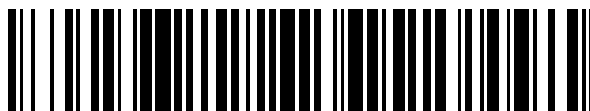


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 789 580**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12Q 1/6813 (2008.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2009** **E 17194587 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020** **EP 3330383**

54 Título: **Grn163l para su uso como inhibidor de la telomerasa en el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

17.10.2008 US 106491 P

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

26.10.2020

73 Titular/es:

GERON CORPORATION (100.0%)

919 E. Hillsdale Blvd.

Foster City, CA 94404, US

72 Inventor/es:

HARLEY, CALVIN, B.;

ELIAS, LAURENCE;

SMITH, JENNIFER;

RATAIN, MARK J. y

BENEDETTI, FABIO

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 789 580 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

Grn163l para su uso como inhibidor de la telomerasa en el tratamiento del cáncer

5 **Campo de la Invención**

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

Antecedentes

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

La telomerasa es una enzima que añade nucleótidos a los telómeros en los extremos de los cromosomas, lo que ayuda a evitar el acortamiento telomérico a longitudes críticas. La telomerasa, estructuralmente, es un complejo macromolecular único que incorpora una cadena de ARN en su sitio activo. Este ARN incluye la secuencia telomérica complementaria (3'-AUCCCAAUC-5'), que funciona tanto para anclar la telomerasa al telómero que como una plantilla para añadir repeticiones al extremo del cromosoma. La telomerasa es activa esencialmente en todos los cánceres, pero se presenta generalmente a niveles muy bajos o no detectables en el tejido adulto normal. Por lo tanto, la longitud promedio de los telómeros de las células normales varía entre los individuos y disminuye con la edad (ver la Figura 7). El acortamiento de los telómeros en los tejidos normales también puede acelerarse por el estrés oxidativo, fisiológico o inmunológico y la exposición a agentes tóxicos.

Las células cancerosas generalmente se someten a rondas 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 de esta manera permitir el crecimiento tumoral y la metástasis. (Kim y otros, Science vol. 266 págs. 2011-2015; Greider CW, Blackburn EH. Sci Am Feb:92-97, 1996; Shay JW y Wright WE. "Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase" Carcinogenesis 26:867-74, 2005). Por lo tanto, la inhibición de la telomerasa se considera una estrategia de tratamiento prometedora para una amplia variedad de tipos de tumores sólidos y neoplasias malignas hematológicas (Harley CB, Nature Rev. Cancer, vol. 8 págs. 167-179, 2008).

GRN163L es un oligonucleótido de tiofosforamidato con una "cola" de palmitoilo 5'. Inhibe la actividad de la telomerasa intracelular mediante la unión a la región plantilla del componente ARN de la holoenzima telomerasa. (Shea-Herbert y otros, Oncogene 24:5262-8, 2005) GRN163L ha demostrado inhibición de la telomerasa y efectos de inhibición del crecimiento de células cancerosas tanto *in vitro* como *in vivo* (Dikmen ZG y otros, Cancer Res. 65:7866-73, 2005; Djojsooburo MW y otros, Hepatol 42:1-11, 2005; Hochreiter AE y otros, Clin Cancer Res 12:3184-92 2006) GRN163L se encuentra actualmente en ensayos clínicos en tumores sólidos y cánceres hematológicos.

En cualquier tratamiento contra el cáncer, la toxicidad inducida por la quimioterapia puede resultar en reducciones de la intensidad de dosis relativa de la quimioterapia. Las toxicidades inducidas por el tratamiento pueden incluir anemia, neutropenia, leucopenia y trombocitopenia. La trombocitopenia es una toxicidad inducida por la quimioterapia que se produce típicamente en la primera ronda del tratamiento de quimioterapia y puede volverse más grave durante rondas repetidas de tratamiento. Los fármacos que resultan en toxicidades pueden tener aplicaciones limitadas debido a la reducción de la intensidad de dosis (RDI), retrasos de la dosis y reducciones de la dosis relativa. Tales reducciones de la dosis, reducción de la intensidad de la dosis o retrasos de la dosis usados como un medio para reducir la toxicidad pueden socavar el control de la enfermedad y la supervivencia general, particularmente en pacientes con neoplasias malignas potencialmente curables. Generalmente, se recomienda que para obtener la máxima relación beneficio-riesgo de la quimioterapia, la dosis prescrita debe individualizarse de acuerdo con el objetivo de la terapia y la respuesta.

El tratamiento de la trombocitopenia se determina por la etiología y la gravedad de la enfermedad. El concepto principal en el tratamiento de la trombocitopenia es eliminar el problema subyacente, ya sea que eso signifique interrumpir los fármacos sospechosos que provocan trombocitopenia, o tratar los factores inmunológicos o inflamatorios contribuyentes. Los pacientes con trombocitopenia grave pueden controlarse con transfusiones de plaquetas de donantes por un período de tiempo. Además, el Oprelvekin (NEUMEGA™, Wyeth) se aprobó para la prevención de la trombocitopenia grave después de la quimioterapia mielosupresora en pacientes adultos con neoplasias malignas no mieloides. Otro fármaco, Romiplostin (NPLATE™, Amgen Inc.) se ha aprobado para el tratamiento de la púrpura trombocitopénica idiopática crónica (ITP).

En este contexto, una prueba altamente predictiva para pacientes que son sensibles a desarrollar toxicidad inducida por la terapia de inhibición de la telomerasa proporcionaría una reducción significativa en la carga total de toxicidad asociada con la terapia de inhibición de la telomerasa, y permitiría el uso más seguro de la terapia de inhibición de la telomerasa sin una negación inapropiada de acceso a su uso.

La presente invención pretende presentar un procedimiento para determinar la susceptibilidad de los pacientes con cáncer a desarrollar toxicidades limitantes del tratamiento, tales como trombocitopenia, a partir de la terapia de inhibición de la telomerasa.

Sumario de la invención

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

La invención proporciona un procedimiento para monitorear un paciente en busca de un evento adverso relacionado con la terapia de inhibición de la telomerasa en el que el procedimiento comprende analizar una muestra biológica del paciente para determinar la longitud o la distribución de la longitud de los telómeros. El procedimiento puede comprender, además, la etapa de identificar la probabilidad de que un sujeto mamífero presentará una reacción adversa al tratamiento con una terapia de inhibición de la telomerasa.

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

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

En un aspecto del procedimiento, el sujeto mamífero es un humano.

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

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

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

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

En un aspecto del procedimiento, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer de

faringe, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer de piel, cáncer de cerebro, leucemia, mieloma y linfoma.

5 En un aspecto del procedimiento, el componente de longitud del telómero es un componente positivo cuando se calcula el cambio porcentual.

En un aspecto del procedimiento, el componente de dosis es un componente negativo cuando se calcula el cambio porcentual.

10 En un aspecto del procedimiento, el procedimiento comprende, además, la etapa de asignar al sujeto la probabilidad de tener una reacción adversa al tratamiento con un inhibidor de la telomerasa.

15 En un aspecto del procedimiento, las longitudes iniciales de los telómeros más cortas se asocian con un aumento del riesgo de una reacción adversa.

En un aspecto del procedimiento, el aumento de la dosis se asocia con un aumento del riesgo de una reacción adversa.

20 En un aspecto del procedimiento, la longitud inicial del telómero se determina mediante análisis FISH, análisis de transferencia de Southern, análisis de PCR o análisis STELA.

En un aspecto del procedimiento, la longitud inicial del telómero se determina mediante análisis FISH.

25 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para determinar la probabilidad de que un sujeto mamífero experimentará trombocitopenia relacionada con la terapia de inhibición de la telomerasa en la que el procedimiento comprende,

- 30 (a) determinar el promedio o la mediana de la longitud del telómero en una muestra biológica que comprende células obtenidas del sujeto mamífero antes o en el momento del tratamiento con una terapia de inhibición de la telomerasa y multiplicar el promedio o la mediana de la longitud del telómero por un coeficiente para llegar a un componente de longitud del telómero;
- (b) multiplicar la dosis de tratamiento prevista por un coeficiente para llegar a un componente de dosis;
- (c) calcular la suma del componente del telómero y el componente de dosis y el log del número de plaquetas inicial del sujeto para determinar el nadir de plaquetas predicho durante las primeras semanas de tratamiento; y
- 35 (d) determinar la probabilidad esperada de trombocitopenia en el sujeto mamífero a partir del tratamiento con la terapia de inhibición de la telomerasa.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para identificar a un paciente que potencialmente requiere un nivel de dosis de inhibidor de la telomerasa por debajo del nivel de dosis máximo recomendado, en el que el procedimiento comprende

- 40 (a) determinar el promedio o la mediana de la longitud del telómero en una muestra biológica que comprende células obtenidas del sujeto mamífero antes o en el momento del tratamiento con una terapia de inhibición de la telomerasa y multiplicar el promedio o la mediana de la longitud del telómero por un coeficiente para llegar a un componente de longitud del telómero;
- 45 (b) multiplicar la dosis de tratamiento prevista por un coeficiente para llegar a un componente de dosis;
- (c) calcular la suma del componente del telómero y el componente de dosis y el log del número de plaquetas inicial del sujeto para determinar el nadir de plaquetas predicho durante las primeras semanas de tratamiento;
- (d) determinar la probabilidad esperada de trombocitopenia en el sujeto mamífero a partir del tratamiento con la terapia de inhibición de la telomerasa; y
- 50 (e) administrar una dosis reducida del inhibidor de la telomerasa o un régimen de dosificación reducido del inhibidor de la telomerasa.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para identificar un sujeto mamífero que requiere que se administre un producto farmacéutico mejorador junto con un inhibidor de la telomerasa en el que el procedimiento comprende

- 55 (a) determinar el promedio o la mediana de la longitud del telómero en una muestra biológica que comprende células obtenidas del sujeto mamífero antes o en el momento del tratamiento con una terapia de inhibición de la telomerasa y multiplicar el promedio o la mediana de la longitud del telómero por un coeficiente para llegar a un componente de longitud del telómero;
- 60 (b) multiplicar la dosis de tratamiento prevista por un coeficiente para llegar a un componente de dosis; y
- (c) calcular la suma del componente del telómero y el componente de dosis y el log del número de plaquetas inicial del sujeto para determinar el nadir de plaquetas predicho durante las primeras semanas de tratamiento; y
- (d) determinar la probabilidad esperada de trombocitopenia en el sujeto mamífero a partir del tratamiento con la terapia de inhibición de la telomerasa
- 65 (e) administrar una dosis apropiada de un producto farmacéutico mejorador junto con el inhibidor de la telomerasa.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para identificar a un sujeto mamífero en terapia de inhibición de la telomerasa que requiere monitorear los eventos adversos que comprende analizar una muestra biológica no cancerosa del sujeto mamífero para determinar la longitud del telómero antes de la terapia de inhibición de la telomerasa.

Preferentemente, el procedimiento comprende, además, monitorear el sujeto mamífero en busca de una reacción adversa relacionada con el tratamiento con el inhibidor de la telomerasa.

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

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

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

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

Otros aspectos y ventajas de la invención se volverán completamente evidentes cuando la siguiente descripción detallada de la invención se lea junto con los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

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

La Figura 6 es un gráfico que muestra el cambio en la longitud inicial de los telómeros de los granulocitos en el nadir en la semana 5 frente al número de regímenes citotóxicos experimentados por los pacientes antes de la inscripción en este estudio.

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

Descripción detallada de la invención

Los expertos en la técnica apreciarán que la invención descrita en la presente memoria es susceptible a variaciones y modificaciones distintas de las descritas específicamente, lo que incluye la adición de otros componentes de factores de riesgo que pueden ser relevantes para diferentes poblaciones de pacientes o combinaciones de la terapia de inhibición de la telomerasa con otros tratamientos. Debe entenderse que la invención incluye todas estas variaciones y modificaciones. La invención incluye, además, todas las etapas, características, composiciones y compuestos referidos o indicados en la memoria descriptiva, individual o colectivamente, y cualquiera y todas las combinaciones o cualquiera de dos o más de las etapas o características.

La presente invención no se limita en su ámbito por las realizaciones específicas descritas en la presente memoria, las que se destinan para el propósito de ejemplificación solamente. Los productos, composiciones y procedimientos funcionalmente equivalentes están claramente dentro del ámbito de la divulgación como se describe en la presente memoria.

