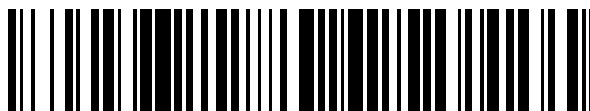


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 914**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)
G01N 33/533 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.11.2013 PCT/US2013/072302**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14085632**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2013 E 13858528 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2925889**

54 Título: **Marcadores de diagnóstico para el tratamiento de los trastornos proliferativos celulares con inhibidores de la telomerasa**

30 Prioridad:

30.11.2012 US 201261732263 P
13.03.2013 US 201313802035
13.03.2013 US 201361780851 P
15.03.2013 US 201361798478 P
05.04.2013 US 201361809228 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BASSETT, EKATERINA;
BURINGTON, BART;
WANG, HUI y
ENG, KEVIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 703 914 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

Marcadores de diagnóstico para el tratamiento de los trastornos proliferativos celulares con inhibidores de la telomerasa

5

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional de EE.UU. n.º 61/732.263 presentada el 30 de noviembre de 2012, la solicitud provisional de patente de EE.UU. n.º 61/780.851 presentada el 13 de marzo de 2013, la solicitud de patente de EE.UU. n.º 13/802.035 presentada el 13 de marzo de 2013, la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/798.478 presentada el 15 de marzo de 2013 y la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 61/809.228 presentada el 5 de abril de 2013.

10

Campo de la invención

15

La presente invención se refiere a métodos para identificar individuos que tienen o que se sospecha que tienen cáncer que se beneficiarían del tratamiento con compuestos inhibidores de la telomerasa, y proporciona métodos para tratar a estos individuos.

20

Antecedentes

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. A pesar de los avances significativos en el campo de la quimioterapia, muchas de las formas más frecuentes de cáncer siguen resistiéndose a la intervención quimioterapéutica.

25

Los telómeros son secuencias de ácido nucleico repetitivas presentes en los extremos de los cromosomas lineales de los organismos eucariotas. Las secuencias teloméricas, junto con las proteínas de unión a los telómeros, confieren estabilidad a los cromosomas. En general, los telómeros se componen de repeticiones cortas en tándem con una unidad de secuencia de repetición especificada por la enzima telomerasa particular de cada organismo. Se conocen las secuencias de repetición teloméricas de una variedad de organismos. La unidad de secuencia de repetición telomérica humana es (TTAGGG)_n. Además de las secuencias de repetición bicatenarias, los extremos 3' de algunos telómeros contienen una región monocatenaria, que para los seres humanos se encuentra en la cadena rica en G.

30

35

La telomerasa es una riboproteína que sintetiza ADN telomérico. En ausencia de telomerasa, los telómeros se van acortando gradualmente, porque las ADN polimerasas son incapaces de replicar los extremos del ADN dúplex lineal. El acortamiento gradual de los telómeros finalmente conduce a la detención del ciclo celular o a la muerte celular. En los seres humanos, se produce la mortalidad dependiente de la longitud de los telómeros en las células debido a la represión de la telomerasa en las células somáticas normales antes del nacimiento, una longitud de los telómeros inicial al nacer y a lo largo de la vida, y la expresión de la telomerasa muy regulada en las células progenitoras o madre. Los seres humanos nacen con telómeros "de longitud completa". Como la telomerasa se regula a la baja en los tejidos somáticos, esto conduce a la pérdida de ADN telomérico con la edad celular y cronológica. Así pues, los telómeros actúan como un reloj mitótico, confiriendo una capacidad finita de división a las células humanas normales. Los telómeros cortos afectan a la capacidad de las células madre para proliferar. Por ejemplo, los telómeros cortos de las células madre epidérmicas impiden el crecimiento de la piel y del cabello.

40

45

Las células de cáncer, en general, se someten a series 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 permite el crecimiento tumoral y la metástasis (Kim *et al.*, *Science* 266: 2011-2015; Shay J. W. y Wright W. E., *Carcinogenesis* 26: 867-74 (2005)). Por consiguiente, la inhibición de la telomerasa se considera una estrategia de tratamiento prometedora para una amplia variedad de tipos de tumores sólidos y neoplasias hematológicas (Harley C. B., *Nature Rev. Cancer*, 8: 167-179 (2008)).

50

55

El documento WO 2010/045245 describe un método para identificar la sensibilidad de un paciente a la terapia de inhibición de la telomerasa. Ladetto *et al.*, *Blood*, 103: 4644-4649 (2004) describen estudios sobre la longitud de los telómeros y la histopatogenia en los trastornos linfoproliferativos de linfocitos B. Wang *et al.*, *Cancer Research* 71: (18) supl. (2011) describen la evaluación de la longitud de los telómeros en tejidos tumorales humanos de archivo mediante el método de PCR cuantitativa. El documento WO 2012/135125 describe la medición de la longitud de los telómeros en muestras embebidas en parafina y fijadas en formalina (EPFF) mediante PCR cuantitativa. Chen *et al.*, *Cancer Research*: 63, 5917-5925 (2003) describe estudios sobre las consecuencias de la inhibición de la telomerasa y los tratamientos combinados para la proliferación de células cancerosas.

60

65

Desafortunadamente, muchos pacientes con cáncer no obtienen beneficio de los agentes citotóxicos o terapias dirigidas, tales como los inhibidores de la telomerasa, pero sí se exponen a sus efectos tóxicos. Por estas razones, se necesitan urgentemente nuevos métodos para la identificación de pacientes con cáncer que respondan favorablemente al tratamiento con estos tratamientos.

A lo largo de toda la presente memoria descriptiva, se hace referencia a varias patentes, solicitudes de patente y otros tipos de publicaciones (por ejemplo, artículos de revistas).

Sumario de la invención

5 La invención proporcionada en el presente documento desvela, entre otras cosas, métodos de identificación de individuos que se beneficiarán del tratamiento con inhibidores de la telomerasa y el uso de inhibidores de la telomerasa para el tratamiento de los mismos.

10 Por consiguiente, en un aspecto, en el presente documento, se proporcionan métodos para seleccionar un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa, comprendiendo el método: determinar la longitud relativa de los telómeros mediante el análisis de la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo; y seleccionar un individuo que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa cuando se determine que la longitud relativa media de los telómeros de las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o inferior de un intervalo de longitudes relativas de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos, en el que el cáncer es un tumor sólido, y en el que:

20 el uno o más patrones conocidos es un intervalo de longitudes de telómeros establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos en los que las células cancerosas de la pluralidad de tumores de origen natural son del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo diagnosticado del cáncer; o

25 el uno o más patrones conocidos son estirpes celulares caracterizadas.

30 Como se desvela en el presente documento, el inhibidor de la telomerasa comprende un oligonucleótido. Como se desvela en el presente documento, el oligonucleótido es complementario al componente de ARN de la telomerasa. Como se desvela en el presente documento, el oligonucleótido es de 10-20 pares de bases de longitud y comprende al menos un enlace internucleosídico de tiofosforamidato N3' → P5'. Como se desvela en el presente documento, el oligonucleótido comprende la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3). Como se desvela en el presente documento, el oligonucleótido comprende enlaces internucleosídicos de tiofosforamidato N3'→ P5'. Como se desvela en el presente documento, el oligonucleótido comprende una fracción lipídica unida al extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido. Como se desvela en el presente documento, la fracción lipídica está unida al extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido a través de un enlazador. Como se desvela en el presente documento, el enlazador es un enlazador de glicerol o aminoglicerol. Como se desvela en el presente documento, la fracción lipídica es una fracción palmitoilo (C16). Como se desvela en el presente documento, el inhibidor de la telomerasa es Imetelstat. Como se desvela en el presente documento, el cáncer es cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de próstata o un cáncer hematológico. Como se desvela en el presente documento, la administración del inhibidor de la telomerasa produce una reducción de la proliferación de las células cancerosas y/o del crecimiento tumoral. Como se desvela en el presente documento, la administración del inhibidor de la telomerasa produce un aumento de la supervivencia libre de progresión en el individuo. Como se desvela en el presente documento, el inhibidor de la telomerasa se administra con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se desvela en el presente documento, el inhibidor de la telomerasa está formulado para la administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, tópica, intraperitoneal, intranasal, por inhalación, intratumoral o intraocular. Como se desvela en el presente documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa comprende poner en contacto una o más células cancerosas con el inhibidor de la telomerasa. Como se desvela en el presente documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa produce uno o más entre la reducción de la proliferación celular, el aumento de la apoptosis o la senescencia celular. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, la longitud media de los telómeros se determina mediante qPCR, telo-FISH o transferencia de Southern. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, dicho uno o más patrones conocidos son estirpes celulares caracterizadas. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, las estirpes celulares se seleccionan del grupo que consiste en: células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. Como se desvela en el presente documento, las estirpes celulares caracterizadas se seleccionan a partir de estirpes celulares representativas del tipo de muestra biológica desvelada en el presente documento. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, las estirpes celulares caracterizadas son estirpes celulares de cáncer de pulmón no microcítico, estirpes celulares hepatocelulares o estirpes celulares ováricas. Como se desvela en el presente documento, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitudes de telómeros establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. Como se desvela en el presente documento, dichas células cancerosas de una pluralidad de tumores de origen natural son del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, la longitud de los telómeros de las células cancerosas presentes en la

muestra biológica está determinada en el percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10 o percentil 5, o percentil inferior del intervalo de longitudes relativas de los telómeros.

En otro aspecto, en el presente documento, se proporciona un inhibidor de la telomerasa para su uso en el tratamiento de un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer, cuando se determine que la longitud relativa media de los telómeros de las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o inferior de un intervalo de longitudes relativas de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos; en el que el cáncer es un tumor sólido, y en el que:

el uno o más patrones conocidos es un intervalo de longitudes de telómeros establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos en los que las células cancerosas de la pluralidad de tumores de origen natural son del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo diagnosticado del cáncer; o el uno o más patrones conocidos son estirpes celulares caracterizadas representativas.

En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, el inhibidor de la telomerasa comprende un oligonucleótido. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, el oligonucleótido es complementario al componente de ARN de la telomerasa. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, el oligonucleótido es de 10-20 pares de bases de longitud y comprende al menos un enlace internucleosídico de tiofosforamidato N3' → P5'. Como se desvela en el presente documento, el oligonucleótido comprende la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3). Como se desvela en el presente documento, el oligonucleótido comprende enlaces internucleosídicos de tiofosforamidato N3' → P5'. Como se desvela en el presente documento, el oligonucleótido comprende una fracción lipídica unida al extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido. Como se desvela en el presente documento, la fracción lipídica está unida al extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido a través de un enlazador. Como se desvela en el presente documento, el enlazador es un enlazador de glicerol o aminoglicerol. Como se desvela en el presente documento, la fracción lipídica es una fracción palmitoílo (C16). En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, el inhibidor de la telomerasa es Imetelstat. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, el cáncer es cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de próstata o un cáncer hematológico. Como se desvela en el presente documento, la administración del inhibidor de la telomerasa produce una reducción de la proliferación de las células cancerosas y/o del crecimiento tumoral. Como se desvela en el presente documento, la administración del inhibidor de la telomerasa produce un aumento de la supervivencia libre de progresión en el individuo. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento, el inhibidor de la telomerasa se administra con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como se desvela en el presente documento, el inhibidor de la telomerasa está formulado para la administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, tópica, intraperitoneal, intranasal, por inhalación, intratumoral o intraocular. Como se desvela en el presente documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa comprende poner en contacto una o más células cancerosas con el inhibidor de la telomerasa. Como se desvela en el presente documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa produce uno o más entre la reducción de la proliferación celular, el aumento de la apoptosis o la senescencia celular. Como se desvela en el presente documento, el uso comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales. Como se desvela en el presente documento, la longitud media de los telómeros se determina mediante qPCR, telo-FISH o transferencia de Southern. Como se desvela en el presente documento, el individuo es un ser humano. Como se desvela en el presente documento, dicho uno o más patrones conocidos son estirpes celulares caracterizadas. Como se desvela en el presente documento, las estirpes celulares se seleccionan del grupo que consiste en: células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. Como se desvela en el presente documento, las estirpes celulares caracterizadas se seleccionan a partir de estirpes celulares representativas del tipo de muestra biológica de cualquiera de las realizaciones desveladas en el presente documento. Como se desvela en el presente documento, las estirpes celulares caracterizadas son estirpes celulares de cáncer de pulmón no microcítico, estirpes celulares hepatocelulares o estirpes celulares ováricas. Como se desvela en el presente documento, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitudes de telómeros establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. Como se desvela en el presente documento, dichas células cancerosas de una pluralidad de tumores de origen natural son del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. Como se desvela en el presente documento, la longitud de los telómeros de las células cancerosas presentes en la muestra biológica está determinada en el percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10 o percentil 5, o percentil inferior del intervalo de longitudes relativas de los telómeros.

En el presente documento, se desvelan métodos de tratamiento de un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer, comprendiendo el método: administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la telomerasa al individuo cuando se haya determinado que la longitud relativa media de los telómeros de las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o inferior de un intervalo de longitudes relativas de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos. En algunas divulgaciones del presente documento, el inhibidor de la telomerasa comprende un oligonucleótido. En algunas

divulgaciones del presente documento, el oligonucleótido es complementario al componente de ARN de la telomerasa. En algunas divulgaciones del presente documento, El oligonucleótido es de 10-20 pares de bases de longitud. En algunas divulgaciones del presente documento, el oligonucleótido comprende la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3). En algunas divulgaciones del presente documento, el oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleosídico de tiofosforamidato N3'→ P5'. En algunas divulgaciones del presente documento, el oligonucleótido comprende enlaces internucleosídicos de tiofosforamidato N3'→ P5'. En algunas divulgaciones del presente documento, el oligonucleótido comprende una fracción lipídica unida al extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido. En algunas divulgaciones del presente documento, la fracción lipídica está unida al extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido a través de un enlazador. En algunas divulgaciones del presente documento, el enlazador es un enlazador de glicerol o aminoglicerol. En algunas divulgaciones del presente documento, la fracción lipídica es una fracción palmitoílo (C16). En algunas divulgaciones del presente documento, el inhibidor de la telomerasa es Imetelstat. En algunas divulgaciones del presente documento, el cáncer es cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de próstata o un cáncer hematológico. En algunas divulgaciones del presente documento, la administración del inhibidor de la telomerasa produce una reducción de la proliferación de las células cancerosas y/o del crecimiento tumoral. En algunas divulgaciones del presente documento, la administración del inhibidor de la telomerasa produce un aumento de la supervivencia libre de progresión en el individuo. En algunas divulgaciones del presente documento, el inhibidor de la telomerasa se administra con un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas divulgaciones del presente documento, el inhibidor de la telomerasa está formulado para la administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, tópica, intraperitoneal, intranasal, por inhalación, intratumoral o intraocular. En algunas divulgaciones del presente documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa comprende poner en contacto una o más células cancerosas con el inhibidor de la telomerasa. En algunas divulgaciones del presente documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa produce uno o más entre la reducción de la proliferación celular, el aumento de la apoptosis o la senescencia celular. En algunas divulgaciones del presente documento, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales. En algunas divulgaciones del presente documento, la longitud media de los telómeros se determina mediante qPCR, telo-FISH o transferencia de Southern. En algunas divulgaciones del presente documento, el individuo es un ser humano. En algunas divulgaciones del presente documento, dicho uno o más patrones conocidos son estirpes celulares caracterizadas. En algunas divulgaciones del presente documento, las estirpes celulares se seleccionan del grupo que consiste en: células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. En algunas divulgaciones del presente documento, las estirpes celulares caracterizadas se seleccionan a partir de estirpes celulares representativas del tipo de muestra biológica de cualquiera de las divulgaciones descritas en el presente documento. En algunas divulgaciones del presente documento, las estirpes celulares caracterizadas son estirpes celulares de cáncer de pulmón no microcítico, estirpes celulares hepatocelulares o estirpes celulares ováricas. En algunas divulgaciones del presente documento, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitudes de telómeros establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. En algunas divulgaciones del presente documento, dichas células cancerosas de una pluralidad de tumores de origen natural son del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. En algunas divulgaciones del presente documento, la longitud de los telómeros de las células cancerosas presentes en la muestra biológica está determinada en el percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10, percentil 5, o percentil inferior del intervalo de longitudes de los telómeros.

Descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra el análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) del subgrupo de telómeros cortos (percentil 33) del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico (CPN) de Imetelstat (CP14B-012) basado en la longitud media de los telómeros determinada usando PCR cuantitativa (qPCR) como se muestra en el Ejemplo 2.

La Figura 1B muestra el análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) del subgrupo de telómeros de longitud media (superior al 67 % de la longitud relativa de los telómeros) del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico (CPN) de Imetelstat (CP14B-012) basado en la longitud media de los telómeros determinada usando PCR cuantitativa (qPCR) como se muestra en el Ejemplo 2.

La Figura 2 muestra el análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) de los datos de los 15 pacientes del grupo tratado con Imetelstat del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico (CPN) de Imetelstat (CP14B-012) que tiene el percentil 25 más corto de las longitudes relativas de los telómeros. El análisis de las longitudes de los telómeros individuales de estos pacientes se realizó usando la hibridación *in situ* fluorescente de telómeros (Telo-FISH).

La Figura 3A representa la longitud del fragmento de restricción terminal (TRF) en estirpes de células tumorales embebidas en parafina y fijadas con formalina (EPFF) humanas M14Mel, OVCAR-8, A549, SK-Mel-5, MDA-MB-231, MDA-MB435, OVCAR-5, A498 y CAKI-1, según lo determinado mediante transferencia de Southern.

La Figura 3B representa las proporciones de T/S medias en estirpes de células tumorales embebidas en parafina y fijadas con formalina (EPFF) humanas M14MeI, OVCAR-8, A549, SK-Mel-5, MDA-MB-231, MDA-MB435, OVCAR-5, A498 y Caki-las determinadas mediante PCR cuantitativa (qPCR).

5 La Figura 4A representa la longitud del fragmento de restricción terminal (TRF) en estirpes de células tumorales embebidas en parafina y fijadas con formalina (EPFF) humanas M14MeI, OVCAR-8, A549, SK-Mel-5, MDA-MB-231, MDA-MB435, OVCAR-5, A498 y CAKI-1, según lo determinado mediante transferencia de Southern.

10 La Figura 4B representa los resultados de la Telo-FISH para las estirpes celulares humanas M14MeI, A549, SK-Mel-5 y OVCAR-5 (OV5).

15 La Figura 5 muestra los cocientes de riesgo (CR) de supervivencia libre de progresión (SSP) para pacientes del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico (CPN) de Imetelstat (CP14B-012) representados frente a los percentiles de longitud de los telómeros de los pacientes, en la que la longitud relativa de los telómeros se determinó mediante PCR cuantitativa (qPCR).

20 La Figura 6 muestra los cocientes de riesgo (CR) de supervivencia libre de progresión (SSP) para pacientes del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico (CPN) de Imetelstat (CP14B-012) representados frente a los percentiles de longitud de los telómeros de los pacientes, en la que la longitud relativa de los telómeros se determinó mediante la hibridación *in situ* fluorescente de telómeros (Telo-FISH).

25 La Figura 7 muestra el análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) para los 114 pacientes del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico de Imetelstat (CP14B-012) basado en las longitudes relativas de los telómeros determinadas mediante un ensayo prospectivo de hibridación *in situ* fluorescente de telómeros (Telo-FISH).

30 La Figura 8A muestra el análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) del subgrupo de telómeros cortos (N = 20) del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico de Imetelstat (CP14B-012) basado en las longitudes relativas de los telómeros determinadas usando el ensayo prospectivo de Telo-FISH.

La Figura 8B muestra el análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) del subgrupo de telómeros de longitud media (N = 39) del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico de Imetelstat (CP14B-012) basado en las longitudes relativas de los telómeros determinadas usando el ensayo prospectivo de Telo-FISH.

35 La Figura 9 muestra el análisis de supervivencia global (SG) para todos los pacientes (N = 114) del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico (CPN) de Imetelstat (CP14B-012) basado en las longitudes relativas de los telómeros determinadas usando un ensayo prospectivo de Telo-FISH.

40 La Figura 10A muestra el análisis de supervivencia global (SG) del subgrupo de telómeros cortos (N = 20) del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico de Imetelstat (CP14B-012) basado en las longitudes relativas de los telómeros determinadas usando un ensayo prospectivo de Telo-FISH.

45 La Figura 10B muestra el análisis de supervivencia global (SG) del subgrupo de telómeros de longitud media (N = 39) del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico de Imetelstat (CP14B-012) basado en las longitudes relativas de los telómeros determinadas usando un ensayo prospectivo de Telo-FISH.

50 La Figura 11A muestra el análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) del subgrupo de telómeros cortos (percentil 33) del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico (CPN) de Imetelstat (CP14B-012) basado en la longitud media de los telómeros determinada usando PCR cuantitativa (qPCR) como se muestra en el Ejemplo 4.

