

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 972 330**

51 Int. Cl.:

<b>C12Q 1/68</b>	(2008.01) <b>A61P 15/00</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/533</b>	(2006.01) <b>A61P 21/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/7125</b>	(2006.01) <b>A61P 25/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 45/06</b>	(2006.01) <b>A61P 35/02</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/574</b>	(2006.01) <b>A61P 43/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 35/00</b>	(2006.01) <b>C12Q 1/6886</b>	(2008.01)
<b>A61P 1/04</b>	(2006.01)	
<b>A61P 1/16</b>	(2006.01)	
<b>A61P 11/00</b>	(2006.01)	
<b>A61P 13/10</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.11.2013** **E 20214086 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.12.2023** **EP 3882355**

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

30 Prioridad:

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

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.06.2024**

73 Titular/es:

**GERON CORPORATION (100.0%)**  
**919 E. Hillsdale Blvd., Suite 250**  
**Foster City, CA 94404, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 972 330 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

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

### 5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a métodos para identificar individuos que tienen o se sospecha que tienen cáncer que se beneficiarían del tratamiento con compuestos inhibidores de la telomerasa, así como métodos para tratar a estos individuos.

### 10 Antecedentes

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. A pesar de los importantes avances en el campo de la quimioterapia, muchas de las formas más prevalentes de cáncer aún resisten la intervención quimioterapéutica.

Los telómeros son secuencias repetitivas de ácido nucleico presentes en los extremos de los cromosomas lineales de organismos eucariotas. Las secuencias de telómeros, junto con las proteínas de unión a los telómeros, confieren estabilidad a los cromosomas. Los telómeros generalmente se componen de repeticiones cortas en tándem con una unidad de secuencia de repetición especificada por la enzima telomerasa particular del organismo. Las secuencias de repetición de telómeros son conocidas para una variedad de organismos. La unidad de secuencia de repetición de telómeros humanos es (TTAGGG)<sub>n</sub>. Además de las secuencias repetidas bicatenarias, los extremos 3' de algunos telómeros contienen una región monocatenaria, que para los seres humanos se encuentra en la cadena rica en G.

La telomerasa es una riboproteína que sintetiza ADN telomérico. En ausencia de telomerasa, los telómeros se acortan gradualmente porque las ADN polimerasas no pueden replicar los extremos del ADN dúplex lineal. El acortamiento gradual de los telómeros finalmente conduce a la detención del ciclo celular o la muerte celular. En los seres humanos, la mortalidad celular dependiente de la longitud de los telómeros se produce debido a la represión de la telomerasa en las células somáticas normales antes del nacimiento, una longitud inicial de los telómeros al nacer y durante toda la vida, y una expresión estrictamente regulada de la telomerasa en las células madre o progenitoras. Los seres humanos nacen con telómeros "de longitud completa". Como la telomerasa está subregulada en los tejidos somáticos, esto conduce a la pérdida de ADN telomérico con la edad celular y cronológica. Por lo tanto, los telómeros actúan como un reloj mitótico, lo que confiere una capacidad finita de división en las células humanas normales. Los telómeros cortos afectan la capacidad de proliferación de las células madre. Por ejemplo, los telómeros cortos en las células madre epidérmicas perjudican el crecimiento de la piel y el cabello.

Las células cancerosas generalmente se someten a ciclos repetidos de división celular y tienen telómeros que son estables, pero más cortos que los de las células normales. La activación de la telomerasa es necesaria para que la mayoría de las células cancerosas se repliquen indefinidamente y permite el crecimiento del tumor y la metástasis (Kim et al., Science 266: 2011-2015; Shay JW y Wright WE., Carcinogenesis 26: 867-74 (2005)). Por consiguiente, la inhibición de la telomerasa se considera una estrategia de tratamiento prometedora para una amplia variedad de tipos de tumores sólidos y neoplasias malignas hematológicas (Harley CB, Nature Rev. Cancer, 8: 167-179 (2008)). El documento WO 2010/045245 describe un método para identificar la sensibilidad de un paciente a la terapia de inhibición de la telomerasa. Ladetto et al., Blood, 103: 4644-4649 (2004) describen un informe sobre la correlación de la longitud del fragmento de restricción de los telómeros con la histopatología respecto al centro germinal en los trastornos linfoproliferativos de células B maduras. Wang et al., Cancer Res., 71: C15 (2011) describen un informe sobre la evaluación de la longitud de telómeros en tejidos tumorales de archivo humano mediante un método de PCR cuantitativa. El documento WO 2012/135125 describe la medición de la longitud de los telómeros en muestras incluidas en parafina fijadas con formalina (FFPE) mediante PCR cuantitativa. O'Sullivan et al., Cytometry, 58A(2): páginas 120-131 (2004) describen la evaluación de la longitud de telómeros en secciones tisulares mediante FISH cuantitativa utilizando algoritmos de análisis de imágenes. Radpour et al., Modern Pathology, 23(5): 763-772 (2010) informan sobre una correlación del acortamiento de la longitud de telómeros con el perfil de metilación del promotor de las vías de p16/Rb y p35/p21 en el cáncer de mama. El documento 2004/234961 describe un método para la determinación de la longitud de telómeros y aplicaciones que determinan el pronóstico de un paciente con cáncer. Baydar et al., Pathology - Research and Practice, 206(2010): 700-704 (2010) informan sobre un estudio preliminar acerca de si las alteraciones en los telómeros podrían predecir la reaparición del adenocarcinoma de próstata. Desafortunadamente, muchos pacientes con cáncer no se benefician de los agentes citotóxicos o de las terapias dirigidas, tales como los inhibidores de la telomerasa, pero todavía están expuestos a sus efectos tóxicos. Por estas razones, se necesitan con urgencia métodos novedosos para identificar a los pacientes con cáncer que responderán favorablemente al tratamiento con estas terapias.

### Sumario de la invención

La invención como se proporciona en este documento describe, entre otros, métodos para identificar individuos que se beneficiarán del tratamiento con terapia con inhibidor de la telomerasa y métodos para tratar la misma. La invención se expone en el conjunto adjunto de reivindicaciones.

Por consiguiente, en un aspecto, se proporcionan en este documento métodos para seleccionar un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa, comprendiendo el método: determinar la longitud relativa de los telómeros analizando la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo; y seleccionar un individuo que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa cuando se determina que la longitud media relativa de los telómeros en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o menos de un intervalo relativo de longitud de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el inhibidor de la telomerasa comprende un oligonucleótido. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el oligonucleótido es complementario al componente de ARN de la telomerasa. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el oligonucleótido tiene una longitud de 10-20 pares de bases. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el oligonucleótido comprende la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleósido tiofosforamidato N3'→P5'. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el oligonucleótido comprende enlaces internucleósidos tiofosforamidato N3'→P5'. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el oligonucleótido comprende una fracción lipídica unida al extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la fracción lipídica está unida al extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido mediante un enlazador. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el enlazador es un enlazador de glicerol o aminoglicerol. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la fracción lipídica es una fracción de palmitoilo (C16). En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el inhibidor de la telomerasa es Imetelstat. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el cáncer es cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de próstata o un cáncer hematológico. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, la administración del inhibidor de la telomerasa da como resultado una disminución de la proliferación de células cancerosas y/o crecimiento tumoral. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la administración del inhibidor de la telomerasa da como resultado una mayor supervivencia libre de progresión en el individuo. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el inhibidor de la telomerasa se administra con un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el inhibidor de la telomerasa se formula para administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, tópica, intraperitoneal, intranasal, por inhalación, intratumoral o intraocular. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa comprende poner en contacto una o más células cancerosas con el inhibidor de la telomerasa. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa da como resultado uno o más de proliferación celular reducida, mayor apoptosis o senescencia celular. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos adicionales contra el cáncer. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la longitud media de los telómeros se determina mediante qPCR, telo-FISH o transferencia Southern. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, dichos uno o más patrones conocidos son líneas celulares caracterizadas. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, las líneas celulares se seleccionan del grupo que consiste en: células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, las líneas celulares caracterizadas se seleccionan de líneas celulares representativas del tipo de muestra biológica de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, las líneas celulares caracterizadas son líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, líneas celulares hepatocelulares o líneas celulares de ovario. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitud de telómero establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, dichas células cancerosas de una pluralidad de tumores de origen natural son del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, se determina que la longitud de los telómeros en las células cancerosas presentes en la muestra biológica está en el percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10, percentil 5, o menos que el intervalo de longitud de los telómeros.