5

A. Definiciones

Los términos más abajo tienen los siguientes significados, a menos que se indique de cualquier otra manera.

10 Un "sujeto mamífero", "sujeto" o "paciente" se refiere a un mamífero. Para los propósitos de la presente invención, mamíferos incluye humanos; mamíferos agrícolaemente importantes, tales como ganado vacuno, caballos, ovejas; y/o mamíferos veterinarios, tales como gatos, conejos, roedores y perros. Un "paciente" significa un sujeto que recibe tratamiento médico o veterinario.

15 Una "dosis" significa la cantidad que se administra en un tiempo, tal como una cantidad específica de medicamento. Para GRN163L, la dosis inicial para adultos es de aproximadamente 0,8 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg; de aproximadamente 1,6 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. La dosis para adultos de GRN163L es de aproximadamente 1,6 mg/kg; o aproximadamente 3,2 mg/kg; o aproximadamente 4,8 mg/kg; o aproximadamente 6,2 mg/kg; o aproximadamente 7,2 mg/kg; o aproximadamente 9 mg/kg; o aproximadamente 12 mg/kg; a
20 aproximadamente 20 mg/kg. La dosis puede administrarse dos veces a la semana, una vez a la semana o a otras tasas de administración. Pueden requerirse dosis más altas para producir la remisión deseada en algunos pacientes. Las dosis pueden administrarse mediante una infusión de 2 - 24 horas, con mayor preferencia, mediante una infusión de 2 - 4 horas.

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

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

35 "Evento adverso" o "reacción adversa" significa el desarrollo de una condición médica indeseable o el deterioro de una condición médica preexistente después o durante la exposición a un producto farmacéutico. Puede seleccionarse una reacción adversa entre trombocitopenia, anemia, leucopenia o neutropenia. Cuando la reacción adversa es trombocitopenia y la suma del componente del telómero y el componente de dosis y una constante determina la disminución en el porcentaje del conteo de plaquetas del sujeto mamífero a partir del conteo de plaquetas del sujeto antes del tratamiento. Cuando la reacción adversa es trombocitopenia, la reacción adversa
40 puede ser cualquier grado de trombocitopenia. La reacción adversa puede ser trombocitopenia de grados 3 o 4.

La trombocitopenia se ha clasificado en diferentes grados en dependencia del número de plaquetas en la sangre del sujeto mamífero.

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

55 El término "neutropenia" significa la presencia de cantidades anormalmente pequeñas de neutrófilos en la sangre.

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

60 El término "anemia" significa una deficiencia en el componente de la sangre que transporta el oxígeno, medido en concentraciones de volumen unitario de hemoglobina, volumen de glóbulos rojos o número de glóbulos rojos.

El término "número de plaquetas inicial" significa el número de plaquetas por microlitro de sangre del sujeto mamífero antes del tratamiento con el inhibidor de la telomerasa.

65 "Relación beneficio-riesgo" significa la relación entre los riesgos y beneficios de un tratamiento o procedimiento dado. Un riesgo aceptable se relaciona con el potencial de experimentar una enfermedad o lesión que se tolerará por un individuo a cambio de los beneficios de usar una sustancia o procedimiento que provocará tal enfermedad o

lesión. La aceptabilidad del riesgo depende de datos científicos, factores sociales y económicos, y de los beneficios percibidos que surgen de una sustancia química o fármaco que crea el(los) riesgo(s) en cuestión.

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

Un "inhibidor de la telomerasa" es un compuesto que inhibe o bloquea directa o indirectamente la expresión o actividad de la telomerasa. Un inhibidor de la telomerasa se dice que inhibe o bloquea la telomerasa si la actividad de la telomerasa en presencia del compuesto es menor que la observada en ausencia del compuesto. Preferentemente, la telomerasa es telomerasa humana. Preferentemente, el inhibidor de la telomerasa es un inhibidor del sitio activo. Con mayor preferencia, el inhibidor de la telomerasa es un antagonista de la plantilla de hTR.

Un "polinucleótido" u "oligonucleótido" se refiere a un polímero u oligómero de subunidad de ribosa y/o desoxirribosa nucleósido que tiene de aproximadamente 2 a aproximadamente 200 subunidades contiguas, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 subunidades contiguas, de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 subunidades. Las subunidades de nucleósidos pueden unirse mediante una variedad de enlaces entre subunidades, lo que incluye, pero no se limita a, enlaces fosodiéster, fosotriéster, metilfosfonato, fosforamidato $P3' \rightarrow N5'$, tiofosforamidato $N3' \rightarrow P5'$, tiofosforamidato $N3' \rightarrow P5'$ y fosforotioato. El término también incluye los polímeros u oligómeros que tienen modificaciones, conocidas por un experto en la técnica, en el azúcar (por ejemplo, sustituciones 2'), la base (ver la definición de "nucleósido" más abajo) y los extremos terminales 3' y 5'. En realizaciones donde el resto oligonucleótido incluye una pluralidad de enlaces entre subunidades, cada enlace puede formarse mediante el uso de la misma química, o puede usarse una mezcla de químicas de enlace. Cuando un oligonucleótido se representa mediante una secuencia de letras, tales como "ATGUCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en el orden 5' $\rightarrow$ 3' de izquierda a derecha. La representación de la secuencia de bases del oligonucleótido de esta manera no implica el uso de ningún tipo particular de subunidad internucleosídica o de modificaciones en el componente base o en cualquier otra parte del oligonucleótido.

El término "nucleósido" incluye los nucleósidos naturales, lo que incluye las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Komberg y Baker, DNA Replication, 2da Ed. (Freeman, San Francisco, 1992) y los análogos. Los "análogos", en referencia a los nucleósidos, incluyen nucleósidos sintéticos que tienen restos de nucleobase modificados (ver la definición de "nucleobase" más abajo) y/o restos de azúcar modificados, por ejemplo, los descritos generalmente por Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley, Nueva York, 1980)). Tales análogos incluyen nucleósidos sintéticos diseñados para mejorar las propiedades de unión, por ejemplo, estabilidad, especificidad o similares, tal como los divulgados por Uhlmann y Peyman (Chemical Reviews 90:543-584, 1990). Un oligonucleótido que contiene tales nucleósidos, y que contiene típicamente enlaces internucleosídicos sintéticos resistentes a nucleasas, puede denominarse en sí mismo como un "análogo".

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

Un oligonucleótido que tiene "enlaces resistentes a nucleasas" se refiere a uno cuya cadena principal tiene enlaces de subunidades que son sustancialmente resistentes a la escisión por nucleasas, en forma no hibridada o hibridada, por nucleasas extracelulares e intracelulares comunes en el cuerpo; es decir, el oligonucleótido muestra poca o ninguna escisión por nucleasa en condiciones normales de nucleasa en el cuerpo al que se expone el oligonucleótido. Los enlaces fosforamidato $N3' \rightarrow P5'$ (NP) o tiofosforamidato $N3' \rightarrow P5'$ (NPS) descritos más abajo son resistentes a las nucleasas.

El término "lípidos" se usa ampliamente en la presente memoria para abarcar sustancias que son solubles en solventes orgánicos, pero escasamente solubles, si acaso, en agua. El término lípidos incluye, pero no se limita a, hidrocarburos, aceites, grasas (tales como ácidos grasos y glicéridos), esteroides, esteroides y formas derivadas de estos compuestos. Los lípidos preferidos son los ácidos grasos y sus derivados, los hidrocarburos y sus derivados, y los esteroides, tales como el colesterol.

Los ácidos grasos contienen generalmente números pares de átomos de carbono en una cadena lineal (comúnmente 12-24 carbonos) y pueden ser saturados o insaturados, y pueden contener, o modificarse para contener, una variedad de grupos sustituyentes. Por simplicidad, el término "ácido graso" también abarca derivados de ácidos grasos, tales como grasas o ésteres.

El término "hidrocarburo" abarca compuestos que consisten únicamente en hidrógeno y carbono, unidos por enlaces covalentes. El término abarca los hidrocarburos de cadena abierta (alifáticos), lo que incluye los hidrocarburos de

cadena lineal y ramificada, y los saturados, así como también los hidrocarburos mono y poliinsaturados. El término también abarca hidrocarburos que contienen uno o más anillos aromáticos.

Como se usa en la presente memoria, el término "lípidos" también incluye compuestos anfipáticos que contienen tanto restos lipídicos como hidrofílicos.

El término "tumor", como se usa en la presente memoria, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Un "producto farmacéutico mejorador" es un producto farmacéutico que puede disminuir o eliminar el riesgo de desarrollar la reacción adversa. Por ejemplo, el Oprelvekin (NEUMEGA™, Wyeth) se aprobó para la prevención de trombocitopenia grave después de la quimioterapia mielosupresora en pacientes adultos con neoplasias malignas no mieloides. Otro fármaco, Romiplostin (NPLATE™, Amgen Inc.) se ha aprobado para el tratamiento de la púrpura trombocitopénica idiopática crónica (ITP).

Un "cáncer" puede ser un tumor maligno. Al menos el 80% de todos los cánceres son carcinomas, e incluyen, pero no se limitan a, cáncer de mama, tanto carcinomas ductales como lobulares de la mama; cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer testicular, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer de faringe, cáncer rectal, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario; cáncer de hígado (o que incluye el carcinoma hepatocelular), cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, cáncer renal, cáncer de piel (lo que incluye el carcinoma de células basales, el cáncer de piel distinto de melanoma más común y el carcinoma de células escamosas, una forma común de cáncer de piel) y cáncer de cerebro. Las células cancerosas que forman un carcinoma se denominan "células de carcinoma". También se incluyen en el término "cáncer" los cánceres de las células sanguíneas tales como leucemias, linfomas y mielomas y los cánceres de otros tipos de tejidos tales como sarcomas, mesoteliomas, gliomas, melanoma, neuroblastoma, etcétera.

En la presente memoria se usa un "pronóstico" para referirse a la predicción de la probabilidad de una reacción adversa al tratamiento con un inhibidor de la telomerasa. El término "predicción" se usa en la presente memoria para referirse a la probabilidad de que un paciente o sujeto mamífero responda ya sea de manera favorable o desfavorable a un fármaco o un conjunto de fármacos, y también al grado de esas respuestas. El término "terapia adyuvante" se usa generalmente para referirse al tratamiento que se administra adicionalmente a un tratamiento primario (inicial). En el tratamiento del cáncer, el término "terapia adyuvante" se usa para referirse a la quimioterapia, la terapia hormonal y/o la radioterapia después de la extirpación quirúrgica del tumor, con el objetivo principal de reducir el riesgo de recurrencia del cáncer.

B. Descripción detallada

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de cualquier otra manera, técnicas convencionales de biología molecular, microbiología, biología celular y bioquímica, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, tales como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da edición (Sambrook y otros, 1989); Oligonucleotide Synthesis: A practical Approach (ed M.J. Gait, 1984); "Current Protocols in Molecular Biology" (F.M. Ausubel y otros, eds. 1987) y "PCR: The Polymerase Chain Reaction" (Mullis y otros, eds., 1994).

La presente divulgación proporciona un algoritmo para determinar la probabilidad de una reacción adversa al tratamiento con un inhibidor de la telomerasa. El procedimiento es en base a la identificación de (1) el promedio o la mediana de la longitud de los telómeros en unas células de un paciente y la dosis del inhibidor de la telomerasa recibida puede servir para determinar la probabilidad de que el paciente experimente una reacción adversa a la terapia con el inhibidor de la telomerasa, (2) ciertos pesos asignados al promedio o la mediana de la longitud de los telómeros y a la dosis reflejan su valor en predecir la respuesta a la terapia y se usan en una fórmula; y (3) la determinación de los valores umbrales usados para dividir a los pacientes en grupos con diversos grados de riesgo de desarrollar una reacción adversa, tales como grupos de bajo, mediano y alto riesgo o grupos en los que la probabilidad de una reacción adversa a los inhibidores de la telomerasa es baja, media o alta. El algoritmo produce una puntuación numérica que puede usarse para tomar decisiones de tratamiento relacionadas con la terapia de pacientes con cáncer.

