubierto que la exposición combinada de células cancerosas a gemcitabina y un inhibidor de telomerasa oligonucleotídico potencia el grado en el que se inhibe la proliferación celular con relación a la gemcitabina por sí sola o el inhibidor de telomerasa por sí solo. El efecto se observa tanto para la inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vitro*, donde la inhibición se pone de manifiesto mediante una reducción de la tasa de proliferación celular, como para el tratamiento del cáncer *in vivo* en un sujeto mamífero, donde la inhibición se pone de manifiesto mediante una reducción de la tasa de crecimiento tumoral y/o un incremento del tiempo de supervivencia del sujeto que se está tratando.

Inicialmente, se identifica un sujeto que padezca un tipo de cáncer que responda a la gemcitabina o un sujeto que esté recibiendo actualmente una terapia contra el cáncer con gemcitabina, como candidato para la terapia combinada. Las indicaciones del cáncer preferidas incluyen, por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de esófago y linfomas, cáncer de vejiga, cáncer del sistema linfático, cáncer de ovario epitelial, cáncer de los conductos biliares, cáncer de vesícula, y tumores de células germinales de los ovarios y los testículos. Los pacientes candidatos son aquellos cuyo cáncer responde al tratamiento con una gemcitabina, pero para los cuales es deseable un tratamiento combinado con un inhibidor de telomerasa para mejorar la eficacia antitumoral de la gemcitabina por sí sola.

El cáncer también debe ser uno que responda a la inhibición de células cancerosas mediante la inhibición de la telomerasa. Según se ha mencionado anteriormente, los inhibidores de telomerasa oligonucleotídicos, como por ejemplo GRN163 y GRN163L, han presentado actividad inhibitoria *in vitro* frente a células humanas de cáncer de riñón, pulmón, pancreático, cerebral, de colon, próstata, mama, leucemia, linfoma, mieloma, epidérmico, de cuello uterino, ovario e hígado, e *in vivo*, mediante el suministro local y sistémico, frente a células humanas de cáncer cerebral, de próstata, linfoma, mieloma, de cuello uterino, pulmón e hígado. Otras dianas preferidas incluyen el cáncer de pulmón microcítico, de esófago, de cabeza y cuello, y de estómago.

En el método de tratamiento preferido, se administra gemcitabina al sujeto, en una cantidad que sea eficaz para inhibir la proliferación de células cancerosas en el sujeto. La dosis administrada y la pauta posológica seguirán, por ejemplo, dosis conocidas o recomendadas para la gemcitabina empleada, que se indican, por ejemplo, en el prospecto del producto farmacológico o los datos de modelos con animales o clínicos publicados. Una ventaja de la presente invención consiste en que se pueden administrar dosis de gemcitabina inferiores a las normales, cuando proceda, debido al efecto de mejora compensador del inhibidor de telomerasa. Un protocolo de este tipo permite una reducción de la dosis de gemcitabina, la cual puede presentar efectos tóxicos significativos con dosis más elevadas. De este modo, un kit que contenga una dosis del inhibidor de telomerasa podría contener opcionalmente un prospecto del producto que presentara un conjunto de instrucciones para utilizar el inhibidor en una monoterapia y otro conjunto de instrucciones para utilizar el inhibidor en una terapia combinada con gemcitabina. El conjunto de instrucciones para la terapia combinada podría recomendar (i) una dosis más baja del inhibidor de telomerasa, cuando se utiliza combinado con gemcitabina, (ii) una dosis más baja de gemcitabina, cuando se utiliza combinada con el inhibidor de telomerasa y/o (iii) una pauta posológica diferente para uno o ambos inhibidores, cuando se utilizan conjuntamente, respecto a la que se recomendaría normalmente para los dos agentes, cuando se utilizan por sí solos.

El inhibidor de telomerasa se puede administrar antes, durante o después de la administración de gemcitabina. Normalmente, los dos inhibidores se administran siguiendo una pauta posológica común, según se describe a continuación, y los dos inhibidores en sí se pueden administrar en una composición de fármacos combinados, p. ej., mediante una administración IV o por separado. A pesar de ello, también se contempla una pauta posológica en la cual el inhibidor de telomerasa se administra antes o después de administrar gemcitabina. Por ejemplo, una persona que sigue un tratamiento con una gemcitabina se puede someter posteriormente a una terapia combinada que incluya un inhibidor de telomerasa.

Como alternativa, se puede administrar inicialmente gemcitabina al paciente y posteriormente, de uno a varios días después, el paciente se puede someter a un tratamiento contra la telomerasa. En este régimen, la gemcitabina puede actuar, en parte, para sensibilizar las células cancerosas frente a la inhibición por parte de un inhibidor de telomerasa, p. ej., sincronizando el ciclo de división celular y/o fomentando la apoptosis en las células. Los niveles de dosis y las pautas posológicas preferidas se consideran en más detalle posteriormente.