55 La Figura 11B muestra el análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) del subgrupo de telómeros de longitud media (superior al 67 % de la longitud relativa de los telómeros) del estudio de fase II del cáncer de pulmón no microcítico (CPN) de Imetelstat (CP14B-012) basado en la longitud media de los telómeros determinada usando PCR cuantitativa (qPCR) como se muestra en el Ejemplo 4.

Descripción detallada de la invención

60 La presente invención proporciona, entre otras cosas, métodos para identificar individuos sospechosos de tener o que han sido diagnosticado de un trastorno de proliferación celular que también se beneficiarán del tratamiento con un compuesto inhibidor de la telomerasa, así como usos de los inhibidores de la telomerasa para el tratamiento de estos individuos. La longitud de los telómeros de las células cancerosas puede variar de un tumor a otro. Los inventores han observado que las células cancerosas con longitudes de telómeros más cortas son más sensibles al tratamiento con compuestos inhibidores de la telomerasa (por ejemplo, Imetelstat) que las células cancerosas que tienen longitudes más largas de los telómeros. Por consiguiente, en el presente documento, se proporcionan métodos para seleccionar un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer que se beneficiará del

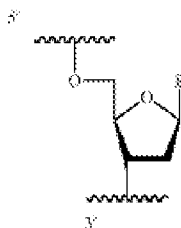
tratamiento con un inhibidor de la telomerasa. También se proporcionan en el presente documento usos de inhibidores de la telomerasa para tratar a un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer, cuando se determine que la longitud relativa media de los telómeros de las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o inferior de un intervalo de longitudes relativas de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos.

I. Técnicas generales

La práctica de la invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales en el campo de la Química de los ácidos nucleicos, Biología molecular, Microbiología, Biología celular, Bioquímica e Inmunología, que son bien conocidas por los expertos en la materia. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tales como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989) y "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", tercera edición (Sambrook y Russel, 2001), (conjuntamente denominado en este documento "Sambrook"); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel *et al.*, ed., 1987, incluyendo los suplementos hasta 2001); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, eds., 1994). Los ácidos nucleicos pueden sintetizarse *in vitro* mediante técnicas de síntesis química bien conocidas, tal como se describe en, por ejemplo, Carruthers (1982) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 47:411-418; Adams (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105:661; Belousov (1997) *Nucleic Acids Res.* 5 25:3440-3444; Frenkel (1995) *Free Radic. Biol. Med.* 19:373-380; Blommers (1994) *Biochemistry* 33:7886-7896; Narang (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90; Brown (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109; Beaucage (1981) *Tetra. Lett.* 22:1859; Komberg y Baker, "DNA Replication", 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992); Scheit, "Nucleotide Analogs" (John Wiley, Nueva York, 1980); Uhlmann y Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584, 1990.

II. Definiciones

El término "nucleósido" se refiere a una fracción que tiene la estructura general representada a continuación, e la que B representa una nucleobase y el átomo de carbono 2' puede sustituirse como se describe a continuación. Cuando se incorpora a un oligómero o a un polímero, El átomo de carbono 3' se une además a un átomo de oxígeno o de nitrógeno.



Esta estructura incluye las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo (es decir, desoxirribosa y ribosa) y análogos. De forma menos común, se puede sustituir un grupo 5'-NH con el 5'-oxígeno. "Análogos", en referencia a los nucleósidos, incluye nucleósidos sintéticos que tienen fracciones de nucleobase modificadas (véase la definición de "nucleobase" a continuación) y/o fracciones de azúcar modificadas, tales como los 2'-flúor-azúcares, y otros análogos. Dichos análogos normalmente están diseñados para afectar a las propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad, la especificidad o similares. El término nucleósido incluye los nucleósidos naturales, incluyendo las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Komberg y Baker, "DNA Replication", 2ª Ed. (Freeman, San Francisco, 1992), y análogos. "Análogos", en referencia a los nucleósidos, incluye nucleósidos sintéticos que tienen fracciones de nucleobase modificadas (véase la definición de "nucleobase" a continuación) y/o fracciones de azúcar modificadas, por ejemplo, como se describe en general en Scheit, "Nucleotide Analogs" (John Wiley, Nueva York, 1980). Dichos análogos incluyen nucleósidos sintéticos diseñados para mejorar las propiedades de unión, por ejemplo, la estabilidad, la especificidad o similares, como se describe en Uhlmann y Peyman, *Chemical Reviews* 90:543-584, 1990). Un oligonucleótido que contiene dichos nucleósidos, y que normalmente contiene enlaces internucleosídicos sintéticos resistentes a la nucleasa, se puede denominar "análogo".

Un "polinucleótido" u "oligonucleótido" se refiere a un polímero u oligómero de subunidades de nucleósidos de ribosa y/o desoxirribosa que tienen entre aproximadamente 2 y aproximadamente 200 subunidades contiguas. Las subunidades de nucleósidos pueden unirse por una variedad de enlaces intersubunitarios, incluyendo, aunque no de forma limitativa, fosfodiéster, fosfotriéster, metilfosfonato, fosforamidato P3'→N5', fosforamidato N3'→P5', tiofosforamidato N3→P5' y enlaces fosforotioato. El término también incluye dichos polímeros u oligómeros que tienen modificaciones, conocidas por los expertos en la materia, en el azúcar (por ejemplo, sustituciones en 2'), la base (véase la definición de "nucleósido", anterior) y los extremos 3' y 5'. En realizaciones en las que la fracción de oligonucleótido incluye una pluralidad de enlaces intersubunitarios, cada enlace puede formarse usando la misma química, o se puede usar una mezcla de agentes químicos de enlace. Cuando un oligonucleótido está representado por una secuencia de letras, tal como "ATGUCCTG", se entenderá que los nucleótidos están 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 un tipo en particular de subunidad internucleosídica en el oligonucleótido.

Una "nucleobase" incluye (i) nucleobases de ADN y ARN nativo (uracilo, timina, adenina, guanina y citosina); (ii) nucleobases modificadas o análogos de nucleobases (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.

5 El término "lípidos" se usa 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 glicéridos), esteroides, esteroides y formas derivadas de estos compuestos. En algunas realizaciones, los lípidos son ácidos grasos y sus derivados, hidrocarburos y sus
10 derivados, y esteroides, tales como colesterol. Los ácidos grasos, por lo general, contienen números pares de átomos de carbono en una cadena lineal (comúnmente de 12 a 24 átomos de carbono) y pueden estar saturados o insaturados, y pueden contener, o ser modificados para contener, una variedad de grupos sustituyentes. Por simplicidad, la expresión "ácido graso" también abarca los derivados de ácidos grasos, tales como ésteres grasos. En algunas realizaciones, el término "lípidos" también incluye compuestos anfipáticos que contienen tanto fracciones
15 lipídicas como fracciones hidrófilas.

Como se usa en el presente documento, "ácidos nucleicos teloméricos" significa una secuencia de ácido nucleico de un ácido nucleico bicatenario o monocatenario que codifica la secuencia telomérica del mamífero. En los seres humanos, la secuencia de repetición telomérica es TTAGGG en una cadena y CCCTAA en la otra cadena.

20 Un "inhibidor de la telomerasa" es un compuesto que es capaz de reducir o inhibir la actividad de la enzima transcriptasa inversa telomerasa en una célula de mamífero. Dicho inhibidor puede ser un compuesto de molécula pequeña, tal como se describe en el presente documento, o un inhibidor del molde de hTR que incluye un oligonucleótido, tal como se describe en el presente documento. En un aspecto, el inhibidor de la telomerasa es Imetelstat.
25

Un "inhibidor del molde de hTR" es un compuesto que bloquea la región molde (la región que abarca los nucleótidos 30-67 de SEQ ID NO: 1 en el presente documento) del componente de ARN de la telomerasa humana, inhibiendo así la actividad de la enzima. El inhibidor es normalmente un oligonucleótido que puede hibridarse con esta región. En algunas realizaciones, el oligonucleótido incluye una secuencia eficaz para hibridarse con una parte más
30 específica de esta región, que tiene la secuencia 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID NO: 2), que abarca los nucleótidos 46-56 de SEQ ID NO: 1 en el presente documento.

35 Se dice que un compuesto "inhibe la proliferación de células" si la proliferación de las células en presencia del compuesto es menor que la que se observa en ausencia del compuesto. Es decir, la proliferación de las células se ralentiza o se detiene en presencia del compuesto. La inhibición de la proliferación de las células cancerosas se puede evidenciar, por ejemplo, mediante la reducción del número de células o de la velocidad de expansión de las células, la reducción de la masa tumoral o de la velocidad de crecimiento del tumor, o el aumento de la velocidad de supervivencia de un sujeto que está siendo tratado.
40

Un oligonucleótido que tiene "enlaces resistentes a la nucleasa" se refiere a uno cuya cadena principal tiene enlaces subunitarios que son esencialmente resistentes a la escisión por nucleasa, en forma no hibridada o hibridada, por nucleasas extracelulares e intracelulares comunes en el organismo; es decir, el oligonucleótido muestra una escisión
45 escasa o nula por las nucleasas en condiciones normales para las nucleasas en el organismo al que se expone el oligonucleótido. Los enlaces fosforamidato N3' → P5' (NP) o tiofosforamidato N3' → P5' (NPS) descritos a continuación son resistentes a las nucleasas.

Un "individuo" puede ser un mamífero, tal como cualquier organismo modelo de laboratorio común. Los mamíferos incluyen, aunque no de forma limitativa, seres humanos y primates no humanos, animales de granja, animales para el deporte, mascotas, ratones, ratas y otros roedores. En algunas realizaciones, un individuo es un ser humano.
50

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" (y las variaciones gramaticales del mismo, tales como "tratar" o "tratando") se refiere a la intervención clínica designada para alterar el curso natural del individuo o de la célula que se esté tratando en el transcurso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, aunque no de forma limitativa, disminuir la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o paliación de la patología y
55 remisión o pronóstico mejorado.

Como se usa en el presente documento, "prevención" incluye proporcionar profilaxis con respecto a la aparición o recurrencia de una enfermedad o los síntomas asociados con una enfermedad en un individuo. Un individuo puede estar predispuesto a, ser susceptible a o estar en riesgo de desarrollar una enfermedad, pero que aún no haya sido diagnosticado de la enfermedad.
60

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de compuesto terapéutico, tal como inhibidor de la telomerasa, administrada a un sujeto mamífero, ya sea como una sola dosis o como parte de una serie de dosis, que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado.
65

Una "muestra biológica" es una muestra de tejido, sangre, líquido linfático o fluido cerebral obtenida del individuo. La muestra biológica puede ser una muestra obtenida durante la eliminación de un crecimiento canceroso del individuo. La muestra biológica podría incluir tejido recién extraído o tejido embebido en parafina y fijado con formalina o tejido congelado.

5 Como se usa en el presente documento, la forma en singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural, a menos que se indique lo contrario.

10 Se entiende que los aspectos y las realizaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

15 Se pretende que cada limitación numérica máxima dada a lo largo de la presente memoria descriptiva incluya cualquier limitación numérica inferior, como si dichas limitaciones numéricas inferiores estuvieran expresamente escritas en el presente documento. Cada limitación numérica mínima dada a lo largo de la presente memoria descriptiva incluirá cada limitación numérica superior, como si dichas limitaciones numéricas superiores estuvieran expresamente escritas en el presente documento. Cada intervalo numérico dado a lo largo de la presente memoria descriptiva incluirá cada intervalo numérico más limitado que pertenezca a dicho intervalo numérico más amplio, como si dichos intervalos numéricos más limitados estuvieran expresamente escritos en el presente documento.

20 III. *Compuestos inhibidores de la telomerasa*

25 La telomerasa es una ribonucleoproteína que cataliza la adición de secuencias de repetición teloméricas (que tienen la secuencia 5'-TTAGGG-3' en seres humanos) a los extremos del cromosoma. Véase, por ejemplo, Blackburn, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61:113-129. La enzima se expresa en la mayoría de las células cancerosas, pero no en las células somáticas maduras. La pérdida de ADN telomérico puede desempeñar un papel en el desencadenamiento de la senescencia celular; véase Harley, 1991, "Mutation Research" 256:271-282. Se ha demostrado que unas variedades de células cancerosas son positivas en telomerasa, incluyendo células de cáncer de piel, tejido conjuntivo, tejido adiposo, mama, pulmón, estómago, páncreas, ovario, cuello del útero, útero, riñón, vejiga, colon, próstata, sistema nervioso central (SNC), retina y tumores hematológicos (tales como mieloma, leucemia y linfoma). La dirección de la telomerasa puede ser eficaz para proporcionar tratamientos que diferencien entre células malignas y normales en un alto grado, evitando muchos de los efectos secundarios perjudiciales que pueden acompañar a los regímenes quimioterapéuticos que se dirigen indiscriminadamente a las células en división.

35 Los inhibidores de la telomerasa identificados hasta la fecha incluyen oligonucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos que tienen enlaces resistentes a las nucleasas), así como compuestos de moléculas pequeñas. Se puede encontrar más información con respecto a los compuestos inhibidores de la telomerasa en la patente de EE.UU. n.º 7.998.938.

A. Compuestos de moléculas pequeñas

40 Los inhibidores de molécula pequeña de la telomerasa incluyen, por ejemplo, BRACO19 ((9-(4-(*N,N*-dimetilamino)fenilamino)-3,6-bis(3-pirrolodino-propionamido)acridina (véase *Mol. Pharmacol.* 61(5):1154-62, 2002); DODC (dietiloxadicarbocianina) y telomestatina. Estos compuestos pueden actuar como estabilizadores G-quad, que potencian la formación de una configuración G-quad inactiva en el componente de ARN de la telomerasa. Otros inhibidores de molécula pequeña de la telomerasa 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 (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.695.932 y 6.368.789), y ciertos derivados de tiopiridinas, benzo[*b*]tiofeno y pirido[*b*]tiofeno, descritos por Gaeta *et al.* en las patentes de EE.UU. n.º 5.767.278, 5.770.613, 5.863.936, 5.656.638 y 5.760.062. Otro ejemplo es el 3-clorobenzo[*b*]tiofeno-2-carboxi-2'-[(2,5-diclorofenilamino)tia]hidrazina, descrito en la patente de EE.UU. n.º 5.760.062.

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

55 Se han clonado y secuenciado los genes que codifican tanto el componente proteico como el componente de ARN de la telomerasa humana (véase la patente de EE.UU. n.º 6.261.836 y 5.583.016, respectivamente). Se pueden dirigir oligonucleótidos contra el ARNm que codifica el componente proteico de la telomerasa (cuya forma humana se conoce como transcriptasa inversa de la telomerasa humana, o hTERT) o el componente de ARN de la holoenzima telomerasa (cuya forma humana se conoce como ARN de la telomerasa humana o hTR).

60 La secuencia de nucleótidos del componente de ARN de la telomerasa humana (hTR) se muestra en la lista de secuencias que figura a continuación (SEQ ID NO: 1), en el sentido 5' → 3'. La secuencia se muestra usando las abreviaturas convencionales para los ribonucleótidos; los expertos en la materia reconocerán que la secuencia también representa la secuencia del ADNc, en la que los ribonucleótidos se reemplazan por desoxirribonucleótidos, siendo la uridina (U) reemplazada por timidina (T). La secuencia molde del componente de ARN se encuentra dentro de la región definida por los nucleótidos 46-56 (5'-CUAACCCUAAC-3') (SEQ ID NO:2), que es complementaria a una secuencia telomérica compuesta de unidades de repetición teloméricas de aproximadamente uno y dos tercios.

La región molde funciona para especificar 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 (véase, por ejemplo, Chen *et al.*, *Cell* 100: 503-514, 2000; Kim *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 98 (14):7982-7987, 2001). El diseño de agentes antisentido, ribozima o ARN de interferencia pequeño (ARNip) para inhibir o causar la destrucción de los ARNm es bien conocido (véase, por ejemplo, Lebedeva, I, *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): 7745-7751, septiembre de 1999 y Zeng, Y. *et al., PNAS* Vol. 100 (17) pág. 9779-9784, 19 de agosto de 2003) y dichos agentes pueden diseñarse para dirigirse al ARNm de hTERT e inhibir así la producción de proteína hTERT en una célula diana, tal como una célula cancerosa (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 6.444.650 y 6.331.399).

Los oligonucleótidos dirigidos a hTR (es decir, el componente de ARN de la enzima) actúan como inhibidores de la actividad de la enzima telomerasa mediante el bloqueo o la interferencia de otro modo con la interacción de hTR con la proteína hTERT, cuya interacción es necesaria para la función de la telomerasa (véase, por ejemplo, Villeponteau *et al.*, patente de EE.UU. n.º 6.548.298).

Una región diana preferida de hTR es la región molde, que abarca los nucleótidos 30-67 de SEQ ID NO: 1 (GGGUUGCGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGCCAUUUUUUGUCUAACCCUAACUGAGAAGGGCGUA G GCGCCGUGCUUUUGCUCCCCGCGCGUGUUUUUCUCGCGUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUG CCGCCUUCACCGUUAUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCUGCGGCCCGUUCGCCUCCCCGGGGACCU GCGCGGGGUCGCCUGCCAGCCCGCCGACCCCGCCUGGAGCCGCGGGUCUCUGGGGCGAGGGCGAGGUUCACC ACCCACUGCCACCGCGAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUGGGGCGAGGGCGAGGUUCACC GUUUCAGGCCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCCGCGCGGAUUCUCCUGAGCUGUGGGACGUGC ACCCAGGACUCGGCUCACACAUGCAGUUCGCUUUCUGUUGGUGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCCGU CACCCUCGCGCGCAGUGGGGGCUUGUGAACCCCAAACCCUGACUGACUGGGCCAGUGUGCU). Los oligonucleótidos que se dirigen a esta región se denominan en el presente documento "inhibidores del molde de hTR" (véase, por ejemplo, Herbert *et al.*, *Oncogene* 21 (4):638-42 (2002).) Preferentemente, dicho oligonucleótido incluye una secuencia que es complementaria o casi complementaria a alguna parte de la región de 11 nucleótidos que tiene la secuencia 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID NO: 2), que abarca los nucleótidos 46-56 de SEQ ID NO: 1.

Otra región diana preferida es la región que abarca los nucleótidos 137-179 de hTR (véase 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 PCT WO 98/28442 describe el uso de oligonucleótidos de al menos 7 nucleótidos de longitud para inhibir la telomerasa, en la que los oligonucleótidos están diseñados para ser complementarios a partes accesibles de la secuencia de hTR fuera de la región molde, incluyendo los nucleótidos 137-196, 290-319 y 350-380 de hTR.

La región del oligonucleótido terapéutico que se dirige a la secuencia de hTR es preferentemente exactamente complementaria a la secuencia de hTR correspondiente. Si bien, en ciertos casos, se pueden tolerar desajustes, se espera que disminuyan la especificidad y la actividad del conjugado de oligonucleótido resultante. En realizaciones particulares, la secuencia de bases del oligonucleótido se selecciona, por tanto, para que incluya una secuencia de al menos 5 nucleótidos exactamente complementarios a la diana de hTR, y se puede obtener una mejor inhibición de la telomerasa si se emplean longitudes crecientes 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 complementaria a la diana de hTR. 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 complementaria a la secuencia de la diana de hTR.

Se puede obtener una actividad inhibidora óptima de la telomerasa cuando se selecciona la longitud completa del oligonucleótido para que sea complementario a la secuencia de la diana de hTR. Sin embargo, no es necesario que la longitud completa del oligonucleótido sea exactamente complementaria a la secuencia diana, y la secuencia de oligonucleótido puede incluir regiones que no sean 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 múltiples repeticiones de una secuencia complementaria a una secuencia de la diana de hTR.

Si el oligonucleótido va a incluir regiones que no son complementarias a la secuencia diana, dichas regiones normalmente están situadas en uno o ambos de los extremos 5' o 3'. Las secuencias ilustrativas que se dirigen al ARN de la telomerasa humana (hTR) incluyen las siguientes:

Los enlaces internucleósido del oligonucleótido pueden incluir cualquiera de las químicas de oligonucleótidos disponibles, por ejemplo, fosfodiéster, fosfotriéster, metilfosfonato, fosforamidato P3'→N5', fosforamidato N3'→P5', tiofosforamidato N3'→P5' y fosfortioato. Por lo general, pero no necesariamente, todos los enlaces internucleosídicos de dentro del oligonucleótido serán del mismo tipo, aunque el componente de oligonucleótido puede sintetizarse usando una mezcla de enlaces diferentes.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos un enlace fosforamidato N3'→ P5' (NP) o tiofosforamidato N3'→ P5' (NPS), enlace que puede estar representado por la estructura: 3'-(-NH-P(=O)(-XR)-O)-5', en la que X es O o S y R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y arilo; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, cuando XR es OH o SH. En otras realizaciones, el oligonucleótido incluye todos los enlaces NP o, en algunas realizaciones, todos los enlaces NPS.