1. Técnicas para la determinación de la longitud del telómero.

Se dispone de diversos procedimientos para medir la longitud de las repeticiones de telómeros en células. Generalmente, las células cuyos telómeros se medirán se aíslan a partir de la muestra biológica del paciente. El ADN se aísla de las células mediante procedimientos que se conocen en la técnica, tales como, por ejemplo, protocolos de proteinasa K, ARNasa A y fenol/cloroformo (Sambrook y otros Molecular Cloning: a Laboratory Manual 2da ed. (1989) o el uso de kits de purificación de ADN disponibles comercialmente.

A. Análisis de transferencia de Southern

Un procedimiento para el análisis de las longitudes de los telómeros es medir la longitud del fragmento de restricción terminal (TRF) mediante análisis de transferencia de Southern. En este procedimiento, el ADN celular se digiere con las enzimas de restricción, tales como Hinf1 y Rsa1, y se procesa en geles de agarosa para transferencia a filtros Nytran. Los filtros se hibridan con una sonda específica de telómero tal como (TTAGGG)_n. Las autorradiografías se generan sin pantalla intensificadora mediante el uso del intervalo de respuesta lineal de la película y se exploran con un densitómetro. La salida se digitaliza. La longitud media del telómero se define como $\sum(OD_i)/\sum(OD_i/L_i)$ donde OD_i es la salida del densitómetro (unidades arbitrarias) y L_i es la longitud del ADN en la posición i. Las sumas se calculan a lo largo del intervalo de 3-17 KB. Este cálculo asume que el ADN se transfiere con la misma eficiencia desde todos los puntos en el gel y que el número de secuencias objetivo (repeticiones de telómeros) por fragmento de ADN es proporcional a la longitud del ADN. La señal desde los geles puede normalizarse con respecto a la señal de otras transferencias de Southern mediante el uso de una sonda control para estimar la cantidad total de ADN telomérico, así como también su longitud. (Harley y otros, Nature 345:458-460 (1990), Englehardt y otros, Leukemia 12:13-24 (1998)). Este procedimiento también proporciona la distribución del tamaño de las longitudes de los telómeros en la población celular a partir de la que se aisló el ADN. Dado que los telómeros cortos son particularmente susceptibles a la disfunción de los telómeros, las modificaciones a la presente invención podrían incluir cálculos en base a la media o la mediana de la longitud del telómero de los telómeros cortos (por ejemplo, para el cuartil más corto de los telómeros).

B. Reacción en cadena de la polimerasa

Se han desarrollado procedimientos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para medir el promedio y las longitudes de telómeros específicos en cromosomas. El primer procedimiento proporciona una medida de ADN telomérico con relación al ADN genómico (típicamente un gen de copia única) como un valor de relación único de una muestra de ADN genómico (Cawthon RM, Nucl. Acids Res. Vol 30, pág. e47).

En el análisis de longitud de telómero único (STELA) se determinan las longitudes de los telómeros de cromosomas individuales (Baird y otros, Nature Genetics 33 203-207 (2003)). En este procedimiento, el ADN se digiere con una enzima de restricción tal como EcoRI y se cuantifica mediante fluorometría Hoechst. Un enlazador o "telorette" comprende varias bases complementarias a la región monocatenaria TTAGGG del cromosoma, precedida en el extremo 5' por unos 20 nucleótidos de una secuencia de ADN única. Este telorette se hibrida al saliente TTAGGG al final del telómero y se liga al extremo 5' de la cadena complementaria rica en C del cromosoma. Esto etiqueta eficazmente el extremo del telómero con una cola de telorette que tiene una secuencia única capaz de unirse a uno de los cebadores de PCR. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realiza mediante el uso de un cebador ("telotail") que es complementario a la cola del telorette, junto con un cebador que corresponde a la región cromosómica adyacente al telómero. El cebador correspondiente a la región cromosómica adyacente al telómero también puede hacerse específico para el cromosoma al explotar los polimorfismos cromosómicos. Después de la PCR. Los fragmentos de ADN se resuelven con electroforesis en gel de agarosa y se detectan mediante hibridación por transferencia de Southern con una sonda adyacente al telómero cebado aleatoriamente. El tamaño de los fragmentos hibridados puede determinarse a partir de estándares de tamaño en el gel y usarse para calcular la longitud de los telómeros individuales. Este procedimiento proporciona, además, la distribución del tamaño de los telómeros del cromosoma específico tomado como objetivo en la población celular de la que se aisló el ADN. Dado que la PCR sesga la amplificación de fragmentos cortos de ADN, el análisis STELA es particularmente útil para el análisis de los telómeros más cortos en una célula. Esto tiene aplicación en la presente invención como se describió anteriormente.

C. Citometría de flujo y análisis de FISH

El promedio o la mediana de la longitud de las repeticiones de telómeros en las células también puede determinarse mediante el uso de hibridación fluorescente in situ (FISH) con sondas de ácido nucleico peptídico (PNA) marcado específicas para repeticiones de telómeros en combinación con mediciones de fluorescencia mediante citometría de flujo (Flow FISH). (Ver Baerlocher y otros, Nature Protocols vol. 1 2365-2376 (2006)). La ventaja de Flow FISH es que proporciona información de múltiples parámetros sobre la longitud de las repeticiones de telómeros en miles de células individuales. El Flow FISH multicolor automatizado es uno de los procedimientos más rápidos y sensibles disponibles para medir el promedio o la mediana de la longitud de los telómeros en granulocitos, células T vírgenes, células T de memoria, células B y células asesinas naturales (NK) en sangre humana. (Baerlocher y Lansdorp, Methods in Cell Biol. 75, 719-750 (2004)).

En el Flow FISH se centrifuga la sangre completa, se lisan los glóbulos rojos y se separa el lisado de glóbulos rojos del sedimento celular que consiste en granulocitos, monocitos, linfocitos, plaquetas y cualquier resto de glóbulos rojos. El sedimento de glóbulos blancos se resuspende en un tampón de hibridación y se cuenta. Las células sanguíneas humanas nucleadas se mezclan con timocitos bovinos, que se incluyen como control interno, ya que estas células se obtienen fácilmente y debido a que la longitud de los telómeros en los timocitos bovinos es aproximadamente 2-3 veces más larga de lo que miden normalmente en las células humanas. En consecuencia, estas células de control se distinguen fácilmente de las células de prueba humanas y proporcionan un punto de referencia para las mediciones por fluorescencia de los telómeros. La mezcla de células humanas y timocitos bovinos se hibrida con la sonda de PNA (ácido nucleico peptídico) marcado con Cy5 o fluoresceína que es

complementaria a la secuencia de repetición de telómeros. Una segunda mezcla de las células no se hibrida con la sonda. Esto último se requiere para medir el nivel de autofluorescencia en las células de interés y para permitir que se calcule la longitud de los telómeros a partir de la hibridación con el PNA específico. La sonda de PNA con fluoresceína o Cy5 está disponible comercialmente. Después de la hibridación, las células sedimentan y el sedimento celular se lava. Las células pueden contrateñirse con concentraciones no saturantes de un colorante de ADN y diversos anticuerpos. Las muestras de células se analizaron en un citómetro de flujo.

La primera etapa en el análisis posterior es identificar las células mediante el uso de dispersión de luz frontal y lateral en un gráfico de puntos bivariado. Pueden observarse tres poblaciones celulares. Los timocitos bovinos pueden distinguirse de los linfocitos humanos, que a su vez pueden distinguirse de los granulocitos. Al combinar la fluorescencia en los gráficos de contorno, pueden obtenerse histogramas de fluorescencia de las diferentes poblaciones celulares, que se usan para los cálculos posteriores de la longitud de los telómeros. Pueden usarse anticuerpos específicos para las células CD45RA y CD20 para realizar el análisis de la longitud de los telómeros de poblaciones específicas dentro de la población de linfocitos. La longitud promedio de los telómeros puede determinarse al restar la fluorescencia de las poblaciones de glóbulos blancos sin teñir del nivel de fluorescencia de las células teñidas con PNA. Este procedimiento recolecta una señal de telómero promedio de cada célula individual, por lo tanto, puede obtenerse la distribución del tamaño de los telómeros de la población general, y podría analizarse el subconjunto de células con telómeros cortos. Esto tiene aplicación en la presente invención como se describió anteriormente.

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

Un aspecto divulgado es el uso de la longitud promedio de los telómeros medida en las células del paciente para proporcionar información con respecto a la probabilidad de una reacción adversa a un inhibidor de la telomerasa antes de la administración de un inhibidor de la telomerasa. En la siguiente etapa, la longitud promedio de los telómeros medida se multiplica por un coeficiente que refleja su contribución relativa al riesgo de reacción adversa al tratamiento con un inhibidor de la telomerasa para determinar el componente de longitud del telómero.

La siguiente etapa es tomar la dosis prevista del inhibidor de la telomerasa y multiplicar la dosis por un coeficiente que refleja su contribución relativa al riesgo de reacción adversa al tratamiento con un inhibidor de la telomerasa para determinar el componente de dosis.

El componente de longitud del telómero y el componente de dosis se suman con un factor de intercepto para determinar la probabilidad de la reacción adversa.

Por ejemplo, la ecuación para describir el número predicho de plaquetas en el nadir de plaquetas en un paciente después de 4 semanas completas de tratamiento es la siguiente:

Número predicho de plaquetas = número de plaquetas iniciales – (número de plaquetas iniciales x % de cambio en las plaquetas/100).

% de cambio en número de plaquetas = (-73,8) – 6,6 x dosis del inhibidor (mg/kg) + 11,2 x longitud promedio de los telómeros (kpb)

La ecuación para describir el número predicho de plaquetas en el nadir de plaquetas en un paciente durante las primeras 4 semanas de tratamiento es la siguiente:

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

Los intervalos de predicción pueden calcularse, por ejemplo, para predecir un probable cambio porcentual en los niveles de plaquetas o el nadir de plaquetas para pacientes o sujetos con un conjunto particular de valores iniciales y de tratamiento, por ejemplo, longitud de los telómeros, plaquetas basales y nivel de dosis. La ecuación de regresión proporciona el valor esperado para un futuro individuo con covariantes específicas (J. Neter y otros Applied linear statistical models: regression, analysis of variance, and experimental designs, 3ra edición págs. 81-83 (1990)). Sin embargo, debido al error de distribución del muestreo, así como también a la variabilidad entre individuos, un paciente puede tener niveles de plaquetas que se encuentran por encima o por debajo de ese valor predicho. Puede crearse una serie de intervalos de predicción con una cobertura decreciente. Por ejemplo, puede crearse un intervalo de predicción del 99 % con límites superiores e inferiores P_{U99} y P_{L99} y en promedio, contendría el 99 % de los niveles de plaquetas observados en los pacientes. Puede crearse un intervalo de predicción del 90 % con límites superiores e inferiores P_{U90} ($< P_{U99}$) y P_{L90} ($> P_{L99}$) y en promedio, contendría el 90 % de los niveles futuros de plaquetas observados. Esto permite determinar la probabilidad de que el paciente desarrolle una trombocitopenia de grado 3 o 4.

La probabilidad de riesgo de una reacción adversa, según se determina mediante el algoritmo de la presente invención, proporciona herramientas valiosas para que el médico en ejercicio tome decisiones fundamentales de tratamiento. De esta forma, si el riesgo de un paciente en particular es bajo, el médico podría decidir que después de la extirpación quirúrgica del cáncer, el paciente puede tratarse agresivamente con altas dosis y alta frecuencia de administración del inhibidor de la telomerasa. Si, por otro lado, se determina que el nivel de riesgo es alto, esta información puede usarse para decidir el nivel de dosis del inhibidor de la telomerasa a administrar, el régimen de dosificación a usar, lo que incluye el uso de semanas sin administrar dosis, llamadas semanas de "descanso". El médico puede decidir monitorear el paciente más estrechamente para detectar reacciones adversas, tales como trombocitopenia. El médico puede decidir administrar un producto farmacéutico mejorador simultáneamente con el inhibidor de la telomerasa. Si el riesgo del paciente de sufrir una reacción adversa es alto, pueden usarse otras modalidades de tratamiento para combatir el cáncer en ese paciente en particular. Otras modalidades de tratamiento para un cáncer en particular incluyen, por ejemplo, otras quimioterapias tales como tratamientos basados en antraciclina y/o taxanos, inhibidores de HER, inhibidores de EGFR y/u otras opciones de tratamiento, tales como solo radioterapia, antes o después de la quimioterapia.