En un método ilustrativo, se administra gemcitabina combinada con un oligonucleótido inhibidor de telomerasa que actúa sobre hTR. La Fig. 1 muestra los resultados del método de tratamiento en el que se administra gemcitabina combinada con el inhibidor de telomerasa GRN163L, para el tratamiento de células tumorales A549 en un modelo de xenoinjerto en ratón. Resumiendo, se implantaron células A549 (aproximadamente 3×10^6) por vía subcutánea en ratones inmunodeprimidos y se inició el tratamiento con GRN163L y/o gemcitabina en los días 4 y 14, respectivamente. Se trataron grupos de 10 ratones, cada uno de ellos de acuerdo con uno de los siguientes tres protocolos: (1) se administró gemcitabina (100 mg/kg, IP) 2 veces por semana durante las primeras 1,5 semanas y a continuación una vez por semana durante el resto del estudio; (2) se suministró GRN163L (15mg/kg, IP) 3 veces por semana durante todo el estudio; (3) se administraron los dos agentes conjuntamente de acuerdo con los protocolos de cada agente individual. Después de 60 días, se evaluó la masa tumoral mediante un ensayo estándar de bioluminiscencia; los resultados se muestran en la Fig. 1.

Como se puede observar, tanto GRN163L por sí solo, la gemcitabina por sí sola como los dos agentes juntos fueron eficaces a la hora de prevenir el crecimiento tumoral durante el periodo de tratamiento. Se observó la mayor reducción de la masa tumoral con el tratamiento combinado.

5 B. Administración

10 El protocolo terapéutico para administrar tales combinaciones dependerá de varios factores, que incluyen, sin carácter limitante, el tipo de cáncer, la edad y el estado de salud general del paciente, la agresividad de la evolución de la enfermedad, la longitud del TRF (longitud del fragmento de restricción terminal; remítase a la Sección V más adelante) y la actividad telomerasa de las células enfermas que se han de tratar, y la capacidad del paciente para tolerar los agentes que constituyen la combinación.

15 En general, se contempla el tratamiento de todos los tipos de neoplasias hematológicas y carcinomas. En realizaciones seleccionadas, la enfermedad diana comprende un tumor sólido; en otras realizaciones, la enfermedad diana comprende una neoplasia hematológica. Un curso de tratamiento ilustrativo implica múltiples dosis. La secuencia de los tratamientos combinados se determinará en función de criterios clínicos de cumplimiento y/o datos clínicos o preclínicos que estén a favor de las estrategias de optimización de la dosis con el fin de aumentar la eficacia o reducir la toxicidad del tratamiento combinado. En general, se pueden emplear varias combinaciones del inhibidor de telomerasa y la gemcitabina, ya sea de forma secuencial o simultánea. Para las dosis múltiples, se pueden alternar los dos agentes directamente o se pueden alternar, por ejemplo, dos o más dosis de un agente con una única dosis del otro agente. La administración simultánea de ambos agentes también se puede alternar o de otro modo intercalar con dosis de los agentes individuales. El tiempo entre las dosis puede ser un periodo desde aproximadamente 1-6 horas hasta aproximadamente 6-12 horas, hasta aproximadamente 12-24 horas, hasta aproximadamente 1-2 días, hasta aproximadamente 1-2 semanas o más prolongado tras el inicio del tratamiento. Durante un curso de tratamiento, se debe reevaluar la necesidad de completar las dosis planeadas.

20 Los compuestos se pueden administrar por inyección directa en un tumor o su vasculatura. Como alternativa, los compuestos terapéuticos se pueden administrar por infusión o perfusión en el tumor utilizando cualquier vehículo de suministro adecuado. Los compuestos se pueden administrar localmente en un órgano afectado. También se puede llevar a cabo una administración sistémica. Se puede aplicar una administración continua cuando proceda, por ejemplo, cuando se extirpe un tumor y se trate el lecho tumoral para eliminar la enfermedad residual. Se prefiere el suministro mediante una jeringa o catéter. Una perfusión continua de este tipo se puede llevar a cabo durante un periodo desde aproximadamente 1-6 horas hasta aproximadamente 6-12 horas, hasta aproximadamente 12-24 horas, hasta aproximadamente 1-2 días, hasta aproximadamente 1-2 semanas o más prolongado tras el inicio del tratamiento. Por lo general, la dosis de la composición terapéutica por perfusión continua será equivalente a la suministrada mediante una única inyección o inyecciones múltiples, ajustada durante un periodo de tiempo durante el cual tenga lugar la perfusión.