En una realización, la secuencia de un oligonucleótido inhibidor del molde de hTR es la secuencia complementaria a los nucleótidos 42-54 de SEQ ID NO: 1 anterior. El oligonucleótido que tiene esta secuencia (TAGGGTTAGACAA; SEQ ID NO: 3) y los enlaces tiofosforamidato N3'→P5' (NPS) se designa en el presente documento GRN163. Véase, por ejemplo, Asai *et al.*, *Cancer Research* 63:3931-3939 (2003) y Gryaznov *et al.*, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22(5-8):577-81 (2003).

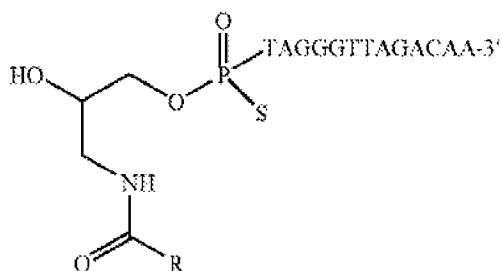
El oligonucleótido GRN163 administrado solo ha mostrado actividad inhibidora *in vitro* en cultivo celular, incluyendo células cancerosas de carcinoma epidermoide, de epitelio de mama, de carcinoma renal, de adenocarcinoma renal, pancreático, de cerebro, de colon, de próstata, leucemia, linfoma, mieloma,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

También se ha ensayado el oligonucleótido GRN163, y ha demostrado ser terapéuticamente eficaz en una variedad de modelos animales de tumores, incluyendo de ovario y de pulmón, tanto microcíticos como no microcíticos (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. n.º 7.998.

C. Conjugados de lípido-oligonucleótido

En algunos aspectos, los inhibidores de la telomerasa basados en oligonucleótidos desvelados en el presente documento incluyen al menos un grupo lipídico enlazado covalentemente (véase la publicación de EE.UU. n.º 2005/0113325). Esta modificación proporciona propiedades de absorción celular superiores, de modo que se puede obtener un efecto biológico equivalente usando cantidades menores del oligonucleótido conjugado en comparación con la forma no modificada. Cuando se aplica al entorno terapéutico humano, esto puede traducirse en una reducción de los riesgos de toxicidad y en un ahorro de costes.

El grupo lipídico L normalmente es un hidrocarburo alifático o un ácido graso, incluyendo los derivados de hidrocarburos y ácidos grasos, siendo ejemplos los compuestos de cadena lineal saturada que tienen de 14 a 20 átomos de carbono, tales como ácido mirístico (tetradecanoico), ácido palmítico (hexadecanoico) y ácido esteárico (octadecanoico), y sus correspondientes formas de hidrocarburos alifáticos, tetradecano, hexadecano y octadecano. Los ejemplos de otros grupos lipídicos adecuados que pueden emplearse son esteroides, tales como colesterol, y ácidos grasos e hidrocarburos sustituidos, en particular, formas polifluoradas de estos grupos. El alcance del grupo lipídico L incluye derivados tales como derivados de amina, amida, éster y carbamato. El tipo de derivado suele estar determinado por el modo de enlace con el oligonucleótido, como se ilustra a continuación.



En una estructura ilustrativa, la fracción lipídica es palmitoil-amida (derivado de ácido palmítico), conjugada a través de un enlazador de aminoglicerol al grupo 5' tiofosfato de un oligonucleótido enlazado a NPS. El oligonucleótido NPS que tiene la secuencia mostrada para GRN163 y conjugado de esta manera (como se muestra a continuación) se designa GRN163L (Imetelstat) en el presente documento. En una segunda estructura ilustrativa, el lípido, como una palmitoil-amida, se conjuga a través del grupo amino 3'-terminal de un oligonucleótido NPS.

D. Composiciones farmacéuticas

En algunos aspectos de la presente invención, cuando se emplean como productos farmacéuticos, los compuestos inhibidores de la telomerasa desvelados en el presente documento se pueden formular con un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para formularse en una composición farmacéutica.

Cuando se emplean como productos farmacéuticos, los compuestos inhibidores de la telomerasa se pueden administrar en forma de composiciones farmacéuticas. Estos compuestos se pueden administrar mediante una variedad de vías, incluyendo oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular e intranasal. Estos compuestos son eficaces como composiciones tanto inyectables como orales. Dichas composiciones se preparan de

una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo. Cuando se emplean como composiciones orales, los compuestos inhibidores de la telomerasa desvelados en el presente documento se protegen de la digestión ácida en el estómago mediante un protector farmacéuticamente aceptable.

5 La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como principio activo, Un compuesto inhibidor de la telomerasa asociado con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. En la preparación de las composiciones de la presente invención, el principio activo normalmente se mezcla con un excipiente o vehículo, se diluye con un excipiente o vehículo, o se encierra dentro de dicho excipiente o vehículo que puede estar en forma de cápsula, sobrecito, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente o vehículo
10 sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como vehículo, portador o medio para el principio activo. Por lo tanto, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobrecitos, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (en forma de un sólido o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta el 10 % en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles.

15 En la preparación de una formulación, puede ser necesario moler el compuesto activo liofilizado para proporcionar el tamaño de partículas apropiado, antes de la combinación con los demás ingredientes. Si el compuesto activo es sustancialmente insoluble, se puede moler normalmente hasta un tamaño de partícula de malla de menos de 200. Si el compuesto activo es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de partícula se ajusta normalmente por molienda para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo, malla de aproximadamente 40.

25 Algunos ejemplos de excipientes o vehículos adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato cálcico, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe, y metil celulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes de lubricación tales como talco, estearato de magnesio, y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes, tales como metil y propilhidroxi-benzoatos; agentes edulcorantes; y agentes saporíferos. Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración al paciente empleando
30 procedimientos conocidos en la técnica.

Las composiciones pueden formularse en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosis de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 100 mg, tal como cualquiera de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg, de 1 mg a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg,
35 de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 30 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 40 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 70 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 80 mg o de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 90 mg, ambos inclusive, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores, del principio activo. La expresión "formas de dosificación unitarias" se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosis unitarias para individuos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente o vehículo farmacéutico adecuado.

45 Los compuestos inhibidores de la telomerasa son eficaces en un amplio intervalo de dosis y, en general, se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz. Se entenderá, sin embargo, que la cantidad de los compuestos inhibidores de la telomerasa realmente administrada será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias pertinentes, incluyendo la afección a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares.

50 Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal compuesto inhibidor de la telomerasa se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición sólida de preformulación que contenga una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, significa que el principio activo se dispersa uniformemente a través de la composición de manera que la composición pueda subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitarias igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas.

60 Los comprimidos o las píldoras de la presente invención pueden recubrirse o componerse de otra manera para proporcionar una forma farmacéutica que proporcione la ventaja de una acción prolongada y para proteger los compuestos inhibidores de la telomerasa de la hidrólisis ácida en el estómago. Por ejemplo, el comprimido o la píldora puede comprender un componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo, estando esta última en forma de una envoltura sobre la primera. Los dos componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interior pase intacto al duodeno o se retrase en su liberación. Pueden usarse una diversidad de materiales para tales capas entéricas o recubrimientos, incluyendo dichos materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con dichos materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

65

Las formas líquidas en las que pueden incorporarse las nuevas composiciones de la presente invención para la administración oral o por inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes aromatizados adecuadamente, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco, o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se ha descrito anteriormente. Las composiciones se pueden administrar por la vía respiratoria oral o nasal para efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables pueden nebulizarse mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas se pueden inhalar directamente desde el dispositivo de nebulización o el dispositivo de nebulización se puede unir a una máscara facial, o una máquina de respiración de presión positiva en tienda o intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o polvo también pueden administrarse, por vía oral o nasal, desde dispositivos que administren la formulación de una manera apropiada.

IV. Métodos de la invención

En algunos aspectos, en el presente documento, se proporcionan métodos para seleccionar un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa. Estos métodos se basan en la determinación de la longitud relativa media de los telómeros en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo. Si se determina que la longitud media de los telómeros de las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o inferior de un intervalo de longitudes relativas de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos, entonces, el individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa (tal como cualquiera de los inhibidores de la telomerasa que se proporcionan en el presente documento). En otros aspectos, los compuestos inhibidores de la telomerasa desvelados en el presente documento se pueden usar para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno de proliferación celular (tal como el cáncer) cuando se determina que la longitud relativa media de los telómeros en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o un percentil menor de un intervalo de longitudes relativas de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos.

A. Trastornos de proliferación celular

Un "trastorno proliferativo" es cualquier trastorno celular en el que las células proliferan más rápidamente que el crecimiento normal del tejido. Por lo tanto, una "célula en proliferación" es una célula que prolifera más rápidamente que las células normales. El trastorno proliferativo incluye, pero sin limitación, neoplasias. Una "neoplasia" es un crecimiento anómalo de tejido, que, en general, forma una masa distinta que crece mediante proliferación celular más rápidamente que el crecimiento normal de tejido. Las neoplasias muestran una falta parcial o total de organización estructural y de coordinación funcional con el tejido normal. Se pueden clasificar ampliamente en tres tipos principales. Las neoplasias malignas derivadas de estructuras epiteliales se denominan carcinomas, las neoplasias malignas que se originan en los tejidos conjuntivos tales como el músculo, el cartílago, la grasa o el hueso se denominan sarcomas, y los tumores malignos que afectan a las estructuras hematopoyéticas (estructuras relacionadas con la formación de células sanguíneas) incluyendo los componentes del sistema inmunitario, se denominan leucemias y linfomas. Un tumor es el crecimiento neoplásico de la enfermedad del cáncer. Como se usa en el presente documento, una neoplasia, también denominada "tumor", pretende englobar tanto las neoplasias hematopoyéticas como las neoplasias sólidas. Otros trastornos proliferativos incluyen, aunque no de forma limitativa, la neurofibromatosis.

Los compuestos inhibidores de la telomerasa (tales como en composiciones) proporcionados en el presente documento son útiles para modular los estados patológicos asociados con la desregulación de la longitud de los telómeros. En algunas realizaciones, el trastorno de proliferación celular está asociado con una mayor expresión o actividad de la telomerasa o el crecimiento celular, o ambos. En algunas realizaciones, la proliferación celular es cáncer.

Los métodos descritos en el presente documento son útiles para tratar tumores sólidos (tales como tumores sólidos avanzados). En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar el cáncer de pulmón, incluyendo, por ejemplo, el cáncer de pulmón no microcítico (CPNM, tal como CPNM avanzado), el cáncer de pulmón microcítico (CPM, tal como CPM avanzado) y tumor maligno sólido avanzado en el pulmón. En algunas realizaciones, se proporciona un método de tratamiento del cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, neoplasias gástricas tales como cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal tal como cáncer gastrointestinal superior, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vejiga, glioblastoma, sarcomas tales como osteosarcoma, sarcoma de Ewing y meningiosarcoma, melanoma (incluyendo melanoma metastásico y melanoma maligno), cáncer colorrectal y cáncer pancreático.

En algunas realizaciones, la enfermedad es un cáncer de entre uno cualquiera de los siguientes: carcinoma de células basales, meduloblastoma, glioblastoma, cáncer pancreático, cáncer de pulmón (cáncer de pulmón

microcítico y cáncer de pulmón no microcítico), cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer biliar, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer de vesícula biliar, cáncer de ovario y cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma ductal del páncreas, adenocarcinoma de colon y cistoadenocarcinoma de ovario. En algunas realizaciones, el cáncer es un adenocarcinoma ductal del páncreas. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor que está mal perfundido y/o poco vascularizado.

En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer pancreático, incluyendo, por ejemplo, adenocarcinoma de páncreas, carcinoma adenoescamoso de páncreas, carcinoma de células escamosas de páncreas y carcinoma de células gigantes de páncreas. En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas es cáncer de páncreas exocrino. En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas es cáncer pancreático endocrino (tal como carcinoma de células de los islotes). En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas es un cáncer de páncreas metastásico avanzado.

Otros ejemplos de cánceres que se pueden tratar mediante los métodos de la invención incluyen, aunque no de forma limitativa, carcinoma adenocortical, metaplasia mioide agnogénica, cánceres relacionados con el SIDA (linfoma relacionado con el SIDA), cáncer de ano, cáncer del apéndice, astrocitoma (por ejemplo, cerebeloso y cerebral), carcinoma de células basales, cáncer de las vías biliares (por ejemplo, extrahepático), cáncer de vejiga, cáncer de huesos, (osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno), tumor cerebral (por ejemplo, glioma, glioma del tronco encefálico, astrocitoma cerebeloso o cerebral (por ejemplo, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico (maligno)), glioma maligno, ependimoma, oligodenglioma, meningioma, meningiosarcoma, craneofaringioma, hemangioblastomas, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma de la vía óptica e hipotalámico, y glioblastoma), cáncer de mama, adenomas bronquiales/carcinoides, tumor carcinoide (por ejemplo, tumor carcinoide gastrointestinal), carcinoma de sitio primario desconocido, linfoma del sistema nervioso central, cáncer de cuello uterino, cáncer de colon, cáncer colorrectal, trastornos crónicos mieloproliferativos, cáncer de endometrio (por ejemplo, cáncer uterino), ependimoma, cáncer de esófago, familia de tumores de Ewing, cáncer ocular (por ejemplo, melanoma intraocular y retinoblastoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (TEGI), tumor de células germinales, (por ejemplo, extracraneal, extragonadal, ovárico), tumor trofoblástico gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado) (por ejemplo, carcinoma hepático y heptoma), cáncer hipofaríngeo, carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino), cáncer de laringe, cáncer de laringe, leucemia, cáncer de labios y de la cavidad oral, cáncer oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón), meduloblastoma, cáncer de ovarios, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico, cáncer de boca, síndrome múltiple de neoplasia endocrina, cáncer de la cavidad nasal y del seno paranasal, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer neuroendocrino, cáncer orofaríngeo, cáncer de ovario (por ejemplo, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales ováricas, tumor ovárico de bajo potencial maligno), cáncer pancreático, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer de peritoneo, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de la pituitaria, blastoma pleuropulmonar, (microglioma), linfangiomomatosis pulmonar, cáncer rectal, cáncer renal, cáncer de pelvis renal y uréter (cáncer de células transicionales), rhabdomyosarcoma, cáncer de las glándulas salivales, cáncer de piel (por ejemplo, carcinoma de células escamosas), melanoma y carcinoma de células de Merkel), cáncer del intestino delgado, cáncer de células escamosas, cáncer de testículos, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, esclerosis tuberosa, cáncer de la uretra, cáncer de vagina, cáncer de vulva, tumor de Wilms y trastorno linfoproliferativo postrasplante (PTLD) y sistema de Meigs.

El cáncer es un tumor sólido (tal como tumor sólido avanzado). Los tumores sólidos incluyen, pero sin limitación, sarcomas y carcinomas como el fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos, sacronomasinovioma uterino, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, meningiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de las glándulas sudoríparas, carcinoma de las glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales (incluyendo, por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de células renales de células claras, carcinoma de células renales papilares, carcinoma de células renales cromóforo, carcinoma de células renales del conducto colector, carcinoma de células renales granulares, carcinoma de células renales granulares mixtas, angiomiolipomas renales o carcinoma de células renales del huso), hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

B. Métodos para seleccionar individuos que se beneficiarán del tratamiento con inhibidores de la telomerasa

En el presente documento, se proporcionan métodos para seleccionar un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa. La longitud de los telómeros se

determina analizando la longitud de los nucleótidos teloméricos en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo. Por "beneficio" se entiende que hay una diferencia positiva o beneficiosa en la gravedad o la aparición de al menos una puntuación clínica o biológica (tal como, aunque no de forma limitativa, la supervivencia libre de progresión), valor o medida usados para evaluar dichos individuos en aquellos que han sido tratados con los compuestos inhibidores de la telomerasa de la presente invención en comparación con aquellos que no han sido tratados.

1. Obtención de muestras biológicas

Las muestras biológicas de los individuos diagnosticados o sospechosos de tener un trastorno de proliferación celular (tal como el cáncer) pueden obtenerse de varias maneras. Por ejemplo, se puede obtener una muestra biológica de un tumor sólido, que puede ser un tumor accesible por vía subcutánea o de cualquier otro tipo de tumor sólido canceroso accesible para biopsia o extirpación quirúrgica. La muestra biológica se puede obtener mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye, aunque no de forma limitativa, biopsia con aguja o núcleo, o aspiración con aguja fina. Además, la muestra biológica puede fijarse, embeberse en parafina, ser recién extraída o congelarse antes de determinarse la longitud de los telómeros. En algunas realizaciones, la muestra biológica se fija en formalina y luego se embebe en parafina. En algunas realizaciones, el individuo tiene o se sospecha que tiene un cáncer transmitido por la sangre (es decir, un cáncer hematológico, tal como, aunque no de forma limitativa, leucemia, linfoma, etc.). En este caso, se puede obtener una muestra biológica de la sangre del individuo.

2. Medición de la longitud de los telómeros en muestras biológicas

En la técnica, se dispone de numerosos métodos para determinar la longitud de los telómeros de las células de muestras biológicas de acuerdo con los métodos desvelados en el presente documento.

En un aspecto, la longitud de los telómeros se puede determinar mediante la medición de la longitud media de un fragmento de restricción terminal (TRF). El TRF se define como la longitud, en general, la longitud media, de los fragmentos resultantes de la digestión completa del ADN genómico con una enzima de restricción que no escinde el ácido nucleico dentro de la secuencia telomérica. Por lo general, el ADN se digiere con enzimas de restricción que se escinden con frecuencia dentro del ADN genómico, pero que no se escinden dentro de las secuencias teloméricas. Por lo general, las enzimas de restricción tienen una secuencia de reconocimiento de cuatro bases (por ejemplo, AluI, HinfI, RsaI y Sau3A1) y se usan solas o en combinación. El fragmento de restricción terminal resultante contiene tanto repeticiones teloméricas como ADN subtelomérico. Como se usa en el presente documento, el ADN subtelomérico son secuencias de ADN adyacentes a las repeticiones en tándem de las secuencias teloméricas y contienen secuencias de repetición de telómeros entremezcladas con secuencias de tipo teloméricas variables. El ADN digerido se separa por electroforesis y se transfiere a un soporte, tal como una membrana. Los fragmentos que contienen secuencias de telómeros se detectan mediante la hibridación de una sonda, es decir, secuencias de repetición marcadas, a la membrana. Tras la visualización de los fragmentos que contienen telómeros, se pueden calcular las longitudes medias de los fragmentos de restricción terminales (Harley, C. B. *et al.*, *Nature*. 345(6274):458-60 (1990)).

La estimación de los TRF por transferencia de Southern da una distribución de la longitud de los telómeros en las células o el tejido, y, por lo tanto, la longitud media de los telómeros de todas las células.

Para los diversos métodos descritos en el presente documento, se puede usar una variedad de condiciones de hibridación, incluyendo condiciones de rigurosidad alta, moderada y baja (véase, por ejemplo, Sambrook, J. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001); Ausubel, F. M. *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons (actualizaciones hasta 2002)). Las condiciones de rigurosidad dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias, incluyendo la longitud de la sonda o el cebador, el número de desapareamientos, el contenido de G/C y la fuerza iónica. Se proporciona una guía para la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, P. "Overview of Principles of Hybridization and the Strategy of Nucleic Acid Assays", en "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes", vol. 24, Elsevier Publishers, Amsterdam (1993). En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto de fusión térmico (es decir, T_f) para un híbrido específico a una temperatura definida en una condición de solución definida en la que se hibrida el 50 % de la sonda o del cebador al ácido nucleico diana en equilibrio. Dado que el grado de rigurosidad, en general, se determina por la diferencia en la temperatura de hibridación y por la T_f , se puede mantener un determinado grado de rigurosidad a pesar de los cambios en la condición de la solución de la hibridación siempre que se mantenga la diferencia de temperatura con respecto a la T_f . Las condiciones de hibridación también pueden variar con el tipo de estructura principal de ácido nucleico, por ejemplo, estructura principal de ácido ribonucleico o de ácido nucleico peptídico.

En otro aspecto, las longitudes de los telómeros pueden medirse por citometría de flujo (Hultdin, M. *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 26: 3651-3656 (1998); Rufer, N. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 16:743-747 (1998)). Los métodos de citometría de flujo son variaciones de las técnicas de FISH. Si el material de partida es tejido, se prepara una suspensión celular, en general, mediante separación mecánica y/o tratamiento con proteasas. Las células se fijan con un fijador y se hibridan con una sonda específica de secuencia de telómeros, preferentemente una sonda de PNA, marcada con un

marcador fluorescente. Después de la hibridación, las células se lavan y luego se analizan mediante FACS. Se mide la señal de fluorescencia para las células en G0/G1 tras la sustracción apropiada de la fluorescencia de fondo. Esta técnica es adecuada para la estimación rápida de la longitud de los telómeros para un gran número de muestras. Al igual que los TRF, la longitud de los telómeros es la longitud media de los telómeros dentro de la célula.