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

La telomerasa es una ribonucleoproteína que cataliza la adición de secuencias de repetición teloméricas (que tienen la secuencia 5'-TTAGGG-3' en humanos) a los extremos cromosómicos. Se ha demostrado que una variedad de células cancerosas son positivas a la telomerasa, lo que incluye las células de cáncer de piel, tejido conectivo, adiposo, mama, pulmón, estómago, páncreas, ovario, cuello uterino, útero, riñón, vejiga, colon, próstata, sistema nervioso central (SNC), retina y tumores hematológicos (tales como mieloma, leucemia y linfoma). El direccionamiento de la telomerasa puede ser eficaz al proporcionar tratamientos que discriminan en gran medida entre las células malignas y las normales, lo que evita muchos de los efectos secundarios nocivos que pueden acompañar a los regímenes quimioterapéuticos que se dirigen indiscriminadamente a las células en división.

Los inhibidores de la telomerasa identificados hasta la fecha incluyen oligonucleótidos, preferentemente, oligonucleótidos que tienen enlaces resistentes a nucleasas, así como también compuestos de moléculas pequeñas.

A. Compuestos de Moléculas Pequeñas

Los inhibidores de moléculas pequeñas de la telomerasa incluyen, por ejemplo, BRACO19 ((9-(4-(N,N-dimetilamino)fenilamino)-3,6-bis(3-pirrolodino propionamido)acridina (ver Mol. Pharmacol. 61(5):1154-62, 2002); DODC (dietiloxadicarbocianina) y telomestatina. Estos compuestos pueden actuar como estabilizadores G-quad, que promueven 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-enilamino]benzoico) (ver Ward y Autexier, Mol. Pharmacol. 68:779-786, 2005; además, J. Biol. Chem. 277(18):15566-72, 2002); AZT y otros análogos de nucleósidos, tales como ddG y ara-G (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 5,695,932 y 6,368,789) y ciertos derivados de tiopiridina, benzo[b]tiofeno y pirido[b]tiofeno, descritos por Gaeta y otros en las patentes de Estados Unidos núms. 5,767,278, 5,770,613, 5,863,936, 5,656,638 y 5,760,062. Un ejemplo es la 3-clorobenzo[b]tiofeno-2-carboxi-2'-[(2,5-diclorofenilamino)tia]hidrazina, descrito en la patente de Estados Unidos núm. 5,760,062.

B. Inhibidores de la Telomerasa basados en oligonucleótidos: Secuencia y composición

Los genes que codifican tanto los componentes de proteína como de ARN de la telomerasa humana se han clonado y secuenciado (ver las patentes de Estados Unidos Núms. 6,261,836 y 5,583,016, respectivamente. Los oligonucleótidos pueden dirigirse contra el ARNm que codifica el componente de proteína 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 de la telomerasa (cuya forma humana se conoce como ARN telomerasa humana, o hTR). patentes de Estados Unidos núms. 5,583,016; 5,776,679; 5,837,857.

La secuencia plantilla del componente de ARN de la telomerasa se ubica dentro de la región definida por los nucleótidos 46-56 (5'-CUAACCCUAAC-3') (SEQ ID NO:1), que es complementaria a una secuencia telomérica compuesta de aproximadamente uno y dos tercios de unidades de repetición teloméricas. La región plantilla 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 (ver, por ejemplo, Chen y otros, Cell 100:503-514, 2000; Kim y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98 (14):7982-7987, 2001). El diseño de agentes antisentido, ribozima o ARN interferente pequeño (ARNip) para inhibir o provocar la destrucción de los ARNm se conoce bien (ver, por ejemplo, Lebedeva, I, y otros Annual Review of Pharmacology and Toxicology, vol. 41: 403-419, abril de 2001; Macejak, D, y otros, Journal of Virology, vol. 73 (9): 7745-7751, septiembre de 1999 y Zeng, Y. y otros, PNAS vol. 100 (17) págs. 9779-9784, 19 de agosto de 2003) y tales agentes pueden diseñarse para dirigirse el ARNm de la hTERT y de esta manera, inhibir la producción de proteína hTERT en una célula objetivo, tal como una célula cancerosa (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 6,444,650 y 6,331,399).

Los oligonucleótidos que se dirigen a la hTR (es decir, el componente de ARN de la enzima) actúan como inhibidores de la actividad de la enzima telomerasa al bloquear o interferir de cualquier otra manera con la interacción de la hTR con la proteína hTERT, cuya interacción es necesaria para la función de la telomerasa. Ver, por ejemplo, Villeponteau y otros, patente de los Estados Unidos núm. 6,548,298.

Una región objetivo preferida de hTR es la región plantilla, que abarca los nucleótidos 30-67 del componente de ARN de la telomerasa humana. Los oligonucleótidos que se dirigen a esta región se denominan en la presente memoria "inhibidores de la plantilla de hTR" (ver por ejemplo Herbert y otros, *Oncogene* 21(4):638-42 (2002).) Preferentemente, tal oligonucleótido incluye una secuencia que es complementaria o casi complementaria a alguna porción de la región de 11 nucleótidos que tiene la secuencia 5'-CUAACCCUAAC-3' (SEQ ID NO:1), que abarca los nucleótidos 46-56 del componente de ARN de la telomerasa humana (hTR).

Otra región objetivo preferida es la región que abarca los nucleótidos 137-179 de la telomerasa humana (hTR) (ver Pruzan y otros, *Nucl. Acids Research*, 30:559-568, 2002). Dentro de esta región, la secuencia que abarca 141-153 es un objetivo preferido. La publicación PCT WO 98/28442 describe el uso de oligonucleótidos de al menos 7 nucleótidos de longitud para inhibir la telomerasa, donde los oligonucleótidos se diseñan para ser complementarios a las porciones accesibles de la secuencia de hTR fuera de la región plantilla, lo que incluye los nucleótidos 137-196, 290-319 y 350-380 de la 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 pueden tolerarse errores de apareamiento en ciertos casos, se espera que disminuyan la especificidad y la actividad del conjugado oligonucleotídico resultante. En realizaciones particulares, la secuencia de bases del oligonucleótido se selecciona por lo tanto para incluir una secuencia de al menos 5 nucleótidos exactamente complementarios al objetivo de hTR, y puede obtenerse una inhibición de la telomerasa mejorada si se emplean longitudes crecientes de secuencia complementaria, tales como al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 13 o al menos 15 nucleótidos exactamente complementarios al objetivo 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 complementarios a la secuencia objetivo de la hTR.

Puede obtenerse una actividad inhibidora de la telomerasa óptima cuando se selecciona la longitud completa del oligonucleótido para que sea complementaria a la secuencia objetivo de la hTR. Sin embargo, no es necesario que la longitud completa del oligonucleótido sea exactamente complementaria a la secuencia objetivo, y la secuencia de oligonucleótidos puede incluir regiones que no son complementarias a la secuencia objetivo. Tales regiones pueden añadirse, por ejemplo, para conferir otras propiedades al compuesto, tales como secuencias que facilitan la purificación. Alternativamente, un oligonucleótido puede incluir múltiples repeticiones de una secuencia complementaria a una secuencia objetivo de la hTR.

El procedimiento incluye administrar al sujeto un inhibidor de la telomerasa de oligonucleótidos del tipo compuesto por un oligonucleótido que tiene enlaces entre subunidades resistentes a nucleasas y una secuencia de oligonucleótidos eficaz para unirse mediante hibridación específica de secuencia a una región plantilla de la hTR. Preferentemente, la cantidad del inhibidor de la telomerasa es eficaz para inhibir la proliferación de células cancerosas en el sujeto cuando solo se administra el inhibidor de la telomerasa.

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

Los enlaces internucleósidos en el 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 fosforotioato. Típicamente, pero no necesariamente, todos los enlaces internucleósidos dentro del oligonucleótido serán del mismo tipo, aunque el componente oligonucleótido puede sintetizarse mediante el uso de una mezcla de enlaces diferentes.

En realizaciones preferentes, el oligonucleótido tiene al menos un enlace fosforamidato N3'→P5' (NP) o tiofosforamidato N3'→P5' (NPS), cuyo enlace puede representarse mediante la estructura: 3'-(-NH-P(=O)(-XR)-O-)-5', en el que X es O o S y R se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y arilo; y sales farmacéuticamente aceptables de estos, cuando XR es OII o SH. Con mayor preferencia, el oligonucleótido incluye todos los enlaces NP o, con la máxima preferencia, todos los NPS.

Una secuencia particularmente preferida para un oligonucleótido inhibidor de plantilla de hTR es la secuencia complementaria a los nucleótidos 42-54 de la hTR. El oligonucleótido que tiene esta secuencia (TAGGGTTAGACAA) (SEQ ID NO:2) y enlaces de tiofosforamidato N3'→P5' (NPS) se designa en la presente

memoria como GRN163. Ver, por ejemplo, Asai y otros, *Cancer Research* 63:3931-3939 (2003); Gryaznov y otros, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 22(5-8):577-81 (2003).

Estos compuestos pueden prepararse como se describe, por ejemplo, en McCurdy y otros, *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 y otros, *J. Org. Chem.* 62:7278-7287 (1997) o mediante los procedimientos descritos en Gryaznov y otros, *Publicación de Solicitud de Estados Unidos* Núm. 2006/0009636.

Puede usarse una variedad de enfoques sintéticos para conjugar un resto lipídico L con el oligonucleótido, en dependencia de la naturaleza del enlace seleccionado; ver, por ejemplo, Mishra y otros, *Biochim. et Biophys. Acta* 1264:229-237 (1995), Shea y otros, *Nucleic Acids Res.* 18:3777-3783 (1995) o Rump y otros, *Bioconj. Chem.* 9:341-349 (1995). Típicamente, la conjugación se logra mediante el uso de grupos funcionales adecuados en un extremo terminal del oligonucleótido. Por ejemplo, el grupo 3'-amino presente en el extremo terminal 3' de los oligonucleótidos NP y NPS puede hacerse reaccionar con ácidos carboxílicos, cloruros de ácido, anhídridos y ésteres activos, mediante el uso de catalizadores de acoplamiento adecuados, para formar un enlace amida. Los grupos tiol también son adecuados como grupos funcionales (ver Kupihar y otros, *Bioorg. Med. Chem.* 9:1241-1247 (2001)). Diversos modificadores funcionalizados con amino y tiol de diferentes longitudes de cadena están disponibles comercialmente para la síntesis de oligonucleótidos.

Los enfoques específicos para unir grupos lipídicos a un extremo terminal de un oligonucleótido NP o NPS incluyen aquellos descritos en la *Publicación de Solicitud de Estados Unidos* Núm. 2005/0113325. Además de los enlaces amida mencionados anteriormente, por ejemplo, los lípidos también pueden unirse a la cadena de oligonucleótidos mediante el uso de un derivado de fosforamido del lípido, para producir un enlace fosforamido o tiofosforamido que conecta el lípido y el oligonucleótido. El grupo 3'-amino libre del oligonucleótido totalmente protegido unido al soporte también puede hacerse reaccionar con un aldehído lipídico adecuado, seguido de reducción con cianoborohidruro de sodio, lo que produce un enlace amina.

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

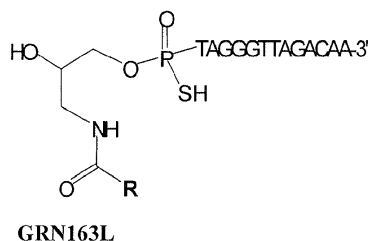
El oligonucleótido GRN163 también se ha probado y demostrado ser terapéuticamente eficaz en una variedad de modelos tumorales en animales, lo que incluye ovario y pulmón, tanto de células pequeñas como no pequeñas.

C. Conjugados lípido-oligonucleótido

Preferentemente, el inhibidor de enzima basado en oligonucleótidos incluye al menos un grupo lipídico unido covalentemente (ver *Publicación de Estados Unidos* Núm. 2005/0113325). Esta modificación proporciona propiedades superiores de captación celular, de modo que puede obtenerse un efecto biológico equivalente mediante el uso de cantidades más pequeñas del oligonucleótido conjugado en comparación con la forma no modificada. Cuando se aplica al contexto terapéutico humano, esto puede traducirse en menores riesgos de toxicidad y ahorro de costos.