Según la divulgación, se describen en el presente documento métodos para tratar a un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer, comprendiendo el método: determinar la longitud relativa de los telómeros analizando la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo; seleccionar un individuo que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa cuando se determina que la longitud media relativa de los telómeros en las células cancerosas presentes en una muestra

biológica del individuo está en el percentil 50 o menos de un intervalo de longitud relativo de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos; y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa al individuo. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el inhibidor de la telomerasa comprende un oligonucleótido. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el oligonucleótido es complementario al componente de ARN de la telomerasa. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el oligonucleótido tiene una longitud de 10-20 pares de bases. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el oligonucleótido comprende la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleósido tiofosforamidato N3'→P5'. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el oligonucleótido comprende enlaces internucleósidos tiofosforamidato N3'→ P5'. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el oligonucleótido comprende una fracción lipídica unido al extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la fracción lipídica está unido al extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido mediante un enlazador. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el enlazador es un enlazador de glicerol o aminoglicerol. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la fracción lipídica es una fracción palmitoilo (C16). En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el inhibidor de la telomerasa es Imetelstat. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el cáncer es cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de próstata o un cáncer hematológico. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, la administración del inhibidor de la telomerasa da como resultado una disminución en la proliferación de células cancerosas y/o crecimiento tumoral. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la administración del inhibidor de la telomerasa da como resultado una mayor supervivencia libre de progresión en el individuo. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el inhibidor de la telomerasa se administra con un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el inhibidor de la telomerasa se formula para administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, tópica, intraperitoneal, intranasal, por inhalación, intratumoral o intraocular. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa comprende poner en contacto una o más células cancerosas con el inhibidor de la telomerasa. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa da como resultado uno o más de proliferación celular reducida, mayor apoptosis o senescencia celular. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes terapéuticos adicionales contra el cáncer. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la longitud promedio de los telómeros se determina mediante qPCR, telo-FISH o transferencia Southern. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, dicho uno o más patrones conocidos son líneas celulares caracterizadas. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, las líneas celulares se seleccionan del grupo que consiste en: células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, las líneas celulares caracterizadas se seleccionan de líneas celulares representativas del tipo de muestra biológica de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, las líneas celulares caracterizadas son líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, líneas celulares hepatocelulares o líneas celulares de ovario. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitud de telómero establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, dichas células cancerosas de una pluralidad de tumores de origen natural son del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, se determina que la longitud de los telómeros en las células cancerosas presentes en la muestra biológica está en el percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10, percentil 5, o menos que el intervalo de longitud de los telómeros.

Según la divulgación, se describen en este documento métodos para tratar a un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer, comprendiendo el método: administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la telomerasa al individuo cuando la longitud promedio relativa de los telómeros en células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo se ha determinado que está en el percentil 50 o menos de un intervalo relativo de longitud de telómero determinado a partir de uno o más patrones conocidos. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el inhibidor de la telomerasa comprende un oligonucleótido. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el oligonucleótido es complementario al componente de ARN de la telomerasa. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el oligonucleótido tiene una longitud de 10-20 pares de bases. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el oligonucleótido comprende la secuencia TAGGGTTAGACAA (SEQ ID NO: 3). En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el

presente documento, el oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleósido tiofosforamidato N3'→P5'. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el oligonucleótido comprende enlaces internucleósidos tiofosforamidato N3'→P5'. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el oligonucleótido comprende una fracción lipídica unida al extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la fracción lipídica está unida al extremo 5' y/o 3' del oligonucleótido mediante un enlazador. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el enlazador es un enlazador de glicerol o aminoglicerol. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la fracción lipídica es una fracción palmitoilo (C16). En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el inhibidor de la telomerasa es Imetelstat. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el cáncer es cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de próstata o un cáncer hematológico. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, la administración del inhibidor de la telomerasa da como resultado una disminución de la proliferación de células cancerosas y/o crecimiento tumoral. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la administración del inhibidor de la telomerasa da como resultado una mayor supervivencia libre de progresión en el individuo. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el inhibidor de la telomerasa se administra con un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, el inhibidor de la telomerasa se formula para administración oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, tópica, intraperitoneal, intranasal, por inhalación, intratumoral o intraocular. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa comprende poner en contacto una o más células cancerosas con el inhibidor de la telomerasa. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, la administración de la cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de la telomerasa da como resultado uno o más de proliferación celular reducida, mayor apoptosis o senescencia celular. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el método comprende además administrar al individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes adicionales terapéuticos contra el cáncer. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, la longitud promedio de los telómeros se determina mediante qPCR, telo-FISH o Transferencia Southern. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en este documento, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, dicho uno o más patrones conocidos son líneas celulares caracterizadas. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, las líneas celulares se seleccionan del grupo que consiste en: células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, las líneas celulares caracterizadas se seleccionan de líneas celulares representativas del tipo de muestra biológica de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, las líneas celulares caracterizadas son líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, líneas celulares hepatocelulares o líneas celulares de ovario. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitud de telómero establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, dichas células cancerosas de una pluralidad de tumores naturales son del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. En algunas realizaciones de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, se determina que la longitud de los telómeros en las células cancerosas presentes en la muestra biológica está en el percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10, percentil 5, o menos que el intervalo de longitud de los telómeros.

#### Descripción de los dibujos

La Figura 1A representa el análisis de supervivencia libre de progresión (PFS) del subgrupo de telómeros cortos (percentil 33) del estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSC) con Imetelstat (CP14B-012) con base en las longitudes promedio de los telómeros determinadas mediante PCR cuantitativa (qPCR) como se muestra en el Ejemplo 2.

La Figura 1B representa el análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) del subgrupo de telómeros de longitud media (mayor al 67% de la longitud relativa de los telómeros) del estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSC) con Imetelstat (CP14B-012) con base en las longitudes promedio de los telómeros determinadas usando PCR cuantitativa (qPCR) como se muestra en el Ejemplo 2.

La Figura 2 representa el análisis de supervivencia libre de progresión (PFS) de los datos de los 15 pacientes en el brazo tratado con Imetelstat del estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSC) con Imetelstat (CP14B-012) que tiene el percentil 25 más corto de longitudes relativas de los telómeros. El análisis de las longitudes de los telómeros individuales de estos pacientes se realizó utilizando hibridación fluorescente *in situ* (Telo-FISH).

La Figura 3A representa la longitud del fragmento de restricción terminal (TRF) en líneas celulares tumorales humanas fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE) M14Mel, OVCAR-8, A549, SK-Mel-5, MDA-MB-231, MDA-MB435, OVCAR-5, A498 y CAKI-1, según se determina mediante transferencia Southern.

5 La Figura 3B representa las relaciones T/S promedio en líneas celulares tumorales humanas fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE) M14Mel, OVCAR-8, A549, SK-Mel-5, MDA-MB-231, MDA-MB435, OVCAR-5, A498 y Caki-1 como se determinó por PCR cuantitativa (qPCR).

10 La Figura 4A representa la longitud del fragmento de restricción terminal (TRF) en las líneas celulares tumorales humanas fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFPE) M14Mel, OVCAR-8, A549, SK-Mel-5, MDA-MB-231, MDA-MB435, OVCAR-5, A498 y CAKI-1, como se determinó mediante transferencia Southern.

15 La Figura 4B representa los resultados de Telo-FISH para las líneas celulares humanas M14Mel, A549, SK-Mel-5 y OVCAR-5 (OV5).