En otros aspectos, la longitud media de los telómeros de las células dentro de una muestra biológica se determina mediante PCR cuantitativa (qPCR) o hibridación *in situ* fluorescente de telómeros (telo-FISH).

a. qPCR en muestras embebidas en parafina y fijadas en formalina (EPFF)

En algunos aspectos, la longitud de los telómeros se determina usando qPCR a partir de ADN extraído de muestras biológicas embebidas en parafina y fijadas en formalina (EPFF).

En la qPCR, se une un colorante de unión al ADN a todo el ADN bicatenario causando la fluorescencia del colorante. Un aumento en el producto de ADN durante la reacción de PCR conduce a un aumento en la intensidad de la fluorescencia, y se mide en cada ciclo de la reacción de PCR. Esto permite cuantificar la concentración de ADN. La concentración relativa del ADN presente durante la fase exponencial de la reacción se determina representando el nivel de fluorescencia frente al número de ciclos de PCR en una escala semilogarítmica. Se determina un umbral para la detección de la fluorescencia sobre el fondo. El ciclo en el que la fluorescencia de la muestra atraviesa el umbral se denomina ciclo umbral (Ct). Debido a que la cantidad de ADN teóricamente se duplica en cada ciclo durante la fase exponencial, se pueden calcular las cantidades relativas de ADN. El valor basal son los ciclos iniciales de PCR, en los que hay pocos cambios en la señal de fluorescencia.

El umbral es un nivel de ΔRn que es determinado automáticamente por el software de Sistemas de Detección de Secuencias o se configura manualmente, y que se usa para la determinación del Ct en ensayos en tiempo real. El nivel se establece por encima del valor basal y lo suficientemente por debajo para que esté dentro de la región de crecimiento exponencial de la curva de amplificación. El umbral es la línea cuya intersección con la gráfica de amplificación define el Ct. El Ct es el número de ciclos fraccional en el que la fluorescencia pasó el umbral. El ciclo umbral de la muestra se determina restando el ciclo umbral de una muestra de referencia al ciclo umbral de la reacción en cadena de la polimerasa telomérica ($\Delta Ct_{muestra} = Ct_{telómero} - Ct_{referencia}$). La reacción en cadena de la polimerasa también se realiza con cebadores dirigidos a un gen de un solo número de copias como referencia para determinar el ciclo umbral para el gen de un solo número de copias. La diferencia media del número de ciclos del gen de una sola copia con respecto a la reacción en cadena de la polimerasa telomérica determinará las longitudes de los telómeros ($\Delta Ct = Ct_{telómero} - Ct_{gen\ de\ una\ sola\ copia}$).

Los ácidos nucleicos teloméricos se pueden extraer de las muestras biológicas embebidas en parafina y fijadas en formalina, usando un método de extracción suave. Por ejemplo, la muestra puede tratarse con el uso de detergentes, sonicación, electroporación, desnaturalizantes, etc. para romper las células. Los ácidos nucleicos diana pueden purificarse según sea necesario. Se ha encontrado que los métodos de extracción suave que no usan una columna para aislar los ácidos nucleicos son beneficiosos, porque estos métodos conservan los fragmentos menores de ácido nucleico en la preparación final de ácido nucleico (los fragmentos pequeños de ADN se encuentran en las muestras EPFF y pueden perderse durante la extracción de la columna). En algunas realizaciones, los métodos de extracción conservan una mayoría de los fragmentos de ácido nucleico diana teloméricos que son al menos de 50 pb, al menos 60 pb, al menos 70 pb, al menos 80 pb. En una realización, el método de extracción conserva fragmentos de ácido nucleico que son de menos de 60 pb, que son de menos de 70 pb, que son de menos de 80 pb, que son de menos de 90 pb, que son de menos de 100 pb, que son de menos de 110 pb. En una realización, el método de extracción de ADN suave no usa una columna para aislar los fragmentos de ADN. En una realización, el método de extracción de ácido nucleico es el kit de extracción de ADN de tejido EPFF BioChain.

En una realización, la muestra EPFF se puede desparafinar antes de la extracción del ADN. En otra realización, el ADN se puede extraer de la muestra EPFF sin la desparafinación previa de la muestra EPFF. En dicha realización, la parafina no se retira de la muestra EPFF. En una realización, el ácido nucleico extraído se calienta hasta al menos 88 °C, 89 °C, 90 °C, 91 °C, 92 °C, 93 °C, 94 °C, 95 °C, 96 °C, 97 °C durante al menos 1 minuto, 5 minutos, 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 60 minutos, 70 minutos, 80 minutos.

Tras la extracción del ADN, el ADN se marca con un colorante fluorescente (tal como SYBR Green I, Invitrogen, Carlsbad, CA). En algunas realizaciones, el ADN se marca con cualquiera de aproximadamente 0,04 x, 0,06 x, 0,08 x, 0,1 x, 0,15 x, 0,2 x, 0,25 x, 0,3 x, 0,35 x, 0,4 x, 0,45 x, 0,5 x, 0,55 x, 0,60 x, 0,65 x, 0,70 x, 0,75 x, 0,8 x, 0,9 x, 1,0 x o 1,1 x, ambos inclusive, incluyendo cualquier valor entre estos números, de colorante SYBR Green I. Tras el marcaje del ADN, se realiza una reacción en cadena de la polimerasa usando un ácido nucleico diana de una sola copia extraído de la muestra biológica de parafina fijada con formalina (que comprende una primera cadena y una segunda cadena esencialmente complementarias), un primer cebador del gen de una sola copia (siendo el primer cebador del gen de una sola copia capaz de (i) hibridarse con la primera cadena del ácido nucleico del gen de una sola copia diana y (ii) ser extendido por la ADN polimerasa para formar un cebador de gen de una sola copia extendido), y un segundo cebador de gen de una sola copia (siendo el segundo cebador del gen de una sola copia capaz de (i) hibridarse con el primer cebador del gen de una sola copia extendida y/o el ADN diana y (ii) ser

extendido por la ADN polimerasa), y dejando que la reacción en cadena de la polimerasa proceda en ciclos de desnaturalización y de extensión, e identificando el ciclo de replicación en el que se pasa la señal de umbral de la PCR.

5 Las secuencias de los telómeros son una reacción en cadena de la polimerasa amplificada en tres etapas. La etapa 1 se realiza en condiciones suficientes para activar la ADN polimerasa. La etapa 2 se realiza en condiciones suficientes para generar productos de PCR que actuarán como moldes para los ciclos de subsecuencias de amplificación. En una realización, el número de ciclos de la etapa 2 es de 2 a 8 ciclos, o de 3 a 6 ciclos o de 3 a 5
10 ciclos. En una realización, la temperatura para la disociación varía de 90 °C a 98 °C, o de 92 °C a 97 °C o de 94 °C a 96 °C durante un período de 10 segundos a 20 segundos. En una realización, la temperatura para la asociación varía de 45 °C a 60 °C, de 49 °C a 58 °C, de 50 °C a 55 °C durante un período de 5 segundos a 20 segundos. La etapa 3 se realiza en condiciones suficientes para amplificar los moldes. En una realización, el número de ciclos de la etapa 3 es de 20 a 40 ciclos, o de 25 a 35 ciclos. En una realización, la temperatura para la disociación varía de 90 °C a 98 °C, o de 92 °C a 97 °C o de 94 °C a 96 °C durante un período de 10 segundos a 20 segundos. En una
15 realización, la temperatura para la asociación varía de 45 °C a 70 °C, de 49 °C a 68 °C, de 50 °C a 60 °C durante un período de 5 segundos a 20 segundos.

En una realización, la qPCR de amplificación del gen de una sola copia se realiza en una placa diferente y en diferentes condiciones en comparación con la qPCR de amplificación de los telómeros que se realizó en una
20 segunda placa. En otra realización, la qPCR de amplificación del gen de una sola copia se realiza en un primer pocillo y la qPCR de amplificación de los telómeros se realiza en un segundo pocillo en la misma placa y en las mismas condiciones. El análisis de los telómeros por qPCR se puede realizar a partir de 1, 2 o más muestras de tejido del mismo tumor del paciente.

25 En una realización, el tamaño del amplicón del gen de una sola copia en la reacción de PCR es similar al tamaño del amplicón para la reacción de PCR de los telómeros. En una realización, el amplicón de un solo gen generado mediante la extensión del primer y del segundo cebador es de aproximadamente 50 a 100 nucleótidos, de 60 a 90 nucleótidos, de 70 a 80 nucleótidos.

30 La longitud de los telómeros se determina restando el ciclo umbral de la PCR cuantitativa del gen de una sola copia al ciclo umbral de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa telomérica ($\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{gen de una sola copia}}$). La diferencia media del número de ciclos del gen de una sola copia con respecto a la reacción en cadena de la polimerasa telomérica determinará las longitudes de los telómeros ($\Delta Ct = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{gen de una sola copia}}$). La longitud de los telómeros se determina para un individuo y se correlaciona con la longitud de los telómeros observada en una
35 población de individuos o en un individuo de referencia. En una realización, la población de individuos es de la misma edad que la del individuo sometido a ensayo. Para los seres humanos, la población de la misma edad se encuentra más/menos 10 años de la edad del individuo, o más/menos 5 años o más/menos 1 año. En otra realización, la población de individuos se compara según el tipo de células cancerosas (tal como, aunque no de forma limitativa, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, leucemia, etc.).

40 La longitud de los telómeros se expresa como el producto telomérico normalizado por un producto génico de una sola copia. En otras palabras, la longitud relativa de los telómeros de una muestra es el factor en el que la muestra experimental difiere de una muestra de ADN de referencia en su proporción del número de copias repetidas de los telómeros con respecto al número de copias de un solo gen. La cantidad de repeticiones de telómeros de cada
45 muestra experimental se mide como el nivel de dilución de una muestra de ADN de referencia escogida arbitrariamente que haría equivalentes a las muestras experimentales y de referencia con respecto al número de ciclos de PCR necesario para generar una cantidad dada de producto de PCR telomérico durante la fase exponencial de la amplificación por PCR. De manera similar, la cantidad relativa del gen de una sola copia en cada muestra experimental se expresa como el nivel de dilución de la muestra de ADN de referencia necesario para que
50 coincida con la muestra experimental con respecto al número de ciclos de PCR necesario para generar una cantidad dada de producto de PCR del gen de una sola copia durante la fase exponencial de la PCR.

En una realización, para cada muestra experimental, la proporción de los factores de dilución es la proporción relativa del telómero con respecto al gen de una sola copia (T/S). Por lo tanto, $T/S = 1$ cuando el ADN desconocido es idéntico al ADN de referencia en su proporción del número de copias de repetición de telómero con respecto al
55 número de copias únicas. La muestra de ADN de referencia (con la que se comparan todas las muestras experimentales en un estudio dado) puede ser de un solo individuo o puede ser una muestra combinada de varios individuos, o puede ser de una o más estirpes celulares que tienen telómeros de longitud conocida. La proporción de T/S de un individuo con relación a la proporción de T/S del individuo de referencia o la muestra combinada o las estirpes celulares corresponde a la longitud relativa de los telómeros del ADN del individuo. En una realización, la estirpe celular se selecciona del grupo que consiste en células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovc4r-5.
60

En otra realización, para cada muestra experimental, la proporción de los factores de dilución es el \log_2 de la proporción relativa del gen de una sola copia con respecto al telómero ($\log_2 S/T$). La muestra de ADN de referencia (con la que se comparan todas las muestras experimentales en un estudio dado) puede ser de un solo individuo o
65

puede ser una muestra combinada de varios individuos, o puede ser de una o más estirpes celulares que tienen telómeros de longitud conocida. El \log_2 de la proporción de S/T de un individuo con relación al \log_2 de la proporción de S/T del individuo de referencia o la muestra combinada o las estirpes celulares corresponde a la longitud relativa de los telómeros del ADN del individuo. En una realización, la estirpe celular se selecciona del grupo que consiste en células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovc4r-5.

La correlación de la longitud de los telómeros medida del individuo y de la población se examina mediante diversos métodos estadísticos, tales como el análisis de la supervivencia, incluyendo los modelos de regresión Cox de riesgos proporcionales, la estimación de la distribución de la supervivencia de Kaplan-Meier, la prueba de Peto Wilcoxon, el análisis de probabilidad máxima, el análisis de regresión múltiple y otros.

Los métodos de qPCR descritos en el presente documento también se pueden usar para medir la reacción de un individuo al tratamiento con un inhibidor de la telomerasa (tal como cualquiera de los inhibidores de la telomerasa desvelados en el presente documento). Se mide la velocidad a la que se acorta la longitud relativa de los telómeros en los tumores sólidos durante el tiempo de tratamiento para determinar la reacción del individuo al inhibidor de la telomerasa.

Además, se puede añadir una variedad de agentes a la reacción de PCR para facilitar la hibridación óptima, la amplificación y la detección. Estos incluyen sales, tampones, proteínas neutras, detergentes, etc. Se pueden añadir otros agentes para mejorar la eficacia de la reacción, tales como inhibidores de proteasas, inhibidores de nucleasas, agentes antimicrobianos, etc.

Se puede encontrar más información relativa a la evaluación de la longitud de los telómeros mediante qPCR en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n.º 2006/0210980, 2010/0151477 y 2011/0207128, así como en las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 2010/075413 y WO 2012/0135125.

b. Hibridación *in situ* fluorescente de telómeros (telo-FISH)

En algunos aspectos, la longitud de los telómeros se determina usando telo-FISH. En este método, las células se fijan y se hibridan con una sonda conjugada a un marcador fluorescente, por ejemplo, Cy-3, fluoresceína, rodamina, etc. Las sondas para este método son oligonucleótidos diseñados para hibridarse específicamente a secuencias de telómeros. En general, las sondas tienen una longitud de 8 o más nucleótidos, tal como una longitud de 12-20 o más nucleótidos. En un aspecto, las sondas son oligonucleótidos que comprenden nucleótidos de origen natural. En un aspecto, la sonda es un ácido nucleico peptídico, que tiene una T_f superior a la de las secuencias naturales análogas y, por lo tanto, permite el uso de condiciones de hibridación más rigurosas. Las células se pueden tratar con un agente, tal como colcemid, para inducir la detención del ciclo celular en la metafase y proporcionar cromosomas en metafase para la hibridación y el análisis. En algunas realizaciones, el ADN celular también puede teñirse con el colorante fluorescente 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI).

Se adquieren imágenes digitales de los cromosomas en metafase intactos y se cuantifica la intensidad de fluorescencia de las sondas hibridadas a los telómeros. Esto permite medir la longitud de los telómeros de los cromosomas individuales, además de la longitud media de los telómeros en una célula, y evita los problemas asociados con la presencia de ADN subtelomérico (Zijlmans, J. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 94:7423-7428 (1997); Blasco, M. A. *et al.*, *Cell* 91:25-34 (1997)). La intensidad de la señal fluorescente se correlaciona con la longitud del telómero, indicando una señal fluorescente más brillante un telómero más largo.

En algunos aspectos, se utiliza un software (tal como el IN Cell developer Toolbox 1.9, GE Corp.) para cuantificar la longitud media de los telómeros de las células obtenidas de muestras biológicas y sometidas a telo-FISH. En una realización, el software se usa para dibujar una o más estirpes alrededor de (i) los núcleos de las células, lo que se determina en función de la ubicación de la tinción con DAPI; y (ii) alrededor de los telómeros. Una vez rodeado cada núcleo y cada telómero, el software puede calcular la intensidad de cada telómero individual en las células y, por lo tanto, determinar la longitud media de los telómeros para las células derivadas de la muestra biológica. En algunas realizaciones, la longitud de los telómeros se calcula usando la ecuación:

$$1,376 \times \log_2(\text{intensidad}) - 6,215 \times \sqrt{(\text{área})} \quad [\text{Ecuación 1}]$$

en la que la "intensidad" se define como la intensidad del telómero y el "área" se define como el área del telómero definida por la línea dibujada a su alrededor.

En otra realización, para cada muestra experimental, el valor calculado usando la Ecuación 1 se normaliza con el valor calculado a partir de un único individuo o de una muestra combinada de múltiples individuos, o de una o más estirpes celulares que tienen telómeros de longitudes conocidas. El valor calculado usando la Ecuación 1 en relación con el valor calculado usando la Ecuación 1 del individuo de referencia, o de la muestra agrupada o las estirpes celulares, corresponde a la longitud relativa de los telómeros del ADN del individuo. En una realización, la estirpe celular se selecciona del grupo que consiste en células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovc4r-5.

La correlación de la longitud de los telómeros medida del individuo y de la población se examina mediante diversos métodos estadísticos, tales como el análisis de la supervivencia, Incluyendo los modelos de regresión Cox de riesgos proporcionales, la estimación de la distribución de la supervivencia de Kaplan-Meier, la prueba de Peto Wilcoxon, el análisis de probabilidad máxima, el análisis de regresión múltiple y otros.

5 3. Selección de un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa

10 En algunos aspectos, en el presente documento, se proporcionan métodos para seleccionar un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa, comprendiendo el método: determinar la longitud relativa de los telómeros mediante el análisis de la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo; y seleccionar un individuo que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa cuando se determine que la longitud relativa media de los telómeros de las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o inferior de un intervalo de longitudes relativas de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos. En algunas realizaciones, el inhibidor de la telomerasa comprende un oligonucleótido. En algunas realizaciones, el inhibidor de la telomerasa es Imetelstat. En otra realización, el cáncer es cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de próstata o un cáncer hematológico. En aún otras realizaciones, el individuo es un ser humano.

20 Se puede usar cualquier método para determinar la longitud relativa de los telómeros en el individuo, incluyendo cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En una realización, se determina la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos usando qPCR a partir de ADN extraído de muestras biológicas embebidas en parafina y fijadas con formalina (EPFF). Cuando se usa este método, la expresión "longitud relativa de los telómeros" se define como (i) la proporción relativa del telómero con respecto al gen de una sola copia (T/S); o (ii) el \log_2 de la proporción relativa del gen de una sola copia con respecto al telómero (\log_2 de S/T). En algunas realizaciones, dicho uno o más patrones conocidos son estirpes celulares caracterizadas. "Estirpes celulares caracterizadas" pretende significar que la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos de las células de las estirpes celulares es conocida y relativamente constante. Los ejemplos no limitantes de estirpes celulares caracterizadas incluyen células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. En otra realización, las estirpes celulares caracterizadas se seleccionan a partir de estirpes celulares representativas de la muestra biológica del individuo. Los ejemplos no limitantes de estas estirpes celulares pueden incluir estirpes celulares de cáncer de pulmón no microcítico, estirpes celulares hepatocelulares o estirpes celulares ováricas. En otras realizaciones más, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitudes de telómeros establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. En una realización, las células cancerosas de una pluralidad de tumores de origen natural pueden ser del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. En algunas realizaciones, la longitud de los telómeros de las células cancerosas presentes en la muestra biológica está determinada en cualquiera de entre el percentil 45, percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10, percentil 5, o percentil inferior del intervalo de longitudes de los telómeros, ambos inclusive, incluyendo cualquier percentil de entre estos números.

45 En aún otras realizaciones, la longitud relativa de ácidos nucleicos teloméricos se determina usando qPCR a partir de ADN extraído de muestras biológicas embebidas en parafina y fijadas con formalina (EPFF), y la expresión "longitud relativa de los telómeros" se define como el \log_2 de la proporción relativa del gen de una sola copia con respecto al telómero (\log_2 S/T). En algunas realizaciones, el \log_2 de la proporción de S/T es inferior a cualquiera de aproximadamente 0, -0,1, -0,2, -0,3, -0,4, -0,5, -0,6, -0,7, -0,8, -0,9, -1,0, -1,1, -1,2, -1,3, -1,4, -1,5, -1,6, -1,7, -1,8, -1,9, -2,0 o más.

50 En otra realización, la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos se determina usando telo-FISH. Cuando se usa este método, la expresión "longitud relativa de los telómeros" se define como el valor determinado usando la Ecuación 1 en los métodos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, dicho uno o más patrones conocidos son estirpes celulares caracterizadas. "Estirpes celulares caracterizadas" pretende significar que la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos de las células de las estirpes celulares es conocida y relativamente constante. Los ejemplos no limitantes de estirpes celulares caracterizadas incluyen células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. En otra realización, las estirpes celulares caracterizadas se seleccionan a partir de estirpes celulares representativas de la muestra biológica del individuo. Los ejemplos no limitantes de estas estirpes celulares pueden incluir estirpes celulares de cáncer de pulmón no microcítico, estirpes celulares hepatocelulares o estirpes celulares ováricas. En otras realizaciones más, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitudes de telómeros establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. En una realización, las células cancerosas de una pluralidad de tumores de origen natural pueden ser del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. En algunas realizaciones, la longitud de los telómeros de las células cancerosas presentes en la muestra biológica está determinada en cualquiera de entre el percentil 45, percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10, percentil 5, o percentil inferior del intervalo de longitudes de los telómeros, ambos inclusive, incluyendo cualquier percentil de entre estos números. En otras realizaciones, la longitud relativa de los telómeros determinada usando la Ecuación 1 en los métodos descritos anteriormente es inferior a cualquiera de aproximadamente 0, -0,1, -

0,2, -0,3, -0,4, -0,5, -0,6, -0,7, -0,8, -0,9, -1,0, -1,5, -2,0, -2,5, -3,0, -3,5, -4,0, -4,5, -5,0, -5,5, -6,0, -6,5, -7,0, -7,5, -8,0, -8,5, -9,0, -9,5, -10,0 o más, ambos inclusive, incluyendo cualquier número entre estos valores.