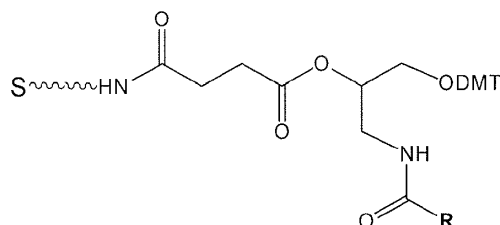
El grupo lipídico L es típicamente un hidrocarburo alifático o ácido graso, lo que incluye derivados de hidrocarburos y ácidos grasos, donde los ejemplos son compuestos saturados de cadena lineal que tienen de 14-20 carbonos, tales como ácido mirístico (tetradecanoico), ácido palmítico (hexadecanoico) y ácido esteárico (octadecanoico) y sus correspondientes formas hidrocarbonadas alifáticas, tetradecano, hexadecano y octadecano. Ejemplos de otros grupos lipídicos adecuados que pueden emplearse son los esteroides, tales como el colesterol, y los ácidos grasos e hidrocarburos sustituidos, particularmente las formas polifluoradas de estos grupos. El ámbito del grupo lipídico L incluye derivados tales como derivados de amina, amida, éster y carbamato. El tipo de derivado se determina a menudo por el modo de enlace con el oligonucleótido, como se ejemplifica más abajo.

En una estructura ilustrativa, el resto lipídico es palmitoilamida (derivado del ácido palmítico), conjugado a través de un enlazador de aminoglicerol al grupo 5'-tiofosfato de un oligonucleótido unido por NPS. El oligonucleótido NPS que tiene la secuencia mostrada para GRN163 y conjugada de esta manera (como se muestra más abajo) se designa en la presente memoria GRN163L. En una segunda estructura ilustrativa, el lípido, como una palmitoilamida, se conjuga a través del grupo amino terminal 3' de un oligonucleótido NPS.

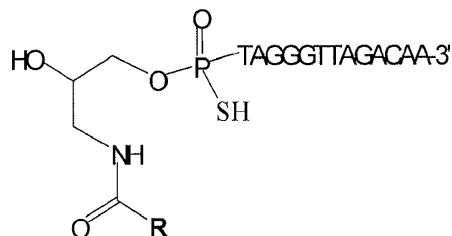


R = $-(CH_2)_{14}CH_3$ (palmitoil)

Para la unión de un lípido al extremo terminal 5', como también se describe en la Publicación de Solicitud de Estados Unidos Núm. 2005/0113325, el oligonucleótido puede sintetizarse mediante el uso de un soporte sólido modificado que contiene lípidos. La reacción del 3-amino-1,2-propanodiol con un cloruro de acilo graso ($RC(O)Cl$), seguido de la dimetoxitritilación del alcohol primario y la succinilación del alcohol secundario, proporciona un intermedio que después se acopla, a través del grupo succinil carboxilo libre, al soporte sólido. A continuación se muestra un ejemplo de un soporte modificado, donde S-- representa un soporte CPG de alquilamina de cadena larga y R representa un lípido.



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



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

IV. Administración

El cáncer también debe ser uno que responda a la inhibición de las células cancerosas mediante la inhibición de la telomerasa. Como se señaló anteriormente, los oligonucleótidos inhibidores de la telomerasa, como se ejemplifica mediante GRN163 y GRN163L, han mostrado actividad inhibitoria *in vitro* contra las células cancerosas humanas de riñón, de pulmón, pancreáticas, de cerebro, de colon, de próstata, de mama, leucemia, linfoma, mieloma, epidérmico, cervical, de ovario y de hígado, e *in vivo*, a través del suministro local y sistémico, contra las células de cáncer de cerebro, próstata, linfoma, mieloma, cuello uterino, pulmón e hígado. Otros objetivos preferidos incluyen cánceres de pulmón de células pequeñas, esófago, cabeza y cuello y estómago. La dosis administrada y el programa de dosificación seguirán, por ejemplo, las dosis conocidas o recomendadas para el inhibidor empleado, como se indica, por ejemplo, en el prospecto del fármaco o en los datos clínicos o en modelos animales publicados. Para GRN163L, la dosis inicial para adultos es de aproximadamente 0,8 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg; de aproximadamente 1,6 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. La dosis para adultos de GRN163L es de aproximadamente 1,6 mg/kg; o aproximadamente 3,2 mg/kg; o aproximadamente 4,8 mg/kg; o aproximadamente 6,2 mg/kg; o aproximadamente 7,2 mg/kg; o aproximadamente 9 mg/kg; o aproximadamente 12 mg/kg; a aproximadamente 20 mg/kg. La dosis puede administrarse dos veces a la semana, una vez a la semana o a otras tasas de administración. Pueden requerirse dosis más altas para producir la remisión deseada en algunos pacientes.

GRN163L puede administrarse a un paciente a una dosis de al menos aproximadamente 4,8 mg/kg de GRN163L el día 1 y aproximadamente el día 8 de un ciclo de 21 días. Alternativamente, puede administrarse a una dosis de al menos aproximadamente 4,8 mg/kg de GRN163L el día 1 y aproximadamente el día 15 de un ciclo de 28 días.

Alternativamente, GRN163L puede administrarse a un paciente a una dosis de al menos aproximadamente 1,6 mg/kg de GRN163L dos veces en la primera semana de un ciclo de 14 días.

El protocolo terapéutico para administrar el inhibidor de la telomerasa en la terapia dependerá de diversos factores lo que incluye, pero no se limita a, el tipo de cáncer, la edad y la salud general del paciente, la agresividad de la progresión de la enfermedad, la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa de las células enfermas a tratar y la capacidad del paciente para tolerar los agentes que comprenden la combinación, que pueden depender de la actividad de la telomerasa y la longitud de los telómeros en diversas células normales, particularmente células normales en tejidos altamente proliferativos, particularmente, pero no se limitan a, la médula ósea.

En general, se contempla el tratamiento de todos los tipos de cáncer y neoplasias malignas hematológicas. En realizaciones seleccionadas, la enfermedad objetivo comprende un tumor sólido; en otras realizaciones, la enfermedad objetivo comprende una neoplasia maligna hematológica. Un curso de tratamiento ilustrativo implica múltiples dosis. La secuencia de los tratamientos combinados se determinará mediante criterios de cumplimiento clínico y/o datos preclínicos o clínicos que respalden las estrategias de optimización de la dosis para aumentar la eficacia o reducir la toxicidad del tratamiento combinado. El tiempo entre las dosis puede ser un período de aproximadamente 1-6 horas, hasta aproximadamente 6-12 horas, hasta aproximadamente 12-24 horas, hasta aproximadamente 1-2 días, hasta aproximadamente 1-2 semanas o más después del inicio del tratamiento. Durante un curso de tratamiento, la necesidad de completar las dosis planificadas puede reevaluarse.

Los compuestos pueden administrarse mediante inyección directa a un tumor o su vasculatura. Alternativamente, el tumor puede infundirse o perfundirse con los compuestos terapéuticos mediante el uso de cualquier vehículo de suministro adecuado. Los compuestos pueden administrarse localmente a un órgano afectado. También puede realizarse la administración sistémica. La administración continua puede aplicarse cuando sea apropiado; por ejemplo, cuando se extirpa un tumor y se trata el lecho tumoral para eliminar la enfermedad residual. Se prefiere el suministro mediante jeringa o cateterismo. Tal perfusión continua puede tener lugar durante un período de aproximadamente 1-6 horas, hasta aproximadamente 6-12 horas, hasta aproximadamente 12-24 horas, hasta aproximadamente 1-2 días, hasta aproximadamente 1-2 semanas o más después del inicio del tratamiento. Generalmente, la dosis de la composición terapéutica mediante perfusión de forma continua será equivalente a la administrada mediante una única o múltiples inyecciones, ajustadas por un período de tiempo durante el cual se produce la perfusión.

Los agentes terapéuticos se administran a un sujeto, tal como un paciente humano, en una formulación y en una cantidad eficaz para lograr un resultado clínicamente deseable. Para el tratamiento del cáncer, los resultados deseables incluyen la reducción de la masa tumoral (según se determina por palpación u obtención de imágenes; por ejemplo, mediante radiografía, exploración con radionucleótidos, exploración por CAT o MRI), reducción en la tasa de crecimiento tumoral, reducción en la tasa de formación de metástasis (según se determina, por ejemplo, mediante análisis histoquímico de especímenes de biopsia), reducción de marcadores bioquímicos (lo que incluye marcadores generales tales como ESR y marcadores tumorales específicos tales como PSA en suero) y mejora en la calidad de vida (según se determina por la evaluación clínica, por ejemplo, puntuación de Karnofsky), aumento del tiempo de progresión, supervivencia libre de enfermedad y supervivencia general.

La cantidad de cada agente por dosis y el número de dosis requeridas para lograr tales efectos variarán en dependencia de muchos factores, lo que incluye la indicación de la enfermedad, las características del paciente a tratar y el modo de administración. Típicamente, la formulación y la vía de administración proporcionarán una concentración local en el sitio de la enfermedad de entre 1 nM y 100 µM de cada agente. El médico podrá variar la cantidad de los compuestos, el portador, la frecuencia de dosificación y similares, al tener en cuenta factores tales como el estado de la enfermedad neoplásica en particular y su gravedad; la condición general del paciente; la edad, el sexo y el peso del paciente; el modo de administración; la idoneidad de administrar simultáneamente agentes antitoxicidad sistémicos; monitorear las funciones vitales de los órganos del paciente; y otros factores típicamente monitoreados durante la quimioterapia contra el cáncer. En general, los compuestos se administran a una concentración que proporciona resultados eficaces sin provocar efectos secundarios dañinos o perjudiciales excesivos.

Los modos de administración y formulación pueden depender del fármaco y su modo de administración aprobado. Cuando el inhibidor de la telomerasa es GRN163L, la formulación en cloruro de sodio al 0,9 % (solución salina normal) y la administración i.v. es una vía preferida, preferentemente, mediante infusión durante 1 a 24 horas, con mayor preferencia, durante 2 a 8 horas, por ejemplo, una infusión de 6 horas. Si bien los oligonucleótidos conjugados con lípidos descritos en la presente memoria, tales como GRN163L, tienen características superiores para la penetración celular y tisular, estos y otros compuestos pueden formularse para proporcionar un beneficio adicional en esta área. Otros adyuvantes útiles incluyen sustratos para la migración transendotelial, tales como sistemas de captación de glucosa para facilitar la salida desde el espacio vascular al microambiente tumoral.

Los siguientes ejemplos se ofrecen en forma de ilustración y no en forma de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1: Estudio de diversos parámetros en pacientes a los que se les recetaron Inhibidores de la Telomerasa

Se diseñó y realizó un estudio para determinar la probabilidad de desarrollo de trombocitopenia en una población de pacientes con cáncer de tumor sólido tratados con el inhibidor de la telomerasa GRN163L. GRN163L es un inhibidor oligonucleotídico de 13-mer de la actividad de la telomerasa. El estudio usó células sanguíneas archivadas como una fuente de longitud de telómeros celulares antes del estudio y registros de pacientes archivados coincidentes.

Diseño del estudio

Los pacientes aceptados fueron adultos con tumores sólidos refractarios avanzados y tratados con GRN163L en un ensayo clínico de fase I. El GRN163L se administró semanalmente mediante dosificación i.v. continua. Además, se presentan datos provisionales sobre una cohorte 6 tratada con un régimen de dosificación alternativo diseñado para reducir el potencial de trombocitopenia. Este fue un ensayo clínico de Fase I multicéntrico con cohortes secuenciales de escalado de dosis. Los pacientes se inscribieron en cohortes sucesivas de 0,4 a 4,8 mg/kg. Las cohortes 1-5 recibieron infusiones intravenosas de 2 horas de GRN163L semanalmente. La cohorte 6 recibió un programa de dosificación intermitente de infusiones iv semanales de GRN163L (4,8 mg/kg) X2, seguido de un descanso de 13 días. Se requirió completar 1 ciclo (4 infusiones semanales) para la evaluación de la Toxicidad limitante de la dosis (DLT)

Los pacientes se excluyeron del estudio si tenían una neoplasia maligna primaria o metástasis activa en el Sistema Nervioso Central; neoplasias malignas hematológicas; hemoglobina <9,0 g/dl; ANC <1.500 /mm³; conteo de plaquetas <100.000 /mm³; o una anomalía en la química sérica (bilirrubina, AST, ALT, albúmina, creatinina).