20 La Figura 5 representa los cocientes de riesgo (HR) de supervivencia libre de progresión (PFS) para pacientes del estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSC) con Imetelstat (CP14B-012) graficado contra los percentiles de longitud de los telómeros del paciente, en los que se determinó la longitud relativa de los telómeros por PCR cuantitativa (qPCR).

25 La Figura 6 representa los cocientes de riesgo (HR) de supervivencia libre de progresión (PFS) para pacientes del estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSC) con Imetelstat (CP14B-012) graficado contra los percentiles de longitud de los telómeros del paciente, en los que se determinó la longitud relativa de los telómeros por hibridación fluorescente *in situ* de los telómeros (Telo-FISH).

30 La Figura 7 representa el análisis de supervivencia libre de progresión (PFS) para los 114 pacientes del estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSC) con Imetelstat (CP14B-012) con base en las longitudes relativas de los telómeros determinadas utilizando un ensayo prospectivo de hibridación fluorescentes *in situ* de los telómeros (Telo-FISH).

35 La Figura 8A representa el análisis de supervivencia libre de progresión (PFS) del subgrupo de telómeros cortos (N = 20) del estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSC) con Imetelstat (CP14B-012) con base en las longitudes relativas de los telómeros determinadas mediante un estudio prospectivo Telo-FISH.

40 La Figura 8B representa el análisis de supervivencia libre de progresión (PFS) del subgrupo de telómeros de longitud media (N = 39) del estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas con Imetelstat (CP14B-012) con base en las longitudes relativas de los telómeros determinadas mediante un ensayo prospectivo Telo-FISH.

45 La Figura 9 representa el análisis de supervivencia global (OS) para todos los pacientes (N = 114) del estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas con Imetelstat (CP14B-012) con base en las longitudes relativas de los telómeros determinadas mediante un ensayo prospectivo Telo-FISH.

50 La Figura 10A representa el análisis de supervivencia general (OS) para el subgrupo de telómeros cortos (N = 20) en el estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas con Imetelstat (CP14B-012) con base en longitudes relativas de telómeros determinadas mediante un ensayo prospectivo Telo-FISH.

55 La Figura 10B representa el análisis de supervivencia general (OS) para el subgrupo de telómeros de mediana longitud (N = 39) en el estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas con Imetelstat (CP14B-012) con base en las longitudes relativas de los telómeros determinadas mediante un estudio prospectivo de Telo-FISH.

60 La Figura 11A representa el análisis de supervivencia libre de progresión (PFS) del subgrupo de telómeros cortos (percentil 33) del estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSC) con Imetelstat (CP14B-012) con base en las longitudes promedio de los telómeros determinadas mediante PCR cuantitativa (qPCR) como se muestra en el Ejemplo 4.

65 La Figura 11B representa el análisis de supervivencia libre de progresión (PFS) del subgrupo de telómeros de longitud media (más del 67% de la longitud relativa de los telómeros) del estudio en fase II de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSC) con Imetelstat (CP14B-012) con base en las longitudes promedio de los telómeros determinadas mediante PCR cuantitativa (qPCR) como se muestra en el Ejemplo 4.

Descripción detallada de la invención

La invención se expone en el conjunto adjunto de reivindicaciones. Esta divulgación describe, entre otros, métodos para identificar individuos sospechosos de tener o que han sido diagnosticados con un trastorno proliferativo celular que se beneficiarán del tratamiento con un compuesto inhibidor de la telomerasa así como métodos para tratar a estos individuos. La longitud de los telómeros en las células cancerosas puede variar de un tumor a otro. Los inventores han

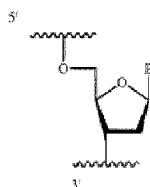
observado que las células cancerosas con longitudes de telómero más cortas responden mejor al tratamiento con compuestos inhibidores de la telomerasa (por ejemplo, imetelstat) en comparación con las células cancerosas que tienen longitudes de telómero más largas. Por consiguiente, en el presente documento se describen métodos para seleccionar un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa. También se describen en este documento métodos para tratar a un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer con un inhibidor de la telomerasa, cuando se determina que la longitud promedio relativa de los telómeros en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o menos de un intervalo relativo de longitud de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos.

## I. Técnicas generales

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

## II. Definiciones

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



Esta estructura incluye formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo (es decir, desoxirribosa y ribosa) y análogos. Con menos frecuencia, un grupo 5'-NH puede estar sustituido por el oxígeno 5'. "Análogos", en referencia a nucleósidos, incluye nucleósidos sintéticos que tienen fracciones de nucleobase modificadas (véase la definición de "nucleobase" más adelante) y/o fracciones de azúcar modificadas, tales como azúcares 2'-flúor y análogos adicionales. Tales análogos se diseñan típicamente para afectar las propiedades de unión, por ejemplo, estabilidad, especificidad o similares. El término nucleósido incluye los nucleósidos naturales, incluidas las formas 2'-desoxi y 2'-hidroxilo, por ejemplo, como se describe en Komberg y Baker, DNA Replication, 2a Ed. (Freeman, San Francisco, 1992) y análogos. "Análogos", en referencia a nucleósidos, incluye nucleósidos sintéticos que tienen fracciones de nucleobase modificadas (véase la definición de "nucleobase" más adelante) y/o fracciones de azúcar modificadas, por ejemplo, descritas generalmente por Scheit, Nucleotide Analogs (John Wiley, Nueva York, 1980). Dichos análogos incluyen nucleósidos sintéticos diseñados para mejorar las propiedades de unión, por ejemplo, estabilidad, especificidad o similares, como los descritos por Uhlmann y Peyman, Chemical Reviews 90: 543-584, 1990). Un oligonucleótido que contiene tales nucleósidos, y que normalmente contiene enlaces internucleosídicos sintéticos resistentes a nucleasas, puede denominarse en sí mismo un "análogo".

Un "polinucleótido" u "oligonucleótido" se refiere a un polímero u oligómero de la subunidad nucleosídica de ribosa y/o desoxirribosa que tiene entre aproximadamente 2 y aproximadamente 200 subunidades contiguas. Las subunidades de nucleósidos pueden unirse mediante una variedad de enlaces entre subunidades, que incluyen, pero no se limitan a, enlaces fosfodiéster, fosfotriéster, metilfosfonato, fosforamido P3'→N5', fosforamido N3'→P5', tiofosforamido N3'→P5' y fosforotioato. El término también incluye tales polímeros u oligómeros que tienen modificaciones, conocidas por un experto en la técnica, en el azúcar (por ejemplo, sustituciones 2'), la base (véase la definición de "nucleósido", más arriba), y los términos 3' y 5'. En realizaciones en las que la fracción de oligonucleótidos incluye una pluralidad de enlaces entre subunidades, cada enlace puede formarse usando la misma química, o puede usarse una mezcla de químicas de enlaces. Cuando un oligonucleótido está representado por una secuencia de letras, tales como "ATGUCCTG", se entenderá que los nucleótidos están en orden 5'→3' de izquierda a derecha. La representación de la secuencia de bases del oligonucleótido de esta manera no implica el uso de ningún tipo particular de subunidad internucleosídica en el oligonucleótido.

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

El término "lípidido" se usa ampliamente en este documento para abarcar sustancias que son solubles en disolventes orgánicos, pero poco solubles, si es que lo hacen, en agua. El término lípido incluye, pero no se limita a, hidrocarburos, aceites, grasas (tales como ácidos grasos y glicéridos), esteroides, esteroides y formas derivadas de estos compuestos. En algunas realizaciones, los lípidos son ácidos grasos y sus derivados, hidrocarburos y sus derivados y esteroides, tales como colesterol. Los ácidos grasos generalmente contienen un número par de átomos de carbono en una cadena lineal (comúnmente 12-24 carbonos) y pueden estar saturados o insaturados y pueden contener, o modificarse para contener, una variedad de grupos sustituyentes. Por simplicidad, el término "ácido graso" también incluye derivados de ácidos grasos, tales como grasas o ésteres. En algunas realizaciones, el término "lípidido" también incluye compuestos anfipáticos que contienen fracciones tanto lipídicas como hidrófilas.