30 Los agentes terapéuticos se administran a un sujeto, tal como un paciente humano, en una formulación y una cantidad que sean eficaces para conseguir un resultado clínicamente deseable. Para el tratamiento del cáncer, los resultados deseables incluyen la reducción de la masa tumoral (que se determina mediante palpación o tomografía, p. ej., mediante una radiografía, un escáner con radionucleótidos, un escáner de tipo CAT o MRI), la reducción de la tasa de crecimiento tumoral, la reducción de la tasa de formación de metástasis (que se determina, p. ej., mediante un análisis histoquímico de muestras de biopsias), la reducción de marcadores bioquímicos (que incluyen marcadores generales tales como ESR, marcadores específicos de tumores tales como PSA en suero) y la mejora de la calidad de vida (que se determina mediante una evaluación clínica, p. ej., la puntuación de Karnofsky), un incremento del tiempo transcurrido hasta que se produce el avance de la enfermedad, la supervivencia sin enfermedad y la supervivencia global.

40 La cantidad de cada agente por dosis y el número de dosis necesarias para conseguir tales efectos variarán dependiendo de muchos factores, que incluyen la indicación de la enfermedad, las características del paciente que está siendo tratado y el modo de administración. Normalmente, la formulación y la vía de administración proporcionarán una concentración local en el lugar de la enfermedad comprendida entre 1 nM y 100 µM de cada agente. El médico será capaz de variar la cantidad de los compuestos, el portador, la frecuencia de la dosis y similares, teniendo en cuenta factores tales como el estado patológico neoplásico particular y su gravedad; el estado de salud general del paciente; la edad, el sexo y el peso del paciente; el modo de administración; la idoneidad de administrar de forma concurrente agentes antitoxicidad sistémicos; la monitorización de las funciones de los órganos vitales del paciente; y otros factores que normalmente se monitorizan durante la quimioterapia contra el cáncer. En general, los compuestos se administran con una concentración que proporcione resultados eficaces sin provocar efectos secundarios perjudiciales o dañinos excesivos.

50 La cantidad del agente utilizado combinado con un inhibidor de telomerasa, especialmente respecto a la gemcitabina, puede ser inferior a la que sería necesaria para el agente utilizado en una terapia no combinada.

65

C. Formulaciones

El o los portadores farmacéuticos empleados pueden ser sólidos o líquidos. Los portadores líquidos se pueden utilizar en la preparación de soluciones, emulsiones, suspensiones y composiciones presurizadas. Los compuestos se disuelven o suspenden en un excipiente líquido farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos adecuados de portadores líquidos para administración parenteral incluyen agua (la cual puede contener aditivos, p. ej., derivados de celulosa, preferentemente una solución de carboximetilcelulosa sódica), solución salina tamponada con fosfato (PBS), alcoholes (incluidos los alcoholes monohídricos y los alcoholes polihídricos, p. ej., los glicoles) y sus derivados, y aceites (p. ej., aceite de cacahuete y aceite de coco fraccionado). El portador líquido puede contener otros aditivos farmacéuticos adecuados, que incluyen, sin carácter limitante, los siguientes: solubilizantes, agentes de suspensión, emulsionantes, tampones, agentes espesantes, colorantes, reguladores de la viscosidad, conservantes, estabilizantes y reguladores de la osmolaridad.

Para la administración parenteral, el portador también puede ser un éster oleoso tal como oleato de etilo o miristato de isopropilo. Los portadores estériles son útiles en composiciones estériles en forma líquida para administración parenteral. Las suspensiones, soluciones o composiciones farmacéuticas líquidas estériles se pueden utilizar, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, por vía intravenosa o tópica. Las composiciones también se pueden administrar por vía intravascular o mediante un estent vascular. El portador líquido para composiciones presurizadas puede ser un hidrocarburo halogenado u otro propulsor farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones presurizadas también se pueden encapsular en lípidos para ser suministradas por inhalación. Para la administración mediante inhalación o insuflación intranasal o intrabronqueal, las composiciones se pueden formular en una solución acuosa o parcialmente acuosa, la cual se puede utilizar posteriormente en forma de aerosol.

Las composiciones se pueden administrar por vía tópica como una solución, crema o loción, mediante la formulación con vehículos farmacéuticamente aceptables que contengan el compuesto activo. Las composiciones de esta invención se pueden administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable, que incluye, sin carácter limitante, las formulaciones en cápsulas, comprimidos, polvos o gránulos, y como suspensiones o soluciones en medios acuosos o no acuosos. Las composiciones y/o formulaciones farmacéuticas que comprenden los oligonucleótidos de la presente invención pueden incluir portadores, lubricantes, diluyentes, espesantes, agentes saborizantes, emulsionantes, adyuvantes dispersantes o aglutinantes. En el caso de comprimidos para uso oral, los portadores que se utilizan habitualmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Normalmente también se añaden agentes lubricantes tales como estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz secado. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Cuando proceda, también se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

Los modos de administración y la formulación pueden depender del fármaco y de su modo de administración aprobado. Por ejemplo, para la gemcitabina se indica la administración IV. Cuando el inhibidor de telomerasa es GRN163L, una vía preferida consiste en la formulación en cloruro de sodio al 0,9% (solución salina normal) y la administración IV, preferentemente mediante infusión durante 4-8 horas, p. ej., una infusión de 6 h.