La población de pacientes incluyó 28 pacientes. Los pacientes habían recibido hasta 9 terapias anteriores para este tumor; más de la mitad recibieron 4 o más. Ver la **Tabla 1**

Tabla 1. Características demográficas al inicio

Núm. de pacientes	28	Sitio del tumor primario		Sitio del tumor primario	
Hombre	20	Pulmón		Otro	
Mujer	8	Pulmón	3	Hueso	1
Edad; Mediana (años)	63	Pleura	2	Mama	1
Intervalo 31	76	Gastro		Orofaringe	1
Karnofsky	Estado	Esófago	1	Paratiroides	1
70-80	16	Estómago	1	Próstata	1
90-100	12	Páncreas	4	Piel	1
Estadio 3	1	Hígado	2	Testicular	1
Estadio 4	26	Colon	5		
Desconocido	1	Rectal	3		

28 pacientes en las cohortes 1-5 recibieron al menos 1 infusión de GRN163L. Se administraron un total de 177 dosis. Ver la **Tabla 2**. Los 28 pacientes interrumpieron el estudio; las razones para la interrupción incluyeron enfermedad progresiva (22/28; 78 %), muerte (3/28; 11 %) y trombocitopenia (3/28; 11 %).

Tabla 2 Dosificación

Cohortes	1	2	3	4	5	Total
Dosis (mg/kg)	0,4	0,8	1,6	3,2	4,8	-
Núm. de pacientes	2	2	2	8	14	28
Mediana núm. de ciclos/paciente	3,0	3,0	1,5	1,5	2,0	2,0
Mediana núm. de dosis/paciente	11,5	12,0	5,5	5,5	5,5	7,0
Por ciento de dosis recibidas	100 %	100 %	100 %	81 %	84 %	88 %

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

Materiales y procedimientos:

Se recolectaron muestras de sangre de cada paciente antes de comenzar el tratamiento. La mediana de la longitud de los telómeros se determinó por Repeat Diagnostics, Vancouver, Canadá, mediante el uso del procedimiento Flow-FISH, con selección de poblaciones de granulocitos y linfocitos mediante el procedimiento descrito en Baerlocher y otros, "Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres (flow FISH) Nature Protocols Vol. 1, Núm. 5: 2365-2376 (2006)

Brevemente, se obtuvo sangre completa de los 28 pacientes. El sobrenadante se aspiró sin alterar los glóbulos blancos o el sedimento de glóbulos rojos. Las células se mezclaron con NH_4Cl frío para lisar los glóbulos rojos. Las células se centrifugaron. Se aspiró el sobrenadante y se extrajo el lisado de glóbulos rojos. Los glóbulos blancos resultantes se suspendieron en tampón de hibridación (5 % de dextrosa/10 mM de Hepes/0/1 % de BSA). Las células se contaron y se diluyeron a aproximadamente 5×10^6 células/200 μl de tampón de hibridación.

Los timocitos bovinos se aislaron del timo bovino fresco y se fijaron en formaldehído. Los timocitos bovinos fijados se mezclaron con tampón de hibridación (Tris, NaCl, BSA, formamida dionizada). Para el control de hibridación sin marcar, se añadió a las células una solución madre de mezcla de hibridación sin marcar. Para la mezcla de hibridación marcada, se añadió a las células una sonda de ácido nucleico peptídico (PNA) de hibridación (CCC TAA CCC TAA CCC TAA marcada con Cy5 o fluoresceína) (SEQ ID NO:3). Las células se hibridaron con la sonda de PNA. Después, las células se centrifugaron y el sedimento celular se lavó para eliminar la sonda no unida.

El citómetro de flujo se calibró y las células se analizaron en el citómetro de flujo. A partir del programa informático de análisis de datos de citometría de flujo, se usó la plantilla de análisis Flow FISH para calcular la fluorescencia de las diversas poblaciones celulares. La fluorescencia se usó para calcular la longitud promedio de los telómeros.

Resultados

Se llevaron a cabo análisis univariados y multivariados para explorar los factores predictivos para determinar las disminuciones posteriores al tratamiento en los niveles de plaquetas y la longitud inicial de los telómeros. Los factores incluyeron edad, sexo, conteo inicial de plaquetas, tiempo desde el diagnóstico de cáncer, número de regímenes de quimioterapia citotóxica o mielosupresora anteriores, terapia con radiación previa y longitud de los telómeros de granulocitos y linfocitos iniciales.

Las infusiones de GRN163L se toleraron bien generalmente. Los eventos adversos (AE) que se consideraron relacionados o posiblemente/probablemente relacionados con el tratamiento se informaron en 16/28 (57,1 %) pacientes. Ver la **Tabla 3**. Los eventos adversos más posiblemente/probablemente relacionados fueron reversibles y de grado 1-2.

No se observaron toxicidades limitantes de la dosis (DLT) en las Cohortes 1-3. En la Cohorte 4 (3,2 mg/kg), un paciente que toleraba bien la terapia murió de causa desconocida después de la 4ta dosis, y esto se consideró una DLT. En la Cohorte 5 (4,8 mg/kg), se observaron dos DLT ambas trombocitopenia (una de grado 4 y una de grado 2 que provocaron un retraso de >2 semanas en el tratamiento).

Tabla 3: Eventos adversos informados (posiblemente/probablemente) relacionados con el tratamiento en >1 paciente†

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

Neutropenia - Grado 2-3	0	0	2 (14,3 %)	2 (7,1 %)
†Los eventos adversos en solo 1 paciente incluyeron fotofobia, neuropatía periférica, tasa de sedimentación elevada, aumento de fosfatasa alcalina, linfopenia, dolor en el cuello por encima del sitio de apertura, ardor al orinar, candidiasis, opresión en el pecho, confusión, deshidratación, AST elevada y muerte. ‡No todas las lecturas de laboratorio compatibles con trombocitopenia se informaron como eventos adversos.				

Los niveles de plaquetas en el tiempo para pacientes individuales que reciben infusiones de GRN163L semanalmente se muestran por cohorte de dosis en las Figuras 1-3. Los puntos de datos en círculo indican que el paciente recibió tratamiento en esa visita. Los niveles de plaquetas en el tiempo para 5 de 6 pacientes en el programa de dosificación intermitente de 4,8 mg/kg (Cohorte 6) se muestran en la Figura 4.

Para comprender mejor los factores del paciente y del tratamiento que influyen potencialmente en las disminuciones (o aumentos) de las plaquetas, se desarrolló un modelo para identificar predictores de cambio en por ciento en los niveles de plaquetas a las 4 semanas.

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

El primer modelo incluyó 20/28 pacientes. La dosis y la longitud inicial de los telómeros de granulocitos fueron predictores significativos. No se encontró interacción de la dosis con la longitud del telómero.

Tabla 4: Análisis multivariado

Predictor	Coefficiente de regresión	Valor P
Dosis	-7	0,034
Longitud inicial de los telómeros de granulocitos	8	0,023

El modelo se extendió para incluir 8 pacientes adicionales (los 28 pacientes en las cohortes 1-5). Las relaciones detectadas en el modelo anterior continuaron significativas. Tanto el nivel de dosis inicial de GRN163L como la mediana de la longitud inicial de los telómeros de granulocitos fueron predictores del % de disminución de los niveles de plaquetas durante las primeras 4 semanas de tratamiento

Tabla 5: Análisis multivariado

Predictor	Coefficiente de regresión	Valor P
Intercepto	-73,8	0,004
Dosis	-6,6	0,033
Longitud inicial de los telómeros de granulocitos	11,2	0,005
Modelo: R cuadrado = 0,319853		

La Figura 5 muestra el cambio en por ciento desde el valor basal hasta el nadir en los niveles de plaquetas en la semana 4 en función de la longitud inicial de los telómeros de granulocitos. Las líneas indican el cambio en porcentaje en función del nivel de dosis de GRN163L.

La ecuación para describir el número predicho de plaquetas en un paciente durante las primeras 4 semanas de tratamiento es la siguiente;

Número predicho de plaquetas = número de plaquetas iniciales – (número de plaquetas iniciales x % de cambio en las plaquetas/100).

% de cambio en número de plaquetas = (-73,8) – 6,6 x dosis del inhibidor (mg/kg) + 11,2 x longitud promedio de los telómeros (kpb)

En los análisis univariados de predictores de cambio en por ciento en los niveles de plaquetas, solo la longitud de los telómeros de granulocitos fue significativa (p=0,024).

Tabla 6: Análisis univariado

Predictor	Coefficiente de regresión	Valor p
Intercepto	-84,54302	0,0018
Longitud inicial de los telómeros de granulocitos	9,17580	0,0241

Después se desarrolló otro modelo para identificar predictores del log del nadir de los niveles de plaquetas durante las primeras 4 semanas. Este modelo resultó en un valor de R^2 más alto lo que indica un mejor ajuste a los datos.

Tabla 7: Análisis multivariado

Predictor	Coefficiente de regresión (b)	Valor p
Intercepto	-0,38	0,725
Dosis (mg/kg)	-0,13	0,017
Longitud inicial de los telómeros de granulocitos	0,25	0,001
Log de valores basales de plaquetas	0,80	<0,001
Modelo: R cuadrado = 0,645071		

La ecuación para describir el número predicho de plaquetas en un paciente en el nadir durante las primeras 4 semanas de tratamiento es la siguiente:

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

En los análisis univariados de predictores del log del nadir de los niveles de plaquetas, la longitud de los telómeros de granulocitos, sola, fue significativa ($p=0,004$).

Tabla 8: Análisis univariado

Predictor	Coefficiente de regresión	Valor p
Intercepto	3,42818	<0,0001
Longitud inicial de los telómeros de granulocitos	0,27189	0,0040

Los intervalos de predicción pueden calcularse, por ejemplo, para predecir un probable cambio en por ciento en los niveles de plaquetas o el nadir de plaquetas para pacientes o sujetos con un conjunto particular de valores basales y de tratamiento, por ejemplo, longitud de los telómeros, plaquetas iniciales y nivel de dosis. La ecuación de regresión proporciona el valor esperado para un futuro individuo con covariantes específicas (J. Neter y otros Applied linear statistical models: regression, analysis of variance, and experimental designs, 3ra edición págs. 81-83 (1990)). Sin embargo, debido al error de distribución del muestreo, así como también a la variabilidad entre individuos, un paciente puede tener niveles de plaquetas que se encuentran por encima o por debajo de ese valor predicho. Puede crearse una serie de intervalos de predicción con una cobertura decreciente. Por ejemplo, puede crearse un intervalo de predicción del 99 % con límites superiores e inferiores P_{U99} y P_{L99} y en promedio, contendría el 99 % de los niveles de plaquetas observados en los pacientes. Puede crearse un intervalo de predicción del 90 % con límites superiores e inferiores P_{U90} ($< P_{U99}$) y P_{L90} ($> P_{L99}$) y en promedio, contendría el 90 % de los niveles futuros de plaquetas observados. Esto permite determinar la probabilidad de que el paciente desarrolle una trombocitopenia de grado 3 o 4.

La longitud promedio de los telómeros de las células normales difiere entre individuos y disminuye con la edad, como lo muestran los percentiles en la Figura 7. Las longitudes de los telómeros de granulocitos en los 28 pacientes en este estudio son generalmente más cortas de lo normal, lo que es consistente con los efectos del estrés fisiológico y la quimioterapia. Aunque el antecedente previo de quimioterapia como se tabula aquí no fue predictivo de la disminución de las plaquetas, en un análisis univariado se correlacionó altamente con las longitudes iniciales de los telómeros. La medición de la longitud de los telómeros refleja los efectos del tratamiento previo junto con otras influencias hereditarias o adquiridas con alta precisión. La edad también fue un predictor significativo de la longitud de los telómeros.

Los resultados de este estudio demuestran una estrecha correspondencia entre los valores iniciales de longitud de los telómeros según se determina mediante la prueba descrita y el riesgo de que el paciente desarrolle trombocitopenia limitante de la dosis.

Aunque la invención se ha descrito con respecto a realizaciones y aplicaciones particulares, los expertos en la técnica apreciarán la gama de aplicaciones y procedimientos de la invención divulgados en la presente memoria y la invención no se limita a tales realizaciones.