Como se usa en este documento, "ácidos nucleicos teloméricos" significa una secuencia de ácido nucleico en un ácido nucleico de cadena doble o sencilla que codifica la secuencia del telómero del mamífero. En los humanos, la secuencia de repetición telomérica es TTAGGG en una cadena y CCCTAA en la otra cadena.

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

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

Se dice que un compuesto "inhibe la proliferación de células" si la proliferación de células en presencia del compuesto es menor que la observada en ausencia del compuesto. Es decir, la proliferación de las células se ralentiza o se detiene en presencia del compuesto. La inhibición de la proliferación de células cancerosas puede evidenciarse, por ejemplo, mediante la reducción del número de células o la tasa de expansión de las células, la reducción de la masa tumoral o la tasa de crecimiento tumoral, o el aumento de la tasa de supervivencia de un sujeto en tratamiento.

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 nucleasas en condiciones normales de nucleasa en el cuerpo al que está expuesto el oligonucleótido. Los enlaces fosforamidato N3'→P5' (NP) o tiofosforamidato N3'→P5' (NPS) descritos a continuación son resistentes a nucleasas.

Un "individuo" puede ser un mamífero, tal como cualquier organismo modelo de laboratorio común. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, humanos y primates no humanos, animales de granja, animales deportivos, mascotas, ratones, ratas y otros roedores. En algunas realizaciones, un individuo es un ser humano.

Como se usa en este documento, "tratamiento" (y variaciones gramaticales del mismo tales como "tratar" o "que se trata") se refiere a una intervención clínica diseñada para alterar el curso natural del individuo o célula que se está tratando durante el curso de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen, pero no se limitan a, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado patológico y remisión o pronóstico mejorado.

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

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

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

5 Como se usa en este documento, la forma singular "un", "una, uno" y "el, la" incluye referencias en plural a menos que se indique lo contrario.

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

10 Se pretende que cada limitación numérica máxima dada a lo largo de esta memoria descriptiva incluya cada limitación numérica inferior, como si tales limitaciones numéricas inferiores estuvieran expresamente escritas en el presente documento. Cada limitación numérica mínima dada a lo largo de esta memoria descriptiva incluirá cada limitación numérica más alta, como si tales limitaciones numéricas más altas estuvieran expresamente escritas en el presente documento. Cada intervalo numérico dado a lo largo de esta memoria descriptiva incluirá cada intervalo numérico más estrecho que se encuentre dentro de un intervalo numérico más amplio, como si tales intervalos numéricos más estrechos estuvieran todos expresamente escritos en el presente documento.

### 20 III. Compuestos inhibidores de la telomerasa

La telomerasa es una ribonucleoproteína que cataliza la adición de secuencias repetidas teloméricas (que tienen la secuencia 5'-TTAGGG-3' en humanos) a los extremos del cromosoma. Véase, por ejemplo, Blackburn, 1992, Ann. Rev. Biochem. 61: 113-129. La enzima se expresa en la mayoría de las células cancerosas, pero no en las células somáticas maduras. La pérdida de ADN telomérico puede desempeñar un papel en el desencadenamiento de la senescencia celular; véase Harley, 1991, Mutation Research 256: 271-282. Se ha demostrado que una variedad de células cancerosas son positivas para telomerasas, incluidas células de cáncer de piel, tejido conectivo, tejido 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). La selección de telomerasa puede ser eficaz para proporcionar tratamientos que discriminen entre células malignas y normales en un alto grado, evitando muchos de los efectos secundarios deletéreos 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 (por ejemplo, oligonucleótidos que tienen enlaces resistentes a nucleasas) así como compuestos de moléculas pequeñas. Se puede encontrar más información sobre los compuestos inhibidores de la telomerasa en la patente de los Estados Unidos No. 7.998.938.

#### A. Compuestos de molécula pequeña

Los inhibidores de la telomerasa de molécula pequeña incluyen, por ejemplo, BRACO19 ((9- 4- (N,N-dimetilamino) fenilamino)-3,6-bis(3-pirrolidino-propionamido)acridina (véase Mol. Pharmacol. 61 (5): 1154-62, 2002); DODC (dietiloxadibocianina) y telomestatina. Estos compuestos pueden actuar como estabilizadores G-quad, que promueven la formación de una configuración G-quad inactiva en el componente ARN de la telomerasa. Otros inhibidores de molécula pequeña de telomerasa incluyen BIBR1532 (ácido 2-[(E)-3-naften-2-il-but-2-enilamino] benzoico) (véase Ward & Autexier, Mol. Pharmacol. 68: 779-786, 2005; también J. Biol. Chem. 277 (18): 15566-72, 2002); AZT y otros análogos de nucleósidos, tales como ddG y ara-G (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.695.932 y 6.368.789), y ciertos derivados de tiopiridina, benzo[b]tiofeno y pirido[b]tiofeno, descritos por Gaeta et al. en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.767.278, 5.770.613, 5.863.936, 5.656.638 y 5.760.062. Otro ejemplo es el 3-clorobenzo[b]tiofen-2-carboxi-2'-[(2,5-diclorofenilamino)tia]hidracina, descrito en la patente de los Estados Unidos No. 5.760.062.

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

Los genes que codifican tanto la proteína como los componentes de ARN de la telomerasa humana se han clonado y secuenciado (véanse las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.261.836 y 5.583.016, respectivamente). Los oligonucleótidos pueden dirigirse contra el ARNm que codifica el componente de la proteína telomerasa (cuya forma humana se conoce como transcriptasa inversa de la telomerasa humana o hTERT) o el componente de ARN de la holoenzima telomerasa (cuya forma humana se conoce como ARN de la telomerasa humana, o hTR).

La secuencia de nucleótidos del componente de ARN de la telomerasa humana (hTR) se muestra en el Listado de secuencias a continuación (SEQ ID NO: 1), en la dirección 5' a 3'. La secuencia se muestra usando las abreviaturas estándar de ribonucleótidos; los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia también representa la secuencia del ADNc, en la que los ribonucleótidos se reemplazan por desoxirribonucleótidos, siendo reemplazada la uridina (U) por timidina (T). La secuencia de la plantilla del componente de ARN se encuentra dentro de la región definida por los nucleótidos 46-56 (5'-CUAACCCUAAC-3') (SEQ ID NO: 2), que es complementaria a una secuencia telomérica compuesta de aproximadamente uno y dos tercios de unidades de repetición telomérica. La región plantilla funciona para especificar la secuencia de las repeticiones teloméricas que la telomerasa agrega a los extremos del cromosoma

y es esencial para la actividad de la enzima telomerasa (véase, por ejemplo, Chen et al., Cell 100: 503-514, 2000; Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (14): 7982-7987, 2001). El diseño de agentes antisentido, ribozimas o ARN pequeño de interferencia (ARNpi) para inhibir o causar la destrucción de ARNm es bien conocido (véase, por ejemplo, Lebedeva, I, et al., Annual Review of Pharmacology and Toxicology, Vol. 41: 403 -419, abril de 2001; Macejak, D, et al., Journal of Virology, Vol. 73 (9): 7745-7751, septiembre de 1999, y Zeng, Y. et al., PNAS Vol. 100 (17) páginas 9779-9784, 19 de agosto de 2003) y tales agentes pueden diseñarse para dirigirse al ARNm de hTERT y, por lo tanto, inhibir la producción de proteína hTERT en una célula diana, tal como una célula cancerosa (véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 6.444.650 y 6.331.399).

Los oligonucleótidos que se dirigen a hTR (es decir, el componente de ARN de la enzima) actúan como inhibidores de la actividad de la enzima telomerasa bloqueando o bien interfiriendo con la interacción de hTR con la proteína hTERT, cuya interacción es necesaria para la función de la telomerasa (véase, por ejemplo, Villeponteau et al., patente de los Estados Unidos No. 6.548.298).