Aunque los oligonucleótidos conjugados con lípidos descritos en la presente, tales como GRN163L, presentan unas características superiores para la penetración celular y de tejidos, estos y otros compuestos se pueden formular para que proporcionen un beneficio adicional en esta área, p. ej., en portadores que sean liposomas. El uso de liposomas para facilitar la captación celular se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE. UU. N.ºs 4.897.355 y 4.394.448, y numerosas publicaciones describen la formulación y preparación de liposomas. Además, las formulaciones de liposomas se pueden modificar mediante la unión de ligandos de direccionamiento a la superficie de los liposomas, con el fin de que actúen sobre sitios de neovascularización tales como las regiones angiogénicas de los tumores. Los compuestos también se pueden formular con potenciadores adicionales del transporte/la penetración, tales como las formas no conjugadas de los restos lipídicos descritos anteriormente, incluidos los ácidos grasos y sus derivados. Los ejemplos incluyen ácido oleico, ácido láurico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, dicaprato, tricaprato, recinleato, monooleína (que también se conoce como 1-monooleoil-rac-glicerol), dilaurina, ácido caprílico, ácido ariquidónico, 1-monocaprato de glicerilo, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, acilcarnitinas, acilcolinas, mono- y diglicéridos y sales fisiológicamente aceptables de estos (es decir, oleato, laurato, caprato, miristato, palmitato, estearato, linoleato, etc.). Otros adyuvantes útiles incluyen sustratos para la migración transendotelial tales como sistemas de captación de glucosa para facilitar la salida del espacio vascular hacia el microentorno del tumor.

V. Medición de la longitud del telómero, la actividad telomerasa y/o la proliferación celular

Cuando se emplea un régimen terapéutico que implica la administración de un inhibidor de telomerasa, puede resultar útil determinar la longitud del telómero y/o la actividad telomerasa en una muestra celular o tisular. Estos parámetros se pueden medir utilizando ensayos conocidos en la técnica. La longitud del telómero se puede medir mediante un método de citometría de flujo utilizando hibridación fluorescente *in situ*, que se denomina FISH de flujo (remítase, p. ej., a M. Hulldin *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 26(16):3651-6, 1998; N. Rufer *et al.*, *Nature Biotechnology*

16:743-7, 1998). Otros métodos incluyen el análisis de fragmentos de restricción terminales (TRF), en el cual el ADN genómico se digiere con una enzima de restricción que contiene una secuencia de reconocimiento de cuatro bases que no está presente en las secuencias de repetición del telómero, y los fragmentos de restricción se separan según su tamaño, p. ej., mediante electroforesis en gel. Remítase, por ejemplo, a la Patente de EE. UU. N.º 5.489.508 (West *et al.*) y Harley *et al.*, *Nature* 345:458, 1990. La patente de West *et al.* también describe métodos para medir la longitud del telómero mediante un método de "cebador terminal anclado" y mediante una reacción de Maxam-Gilbert modificada.

Además, se puede predecir una respuesta más rápida frente a un agente inhibidor de telomerasa para células tumorales que tengan un ADN telomérico más corto, aunque se ha demostrado que la telomerasa presenta otros efectos inhibitorios independientes de la longitud del telómero (p. ej., Stewart *et al.*, *PNAS* 99:12606, 2002; Zhu *et al.*, *PNAS* 93:6091, 1996; Rubaiyat *et al.*, *Oncogene* 24(8):1320, 2005); y Folini *et al.*, *Curr. Pharm. Design* 11(9):1105, 2005).

El ensayo TRAP (remítase a la Parte experimental más adelante) es un método estándar para medir la actividad telomerasa en un sistema de extracto celular (Kim *et al.*, *Science* 266:2011, 1997; Weinrich *et al.*, *Nature Genetics* 17:498, 1997). Resumiendo, este ensayo mide la cantidad de nucleótidos incorporados en los productos de elongación (polinucleótidos) formados mediante la adición de nucleótidos a un cebador o sustrato marcado de la telomerasa. El ensayo TRAP se describe detalladamente en las Patentes de EE. UU. N.ºs 5.629.154, 5.837.453 y 5.863.726, y su uso para evaluar la actividad de los compuestos inhibidores de telomerasa se describe en varias publicaciones, que incluyen WO 01/18015. Además, se pueden adquirir los siguientes kits de proveedores comerciales con fines de investigación para medir la actividad telomerasa: kit de detección de telomerasa TRAPEze™XK (Intergen Co., Purchase N.Y.); y TeloTAGGG Telomerasa PCR ELISA plus (Roche Diagnostics, Indianapolis Ind.).