5 Listado de secuencias

	<110> Geron Corporation Harley, Calvin Elias, Laurence Smith, Jennifer Ratain, Mark Benedetti, Fabio	
10	<120> Procedimiento para la identificación de la sensibilidad de un paciente a la terapia de inhibición de la telomerasa	
	<130> 175/200PCT	
15	<140> Sin asignar	
	<141> 2009-10-13	
	<150> US 61/106,491	
	<151> 2008-10-17	
20	<160> 3	
	<170> PatentIn versión 3.5	
25	<210> 1	
	<211> 11	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 1	
	cuaaccuuaa c 11	
	<210> 2	
	<211> 13	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> GRN-163	
40	<400> 2	
	tagggttaga caa 13	
	<210> 3	
45	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Sonda PNA	
	<400> 3	
	ccctaaccct aaccctaa	18

REIVINDICACIONES

- 5 1. GRN163L para su uso en el tratamiento del cáncer, en el que dicho tratamiento consiste en la administración de al menos aproximadamente 1,6 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de GRN163L dos veces en la primera semana de un ciclo de 14 días.
2. GRN163L para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento consiste en la administración de al menos aproximadamente 3,2 mg/kg.
- 10 3. GRN163L para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento consiste en la administración de al menos aproximadamente 4,8 mg/kg.
4. GRN163L para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento consiste en la administración de al menos aproximadamente 6,2 mg/kg.
- 15 5. GRN163L para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento consiste en la administración de al menos aproximadamente 7,2 mg/kg.
6. GRN163L para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento consiste en la administración de al menos aproximadamente 9 mg/kg.
- 20 7. GRN163L para su uso en el tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho tratamiento consiste en la administración mediante una infusión de 2 a 4 horas.

FIGURA 1

Cohortes (1-3) – 0,4-1,6 mg/kg

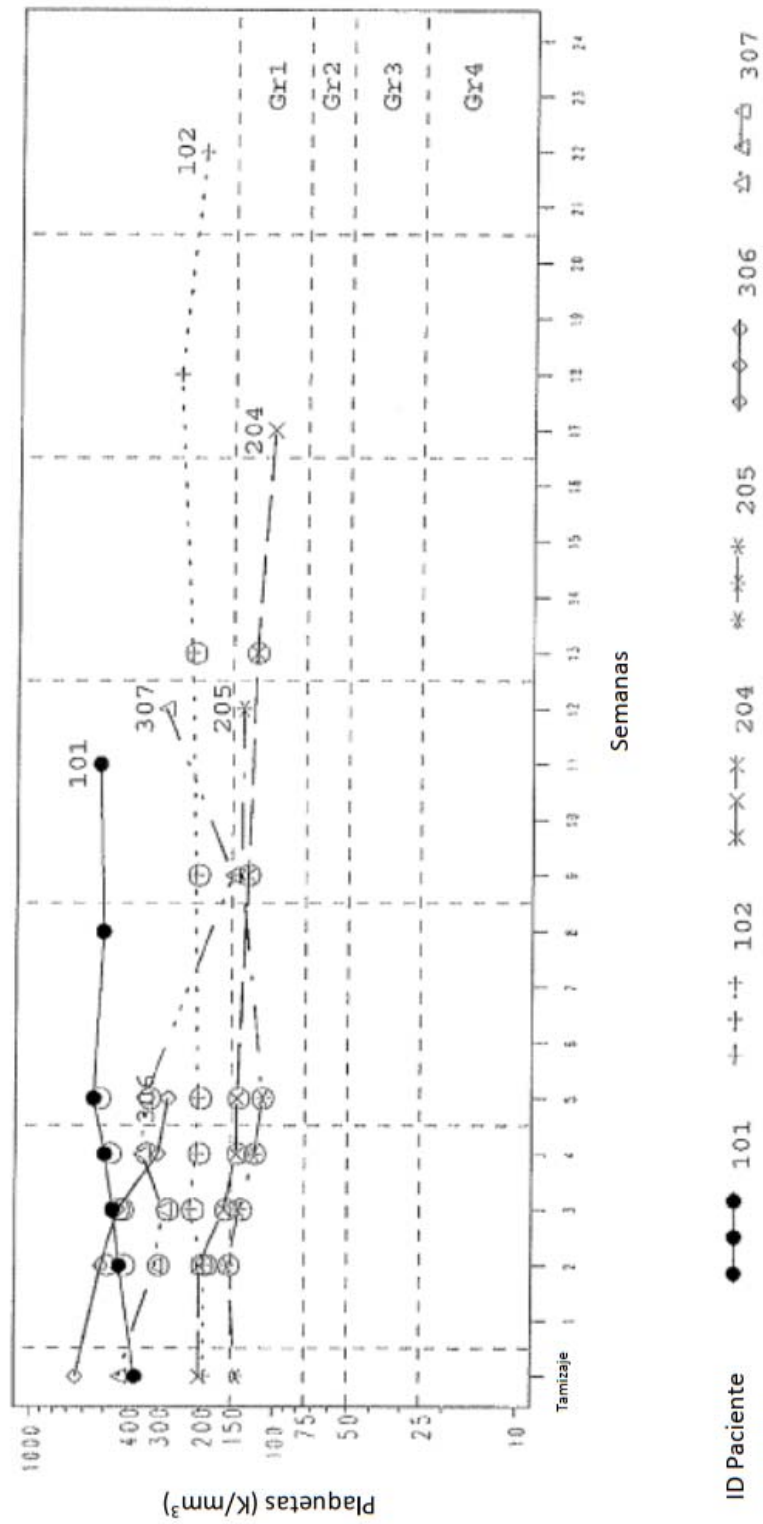
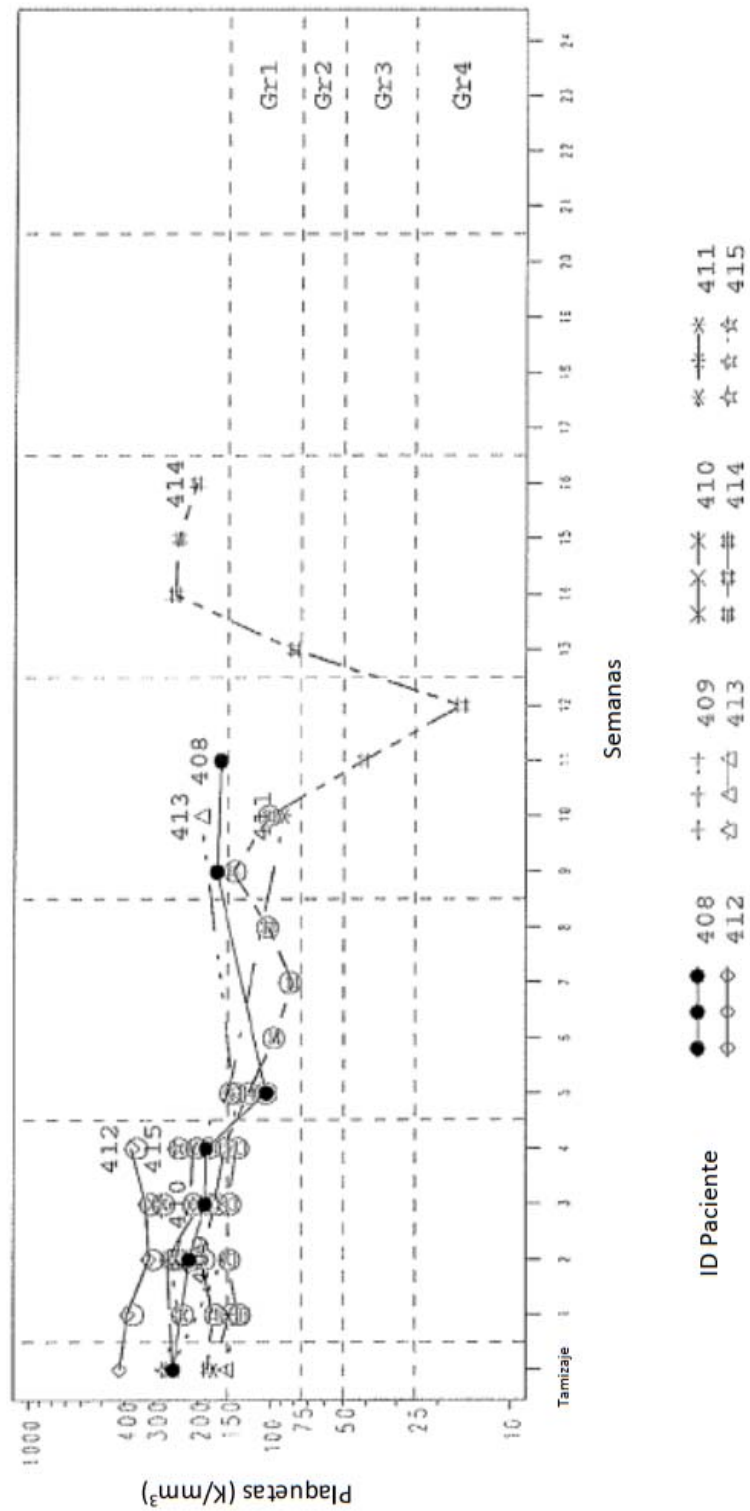


FIGURA 2

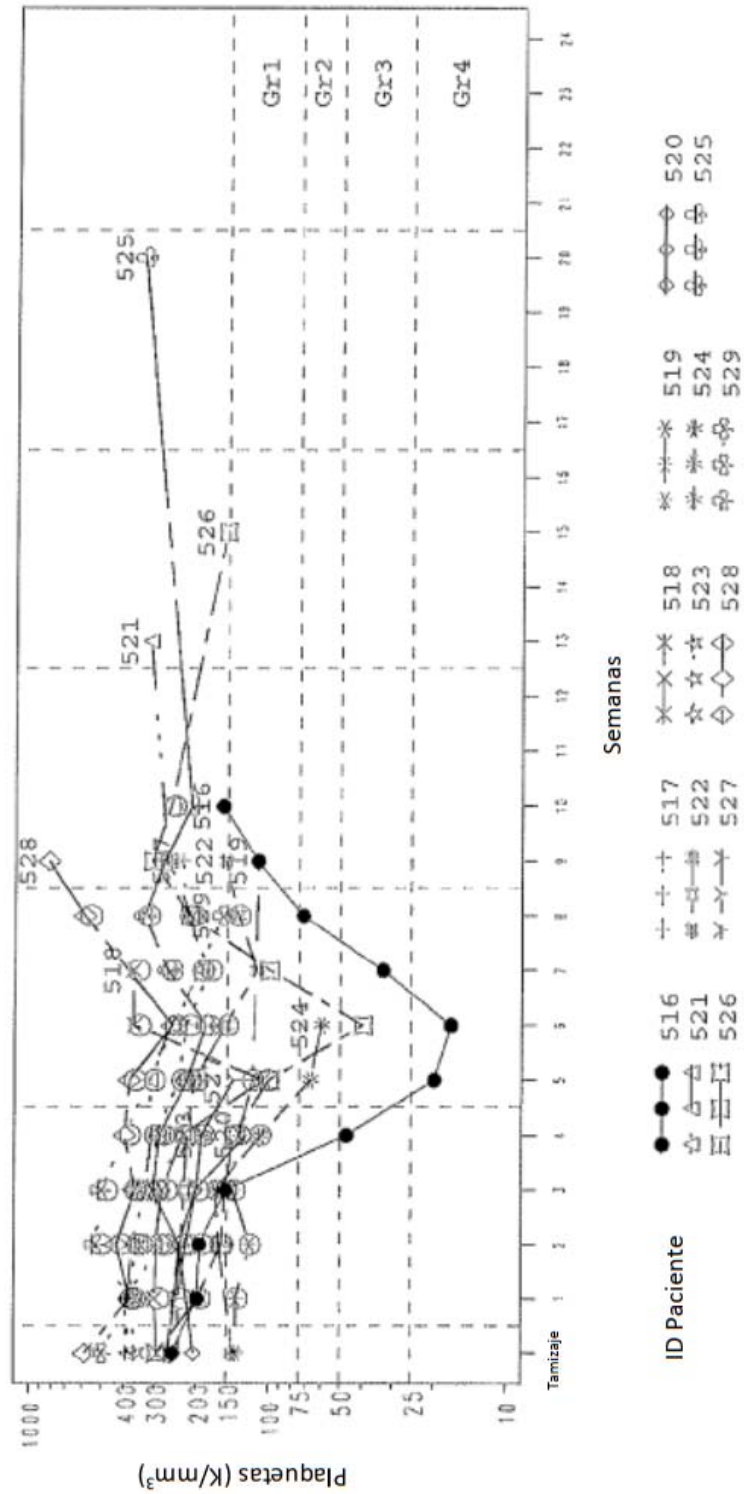
Cohorte 4 – 3,2 mg/kg



O – Se dosificó y se realizó la prueba de plaquetas.