Una región diana preferida de hTR es la región plantilla, que abarca los nucleótidos 30-67 de SEQ ID NO: 1 (GGGUUGCGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGGCCAUUUUUUGUCUAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGCUCCCCGCGCGCUGUUUUUCUCGCUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCUUCACCGUUCAUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCUGCUGGC CCGUUCGCCUCCCCGGGGACCUGCGGCGGGUCGCCUGCCCAGCCCCGAAC CCCGCCUGGAGCCGCGGUCGCGCCCGGGGCUUCUCCGAGGCACCCACUGC CACCGCGAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUCGGGGGCGAGGG CGAGGUUCACCGUUUCAGGCCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCC GCGGCGCGAUUCCUGAGCUGUGGGACGUGCACCCAGGACUCGGCUCACA CAUGCAGUUCGCUUUCUGUUGGUGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCC GUCACCCCUCGCCGCGCAGUGGGGGCUUGUGAACCCCCAAACCUGACUGAC UGGGCCAGUGUGCU). Los oligonucleótidos que se dirigen a esta región se denominan en el presente documento "inhibidores de la plantilla de hTR" (véase, por ejemplo, Herbert et al., Oncogene 21 (4): 638-42 (2002)). Preferiblemente, 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: 2), que abarca los nucleótidos 46-56 de la SEQ ID NO: 1.

Otra región diana preferida es la región que abarca los nucleótidos 137-179 de hTR (véase Pruzan et al., Nucl. Acids Research, 30: 559-568, 2002). Dentro de esta región, la secuencia que abarca 141-153 es 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, en la que los oligonucleótidos están diseñados para ser complementarios a porciones accesibles de la secuencia de hTR fuera de la región plantilla, incluidos los nucleótidos 137-196, 290-319 y 350-380 de hTR.

La región del oligonucleótido terapéutico que se dirige a la secuencia de hTR es preferiblemente exactamente complementaria a la secuencia de hTR correspondiente. Si bien los desajustes pueden tolerarse en ciertos casos, se espera que disminuyan la especificidad y la actividad del conjugado de oligonucleótidos resultante. En realizaciones particulares, la secuencia de bases del oligonucleótido se selecciona así para incluir una secuencia de al menos 5 nucleótidos exactamente complementaria a la diana de hTR, y se puede obtener una inhibición mejorada de la telomerasa si se emplean longitudes crecientes de secuencia complementaria, tales como al menos 8, al menos 10, al menos 12, al menos 13 o al menos 15 nucleótidos exactamente complementarios a la diana de hTR. En otras realizaciones, la secuencia del oligonucleótido incluye una secuencia de al menos 5 a 20, de al menos 8 a 20, de al menos 10 a 20 o de al menos 10 a 15 nucleótidos exactamente complementaria a la secuencia diana de hTR.

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

Si el oligonucleótido va a incluir regiones que no son complementarias a la secuencia diana, tales regiones se colocan típicamente en uno o en ambos extremos 5' o 3'. Los ejemplos de secuencias que se dirigen al ARN de la telomerasa humana (hTR) incluyen los siguientes:

Los enlaces internucleosídicos en el oligonucleótido pueden incluir cualquiera de las químicas de oligonucleótidos disponibles, por ejemplo, fosfodiéster, fosfotriéster, metilfosfonato, fosforamido P3'4N5', fosforamido N3'→ P5', tiofosforamido N3'→ P5' y fosforotioato. Normalmente, pero no necesariamente, todos los enlaces internucleosídicos dentro del oligonucleótido serán del mismo tipo, aunque el componente oligonucleotídico puede sintetizarse usando una mezcla de enlaces diferentes.

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

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

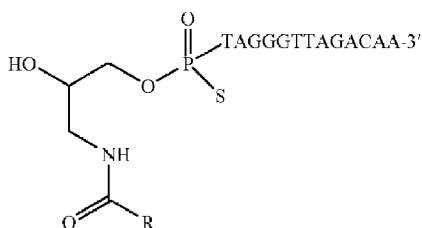
El oligonucleótido GRN163 administrado solo ha mostrado actividad inhibidora *in vitro* en cultivo celular, incluyendo carcinoma epidermoide, epitelio de mama, carcinoma renal, adenocarcinoma renal, páncreas, cerebro, colon, próstata, leucemia, linfoma, mieloma, epidérmico, cervical, ovárico y células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

El oligonucleótido GRN163 también se ha probado y se ha demostrado que es terapéuticamente eficaz en una variedad de modelos de tumores animales, que incluyen ovario y pulmón, tanto de células pequeñas como de células no pequeñas (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 7.998.938).

#### C. Conjugados de lípido-oligonucleótido

En algunos aspectos, los inhibidores de telomerasa con base en oligonucleótidos descritos en el presente documento incluyen al menos un grupo lipídico unido covalentemente (véase la publicación de la patente de los Estados Unidos No. 2005/0113325). Esta modificación proporciona propiedades superiores de captación celular, de modo que se puede obtener un efecto biológico equivalente usando cantidades más pequeñas del oligonucleótido conjugado en comparación con la forma no modificada. Cuando se aplica al entorno terapéutico humano, esto puede traducirse en menores riesgos de toxicidad y ahorros de costes.

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



En un ejemplo de estructura, la fracción lipídica es palmitoilamida (derivada del ácido palmítico), conjugada a través de un enlazador de aminoglicerol al grupo tiofosfato 5' de un oligonucleótido unido a NPS. El oligonucleótido de NPS que tiene la secuencia mostrada para GRN163 y conjugado de esta manera (como se muestra a continuación) se denomina GRN163L (Imetelstat) en el presente documento. En un segundo ejemplo de estructura, el lípido, tal como palmitoilamida, se conjuga a través del grupo terminal amino 3' de un oligonucleótido de NPS.

#### D. Composiciones farmacéuticas

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

Cuando se emplean como productos farmacéuticos, los compuestos inhibidores de la telomerasa se pueden administrar en forma de composiciones farmacéuticas. Estos compuestos se pueden administrar mediante una variedad de vías que incluyen oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular e intranasal. Estos compuestos son eficaces tanto como composiciones inyectables como orales. Tales composiciones se preparan de una manera bien conocida en la técnica farmacéutica y comprenden al menos un compuesto activo. Cuando se emplean como composiciones orales, los compuestos inhibidores de la telomerasa descritos en el presente documento están protegidos de la digestión ácida en el estómago mediante un protector farmacéuticamente aceptable.

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

Al preparar una formulación, puede ser necesario moler el compuesto liofilizado activo para proporcionar el tamaño de partícula apropiado antes de combinarlo con los otros ingredientes. Si el compuesto activo es sustancialmente insoluble, normalmente se muele hasta un tamaño de partícula de menos de 200 mallas. Si el compuesto activo es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de partícula normalmente se ajusta moliendo para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo, alrededor de 40 mallas.

Algunos ejemplos de excipientes o vehículos adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe, y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes tales como metil y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes; y agentes saborizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente mediante el empleo de procedimientos conocidos en la técnica.

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

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

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el compuesto inhibidor de la telomerasa del ingrediente activo principal se mezcla con un excipiente o vehículo farmacéutico para formar una composición sólida de formulación previa que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se hace referencia a estas composiciones de formulación previa como homogéneas, se quiere decir que el ingrediente activo se dispersa uniformemente por toda la composición de modo que la composición se puede subdividir fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas.

Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden recubrirse o bien componerse para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada y para proteger los compuestos inhibidores de la telomerasa de la hidrólisis ácida en el estómago. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interior y un componente de dosificación exterior, estando este último en forma de envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permite que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase en su liberación. Puede usarse una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, tales materiales incluyen varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que se pueden incorporar las nuevas composiciones de la presente invención para la administración oral o por inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes saborizados adecuadamente, suspensiones acuosas o oleosas y emulsiones saborizadas con aceites comestibles tales como aceite de maíz, aceite de semilla de

algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describió anteriormente. Las composiciones pueden administrarse por vía respiratoria oral o nasal para un efecto local o sistémico. Las composiciones en disolventes farmacéuticamente aceptables se pueden nebulizar mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas se pueden inhalar directamente desde el dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador se puede conectar a una mascarilla o un respirador de presión positiva intermitente. Las composiciones en solución, suspensión o polvo también se pueden administrar, por vía oral o nasal, desde dispositivos que administran la formulación de una manera apropiada.