La actividad contra el cáncer de las combinaciones terapéuticas se puede evaluar utilizando ensayos *in vivo* e *in vitro* estándar. La capacidad de la composición para inhibir específicamente el crecimiento de células tumorales se puede evaluar utilizando líneas de células tumorales *in vitro* o en modelos de xenoinjertos en animales *in vivo*. Un protocolo preferido para tales ensayos de la curva de crecimiento consiste en el ensayo de viabilidad celular a corto plazo que se describe en Asai *et al.* (2003, citado anteriormente). En los modelos establecidos de xenoinjertos de tumores humanos, el compuesto de prueba se administra o bien directamente al sitio del tumor o por vía sistémica, y el crecimiento del tumor se sigue mediante una medición física. En Asai *et al.* (2003, citado anteriormente) también se describe un ejemplo preferido de un ensayo de xenoinjerto tumoral *in vivo* adecuado. Se describen otros ejemplos en Scorski *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 3966-3971 (1997) y Damm *et al.*, *EMBO J.*, 20:6958-6968 (2001).

Parte experimental

A. Preparación y conjugación lipídica de N3'→P5' fosforamidatos o N3'→P5' tiofosforamidatos oligonucleotídicos

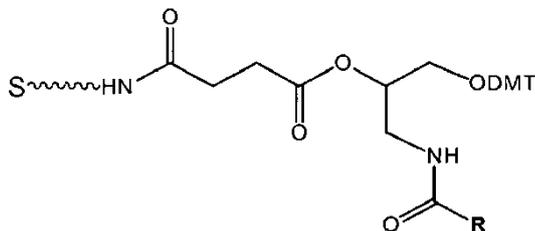
Estos compuestos se pueden preparar según se describe, por ejemplo, en McCurdy *et al.*, *Tetrahedron Letters* 38:207-210 (1997) o Pongracz y Gryaznov, *Tetrahedron Letters* 49:7661-7664 (1999). Los monómeros nucleosídicos 3'-amino de partida se pueden preparar según se describe en Nelson *et al.*, *J.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

Se pueden utilizar varias estrategias sintéticas para conjugar un resto lipídico L con el oligonucleótido, dependiendo de la naturaleza de la unión seleccionada; remítase, por ejemplo, a 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 consigue mediante el uso de grupos funcionales adecuados en un extremo del oligonucleótido. Por ejemplo, el grupo 3'-amino presente en el extremo 3' de los oligonucleótidos NP y NPS se puede hacer reaccionar con ácidos carboxílicos, cloruros de ácido, anhídridos y ésteres activos, utilizando catalizadores de acoplamiento adecuados, para formar una unión de tipo amida. Los grupos tiol también son adecuados como grupos funcionales (remítase a Kupihar *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* 9:1241-1247 (2001)). Existen varios modificadores funcionalizados con grupos amino y tiol con diferentes longitudes de cadena que se pueden adquirir de proveedores comerciales para la síntesis de oligonucleótidos.

Las estrategias específicas para unir grupos lipídicos a un extremo de un oligonucleótido NP o NPS incluyen las que se describen en la Publicación de la Solicitud de EE. UU. N.º 2005/0113325, la cual se incorpora a la presente por referencia. Además de las uniones de tipo amida mencionadas anteriormente, los lípidos también se pueden unir a la cadena del oligonucleótido utilizando, por ejemplo, un derivado del lípido de tipo fosforamidito, para producir una unión de tipo fosforamidato o tiofosforamidato que conecte el lípido y el oligonucleótido. El grupo 3'-amino libre del oligonucleótido unido al soporte totalmente protegido también se puede hacer reaccionar con un aldehído lipídico adecuado y a continuación reducirlo con cianoborohidruro de sodio, lo cual proporciona una unión de tipo amina.

Para unir un lípido al extremo 5', según se describe también en la Publicación de la Solicitud de EE. UU. N.º 2005/0113325, el oligonucleótido se puede sintetizar utilizando un soporte sólido modificado que contenga el lípido. La reacción de 3-amino-1,2-propanodiol con un cloruro de acilo graso (RC(O)Cl), seguida de la dimetoxitritilación del

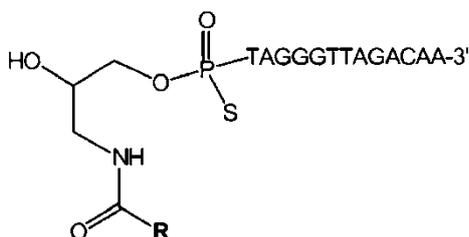
alcohol primario y la succinilación del alcohol secundario, proporciona un intermedio que se acopla a continuación, mediante el grupo carboxilo succinilo libre, al soporte sólido. A continuación, se muestra un ejemplo de un soporte modificado, donde S representa un soporte de CPG con una amina alquílica de cadena larga y R representa un lípido.