C. Métodos de tratamiento de los trastornos de proliferación celular usando inhibidores de la telomerasa

5 En algunos aspectos, la presente invención se dirige a métodos para inhibir los síntomas o las afecciones (discapacidades, deficiencias) asociados a un trastorno de proliferación celular (tal como el cáncer) según lo descrito en detalle anteriormente. Como tal, no es necesario que todos los efectos de la afección se prevengan o reviertan por completo, aunque los efectos de los métodos desvelados en el presente documento probablemente se extiendan a un beneficio terapéutico significativo para el paciente. Como tal, un beneficio terapéutico no es necesariamente la prevención o cura completa de una determinada afección producida como consecuencia de un trastorno de proliferación celular (tal como el cáncer), sino que más bien, puede abarcar un resultado que incluya reducir o prevenir los síntomas producidos como consecuencia de un trastorno de proliferación celular, reducir o prevenir la aparición de dichos síntomas (bien cuantitativa o cualitativamente), reducir la gravedad de dichos síntomas o efectos fisiológicos de los mismos, y/o mejorar la recuperación del individuo tras experimentar los síntomas de un trastorno de proliferación celular.

20 Específicamente, una composición de la presente invención (tal como cualquiera de los compuestos inhibidores de la telomerasa desvelados en el presente documento), cuando se administra a un individuo, puede tratar o prevenir uno o más de los síntomas o afecciones asociados con un trastorno de proliferación celular (tal como el cáncer) y/o reducir o aliviar los síntomas o afecciones asociados con este trastorno. Como tal, la protección de un individuo de los efectos o síntomas producidos como consecuencia de un trastorno de proliferación celular (tal como el cáncer) incluye prevenir o reducir la aparición y/o la gravedad de los efectos del trastorno y tratar a un paciente en el que los efectos del trastorno ya se están produciendo o están comenzando a producirse. Un experto en la materia y/o un médico capacitado que esté tratando al paciente puede evaluar fácilmente un efecto beneficioso. Preferentemente, hay una diferencia positiva o beneficiosa en la gravedad o la aparición de al menos una puntuación clínica o biológica, un valor o una medida usados para evaluar dichos pacientes en aquellos que han sido tratados con los métodos de la presente invención en comparación con aquellos que no lo han sido.

30 Los métodos se pueden poner en práctica en un entorno adyuvante. El "entorno adyuvante" se refiere a un entorno clínico en el que un individuo ha tenido antecedentes de una enfermedad proliferativa, en particular, cáncer, y en general (pero no necesariamente), ha respondido al tratamiento, que incluye, pero sin limitación, cirugía (tal como resección quirúrgica), radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, debido a sus antecedentes de enfermedad proliferativa (tal como cáncer), estos individuos se consideran en riesgo de desarrollo de la enfermedad. El tratamiento o la administración en el "entorno adyuvante" se refiere a un modo de tratamiento posterior. El grado de riesgo (es decir, cuando un individuo en el entorno adyuvante se considera como de "alto riesgo" o "bajo riesgo") depende de varios factores, lo más normalmente, del grado de la enfermedad cuando se trata por primera vez.

40 Los métodos proporcionados en el presente documento también se pueden poner en práctica en un "entorno neoadyuvante", es decir, el método puede llevarse a cabo antes de la terapia primaria/definitiva. En algunas realizaciones, el individuo ha sido tratado previamente. En algunas realizaciones, el individuo no ha sido tratado previamente. En algunas realizaciones, el tratamiento es una terapia de primera línea.

45 Por consiguiente, en algunos aspectos, en el presente documento, se proporcionan métodos de tratamiento de un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer, comprendiendo el método: determinar la longitud relativa de los telómeros mediante el análisis de la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo; seleccionar un individuo que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa cuando se determine que la longitud relativa media de los telómeros de las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o inferior de un intervalo de longitudes relativas de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos; y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa al individuo. En algunas realizaciones, el inhibidor de la telomerasa comprende un oligonucleótido. En algunas realizaciones, el inhibidor de la telomerasa es imetelstat. En otra realización, el cáncer es cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de próstata o un cáncer hematológico. En aún otras realizaciones, el individuo es un ser humano.

55 En otros aspectos, en el presente documento, se proporcionan métodos de tratamiento de un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer, comprendiendo el método: administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la telomerasa al individuo cuando se haya determinado que la longitud relativa media de los telómeros de las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o inferior de un intervalo de longitudes relativas de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos. En algunas realizaciones, el inhibidor de la telomerasa es imetelstat. En otra realización, el cáncer es cáncer de pulmón microcítico, cáncer de mama, cáncer de próstata o un cáncer hematológico. En aún otras realizaciones, el individuo es un ser humano.

65 Se puede usar cualquier método para determinar la longitud relativa de los telómeros en el individuo, incluyendo cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En una realización, se determina la longitud relativa

de los ácidos nucleicos teloméricos usando qPCR a partir de ADN extraído de muestras biológicas embebidas en parafina y fijadas con formalina (EPFF). Cuando se usa este método, la expresión "longitud relativa de los telómeros" se define como (i) la proporción relativa del telómero con respecto al gen de una sola copia (T/S); o (ii) el \log_2 de la proporción relativa del gen de una sola copia con respecto al telómero (\log_2 de S/T). En algunas realizaciones, dicho uno o más patrones conocidos son estirpes celulares caracterizadas. "Estirpes celulares caracterizadas" pretende significar que la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos de las células de las estirpes celulares es conocida y relativamente constante. Los ejemplos no limitantes de estirpes celulares caracterizadas incluyen células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. En otra realización, las estirpes celulares caracterizadas se seleccionan a partir de estirpes celulares representativas de la muestra biológica del individuo. Los ejemplos no limitantes de estas estirpes celulares pueden incluir estirpes celulares de cáncer de pulmón no microcítico, estirpes celulares hepatocelulares o estirpes celulares ováricas. En otras realizaciones más, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitudes de telómeros establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. En una realización, las células cancerosas de una pluralidad de tumores de origen natural pueden ser del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. En algunas realizaciones, la longitud de los telómeros de las células cancerosas presentes en la muestra biológica está determinada en cualquiera de entre el percentil 45, percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10, percentil 5, o percentil inferior del intervalo de longitudes de los telómeros, ambos inclusive, incluyendo cualquier percentil de entre estos números.

En otra realización, la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos se determina usando telo-FISH. Cuando se usa este método, la expresión "longitud relativa de los telómeros" se define como el valor determinado usando la Ecuación 1 en los métodos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, dicho uno o más patrones conocidos son estirpes celulares caracterizadas. Los ejemplos no limitantes de estirpes celulares caracterizadas incluyen células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. En otra realización, las estirpes celulares caracterizadas se seleccionan a partir de estirpes celulares representativas de la muestra biológica del individuo. Los ejemplos no limitantes de estas estirpes celulares pueden incluir estirpes celulares de cáncer de pulmón no microcítico, estirpes celulares hepatocelulares o estirpes celulares ováricas. En otras realizaciones más, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitudes de telómeros establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. En una realización, las células cancerosas de una pluralidad de tumores de origen natural pueden ser del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. En algunas realizaciones, la longitud de los telómeros de las células cancerosas presentes en la muestra biológica está determinada en cualquiera de entre el percentil 45, percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10, percentil 5, o percentil inferior del intervalo de longitudes de los telómeros, ambos inclusive, incluyendo cualquier percentil de entre estos números.

D. Administración de los inhibidores de la telomerasa

En algunas realizaciones, el inhibidor de la telomerasa (tal como cualquiera de los compuestos inhibidores de la telomerasa desvelados en el presente documento) se administra en forma de una inyección. La inyección puede comprender el compuesto en combinación con un excipiente o vehículo inyectable acuoso. Los ejemplos no limitantes de excipientes o vehículos inyectables acuosos adecuados son bien conocidos por los expertos en la materia, y estos, y los métodos de formulación de las formulaciones, se pueden encontrar en referencias convencionales tales como Alfonso A. R.: "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17^a ed., Mack Publishing Company, Easton Pa., 1985. Los excipientes o vehículos inyectables acuosos adecuados incluyen agua, solución salina acuosa, solución de dextrosa acuosa y similares, que contienen, opcionalmente, potenciadores de la disolución tales como manitol al 10 % u otros azúcares, glicina al 10 % u otros aminoácidos. La composición puede inyectarse por vía subcutánea, intraperitoneal o intravenosa.

En algunas realizaciones, se usa la administración intravenosa, y puede ser la infusión intravenosa continua durante un período de unos cuantos minutos a una hora o más, tal como aproximadamente quince minutos. La cantidad administrada puede variar ampliamente dependiendo del tipo de inhibidor de la telomerasa, del tamaño de una dosis unitaria, del tipo de excipientes o vehículos, y de otros factores bien conocidos por los expertos en la materia. El inhibidor de la telomerasa puede comprender, por ejemplo, del aproximadamente 0,001 % al aproximadamente 10 % (p/p), del aproximadamente 0,01 % al aproximadamente 1 %, del aproximadamente 0,1 % al aproximadamente 0,8 %, o cualquier intervalo de los mismos, comprendiendo el resto el/los excipiente/s o vehículo/s.

Para la administración oral, el inhibidor de la telomerasa puede adoptar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparados mediante medios convencionales con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes; cargas; lubricantes; disgregantes; o agentes humectantes. Los preparados líquidos para la administración oral pueden adoptar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para su constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Dichos preparados líquidos se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendras, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo,

p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Los preparados también pueden contener sales tampón, agentes aromatizantes y colorantes, según proceda.

En algunas realizaciones, el inhibidor de la telomerasa se puede administrar por inhalación a través de un pulverizador de aerosol o un nebulizador que puede incluir un propulsor adecuado tal como, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono o una combinación de los mismos. En un ejemplo no limitante, se puede administrar una unidad de dosis para un aerosol presurizado a través de una válvula dosificadora. En otra realización, se pueden usar cápsulas y cartuchos de gelatina, por ejemplo, en un inhalador, y pueden formularse para contener una mezcla en polvo del compuesto con una base en polvo adecuada tal como, por ejemplo, almidón o lactosa.

En algunas realizaciones, la cantidad de inhibidor de la telomerasa en la composición (tal como una composición farmacéutica) está incluida en cualquiera de los siguientes intervalos: de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mg, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg, de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg, de aproximadamente 50 a aproximadamente 75 mg, de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 75 a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 100 a aproximadamente 125 mg, de aproximadamente 125 a aproximadamente 150 mg, de aproximadamente 150 a aproximadamente 175 mg, de aproximadamente 175 a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 200 a aproximadamente 225 mg, de aproximadamente 225 a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 250 a aproximadamente 300 mg, de aproximadamente 300 a aproximadamente 350 mg, de aproximadamente 350 a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 400 a aproximadamente 450 mg o de aproximadamente 450 a aproximadamente 500 mg. En algunas realizaciones, la cantidad de un inhibidor de la telomerasa en la cantidad eficaz de la composición farmacéutica (por ejemplo, una forma de dosificación unitaria) está en el intervalo de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 500 mg, tal como de aproximadamente 30 mg a aproximadamente 300 mg o de aproximadamente 50 mg a aproximadamente 200 mg. En algunas realizaciones, la concentración del inhibidor de la telomerasa en la composición farmacéutica está diluida (aproximadamente 0,1 mg/ml) o concentrada (aproximadamente 100 mg/ml), incluyendo, por ejemplo, cualquiera de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 20 mg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/ml, de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 8 mg/ml, de aproximadamente 4 a aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml. En algunas realizaciones, la concentración del inhibidor de la telomerasa es de al menos aproximadamente cualquiera de 0,5 mg/ml, 1,3 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml o 50 mg/ml.

Las cantidades eficaces ilustrativas de un inhibidor de la telomerasa en la composición farmacéutica incluyen, aunque no de forma limitativa, al menos aproximadamente cualquiera de 25 mg/m², 30 mg/m², 50 mg/m², 60 mg/m², 75 mg/m², 80 mg/m², 90 mg/m², 100 mg/m², 120 mg/m², 125 mg/m², 150 mg/m², 160 mg/m², 175 mg/m², 180 mg/m², 200 mg/m², 210 mg/m², 220 mg/m², 250 mg/m², 260 mg/m², 300 mg/m², 350 mg/m², 400 mg/m², 500 mg/m², 540 mg/m², 750 mg/m², 1.000 mg/m², o 1.080 mg/m². En diversas realizaciones, la composición farmacéutica incluye menos de aproximadamente cualquiera de 350 mg/m², 300 mg/m², 250 mg/m², 200 mg/m², 150 mg/m², 120 mg/m², 100 mg/m², 90 mg/m², 50 mg/m², o 30 mg/m² de un inhibidor de la telomerasa. En algunas realizaciones, la cantidad del inhibidor de la telomerasa por administración es inferior a aproximadamente cualquiera de 25 mg/m², 22 mg/m², 20 mg/m², 18 mg/m², 15 mg/m², 14 mg/m², 13 mg/m², 12 mg/m², 11 mg/m², 10 mg/m², 9 mg/m², 8 mg/m², 7 mg/m², 6 mg/m², 5 mg/m², 4 mg/m², 3 mg/m², 2 mg/m², o 1 mg/m². En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de un inhibidor de la telomerasa en la composición farmacéutica está incluida en cualquiera de los siguientes intervalos: de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/m², de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg/m², de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 mg/m², de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg/m², de aproximadamente 50 a aproximadamente 75 mg/m², de aproximadamente 75 a aproximadamente 100 mg/m², de aproximadamente 100 a aproximadamente 125 mg/m², de aproximadamente 125 a aproximadamente 150 mg/m², de aproximadamente 150 a aproximadamente 175 mg/m², de aproximadamente 175 a aproximadamente 200 mg/m², de aproximadamente 200 a aproximadamente 225 mg/m², de aproximadamente 225 a aproximadamente 250 mg/m², de aproximadamente 250 a aproximadamente 300 mg/m², de aproximadamente 300 a aproximadamente 350 mg/m², o de aproximadamente 350 a aproximadamente 400 mg/m². En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de un inhibidor de la telomerasa en la composición farmacéutica es de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mg/m², tal como de aproximadamente 20 a aproximadamente 300 mg/m², de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 mg/m², de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 mg/m², aproximadamente 120 mg/m², aproximadamente 130 mg/m², o aproximadamente 140 mg/m², o aproximadamente 260 mg/m².

En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, la cantidad eficaz de un inhibidor de la telomerasa en la composición farmacéutica incluye al menos aproximadamente cualquiera de 1 mg/kg, 2,5 mg/kg, 3,5 mg/kg, 5 mg/kg, 6,5 mg/kg, 7,5 mg/kg, 9,4 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg o 20 mg/kg. En diversas realizaciones, la cantidad eficaz de un inhibidor de la telomerasa en la composición farmacéutica incluye menos de aproximadamente cualquiera de 350 mg/kg, 300 mg/kg, 250 mg/kg, 200 mg/kg, 150 mg/kg, 100 mg/kg, 50 mg/kg, 30 mg/kg, 25 mg/kg, 20 mg/kg, 10 mg/kg, 9,4 mg/kg, 7,5 mg/kg, 6,5 mg/kg, 5 mg/kg, 3,5 mg/kg, 2,5 mg/kg o 1 mg/kg de un inhibidor de la telomerasa.

Las frecuencias de dosificación ilustrativas para las composiciones farmacéuticas (tales como una composición farmacéutica que contiene cualquiera de los inhibidores de la telomerasa desvelados en el presente documento) incluyen, aunque no de forma limitativa, diaria; en días alternos; dos veces a la semana; tres veces a la semana; semanalmente sin interrupción; semanalmente, tres de cada cuatro semanas; una vez cada tres semanas; una vez cada dos semanas; semanalmente, dos de cada tres semanas. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra aproximadamente una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, una vez cada 6 semanas o una vez cada 8 semanas. En algunas realizaciones, la composición se administra al menos aproximadamente cualquiera de x 1, x 2, x 3, x 4, x 5, x 6 o x 7 (es decir, diariamente) una semana, o tres veces al día, dos veces al día. En algunas realizaciones, los intervalos entre cada administración son inferiores a aproximadamente 6 meses, 3 meses, 1 mes, 20 días, 15 días, 12 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día. En algunas realizaciones, los intervalos entre cada administración son de más de aproximadamente 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 8 meses o 12 meses. En algunas realizaciones, no hay interrupción en el programa de dosificación. En algunas realizaciones, el intervalo entre cada administración no es superior a aproximadamente una semana.

La administración de la composición farmacéutica puede prolongarse durante un período de tiempo prolongado, tal como de aproximadamente un mes hasta aproximadamente siete años. En algunas realizaciones, la composición se administra durante un período de al menos aproximadamente cualquiera de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72 o 84 meses.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación y conjugación con el lípido de los oligonucleótidos fosforamidato N3'→ P5' (NP) o tiofosforamidato N3'→ P5' (NPS)

Este ejemplo muestra cómo sintetizar los oligonucleótidos fosforamidato N3'→ P5' (NP) o tiofosforamidato N3'→ P5' (NPS) conjugados a lípido.

Materiales y métodos

Compuestos de partida

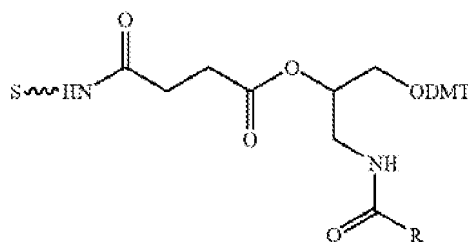
Estos compuestos se pueden preparar según lo descrito, por ejemplo, en McCurdy *et al.*, *Tetrahedron Letters* 38: 207-210 (1997) o Pongracz y Gryaznov, *Tetrahedron Letters* 49: 7661-7664 (1999). Los monómeros de 3'-amino-nucleósidos de partida pueden prepararse como se describe en Nelson *et al.*,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

Unión a lípidos

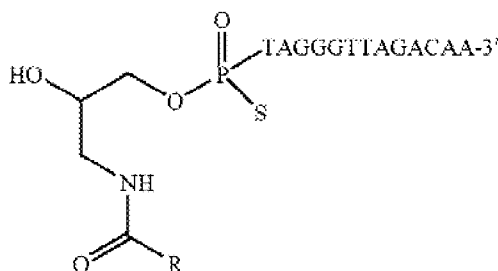
Se puede usar una variedad de enfoques sintéticos para conjugar una fracción lipídica L al oligonucleótido, dependiendo de la naturaleza del enlace seleccionado; véase, por ejemplo, Mishra *et al.*, *Biochim. et Biophys. Acta* 1264: 229-237 (1995), Shea *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 18: 3777-3783 (1995), o Rump *et al.*, *Bioconj. Chem.* 9: 341-349 (1995). Por lo general, la conjugación se realiza mediante el uso de un grupo funcional adecuado 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 ácidos, anhídridos y ésteres activos, usando catalizadores de acoplamiento adecuados, para formar un enlace de amida. Los grupos tiol también son adecuados como grupos funcionales (véase Kupihar *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.* 9: 1241-1247 (2001)). Hay diversos modificadores funcionalizados con amino y tiol de diferentes longitudes de cadena disponibles en el mercado para la síntesis de oligonucleótidos.

Los enfoques específicos para la unión de grupos de lípidos a un extremo de un oligonucleótido NP o NPS incluyen los descritos en la publicación de solicitud de EE.UU. n.º 2005/0113325. Además de los enlaces de amida indicados anteriormente, por ejemplo, los lípidos también pueden unirse a la cadena de oligonucleótido usando un derivado de fosforamidita del lípido, para producir un enlace de fosforamidato o tiofosforamidato que conecte el lípido y el oligonucleótido. El 3'-amino libre del oligonucleótido unido al soporte totalmente protegido también puede hacerse reaccionar con un aldehído lipídico adecuado, seguido de la reducción con cianoborohidruro de sodio, que produce un enlace de amina.