#### IV. Métodos de la invención

Las referencias a los métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía o métodos de diagnóstico in vivo en esta sección de la descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos.

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

#### A. Trastornos proliferativos celulares

Un "trastorno proliferativo" es cualquier trastorno celular en el que las células proliferan más rápidamente que el crecimiento de tejido normal. Por lo tanto, una "célula en proliferación" es una célula que está proliferando más rápidamente que las células normales. El trastorno proliferativo incluye, pero no se limita a, neoplasias. Una "neoplasia" es un crecimiento de tejido anormal, que generalmente forma una masa distinta que crece por proliferación celular más rápidamente que el crecimiento de tejido normal. Las neoplasias muestran una falta parcial o total de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal. Estos pueden clasificarse ampliamente en tres tipos principales. Las neoplasias malignas que surgen de estructuras epiteliales se denominan carcinomas, neoplasias malignas que se originan en tejidos conectivos como músculo, cartílago, grasa o hueso se denominan sarcomas y tumores malignos que afectan a las estructuras hematopoyéticas (estructuras pertenecientes a la formación de células sanguíneas), incluidos componentes del sistema inmunitario, se denominan leucemias y linfomas. Un tumor es el crecimiento neoplásico de la enfermedad del cáncer. Como se usa en el presente documento, una neoplasia, también denominada "tumor", pretende abarcar neoplasias hematopoyéticas así como neoplasias sólidas. Otros trastornos proliferativos incluyen, pero no se limitan a, neurofibromatosis.

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

Los métodos descritos en el presente documento también son útiles para tratar tumores sólidos (tales como tumores sólidos avanzados). En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar el cáncer de pulmón, que incluye, por ejemplo, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, tal como NSCLC avanzado), cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC, tal como SCLC avanzado) y neoplasias tumorales sólidas avanzadas en el pulmón. En algunas realizaciones, se proporciona un método para tratar cualquiera de cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, neoplasias gástricas tal como cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal tal como cáncer gastrointestinal superior, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vejiga, glioblastoma, sarcomas tal como osteosarcoma, sarcoma de Ewing y meningiosarcoma, melanoma (incluidos melanoma metastásico y melanoma maligno), cáncer colorrectal y cáncer de páncreas.

En algunas realizaciones, el método es útil para tratar uno o más de los siguientes: linfoma cutáneo de células T (CTCL), leucemia, linfoma folicular, linfoma de Hodgkin y leucemia mieloide aguda.

- En algunas realizaciones, la enfermedad es un cáncer de cualquiera de los siguientes: carcinoma de células basales, meduloblastoma, glioblastoma, mieloma múltiple, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mielógena aguda, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón (cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de esófago, cáncer de estómago, cáncer biliar, cáncer de próstata, cáncer de hígado, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer gástrico, cáncer de vesícula biliar, cáncer de ovario y cáncer de vejiga. En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en adenocarcinoma ductal de páncreas, adenocarcinoma de colon y cistadenocarcinoma de ovario. En algunas realizaciones, el cáncer es un adenocarcinoma ductal de páncreas. En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor que está mal perfundido y/o mal vascularizado.
- En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de páncreas, que incluye, por ejemplo, adenocarcinoma de páncreas, carcinoma adenoescamoso de páncreas, carcinoma de células escamosas de páncreas y carcinoma de células gigantes de páncreas. En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas es cáncer de páncreas exocrino. En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas es cáncer de páncreas endocrino (tal como carcinoma de células de los islotes). En algunas realizaciones, el cáncer de páncreas es cáncer de páncreas metastásico avanzado.
- Otros ejemplos de cánceres que pueden tratarse mediante los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, carcinoma adenocortical, metaplasia mieloide agnógena, cánceres relacionados con SIDA (por ejemplo, linfoma relacionado con SIDA), cáncer anal, cáncer de apéndice, astrocitoma (por ejemplo, cerebeloso y cerebral), carcinoma de células basales, cáncer de vías biliares (por ejemplo, extrahepático), cáncer de vejiga, cáncer de hueso (osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno), tumor cerebral (por ejemplo, glioma, glioma de tronco encefálico, glioma cerebeloso o astrocitoma cerebral (por ejemplo, astrocitoma pilocítico, astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico (maligno), glioma maligno, ependimoma, oligodendglioma, meningioma, meningiosarcoma, craneofaringioma, hemangioblastomas, meduloblastoma, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, glioma de vías visuales, e hipotalámico y glioblastoma), cáncer de mama, adenomas/carcinoides bronquiales, tumor carcinoide (por ejemplo, tumor carcinoide gastrointestinal), carcinoma del sistema nervioso central primario desconocido, linfoma, cáncer cervical, cáncer de colon, cáncer colorrectal, trastornos mieloproliferativos crónicos, cáncer de endometrio (por ejemplo, cáncer de útero), ependimoma, cáncer de esófago, familia de tumores de Ewing, (por ejemplo, melanoma intraocular y retinoblastoma), cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico (estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor del estroma gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales (por ejemplo, extracraneal, extragonadal, ovárico), tumor trofoblástico gestacional, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado) (por ejemplo, carcinoma hepático y hepatoma), cáncer de hipofaringe, carcinoma de células de los islotes (páncreas endocrino), cáncer de laringe, leucemia, cáncer de labio y cavidad oral, cáncer oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón), neoplasia linfoide (por ejemplo, linfoma), meduloblastoma, cáncer de ovario, mesotelioma, cáncer de cuello escamoso metastásico, cáncer de boca, síndrome de neoplasia endocrina múltiple, síndromes mielodisplásicos, enfermedades mielodisplásicas/mieloproliferativas, cáncer de cavidad nasal y de seno paranasal, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, cáncer neuroendocrino, cáncer de orofaringe, cáncer de ovario (por ejemplo, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales de ovario, tumor de ovario de bajo potencial maligno), cáncer de páncreas, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, cáncer de peritoneo, cáncer de faringe, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de pituitaria, blastoma pleuropulmonar, linfoma, linfoma primario del sistema nervioso central (microglioma), linfangiomatosis pulmonar, cáncer de recto, cáncer renal, cáncer de pelvis renal y de uréter (cáncer de células de transición), rhabdomyosarcoma, cáncer de glándulas salivales, cáncer de piel (por ejemplo, no melanoma (por ejemplo, carcinoma de células escamosas, melanoma y carcinoma de células de Merkel), cáncer de intestino delgado, cáncer de células escamosas, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma y carcinoma tímico, cáncer de tiroides, esclerosis tuberosa, cáncer de uretra, cáncer de vagina, cáncer de vulva, tumor de Wilms y trastorno linfoproliferativo después de trasplante (PTLD), proliferación vascular anormal asociada con facomatosis, edema (tal como el asociado con tumores cerebrales), y síndrome de Meigs.
- En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor sólido (tal como un tumor sólido avanzado). El tumor sólido incluye, entre otros, sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sarcoma de Kaposi, sarcoma de tejidos blandos sacronomasinobioma uterino, mesotelioma, Tumor de Ewing, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, meningiosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas, papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales (incluyendo, por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de células renales de células claras, carcinoma papilar de células renales, carcinoma de células renales cromóforo, carcinoma de células renales de los conductos colectores, carcinoma de células renales granular, carcinoma de células renales granular mixto, angiomiolipomas renales, o carcinoma de células renales fusiformes), hepatoma, carcinoma de vías biliares, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