5

Este procedimiento va seguido por la síntesis del oligonucleótido en la dirección de 5' a 3', según se describe, por ejemplo, en Pongracz & Gryaznov (1999), empezando con la desprotección y fosfitilación del grupo -ODMT. Esto resulta eficaz para producir, por ejemplo, la siguiente estructura, tras su escisión del soporte sólido:

10



La estructura anterior, donde -R es $-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ (palmitoilo), se denomina en la presente GRN163L.

15 B. Ensayo de FlashPlate™

Este ensayo se llevó a cabo esencialmente como se describe en Asai *et al.*, *Cancer Research*, 63:3931-3939 (2003). Resumiendo, el ensayo detecta y/o mide la actividad telomerasa midiendo la adición de repeticiones teloméricas TTAGGG a un cebador que es un sustrato de la telomerasa biotilado. Los productos biotilados se capturan en placas de microvaloración recubiertas con estreptavidina y se utiliza una sonda oligonucleotídica complementaria respecto a 3,5 repeticiones del telómero, marcada con ^{33}P , para medir los productos de la telomerasa. La sonda no unida se elimina por lavado y la cantidad de sonda hibridada con los productos de la telomerasa capturados se determina por recuento de centelleo.

25 C. Ensayo TRAP

La capacidad de un compuesto para incrementar o inhibir la actividad telomerasa en una célula se puede determinar utilizando el ensayo TRAP (protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas), el cual se describe, por ejemplo, en Kim *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.629.154; Harley *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.891.639; y Harley *et al.*, Publicación de PCT N.º WO 2005/000245. Resumiendo, se incuban líneas de células tumorales que expresan telomerasa con composiciones de prueba, se someten a lisis y se tratan con un sustrato de la telomerasa oligonucleotídico marcado, cebadores adecuados y un patrón interno con fines de cuantificación. Dependiendo de la actividad telomerasa del medio, se añadirán repeticiones del telómero al sustrato, para formar productos extendidos de la telomerasa. La mezcla se incuba a temperatura ambiente y a continuación se realizan múltiples ciclos de PCR. La mezcla se separa en un gel y el producto de extensión marcado se detecta y cuantifica por comparación con el patrón interno.

Lista de secuencias

40 SEQ ID NO: 1: componente de ARN de la telomerasa humana (hTR):

ES 2 696 828 T3

```

GGGUUGC GGA GGGUGGGCCU GGGAGGGGUG GUGGCCAUUU UUUGUCUAAC CCUAACUGAG 60
AAGGGCGUAG GCGCCGUGCU UUUGCUCUCCC GCGCGCUGUU UUUCUCGCUG ACUUUCAGCG 120
GGCGGAAAAG CCUCGGCCUG CCGCCUUGCA CCGUUCAUUC UAGAGCAAAC AAAAAAUGUC 180
AGCUGCUGGC CCGUUCGCCU CCCGGGGACC UGCGGCGGGU CGCCUGCCCA GCCCCCGAAC 240
CCCGCCUGGA GCCGCGGUCG GCCCGGGGCU UCUCGGGAGG CACCCACUGC CACCGCGAAG 300
AGUUGGGCUC UGUCAGCCGC GGGUCUCUCG GGGGCGAGGG CGAGGUUCAC CGUUUCAGGC 360
CGCAGGAAGA GGAACGGAGC GAGUCCC GCCGCGCGAU UCCCUGAGCU GUGGGACGUG 420
CACCCAGGAC UCGGCUCACA CAUGCAGUUC GCUUUCUGU UGGUGGGGG AACGCCGAUC 480
GUGCGCAUCC GUCACCCUC GCCGGCAGUG GGGGCUUGUG AACCCCAAA CCUGACUGAC 540
UGGGCCAGUG UGCU
    
```

SEQ ID NOS: 2-26, secuencias de nucleótidos de agentes que actúan sobre la SEQ ID NO: 1:

ACATTTTTGTTGCTCTAG	2
GCTCTAGAATGAACGGTGAAGGCGGCAGG	3
GTGGAGGCGGCAGG	4
GGAAGGCGGCAGG	5
GTGGAAGGCGGCA	6
GTGGAAGGCGG	7
CGGTGAAGGCGG	8
ACGGTGAAGGCG	9
AACGGTGAAGGCGGC	10
ATGAACGGTGAAGGCGG	11
TAGGGTTAGACAA	12
CAGTTAGGGTTAG	13
TAGGGTTAGACA	14
TAGGGTTAGAC	15
GTTAGGGTTAG	16
GTTAGGGTTAGAC	17
GTTAGGGTTAGACAA	18
GGGTTAGAC	19
CAGTTAGGG	20
CCCTTCTCAGTT	21
CGCCCTTCTCAG	22
TAGGTGTAAGCAA	23
TTGTCTAACCCTA	24
GTTGAGTGTAG	25
TTAGGG	26
TTTTTTTTT	27

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Geron Corporation et al. Go, Ning Tressler, Robert J.