Para la fijación de un lípido a extremo 5', como también se describe en la publicación de solicitud de EE.UU. n.º 2005/0113325, el oligonucleótido puede sintetizarse usando un soporte sólido que contiene lípido modificado. La reacción del 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 producto intermedio que luego se acopla, a través del grupo succinilcarboxilo libre, al soporte sólido. A continuación, se muestra un ejemplo de un soporte modificado, en el que S- representa un soporte de CPG de alquilamina de cadena larga, y R representa un lípido.



5 A este procedimiento, le sigue la síntesis del oligonucleótido en el sentido 5' a 3', tal como se describe, por ejemplo, en Pongracz y Gryaznov (1999), comenzando con la desprotección y la fosforilación del grupo -ODMT. Esto es efectivo para producir, por ejemplo, la siguiente estructura, tras la escisión del soporte sólido:



10 La estructura anterior, cuando -R es $-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ (palmitoilo), se designa en el presente documento GRN163L (Imetelstat).

Ensayo FlashPlate™

15 Este ensayo se llevó a cabo esencialmente como se describe en Asai *et al.*, *Cancer Research* 63: 3931-3939 (2003). En resumen, el ensayo detecta y/o mide la actividad de la telomerasa midiendo la adición de repeticiones teloméricas de TTAGGG a un cebador de sustrato de telomerasa biotinilado. Los productos biotinilados se capturan en placas de microtitulación recubiertas con estreptavidina, y se usa una sonda de oligonucleótido complementaria a 3,5 repeticiones de telómeros, marcada con ^{33}P , para medir los productos de telomerasa. La sonda no unida se elimina mediante lavado, y la cantidad de la sonda que se hibrida a los productos de telomerasa capturados se determina mediante recuento por centelleo.

Ejemplo 2: qPCR en muestras embebidas en parafina y fijadas con formalina del estudio de fase II de CPN de Imetelstat (CP14B-012)

25 Este ejemplo demuestra el rendimiento de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para determinar la longitud relativa de los telómeros de muestras de tejido del estudio de fase II de CPN EPFF (CP14B-012).

Materiales y métodos

30 Diseño del ensayo clínico

35 El fin del estudio de fase II de CPN (CP14B-012) era evaluar la eficacia y la seguridad de imetelstat (GRN163L) como terapia de mantenimiento en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico en fase avanzada que no habían progresado tras 4 ciclos de tratamiento a base de platino. Los participantes se asignaron al azar en una proporción de 2:1 a Imetelstat más el tratamiento convencional frente al tratamiento convencional solo. Los participantes que recibían bevacizumab con su quimioterapia de inducción continuaron recibiendo bevacizumab en este estudio.

40 Las medidas de resultado primarias fueron la supervivencia libre de progresión, definida como el tiempo desde la aleatorización hasta la progresión de la enfermedad o la muerte documentada, lo que ocurra antes, según lo determinado por la evaluación del investigador de acuerdo con los RECIST (criterios de evaluación de respuesta en tumores sólidos). Las medidas de resultado secundarias fueron la respuesta objetiva, el tiempo hasta la mortalidad por todas las causas, y la seguridad y la tolerabilidad (evaluadas por la incidencia, la naturaleza y la gravedad de los hechos adversos, anomalías de laboratorio y constantes vitales).

45 Los pacientes fueron divididos en dos grupos. En el grupo experimental, los pacientes recibieron Imetelstat más el tratamiento convencional (Bevacizumab u observación). Específicamente, se administraron 9,4 mg/kg de Imetelstat (GRN163L) a los pacientes durante una infusión intravenosa de 2 horas el día 1 y el día 8 de cada ciclo de 21 días hasta la progresión de la enfermedad. Si se administró, Bevacizumab se administró el día 1 de cada ciclo de 21 días, con la dosis y la duración de acuerdo con el prospecto de Bevacizumab aprobado por la FDA.

En el grupo de control, los pacientes recibieron Bevacizumab u observación. Si se administró, Bevacizumab se administró el día 1 de cada ciclo de 21 días, con la dosis y la duración de acuerdo con el prospecto de Bevacizumab aprobado por la FDA.

5 Se obtuvieron muestras de 61 de los 116 pacientes incluidos en el estudio de fase II de CPN (CP14B-012), y de éstos, 57 arrojaron los resultados del ensayo evaluables usados para el análisis de supervivencia libre de progresión (SLP).

10 Se prepararon muestras embebidas en parafina y fijadas con formalina usando el kit HistoGel (n.º de catálogo R904012):

15 Richard Allen Scientific, una filial de ThermoFisher, Kalamazoo, MI). Las células se cultivaron hasta el 80-90 % de confluencia. En primer lugar, se mezclaron suavemente los sedimentos celulares (10^6 /sedimento) en 200-500 μ l de HistoGel fundido a 50 ± 5 °C, luego se enfriaron en hielo para solidificarse. Tras la solidificación, se centrifugaron las muestras rápidamente para eliminar el líquido residual. Se añadieron diez ml de formalina al 4 % a los sedimentos gelificados y se fijaron los sedimentos celulares durante 48 horas a temperatura ambiente. A continuación, se embebieron los sedimentos celulares fijos usando una técnica de histología convencional en el Laboratorio Histo-Tec en Hayward, CA, y luego se congelaron a -80 °C.

20 Extracción de ADN

El ADN genómico de las muestras del estudio de fase II del CPNM fue aislado de muestras EPFF procesadas usando el kit de extracción de ADN EPFF fabricado por BioChain (BioChain Institute, n.º de catálogo K5019100, Hayward, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tejido se mezcló en 170 μ l de tampón del kit y 25 30 μ l de proteinasa K. La mezcla se incubó a 56 °C durante una hora, luego, se aumentó la temperatura hasta 90 °C durante 60 minutos y después a 98 °C durante 2 minutos, y se dispuso sobre hielo durante 2 minutos. Se centrifugó la mezcla a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se obtuvo el sobrenadante. Se determinó la concentración de ADN mediante el kit de ensayo de ADNbc Quant-iT Pico Green (Invitrogen, n.º de catálogo P7589, Carlsbad, CA). Se ajustó la concentración de ADN del sobrenadante a 0,1 ng/ μ l con H₂O.

30 PCR cuantitativa (qPCR)

Todas las reacciones de PCR cuantitativas se llevaron a cabo usando el Sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems, Carlsbad CA). Se realizaron dos PCR por cada muestra, una para determinar el 35 valor de los ciclos umbral (Ct) para la amplificación de los telómeros (T) y la otra para determinar el valor de Ct para la amplificación de un gen de una sola copia (fosfoproteína ribosómica ácida P, 36B4).

Las secuencias de los cebadores para la amplificación de los telómeros fueron Telg 5'-ACA CTA AGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTA GTG T (SEQ ID NO:4) y Telc 5'-TGT TAG GTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA ACA (SEQ ID NO: 5) (Cawthon, 2009); y las de 36B4u: 5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC (SEQ ID NO: 6) y 36B4d: 5'-CCC ATT CTA TCA TCA TCA ACG GGT ACA A (SEQ ID NO: 7) (Cawthon, 2002).

45 Cada reacción de PCR para la amplificación de los telómeros se realizó usando 1 ng/10 μ l de muestra (0,1 ng/ μ l) y una mezcla de PCR de 40 μ l que contenía 1,25 U de ADN Taq polimerasa Hotstart (BioChain), colorante fluorescente 6-ROX 150 nM, 0,04 x tinte de ácido nucleico SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad CA), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,2 mM de cada trifosfato desoxinucleósido (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), ditiotreitól 5 mM, dimetilsulfóxido al 1 % y Tris-HCl 15 mM a pH 8,0 y el par de cebadores Telg y Telc (ambos a 900 nM). La concentración de cebador superior se prefiere para el ADN telomérico cuando se usa ADN EPFF, porque las 50 concentraciones altas de cebadores permiten múltiples sitios de hibridación.

Las secuencias de los telómeros se amplificaron en tres etapas. Etapa 1: 95 °C durante 10 minutos para activar la ADN Taq polimerasa Hotstart (BioChain); etapa 2: 5 ciclos de 15 s a 95 °C, 10 s a 50 °C para generar productos de PCR que actuarán como moldes para los posteriores ciclos de amplificación. La temperatura de hibridación de la 55 etapa 2 podría variar entre 49 °C y 58 °C. Etapa 3: 25 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C con adquisición de señal a 60 °C. El tiempo total de ejecución fue de 70 minutos.

La amplificación del gen 36B4 de una sola copia se realizó usando la mezcla maestra de PCR Power SYBR Green (Applied Biosystems) de la siguiente manera: diez minutos a 95 °C para activar la ADN polimerasa en la mezcla maestra (Applied Biosystems), seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 minuto a 58 °C con adquisición de señal a 60 58 °C. La amplificación de 36B4 se realizó usando 1 ng/10 μ l de muestras (0,1 ng/ μ l), 40 μ l de mezcla maestra Power SYBR Green (Applied Biosystems, Carlsbad CA) y el par de cebadores 36B4d (300 nM) y 36B4u (300 nM).

El número de ciclos para la PCR de las secuencias de los telómeros en la etapa 2 se modificó a 5 ciclos con el fin de tener un valor de Δ Ct adecuado (Δ Ct_{muestra} = Ct_{telómero} - Ct_{referencia}) usando 1 ng de ADN en cada reacción de PCR. 65 1 ng - 10 ng de ADN por reacción tuvieron una eficiencia de PCR > 94 % en los estudios de reproducibilidad. El

número de ciclos de la PCR del gen de una sola copia debe ser nueve ciclos más alto que el de la PCR del telómero para producir suficiente producto de la PCR del gen de una sola copia.

5 Las diferencias medias del número de ciclos del gen de una sola copia con respecto al telómero ($Ct_{36B4} - Ct_{telómero}$, o ΔCt) entre las muestras varió de 9,208 a 14,500.

10 El entrecruzamiento y la fragmentación del ADN en el ADN genómico de las muestras EPFF presentan un desafío único, en especial, para amplificar secuencias teloméricas largas y repetitivas, mientras que la amplificación de un fragmento de 76 pb de un gen de una sola copia para la fosfoproteína P ribosomal ácida (designada 36B4 en el presente documento) en la misma muestra no suele verse afectada. Para resolver este problema, se modificaron varias condiciones de la PCR, es decir, la elección de los cebadores de la PCR, las condiciones del tampón de reacción de la PCR y las condiciones del ciclado térmico, para lograr el objetivo de acortar el tamaño del amplicón del telómero y de mejorar la eficacia de la amplificación de la PCR.

15 Resultados

Las longitudes medias de los telómeros en las estirpes de células tumorales humanas determinadas por transferencia de Southern se correlacionan con los resultados obtenidos mediante qPCR (patrones de ensayo) (Figuras 3A y 3B).

20 El análisis de la supervivencia libre de progresión en los subgrupos de longitudes de telómeros obtenido mediante qPCR indicó que los pacientes con telómeros cortos que fueron tratados con Imetelstat eran significativamente más sensibles en comparación con los controles que los pacientes con telómeros de longitud media-larga (Figuras 1A y 1B).

25 19 de las 57 muestras (33 %) tenían telómeros cortos (Figura 1A). Para estas, el análisis de la supervivencia libre de progresión indicó lo siguiente: los eventos de control/N fueron 7/8, y los eventos de Imetelstat/N fueron 8/11 (Figura 1A); la mediana del control (IC del 95 %) fue de 1,48 (1,18; 2,76), y la mediana de Imetelstat (IC del 95 %) fue de 4,05 (1,25, ND) (Figura 1A); el valor p del rango logarítmico fue de 0,042 y la razón de riesgos instantáneos (IC del 95 %) fue de 0,32 (0,1; 1,02) (Figura 1A).

30 38 de las 57 muestras (67 %) tenían telómeros de longitud media-larga (Figura 1B). Para estas, el análisis de la supervivencia libre de progresión indicó lo siguiente: los eventos de control/N fueron 8/12, y los eventos de Imetelstat/N fueron 21/26 (Figura 1B); la mediana del control (IC del 95 %) fue de 2,7 (1,09; 3,59), y la mediana de Imetelstat (IC del 95 %) fue de 2,8 (1,51, 4,18) (Figura 1B); el valor p del rango logarítmico fue de 0,623 y la razón de riesgos instantáneos (IC del 95 %) fue de 0,83 (0,36; 1,89) (Figura 1B).

35 El efecto del tratamiento aumenta de forma no lineal con la reducción de la longitud de los telómeros tumorales (Figura 5).

40 Ejemplo 3: Telo-FISH en muestras embebidas en parafina y fijadas con formalina del estudio de Fase II de CPN de (CP14B)

45 Se obtuvieron muestras de 61 de los 116 pacientes incluidos en el estudio de fase II de CPN (CP14B-012) descrito anteriormente. De estas 61 muestras de pacientes, 59 arrojaron resultados evaluables del ensayo Telo-FISH usados para el análisis de SLP. Cada ensayo produjo datos para entre 7 y 14545 focos de seis regiones ("campos") en un portaobjetos. Se registraron el área y la intensidad de fluorescencia para cada uno de los focos.

50 Materiales y métodos

Se prepararon portaobjetos de tejido EPFF sin teñir (secciones de tejido de 5 μ m de espesor) mediante métodos histológicos de rutina. Los portaobjetos de tejido se precalentaron a 65 °C durante 6 minutos para fundir la parafina, luego se cargaron en una rejilla para portaobjetos. Se sumergió la rejilla para portaobjetos cargada en 100 ml de xileno en un tanque de tinción durante 3 minutos dos veces (3 minutos x 2) para eliminar la parafina.

55 A continuación, se hidrataron los portaobjetos en incrementos de 3 minutos a través de una serie de etanol graduada: EtOH al 100 %, (3 minutos x 2), EtOH al 95 % (3 minutos x 2) y EtOH al 70 % (3 minutos x 2). Tras esta inmersión en etanol, se sumergieron los portaobjetos en agua desionizada durante 3 minutos y en agua desionizada con detergente Tween-20 al 1 % durante otros 3 minutos.

60 Se sumergieron los portaobjetos brevemente en agua para lavar el Tween-20, a continuación, se transfirieron y se sumergieron en un tanque de tampón de citrato IX de 100 ml que contenía solución de desenmascaramiento diana Vector (dilución x100 en H₂O). Se colocó todo el tanque en un vaporizador precalentado (en ebullición) y se vaporizó durante 35 minutos, luego se retiró del vaporizador y se enfrió durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. 65 Entonces, se sumergieron los portaobjetos en agua desionizada durante 3 minutos, luego en etanol al 70 % dos veces, etanol al 95 % dos veces y se secaron al aire.

ES 2 703 914 T3

Se preparó una sonda de hibridación usando los siguientes reactivos y volúmenes:

Tampón de hibridación para la sonda de telómero de PNA		
reactivo	volumen	común
H ₂ O destilada	190 ul	
Tris HCl 1 M (pH 7,5)	10 ul	dilución 1:2 de Tris 2 M, HCl
Tampón de bloqueo	5 ul (x1)	(leche en polvo en ácido maleico, solución madre al 10 %)
Formamida al 100 %	700 ul	

5 Se diluyó solución madre de sonda de telómero de PNA a 10 ug/ml Te1C-Cy3 (PNA Bio Inc.) CCCTAACCCCTAACCCCTAA (SEQ ID NO:8) en tampón de hibridación con un factor de dilución adecuado (por ejemplo, x5). Se añadieron 30-50 µl de sonda de PNA diluida sobre la muestra, y luego se aplicó un cubreobjetos sin introducir burbujas de aire. Se dispusieron los portaobjetos sobre la superficie de una incubadora de portaobjetos durante 6 minutos a 84 °C para desnaturalizar el ADN del telómero.

10 Se desplazaron los portaobjetos a un recipiente cerrado oscuro y se hibridaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se humedeció el recipiente bien mediante la adición de agua o una toallita kimwipe húmeda para evitar la desecación.

El tampón de lavado para la sonda de telómero de PNA se preparó usando los siguientes reactivos y volúmenes:

15

Tampón de lavado para la sonda de telómero de PNA (100 ml)		
reactivo	volumen	común
H ₂ O destilada	29 ml	
Tris HCl 1 M (pH 7,5)	1 ml	dilución 1:3 de Tris 2 M, HCl
Formamida al 100 %	700 ml	

20 Tras retirar los cubreobjetos, se lavaron los portaobjetos con tampón de lavado de PNA durante 15 minutos dos veces (15 minutos x 2) con agitación suave a temperatura ambiente. A continuación, se drenaron los portaobjetos y se tiñeron los núcleos por contraste con 1 ug/ml de solución de DAPI durante 5 minutos (dilución 1:5000 en agua de una solución madre de 5 mg/ml de DAPI; por ejemplo, 20 µl de solución madre de DAPI a 5 mg/ml en 100 ml de H₂O).

25 A continuación, se lavaron los portaobjetos en agua destilada durante 3 minutos cuatro veces (3 minutos x 4), luego se drenaron y se secaron al aire. Se montaron los cubreobjetos sobre los portaobjetos usando una solución de medios de montaje contra el desteñido, mientras se evitaban las burbujas de aire. Los portaobjetos montados se mantuvieron durante una noche en un lugar oscuro para protegerlos de la luz antes de analizarlos bajo el microscopio. Los portaobjetos teñidos se seleccionaron en el analizador celular IN Cell Analyzer 2000 (GE Corp.) para recoger la intensidad de la señal fluorescente y el área de la señal fluorescente de DAPI (núcleos) y Cy3 (telómero).

30

35 Se utilizó el IN Cell developer Toolbox 1.9 (GE Corp.) para cuantificar la longitud media de los telómeros de las células obtenidas de muestras biológicas y sometidas a telo-FISH. Este software se usó para dibujar líneas alrededor de los núcleos celulares en función de la ubicación de la tinción de DAPI, y alrededor de los telómeros celulares en función de la ubicación de la fluorescencia específica del telómero. Una vez rodeado cada núcleo y cada telómero, el software calculó la intensidad y el área de cada telómero individual en las células y determinó la longitud media de los telómeros para las células derivadas de la muestra biológica de acuerdo con la Ecuación 1:

$$1,376 \times \log_2(\text{intensidad}) - 6,215 \times \sqrt{(\text{área})} \text{ [Ecuación 1]}$$

40 Resultados iniciales

Las longitudes de los telómeros en las estirpes de células tumorales humanas determinadas mediante transferencia de Southern se correlacionan con los resultados obtenidos mediante Telo-FISH (patrones de ensayo) (Figuras 4A y 4B).

45

El análisis de la supervivencia libre de progresión en los subgrupos de longitudes de los telómeros obtenidos mediante Telo-FISH IN Cell-Quartile Split indicó que el área grande y la intensidad baja (es decir, una proporción baja de la intensidad con respecto al área) se asocian con una mejor eficacia de Imetelstat (Figura 2).

50

El análisis de supervivencia libre de progresión indicó lo siguiente: los eventos/N fueron 9/15; la mediana del control (IC del 95 %) fue de 1,18 (1,09; ND), y la mediana de Imetelstat (IC del 95 %) fue de 4,7 (1,41, ND) (Figura 2); el valor *p* del rango logarítmico fue de 0,044 y la razón de riesgos instantáneos (IC del 95 %) fue de 0,26 (0,06; 1,1) (Figura 2).

La predicción multivariable de Telo-FISH de la supervivencia libre de progresión en los pacientes tratados con imetelstat arrojó los siguientes datos:

TeloFISH Metric	Razón de riesgos instantáneos (HR)	Log del coeficiente lineal (HR)	Valor de p
Log2 (Intensidad)	3,960	1,376	0,22
Raíz cuadrada (Área)	0,002	-6,215	0,017

5 División en cuartiles del riesgo de SLP del modelo multivariable (Proporción baja de intensidad/área):

Intensidad/Área baja
15/59 (25,4 %)

El efecto del tratamiento aumenta de forma no lineal con la reducción de la longitud de los telómeros tumorales (Figura 6).

10

Resultados posteriores

Se realizó un análisis adicional de la población de pacientes en un punto de tiempo posterior. Estos datos posteriores se representan en las Figuras 7 a 10.

15

La Figura 7 muestra el análisis de supervivencia libre de progresión para todos los pacientes (N = 114 pacientes en total, con 92 eventos de supervivencia sin progresión y una mediana de seguimiento de 2,6 meses), mientras que las Figuras 8A y 8B muestran el análisis de supervivencia libre de progresión para los pacientes con telómeros cortos y telómeros de longitud media-larga, respectivamente. Para los pacientes con telómeros cortos, el ensayo prospectivo de Telo-FISH fue predictivo de la supervivencia libre de progresión (Figura 8A).

20

En la Figura 9, se muestra el análisis de supervivencia global para todos los pacientes (114 pacientes en total, con 66 eventos de supervivencia global y una mediana de seguimiento de 10,5 meses), lo que demuestra una tendencia hacia un beneficio de supervivencia global para los pacientes que reciben imetelstat en comparación con el control. El análisis de supervivencia global para los pacientes con telómeros cortos se muestra en la Figura 10A, mientras que el análisis de supervivencia global para los pacientes con telómeros de longitud media-larga se muestra en la Figura 10B.