FIGURA 3

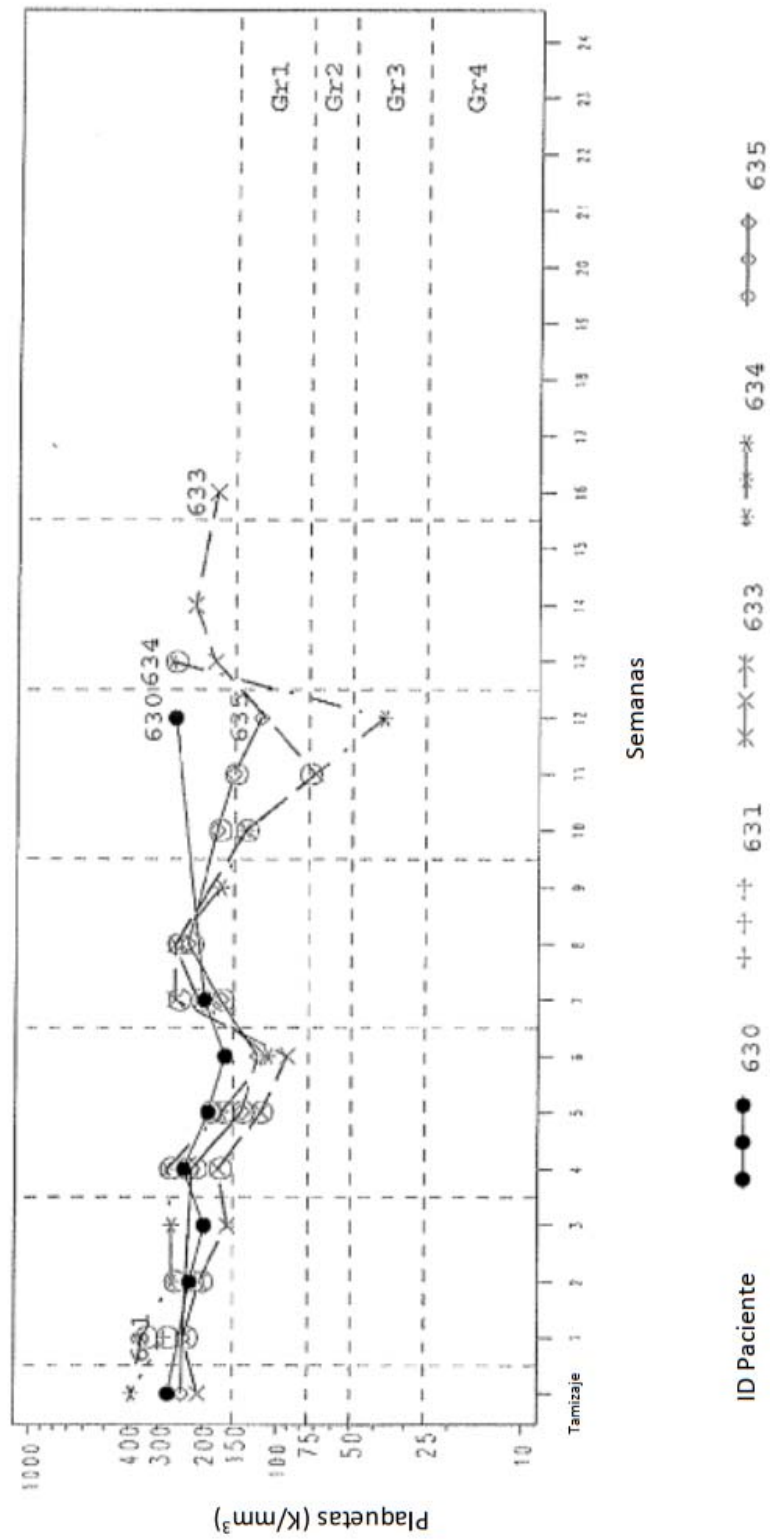
Cohorte 5 – 4,8 mg/kg



O – Se dosificó y se realizó la prueba de plaquetas.

FIGURA 4

Cohorte 6 – 4,8 mg/kg Programa A



O – Se dosificó y se realizó la prueba de plaquetas.

FIGURA 5

Cambio en % del valor inicial al nadir del nivel de plaquetas en la semana 4 frente a la LT inicial de granulocitos

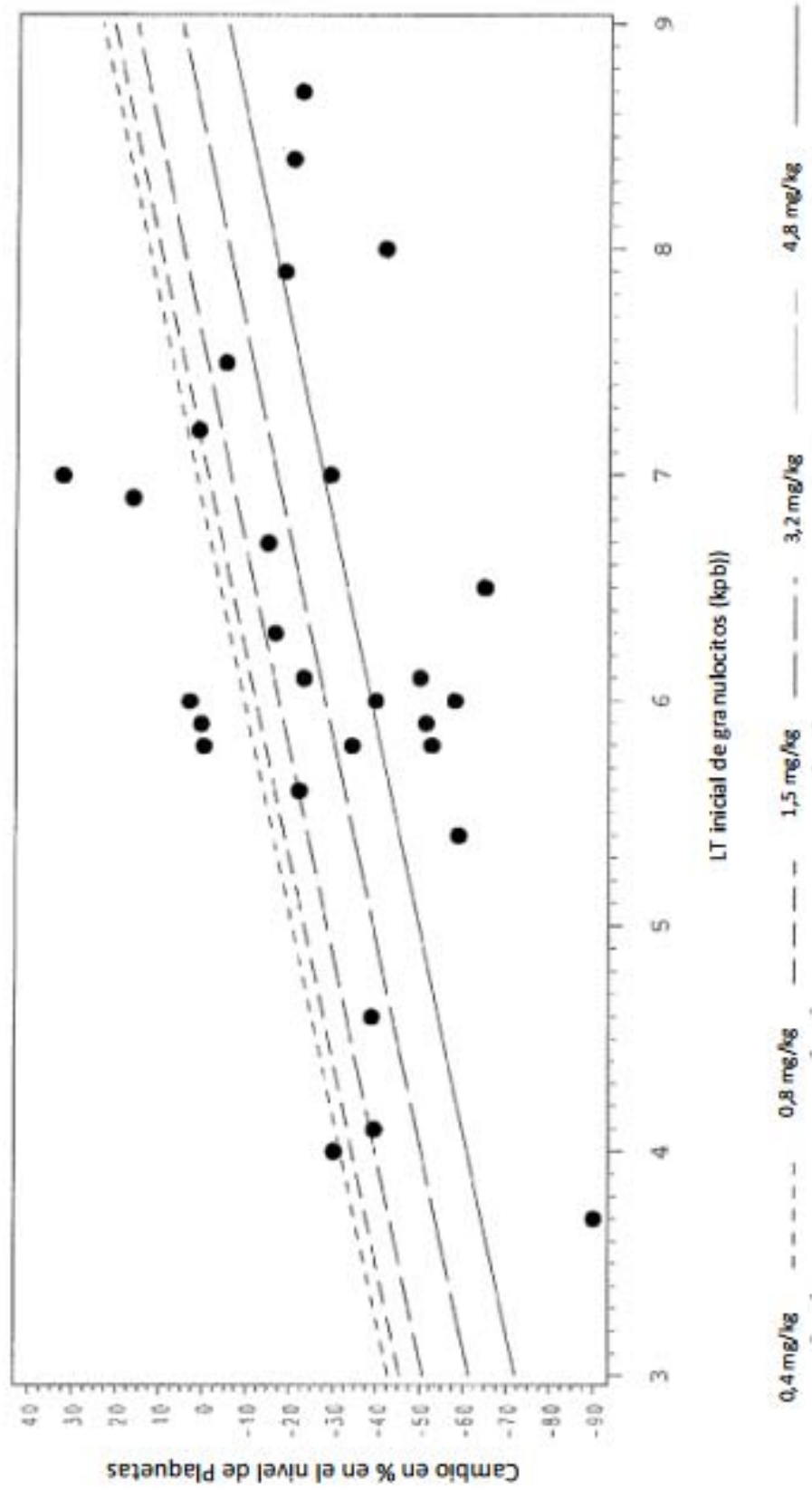


FIGURA 6

LT inicial de granulocitos frente a número de regímenes citotóxicos hasta la cohorte 5

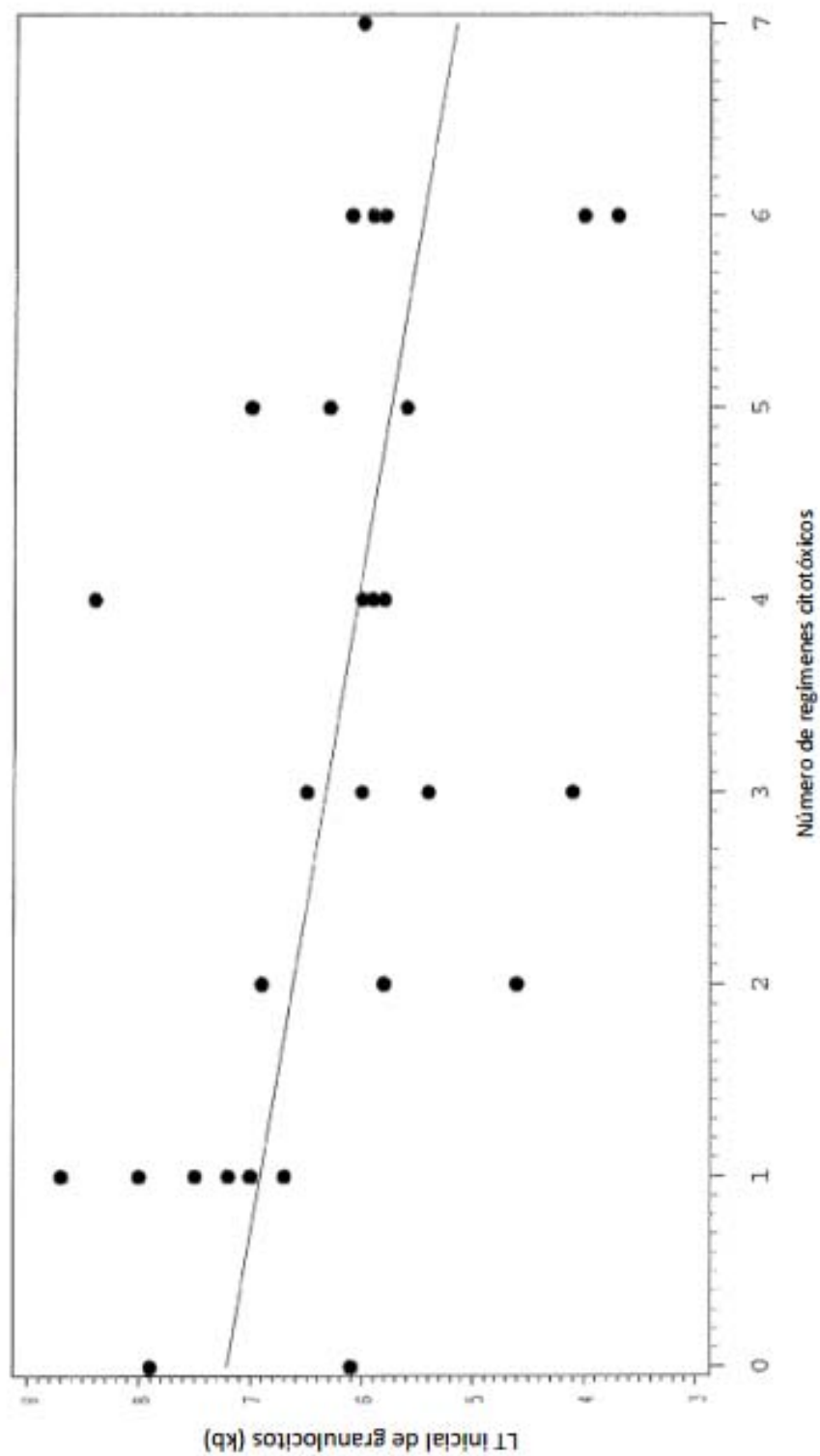


FIGURA 7

LT inicial de granulocitos frente a la edad hasta la cohorte 5