10 <120> INHIBIDOR DE TELOMERASA Y GEMCITABINA COMBINADOS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> 387978019W00

15 <140> A asignar

<141> Junto con la presente

<150> US 60/855.583

<151> 30-10-2006

20

<160> 27

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

25

ES 2 696 828 T3

<210> 1
 <211> 554
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 1
 ggguugcgggaggguaggccu gggagggggug guggccauuu uuugucuaac ccuaacugag 60
 aagggcguag ggcgcgugcu uuugcucccc gcgcgcuguu uuucucgcug acuuucagcg 120
 ggcggaaaag ccucggccug ccgccuucca ccguucauuc uagagcaaac aaaaaauguc 180
 agcugcuggc ccguucgccu cccggggacc ugccggcgggu cgccugccca gccccgaac 240
 cccgccugga gccgcggucg gcccggggcu ucuccggagg caccacugc caccgcgaag 300
 aguugggcuc ugucagccgc gggucucucg ggggcgaggg cgagguucac cguuucaggc 360
 cgcaggaaga ggaacggagc gagucccgcc gcggcgcgau ucccugagcu gugggacgug 420
 caccagggac ucggcucaca caugcaguuc gcuuuccugu uggugggggg aacgccgauc 480
 gugcgcuauc gucaccccuc gccggcagug ggggcuuugug aacccccaaa ccugacugac 540
 ugggccagug ugcu 554
 10 <210> 2
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 2
 acatTTTTg tTgctctag 20
 20 <210> 3
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Oligonucleótido
 <400> 3
 30 gctctagaat gaacggtgga aggcggcagg 30
 <210> 4
 <211> 14
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 40 <400> 4
 gtggaggcgg cagg 14
 <210> 5
 <211> 13
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 50 <400> 5
 ggaaggcggc agg 13
 <210> 6
 <211> 13
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

 5 <400> 6
 gtggaaggcg gca 13

 <210> 7
 <211> 11
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 15 <400> 7
 gtggaaggcg g 11

 <210> 8
 <211> 13
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 25 <400> 8
 cgggtggaagg cgg 13

 <210> 9
 <211> 13
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 35 <400> 9
 acggtggaag gcg 13

 <210> 10
 <211> 16
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 45 <400> 10
 aacggtgga ggcggc 16

 <210> 11
 <211> 18
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 55 <400> 11
 atgaacggtg gaaggcgg 18

 <210> 12
 <211> 13
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 65

<220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 12
 5 tagggtaga caa 13

 <210> 13
 <211> 13
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 13
 15 cagtagggt tag 13

 <210> 14
 <211> 12
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 14
 25 tagggtaga ca 12

 <210> 15
 <211> 11
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 15
 35 tagggtaga c 11

 <210> 16
 <211> 11
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 16
 50 gtagggta g 11

 <210> 17
 <211> 13
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido

 <400> 17
 60 gtagggta gac 13

 <210> 18
 <211> 15
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

5 <400> 18
 gttagggtta gacaa 15

10 <210> 19
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido

20 <400> 19
 gggtagac 9

25 <210> 20
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido

35 <400> 20
 cagtaggg 9

40 <210> 21
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido

50 <400> 21
 ccctctcag tt 12

55 <210> 22
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 22
 cgccctctc ag 12

<210> 23
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

<400> 23
 taggtgtaag caa 13

5
<210> 24
<211> 13
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

10
<400> 24
ttgtctaacc cta 13

<210> 25
<211> 11
<212> ADN
15
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

20
<400> 25
gttgagtgta g 11

<210> 26
<211> 6
25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

30
<400> 26
ttaggg 6

<210> 27
<211> 10
35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
40
<223> Oligonucleótido