25

Ejemplo 4: qPCR en muestras embebidas en parafina y fijadas con formalina del estudio de fase II de CPN de Imetelstat (CP14B-012)

30

Este ejemplo demuestra el rendimiento de una segunda reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa para determinar la longitud relativa de los telómeros de muestras de tejido del estudio de fase II de CPN EPFF (CP14B-012).

35

Este ejemplo siguió todos los procedimientos del Ejemplo 2 con los siguientes cambios en el protocolo de qPCR.

PCR cuantitativa (qPCR)

40 Todas las reacciones de PCR cuantitativas se llevaron a cabo usando el Sistema de detección de secuencias ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems, Carlsbad CA). Se realizó una PCR.

Las secuencias de los cebadores para la amplificación de los telómeros fueron Telg 5'-ACA CTA AGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTA GTG T (SEQ ID NO:4) y Telc 5'-TGT TAG GTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA ACA (SEQ ID NO: 5) (Cawthon, 2009); y las de 36B4u: 5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC (SEQ ID NO:6 y 36B4d: 5'-CCC ATT CTA TCA TCA TCA ACG GGT ACA A (SEQ ID NO: 7) (Cawthon, 2002).

45

También se usaron patrones de ADN como un control de ensayo/placa. La secuencia para el patrón de ADN para el molde bicatenario de longitud telomérica fue 5'-TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG TTA GGG-3' (SEQ ID NO: 9) y la secuencia para el molde bicatenario del gen de una sola copia fue: 5'-CTT TTC AGC AAG TGG GAA GGT GTA ATC CGT CTC CAC AGA CAA GGC CAG GAC TCG TTT GTA CCC GTT GAT GAT AGA ATG GGG TAC-3' (SEQ ID NO: 10) (ambas de Integrated DNA Technologies).

50

55 Cada reacción de PCR para la amplificación de telómeros en el ADN de la muestra EPFF o para el patrón de los telómeros de oligonucleótidos se realizó usando 1 ng/10 μ l de muestra (0,1 ng/ μ l) y una mezcla de PCR de 40 μ l que contenía 1,25 U de ADN Taq polimerasa Hotstart (BioChain), colorante fluorescente 6-ROX 150 nM, 0,4 x tinte de ácido nucleico SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad CA), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,2 mM de cada trifosfato

desoxinucleósido (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), ditioneitol 5 mM, dimetilsulfóxido al 1 % y Tris-HCl 15 mM a pH 8,0 y el par de cebadores Telg y Telc (ambos a 900 nM). La concentración de cebador superior se prefiere para el ADN telomérico cuando se usa ADN EPFF, porque las concentraciones altas de cebadores permiten múltiples sitios de hibridación.

5 La amplificación del patrón de gen 36B4 de una sola copia y del gen de una sola copia en la muestra EPFF se realizó usando la mezcla maestra de PCR Power SYBR Green (Applied Biosystems). La amplificación de 36B4 se realizó usando 1 ng/10 µl de muestras (0,1 ng/µl), 40 µl de mezcla maestra Power SYBR Green (Applied Biosystems, Carlsbad CA) y el par de cebadores 36B4d (300 nM) y 36B4u (300 nM).

10 Se dispusieron el ADN de las muestras EPFF para la amplificación de la secuencia telomérica y el ADN de las muestras EPFF para la amplificación del gen de una sola copia en pocillos separados de la placa. Los patrones de ADN para la amplificación de la secuencia telomérica y para la amplificación del gen 36B4 de una sola copia se dispusieron en pocillos separados de la misma placa y todos se amplificaron en tres etapas. Etapa 1: 95 °C durante 15 10 minutos para activar la ADN Taq polimerasa; etapa 2: 3 ciclos de 15 s a 95 °C, 10 s a 50 °C para generar productos de PCR que actuarán como moldes para los posteriores ciclos de amplificación. Etapa 3: 35 ciclos de 15 s a 95 °C, 15 s a 60 °C con adquisición de señal a 60 °C. El tiempo total de ejecución fue de 90 minutos.

20 El número de ciclos en la etapa 2 fue de 3 ciclos con el fin de tener un valor de ΔCt adecuado ($\Delta Ct_{muestra} = Ct_{telómero} - Ct_{referencia}$) usando 10 ng de ADN de muestra EPFF en cada reacción de PCR. 1 ng-10 ng de ADN de muestra EPFF por reacción tuvieron una eficiencia de PCR > 94 % en los estudios de reproducibilidad.

Resultados

25 El análisis de la supervivencia libre de progresión en los subgrupos de longitudes de telómeros obtenido mediante qPCR retrospectiva indicó que los pacientes con telómeros cortos que fueron tratados con Imetelstat eran significativamente más sensibles en comparación con los controles que los pacientes con telómeros de longitud media-larga (Figuras 11A y 11B).

30 la mediana del control (IC del 95 %) fue de 2,57 (1,18; ND), y la mediana de Imetelstat (IC del 95 %) fue de 1,91 (1,22, ND) (Figura 11A); el valor p del rango logarítmico fue de 0,325 y la razón de riesgos instantáneos (IC del 95 %) fue de 0,55 (0,17; 1,84) (Figura 11A).

35 34 de las 52 muestras (65 %) tenían telómeros de longitud media-larga (Figura 11B). Para estas, el análisis de la supervivencia libre de progresión indicó lo siguiente: los eventos/N fueron 26/34 (Figura 11B); la mediana del control (IC del 95 %) fue de 2,66 (0,92; ND), y la mediana de Imetelstat (IC del 95 %) fue de 3,03 (1,58, 4,47) (Figura 11B); el valor p del rango logarítmico fue de 0,309 y la razón de riesgos instantáneos (IC del 95 %) fue de 0,65 (0,27; 1,56) (Figura 11B).

40 Los ejemplos, que están destinados a ser puramente ilustrativos de la invención y que, por lo tanto, no deben considerarse limitantes de la invención de ninguna manera, también describen y detallan aspectos y realizaciones de la invención analizada anteriormente. Los ejemplos anteriores y la descripción detallada se ofrecen a modo ilustrativo y no a modo de limitación.

REIVINDICACIONES

1. Un método de selección de un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa, comprendiendo el método:

- 5 a. determinar la longitud relativa de los telómeros mediante el análisis de la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo; y
 b. seleccionar un individuo que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa cuando se determine que la longitud relativa media de los telómeros de las células cancerosas presentes en una muestra
 10 biológica del individuo está en el percentil 50 o inferior de un intervalo de longitudes relativas de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos;

en el que el cáncer es un tumor sólido, y en el que:

- 15 el uno o más patrones conocidos es un intervalo de longitudes de telómeros establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos en los que las células cancerosas de la pluralidad de tumores de origen natural son del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo diagnosticado del cáncer; o el uno o más patrones conocidos son estirpes celulares
 20 caracterizadas.

2. Un inhibidor de la telomerasa para su uso en el tratamiento de un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer, cuando se ha determinado que la longitud relativa media de los telómeros de las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o inferior de un intervalo de longitudes
 25 relativas de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos, en el que el cáncer es un tumor sólido, y en el que:

- el uno o más patrones conocidos es un intervalo de longitudes de telómeros establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos en los que las células cancerosas de la pluralidad de tumores de origen natural son del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra
 30 biológica del individuo diagnosticado del cáncer; o el uno o más patrones conocidos son estirpes celulares caracterizadas.

3. El inhibidor de la telomerasa para el uso de la reivindicación 2, en el que el cáncer se selecciona entre cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vejiga, glioblastoma, un sarcoma, melanoma, cáncer colorrectal y cáncer pancreático.
 35

4. El inhibidor de la telomerasa para el uso de la reivindicación 2 o 3, en el que la longitud de los telómeros de las células cancerosas presentes en la muestra biológica está determinada en el percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10 o percentil 5 o percentil inferior del intervalo de longitudes
 40 relativas de los telómeros.

5. El inhibidor de la telomerasa para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el inhibidor de la telomerasa comprende un oligonucleótido.

45 6. El inhibidor de la telomerasa para el uso de la reivindicación 4, en el que el oligonucleótido es complementario al componente de ARN de la telomerasa.

7. El inhibidor de la telomerasa para el uso de la reivindicación 5, en el que el oligonucleótido es de 10-20 pares de bases de longitud y comprende al menos un enlace internucleosídico de tiofosforamidato N3' → P5'.
 50

8. El inhibidor de la telomerasa para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en el que el inhibidor de la telomerasa es Imetelstat.

9. El inhibidor de la telomerasa para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en el que el inhibidor de la telomerasa se administra con un excipiente farmacéuticamente aceptable.
 55

10. El método de la reivindicación 1, en el que el cáncer se selecciona entre cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de ovarios, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vejiga, glioblastoma, un sarcoma, melanoma, cáncer colorrectal y cáncer pancreático.
 60

11. El método de la reivindicación 1, en el que el cáncer es cáncer de pulmón no microcítico.

12. El método de la reivindicación 1, que comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales.
 65

13. El método de la reivindicación 1, en el que la longitud media de los telómeros se determina mediante qPCR, telo-FISH o transferencia de Southern.
- 5 14. El método de la reivindicación 1, en el que el individuo es un ser humano.
15. El método de la reivindicación 1, en el que dichos uno o más patrones son estirpes celulares caracterizadas seleccionadas del grupo que consiste en: células M14, células A549, en células SK-5 y células Ovar5.
- 10 16. El método de la reivindicación 1, en el que las estirpes celulares caracterizadas se seleccionan a partir de estirpes celulares representativas del tipo de muestra biológica de la reivindicación 1, opcionalmente, en el que las estirpes celulares caracterizadas son estirpes celulares de cáncer de pulmón no microcítico, estirpes celulares hepatocelulares o estirpes celulares ováricas.
- 15 17. El método de la reivindicación 1, en el que la longitud de los telómeros de las células cancerosas presentes en la muestra biológica está determinada en el percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10 o percentil 5 o percentil inferior del intervalo de longitudes relativas de los telómeros.
- 20 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 10-17, en el que el inhibidor de la telomerasa comprende un oligonucleótido.
19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 10-18, en el que el inhibidor de la telomerasa es Imetelstat.

Figura 1A

**SLP de los telómeros cortos mediante qPCR
del estudio de fase II del CPN de Imetelstat
(CP14B-012)**

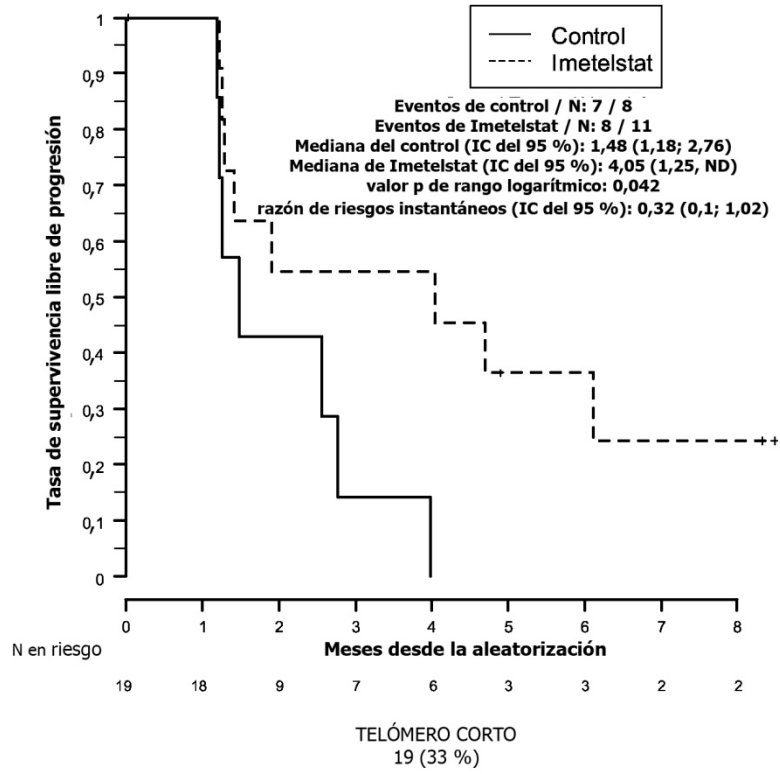


Figura 1B

SLP de los telómeros medios-largos mediante qPCR del estudio de fase II de CPN de imetelstat (CP14B-012)

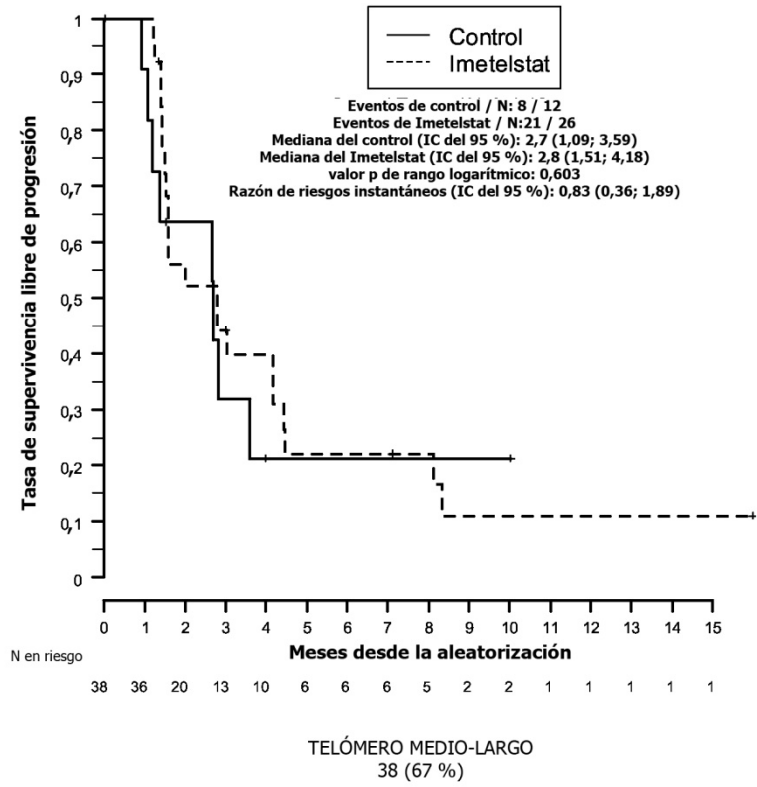


Figura 2

**SLP de intensidad/área de TeloFISH corto
del estudio de fase II de CPN de Imetelstat
(CP14B-012)**

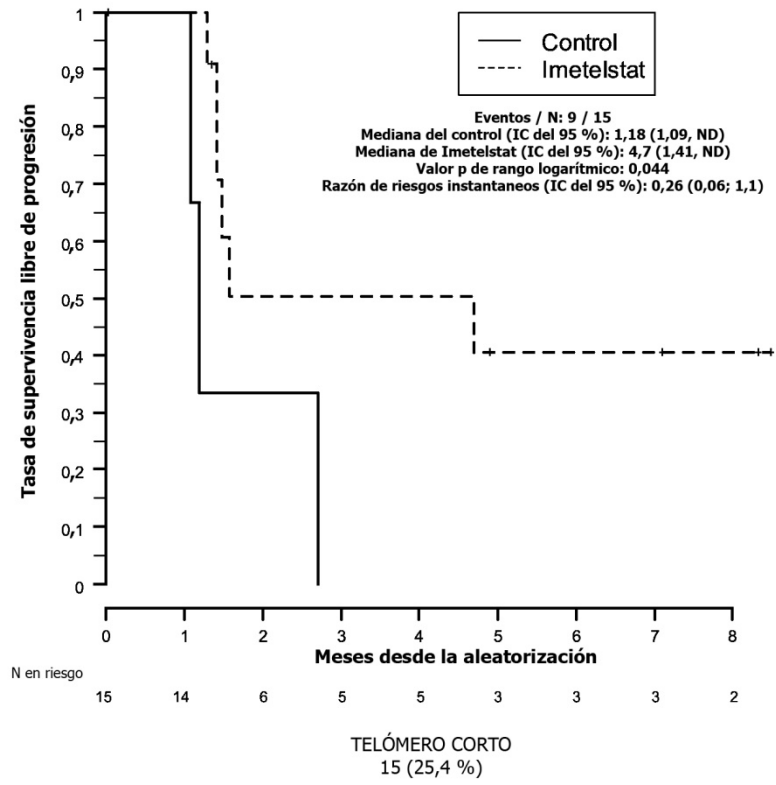
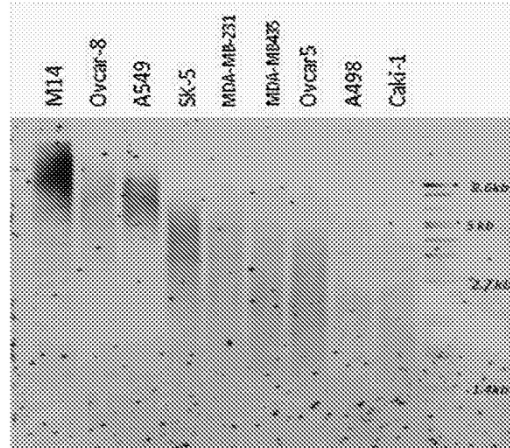


Figura 3

A

Longitud de TRF en estirpes de células tumorales humanas



B

Proporciones de T/S medias en estirpes de células tumorales EPFF humanas

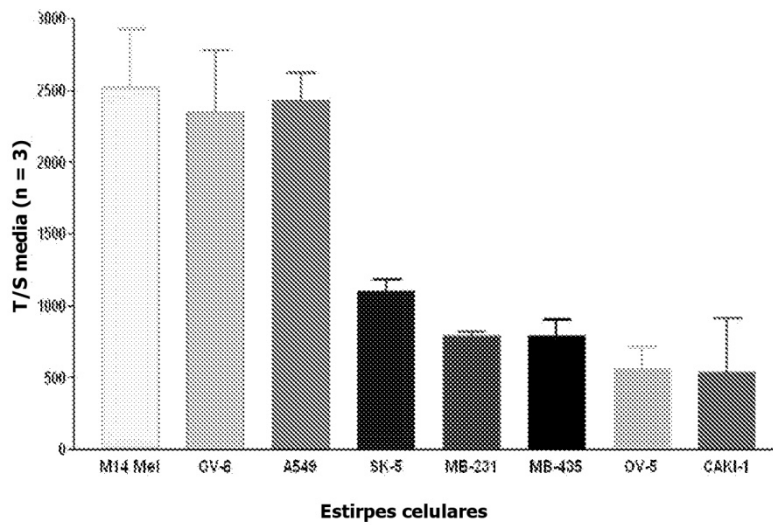
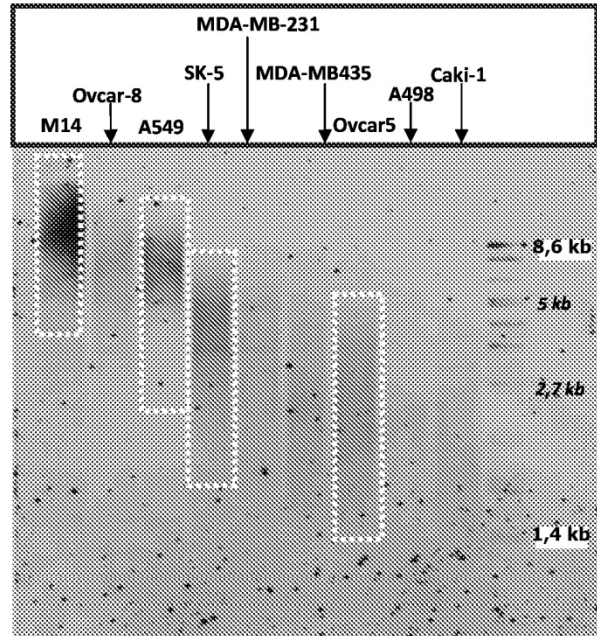


Figura 4

A)



B)