En algunas realizaciones, la neoplasia linfoide (por ejemplo, linfoma) es una neoplasia de células B. Ejemplos de neoplasias de células B incluyen, pero no se limitan a, neoplasias de células B precursoras (por ejemplo, leucemia/linfoma linfoblástico B precursor) y neoplasias de células B periféricas (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica de células B/leucemia prolinfocítica/linfoma linfocítico pequeño (NHL linfocítico pequeño (SL)), linfoma/inmunocitoma linfoplasmatocitoide, linfoma de células del manto, linfoma del centro del folículo, linfoma folicular (por ejemplo, grados citológicos: I (células pequeñas), II (células pequeñas y grandes mixtas), III (células grandes) y/o subtipo: difuso y predominantemente del tipo de células pequeñas), linfoma no Hodgkin (NHL) de grado bajo/folicular, NHL de grado intermedio/folicular, linfoma de células B de la zona marginal (por ejemplo, extranodal (por ejemplo, células B +/- monocitoides de tipo MALT) y/o nodal (por ejemplo, células B +/- monocitoides)), linfoma de zona marginal esplénica (por ejemplo, linfocitos+vellosos), leucemia de células pilosas, plasmacitoma/mieloma de células plasmáticas (por ejemplo, mieloma y mieloma múltiple), linfoma de células B grandes difusas (por ejemplo, linfoma de células B mediastinales (tímicas) primarias), NHL difuso de grado intermedio, linfoma de Burkitt, linfoma de células B de alto grado, NHL inmunoblástico de alto grado tipo Burkitt, NHL linfoblástico de alto grado, NHL de células pequeñas no escindidas de alto grado, NHL de enfermedad voluminosa, linfoma relacionado con SIDA y macroglobulinemia de Waldenstrom).

En algunas realizaciones, la neoplasia linfoide (por ejemplo, linfoma) es una neoplasia de células T y/o supuestas células NK. Ejemplos de neoplasias de células T y/o supuestas neoplasias de células NK incluyen, pero no se limitan a, neoplasias de células T precursoras (linfoma/leucemia linfoblástica T precursora) y neoplasias periféricas de células T y células NK (por ejemplo, leucemia linfocítica crónica de células T/leucemia prolinfocítica y leucemia de linfocitos granulares grandes (LGL) (por ejemplo, tipo de células T y/o tipo de células NK), linfoma cutáneo de células T (por ejemplo, micosis fungoide/síndrome de Sezary), linfomas no especificados de células T primarias (por ejemplo, categorías citológicas (por ejemplo, células de tamaño mediano, células medianas y grandes mezcladas), células grandes, células linfoepitelioides, linfoma de células T $\gamma\delta$  del subtipo hepatoesplénico y linfoma paniculítico subcutáneo de células T), linfoma de células T angioinmunoblásticas (AILD), linfoma angiocéntrico, linfoma de células T intestinales (por ejemplo, enteropatía +/- asociada), linfoma/leucemia de células T adultas (ATL), linfoma anaplásico de células grandes (ALCL) (por ejemplo, tipos de células T y nulas CD30+), linfoma anaplásico de células grandes y linfoma de Hodgkin).

En algunas realizaciones, la neoplasia linfoide (por ejemplo, linfoma) es la enfermedad de Hodgkin. Por ejemplo, la enfermedad de Hodgkin puede ser con predominio de linfocitos, esclerosis nodular, celularidad mixta, agotamiento de linfocitos y/o rica en linfocitos.

En algunas realizaciones, el cáncer es leucemia. En algunas realizaciones, la leucemia es leucemia crónica. Los ejemplos de leucemia crónica incluyen, pero no se limitan a, leucemia mielocítica crónica I (granulocítica), leucemia mielógena crónica y leucemia linfocítica crónica (CLL). En algunas realizaciones, la leucemia es leucemia aguda. Los ejemplos de leucemia aguda incluyen, pero no se limitan a, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia mieloide aguda, leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda (por ejemplo, leucemia mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia).

En algunas realizaciones, el cáncer es un tumor líquido o plasmacitoma. El plasmacitoma incluye, pero no se limita a, mieloma. El mieloma incluye, pero no se limita a, un plasmacitoma extramedular, un mieloma solitario y mieloma múltiple. En algunas realizaciones, el plasmacitoma es mieloma múltiple.

En algunas realizaciones, el cáncer es mieloma múltiple. Los ejemplos de mieloma múltiple incluyen, pero no se limitan a, mieloma múltiple IgG, mieloma múltiple IgA, mieloma múltiple IgD, mieloma múltiple IgE y mieloma múltiple no secretor. En algunas realizaciones, el mieloma múltiple es mieloma múltiple IgG. En algunas realizaciones, el mieloma múltiple es mieloma múltiple IgA. En algunas realizaciones, el mieloma múltiple es un mieloma múltiple latente o indolente. En algunas realizaciones, el mieloma múltiple es mieloma múltiple progresivo. En algunas realizaciones, el mieloma múltiple puede ser resistente a un fármaco, tal como, pero sin limitarse a, bortezomib, dexametasona (Dex-), doxorubicina (Dox-) y melfalán (LR).

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

En el presente documento se proporcionan métodos para seleccionar un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa. La longitud de los telómeros se determina analizando la longitud de los nucleótidos teloméricos en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo. Por "beneficio" se entiende que hay una diferencia positiva o beneficiosa en la gravedad o la aparición de al menos una puntuación clínica o biológica (tal como, pero sin limitarse, supervivencia libre de progresión), valor o medida utilizada para evaluar tales individuos de los que han sido tratados con los compuestos inhibidores de la telomerasa de la presente invención en comparación con los que no lo han hecho.

#### 1. Obtención de muestras biológicas

Las muestras biológicas de individuos diagnosticados o sospechosos de tener un trastorno de proliferación celular (tal como cáncer) se pueden obtener de diversas formas. Por ejemplo, se puede obtener una muestra biológica de un

tumor sólido, que puede ser un tumor accesible por vía subcutánea o de cualquier otro tipo de tumor sólido canceroso accesible para biopsia o extirpación quirúrgica. La muestra biológica puede obtenerse mediante cualquier método conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, biopsia con aguja o núcleo o aspiración con aguja fina. Además, la muestra biológica puede ser fijada, incluida en parafina, fresca o congelada antes de que se determine la longitud de los telómeros. En algunas realizaciones, la muestra biológica se fija con formalina y luego se embebe en parafina. En algunas realizaciones, el individuo tiene o se sospecha que tiene un cáncer de transmisión sanguínea (es decir, un cáncer hematológico, tal como, pero no limitado a, leucemia, linfoma, etc.). En este caso, se puede obtener una muestra biológica de la sangre del individuo.

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

Hay numerosos métodos disponibles en la técnica para determinar la longitud de los telómeros a partir de células en muestras biológicas de acuerdo con los métodos descritos en este documento.

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

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

En otro aspecto, las longitudes de los telómeros pueden medirse mediante citometría de flujo (Hultdin, M. et al., *Nucleic Acids Res.* 26: 3651-3656 (1998); Rufer, N. et al., *Nat. Biotechnol.* 16 : 743 - 747 (1998)). Los métodos de citometría de flujo son variaciones de las técnicas FISH. Si el material de partida es tejido, se prepara una suspensión celular, generalmente mediante separación mecánica y/o tratamiento con proteasas. Las células se fijan con un fijador y se hibridan con una sonda específica de secuencia de telómeros, preferiblemente una sonda de PNA, marcada con un marcador fluorescente. Después de la hibridación, las células se lavan y luego se analizan mediante FACS. La señal de fluorescencia se mide para las células en G0/G1 después de la sustracción apropiada de la fluorescencia de fondo. Esta técnica es adecuada para la estimación rápida de la longitud de los telómeros para un gran número de muestras. Similar a TRF, la longitud de los telómeros es la longitud promedio de los telómeros dentro de la célula.

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

### a. qPCR en muestras incluidas en parafina fijadas con formalina (FFPE)

En algunos aspectos, la longitud de los telómeros se determina usando qPCR de ADN extraído de muestras biológicas fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE).