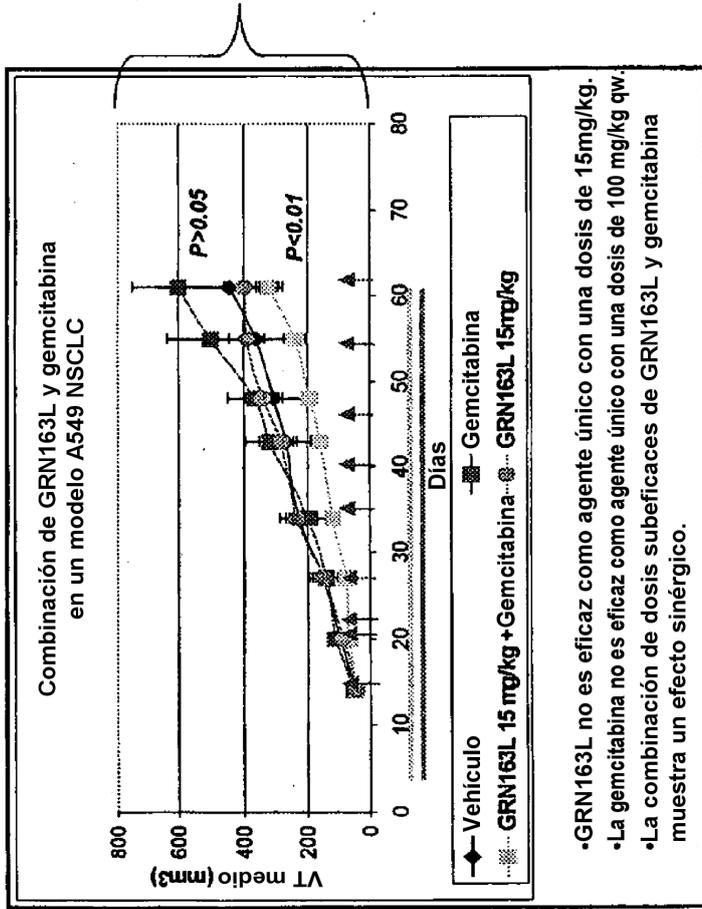
<400> 27
ttttttttt 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GNR163L) en la elaboración de un medicamento para inhibir la proliferación de células cancerosas en un sujeto que está siendo tratado ya sea de forma secuencial o simultánea con gemcitabina, en donde la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L) se administra por perfusión continua durante un periodo de aproximadamente 1-6 horas.
- 10 2. El uso de una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GNR163L) de la reivindicación 1 con el fin de mejorar la eficacia del tratamiento contra el cáncer de la gemcitabina en el sujeto.
- 15 3. El uso de cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde el medicamento se administra mediante la infusión de la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GNR163L) por vía intravenosa en el sujeto en condiciones de infusión eficaces para producir una concentración en sangre del inhibidor comprendida entre 1 nM y 100 µM.
- 20 4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GNR163L) se administra en una cantidad eficaz para inhibir la proliferación de células cancerosas en el sujeto cuando imetelstat (GRN163L) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra por sí solo.
- 25 5. El uso de cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde el cáncer se selecciona del grupo constituido por cáncer de pulmón no microcítico, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de esófago y linfomas, cáncer de vejiga, cáncer del sistema linfático, cáncer de ovario epitelial, cáncer de los conductos biliares, cáncer de la vesícula biliar y tumores de células germinales de los ovarios y los testículos.
- 30 6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones previas, en donde dicha administración proporciona un efecto inhibidor supraaditivo respecto a los efectos de los agentes individuales gemcitabina e inhibidor de telomerasa.
- 35 7. Una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GNR163L), para su uso en el tratamiento del cáncer en un sujeto que está siendo tratado con gemcitabina.
8. Una composición que contiene una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GNR163L) y gemcitabina como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento del cáncer.
- 40 9. Una composición que contiene un inhibidor de telomerasa que comprende un oligonucleótido caracterizado por:
- (i) uniones entre nucleósidos de N3'→P5' fosforamidato o N3'→P5' tiofosforamidato;
- (ii) tener la secuencia identificada como SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13; y
- (iii) un resto lipídico seleccionado del grupo que consiste en ácidos grasos, esteroides y derivados de los mismos unidos de forma covalente a un extremo del nucleótido;
- 45 y gemcitabina como una preparación combinada para uso simultáneo, separado o secuencial en la inhibición de la proliferación de células cancerosas.
- 50 10. La composición de la reivindicación 9 en donde el inhibidor de telomerasa es una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L).
- 55 11. La composición de la reivindicación 10, en donde la sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L) se administra mediante perfusión continua durante un periodo de aproximadamente 1-6 horas.
- 60 12. Un kit que comprende:
- (a) una dosis de gemcitabina en una cantidad eficaz, cuando se administra por sí sola, para inhibir la proliferación de células cancerosas en un sujeto y
- (b) una dosis de un inhibidor de telomerasa oligonucleotídico que comprende un oligonucleótido caracterizado por:
- (i) uniones entre nucleósidos de N3'→P5' tiofosforamidato;
- (ii) tener la secuencia identificada como SEQ ID NO: 12; y
- (iii) un resto de palmitoilo (C16) unido al extremo 5' del oligonucleótido mediante un conector de glicerol o aminoglicerol,
- 65

en una cantidad eficaz, cuando se administra por sí solo, para inhibir la proliferación de células cancerosas en el sujeto, en donde dicho kit comprende (a) y (b) como una preparación combinada para inhibir la proliferación de células cancerosas en el que dichas células cancerosas se exponen a (a) ya sea antes, después o junto con la exposición de dichas células a (b).

- 5
13. El kit de la reivindicación 12, en donde el inhibidor de telomerasa oligonucleotídico es una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto designado en el presente documento imetelstat (GRN163L).



- GRN163L no es eficaz como agente único con una dosis de 15mg/kg.
- La gemcitabina no es eficaz como agente único con una dosis de 100 mg/kg qw.
- La combinación de dosis subeficaces de GRN163L y gemcitabina muestra un efecto sinérgico.

Fig. 1