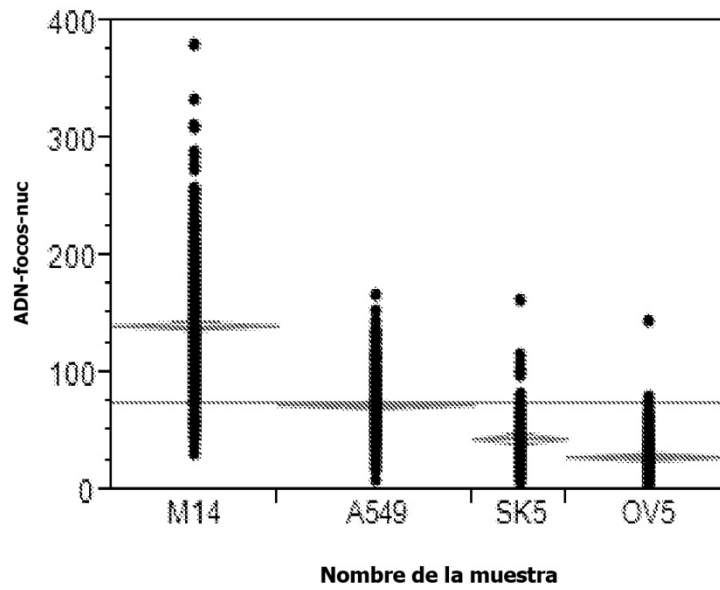


Figura 5

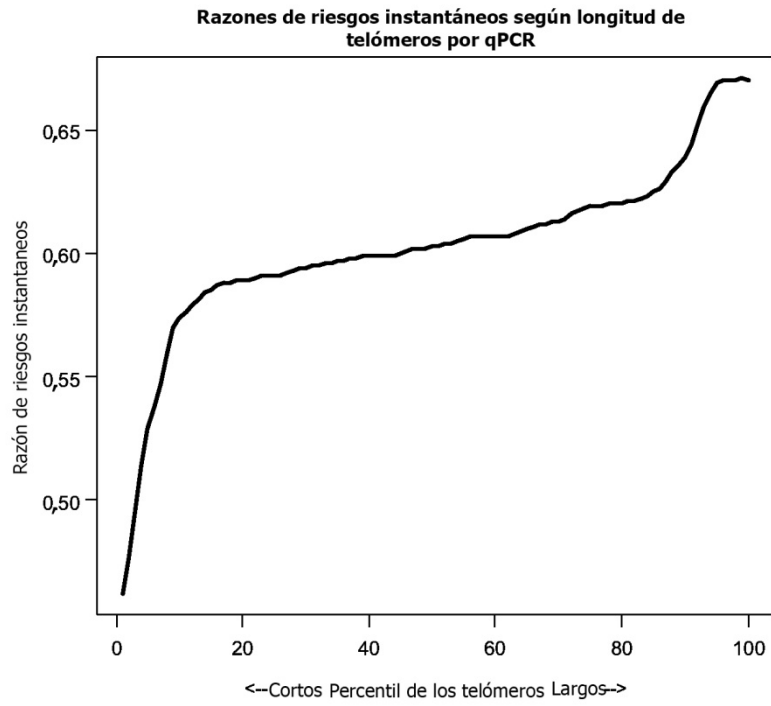


Figura 6

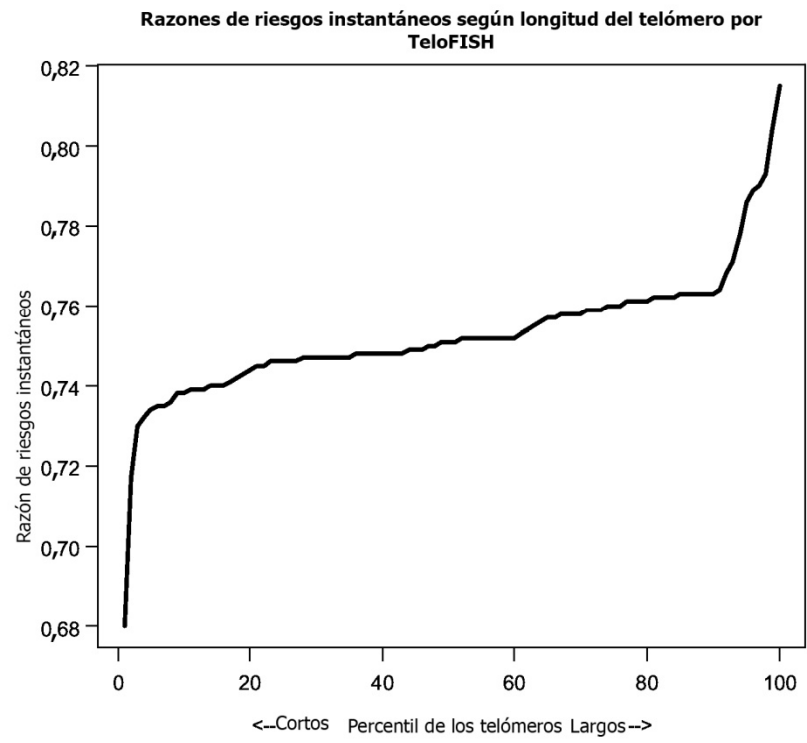
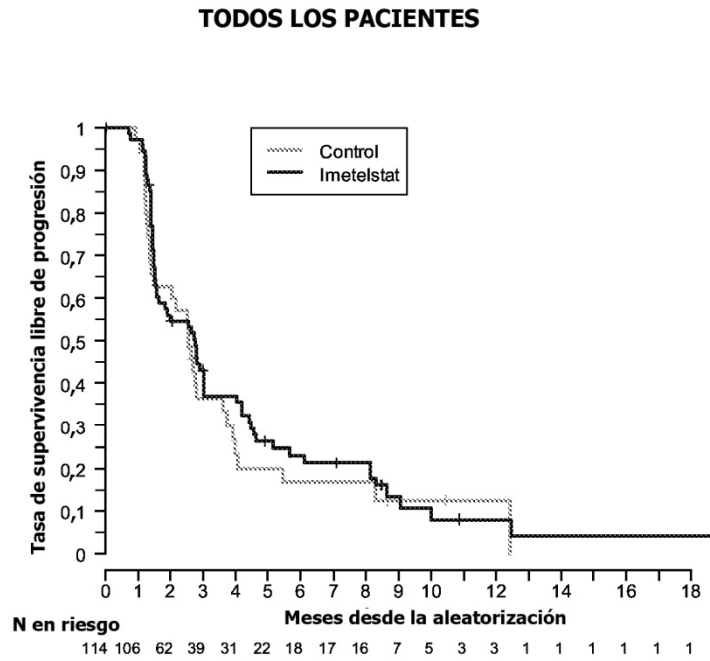


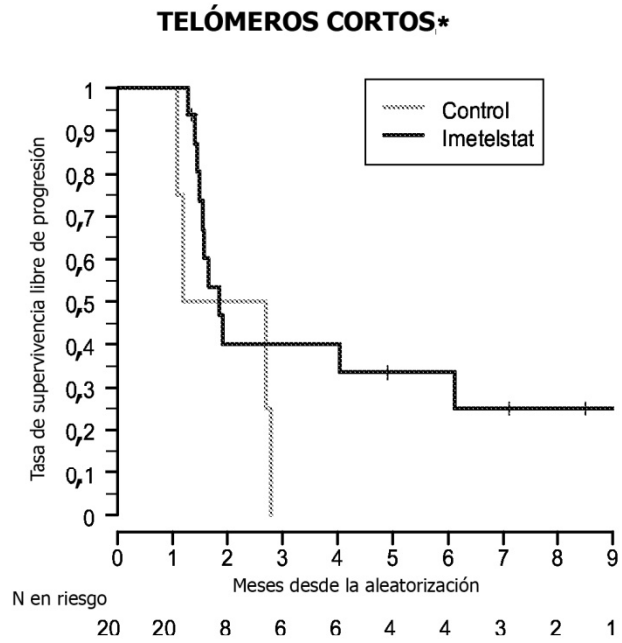
Figura 7



Resultados de SLP (N = 114, Eventos = 92, Mediana de UF 2,6 mn)	
Mediana del control (IC del 95 %)	2,57 (1,41, 3,62)
Mediana de Imetelstat (IC del 95 %)	2,76 (1,58, 3,03)
Razón de riesgos instantáneos (IC del 95 %)	0,84 (0,54, 1,31)
Valor de p (Ensayo de puntuación)	0,446

Figura 8

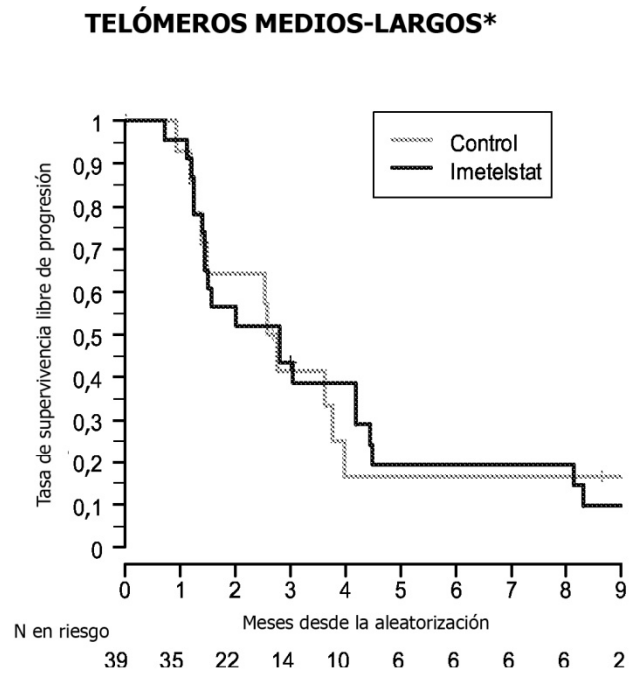
A)



Resultados de TL cortos N = 20, Eventos = 16	
Mediana del control (IC del 95 %)	1,94 (1,09, ND)
Mediana de Imetelstat (IC del 95 %)	1,84 (1,48, 6,12)
Razón de riesgos instantáneos (CI del 95 %)	0,45 (0,14, 1,48)
Valor p (Ensayo de puntuación)	0,177

Figura 8

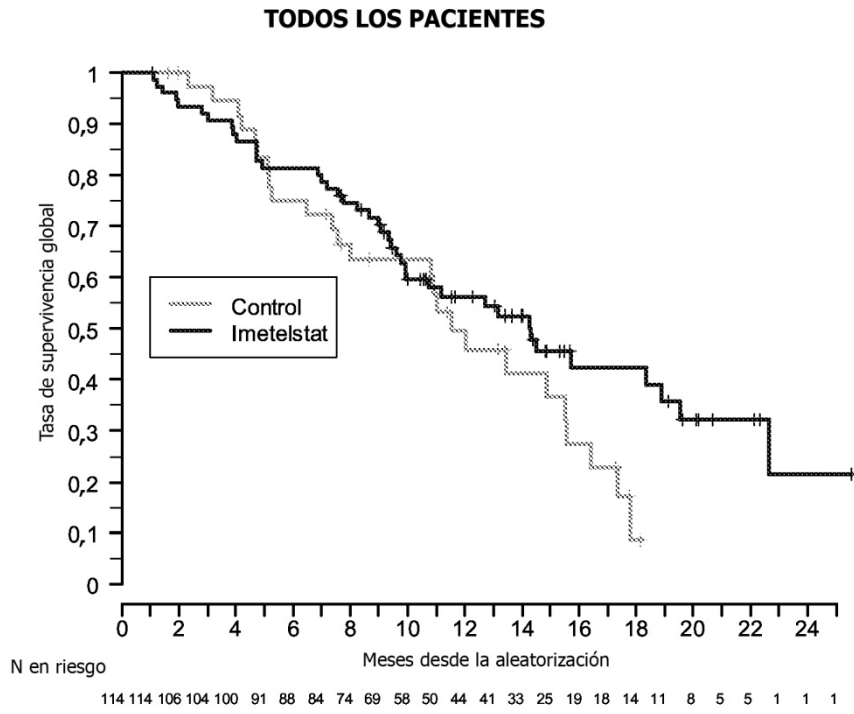
B)



***Interacción p = 0,175**

Resultados de TL medios-largos N = 39, Eventos = 32	
	2,66 (1,25, 3,75)
	2,80 (1,45, 4,18)
	0,92 (0,45, 1,89)
	0,801

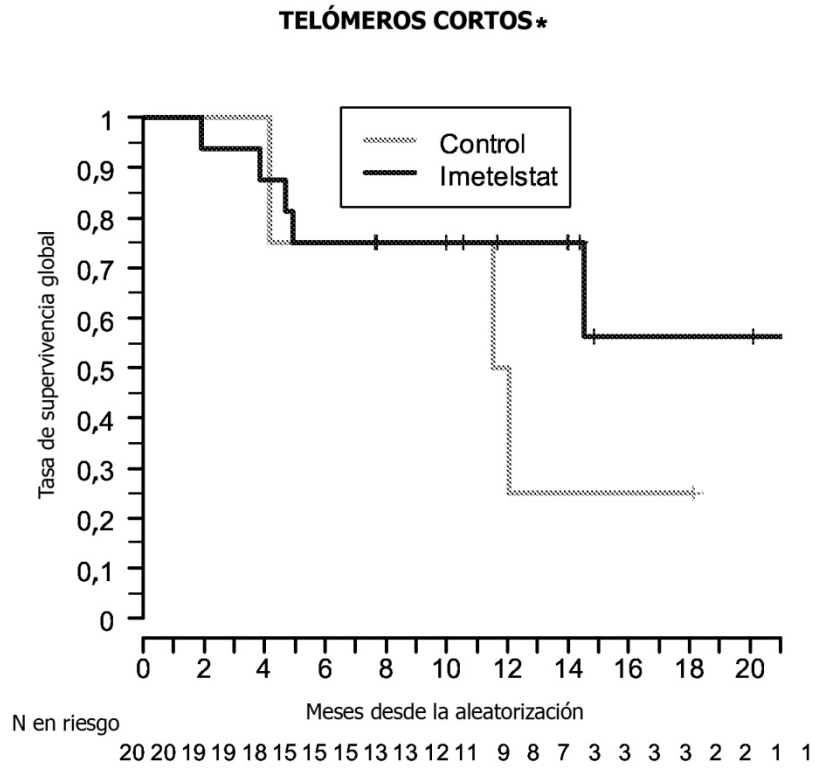
Figura 9



Resultados de supervivencia global (N = 114, Eventos = 66, Mediana UF 10,5 mn)		
	Imetelstat	Control
Mediana (IC del 95 %)	14,3 (9,9, 18,9)	11,5 (7,6, 15,5)
Tasa de supervivencia de 6 meses (IC del 95 %)	81 %	75 %
Razón de riesgos instantáneos (IC del 95 %)	0,68 (0,41, 1,12)	
Valor de p (Ensayo de puntuación)	0,129	

Figura 10

A)

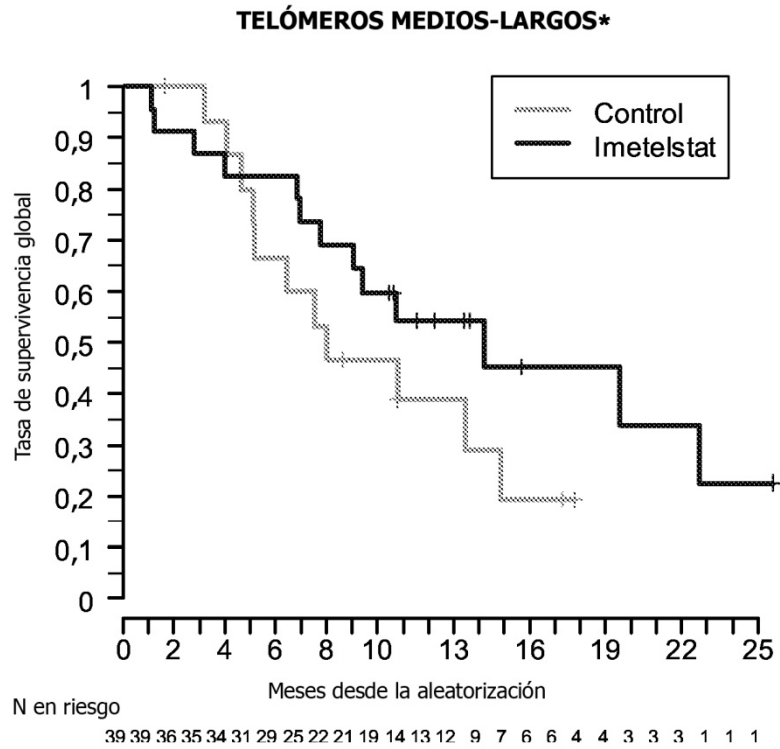


*Interacción p = 0,689

	Resultados de TL cortos N = 20, Eventos = 8
Mediana del control (IC del 95 %)	11,79 (4,18, ND)
Mediana de Imetelstat (IC del 95 %)	ND (4,93, ND)
Razón de riesgos instantáneos (IC del 95 %)	0,44 (0,11, 1,87)
Valor de p (Ensayo de puntuación)	0,256

Figura 10

B)

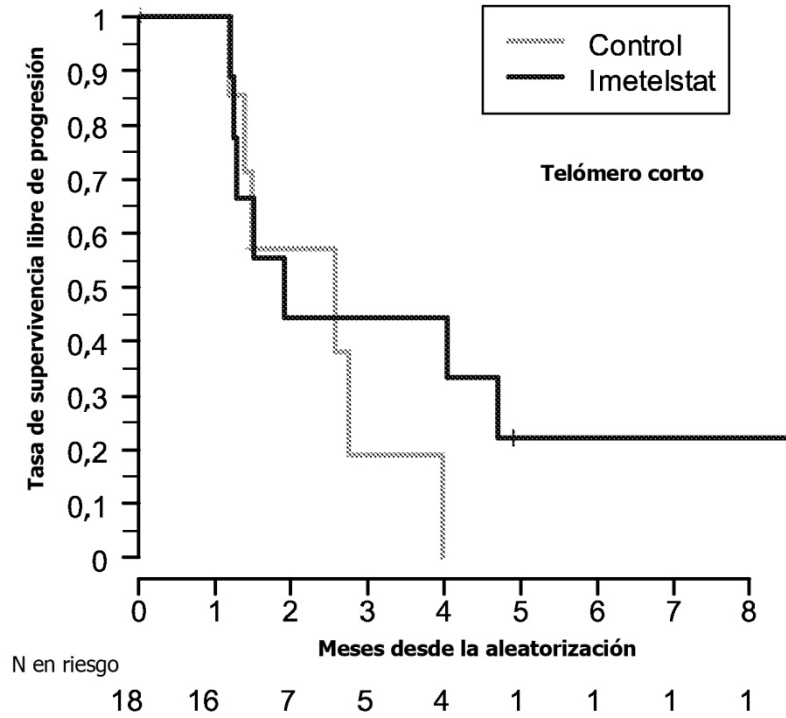


*Interacción p = 0,689

Resultados de TL medios-largos N = 39, Eventos = 24	
	7,99 (4,67, 14,87)
	14,24 (7,76, 22,66)
	0,58 (0,25, 1,35)
	0,200

Figura 11

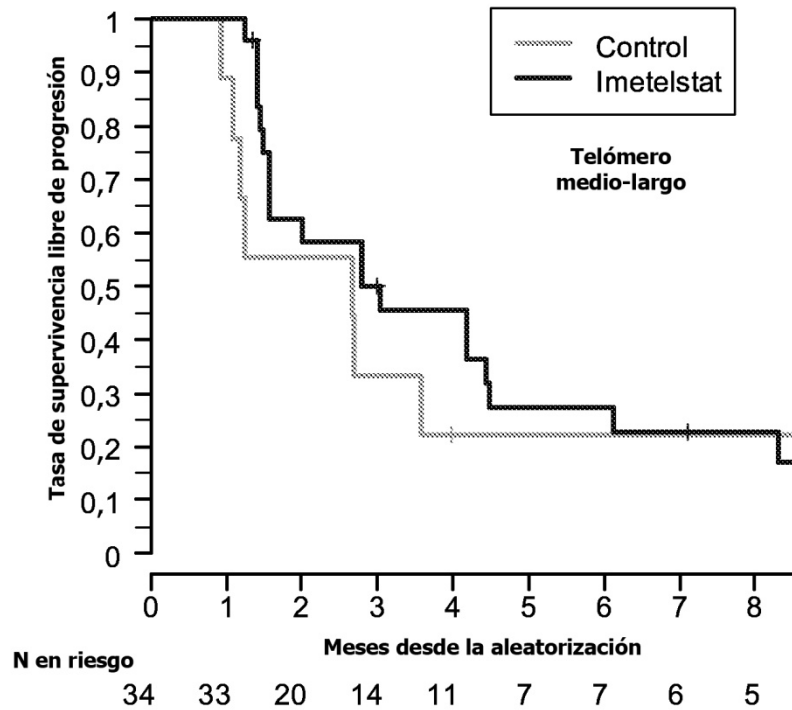
A)



	Resultados de SLP de telómero corto N = 18 (35 %), Eventos = 13
Mediana del control (IC del 95 %)	2,57 (1,18, ND)
Mediana de Imetelstat (IC del 95 %)	1,91 (1,22, ND)
Razón de riesgos instantáneos (IC del 95 %)	0,55 (0,17, 1,84)
Valor de p (Prueba de rango log)	0,325

Figura 11

B)



Resultados de SLP de telómero medio-largo N = 34 (65 %), Eventos = 26	
Mediana del control (IC del 95 %)	2,66 (0,92, ND)
Mediana de Imetelstat (IC del 95 %)	3,03 (1,58, 4,47)
Razón de riesgos instantáneos (IC del 95 %)	0,65 (0,27, 1,56)
Valor de p (Prueba de rango log)	0,309