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

El umbral es un nivel de  $\Delta Rn$  que se determina automáticamente mediante el software Sequence Detection Systems o se establece manualmente y que se utiliza para la determinación de Ct en ensayos en tiempo real. El nivel se establece para estar por encima de la línea base y lo suficientemente bajo para estar dentro de la región de crecimiento exponencial de la curva de amplificación. El umbral es la línea cuya intersección con el gráfico de amplificación define el Ct. Ct es el número de ciclo fraccional en el que la fluorescencia pasó el umbral. El ciclo de umbral de la muestra se determina restando el ciclo de umbral de una muestra de referencia del ciclo de umbral de la reacción en cadena de la polimerasa telomérica ( $\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{referencia}}$ ). La reacción en cadena de la polimerasa también se realiza con cebadores dirigidos a un gen de número de copia única como referencia para determinar el ciclo de umbral para el gen de número de copia única. La diferencia promedio del número de ciclos del gen de copia única con respecto a la reacción en cadena de la polimerasa telomérica determinará las longitudes de los telómeros ( $\Delta Ct = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{gen de copia única}}$ ).

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

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

Después de la extracción de ADN, el ADN se marca con un colorante fluorescente (tal como SYBR Green I, Invitrogen, Carlsbad, CA). En algunas realizaciones, el ADN se marca con cualquiera de aproximadamente 0,04X, 0,06X, 0,08X, 0,1X, 0,15X, 0,2X, 0,25X, 0,3X, 0,35X, 0,4X, 0,45X, 0,5X, 0,55X, 0,60X, 0,65X, 0,70X, 0,75X, 0,8X, 0,9X, 1,0X o 1,1X, inclusive, incluidos los valores entre estos números, con colorante SYBR Green I. Después del marcaje del ADN, se realiza una reacción en cadena de la polimerasa utilizando un ácido nucleico de copia única diana extraído de la muestra biológica de parafina fijada con formalina (que comprende una primera y segunda cadenas sustancialmente complementarias), un primer cebador genético de copia única (en el que el primer cebador genético de copia única es capaz de (i) hibridar con la primera cadena del ácido nucleico del gen de copia única diana y (ii) ser extendido por la ADN polimerasa para formar un cebador genético de copia única extendido), y un segundo cebador genético de copia única (en el que el segundo cebador del gen de copia única es capaz de (i) hibridar con el primer cebador del gen de copia única extendido y/o el ADN diana y (ii) ser extendido por la ADN polimerasa) y permitir que la reacción en cadena de la polimerasa se desarrolle en ciclos de desnaturización y extensión e identificar el ciclo de replicación en el que se pasa la señal de PCR de umbral.

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

de asociación varía de 45 °C a 70 °C, de 49 °C a 68 °C, de 50 °C a 60 °C durante un período de 5 segundos a 20 segundos.

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

En una realización, el tamaño del amplicón del gen de copia única en la reacción de PCR es similar al tamaño del amplicón para la reacción de PCR del telómero. En una realización, el amplicón de gen único generado por la extensión del primer y segundo cebadores es de aproximadamente 50 a 100 nucleótidos, de 60 a 90 nucleótidos, de 70 a 80 nucleótidos.

La longitud de los telómeros se determina restando el ciclo de umbral de la PCR cuantitativa de copia de gen único del ciclo de umbral de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa telomérica ( $\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{gen de copia única}}$ ). La diferencia de número de ciclo promedio del gen de copia única a la reacción en cadena de la polimerasa telomérica determinará las longitudes de los telómeros ( $\Delta Ct = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{gen de copia única}}$ ). La longitud de los telómeros se determina para un individuo y se correlaciona con la longitud de los telómeros observada en una población de individuos o en un individuo de referencia. En una realización, la edad de la población de individuos coincide con la edad del individuo que se está probando. En el caso de los seres humanos, la población de la misma edad está dentro de los 10 años de la edad del individuo, o dentro de los 5 años o dentro de 1 año. En otra realización, la población de individuos se empareja según el tipo de células cancerosas (tales como, pero sin limitarse a, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, leucemia, etc.).

La longitud de los telómeros se expresa como el producto de los telómeros normalizado por el producto génico de copia única. En otras palabras, la longitud relativa de los telómeros de una muestra es el factor por el cual la muestra experimental se diferencia de una muestra de ADN de referencia en su relación entre el número de copias repetidas de los telómeros y el número de copias de un solo gen. La cantidad de repeticiones de telómeros en cada muestra experimental se mide como el nivel de dilución de una muestra de ADN de referencia elegida arbitrariamente que haría que las muestras experimentales y de referencia fueran equivalentes con respecto al número de ciclos de PCR necesarios para generar una cantidad determinada de producto PCR de telómeros durante la fase exponencial de amplificación por PCR. De manera similar, la cantidad relativa del gen de copia única en cada muestra experimental se expresa como el nivel de dilución de la muestra de ADN de referencia necesaria para hacerla coincidir con la muestra experimental con respecto al número de ciclos de PCR necesarios para generar una cantidad determinada de producto de PCR del gen de copia única durante la fase exponencial de la PCR.

En una realización, para cada muestra experimental, la relación de los factores de dilución es la relación relativa de telómeros con respecto al gen de copia única (T/S). Por lo tanto, T/S = 1 cuando el ADN desconocido es idéntico al ADN de referencia en su relación de número de copias repetidas de telómeros con respecto al número de copia única. La muestra de ADN de referencia (con la que se comparan todas las muestras experimentales en un estudio determinado) puede ser de un solo individuo o puede ser una muestra combinada de varios individuos o puede ser de una o más líneas celulares que tienen telómeros de longitudes conocidas. La relación T/S de un individuo en relación con la relación T/S del individuo de referencia o la muestra combinada o las líneas celulares corresponde a la longitud relativa de los telómeros del ADN del individuo. En una realización, la línea celular se selecciona del grupo que consiste en células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5.

En otra realización, para cada muestra experimental, la relación de los factores de dilución es el  $\log_2$  del gen de copia única con respecto a la relación relativa de telómeros ( $\log_2 S/T$ ). La muestra de ADN de referencia (con la que se comparan todas las muestras experimentales en un estudio determinado) puede ser de un solo individuo o puede ser una muestra combinada de varios individuos o puede ser de una o más líneas celulares que tienen telómeros de longitudes conocidas. La relación  $\log_2 S/T$  de un individuo con respecto a la relación  $\log_2 S/T$  del individuo de referencia o la muestra combinada o las líneas celulares corresponde a la longitud relativa de los telómeros del ADN del individuo. En una realización, la línea celular se selecciona del grupo que consiste en células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5.

La correlación de la longitud de los telómeros medida del individuo y la población se examina mediante varios métodos estadísticos, tales como análisis de supervivencia, que incluyen modelos de regresión de riesgo proporcional de Cox, estimación de distribución de supervivencia de Kaplan-Meier, prueba de Peto Wilcoxon, análisis de máxima verosimilitud, análisis de regresión múltiple y otros.

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

Además, se puede añadir una variedad de agentes a la reacción de PCR para facilitar la hibridación, amplificación y detección óptimas. Estos incluyen sales, tampones, proteínas neutras, detergentes, etc. Pueden añadirse otros agentes para mejorar la eficacia de la reacción, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, agentes antimicrobianos, etc.

Se puede encontrar más información relacionada con la evaluación de la longitud de los telómeros mediante qPCR en las publicaciones de las solicitudes de patente de los Estados Unidos Nos. 2006/0210980, 2010/0151477 y 2011/0207128, así como en las publicaciones de solicitud de patente internacional Nos WO 2010/075413 y WO 2012/0135125.

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

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

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

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

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

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

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

La correlación de la longitud de los telómeros medida del individuo y la población se examina mediante varios métodos estadísticos, tales como análisis de supervivencia, que incluyen modelos de regresión de riesgo proporcional de Cox, estimación de distribución de supervivencia de Kaplan-Meier, prueba de Peto Wilcoxon, análisis de máxima verosimilitud, análisis de regresión múltiple y otros.

#### 3. Seleccionar a un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa

En algunos aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para seleccionar un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa, comprendiendo el método: determinar la longitud relativa de los telómeros analizando la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos en células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo; y seleccionar un individuo que se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de la telomerasa cuando se determina que la longitud media relativa de los telómeros en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo está en el percentil 50 o menos de un intervalo relativo de longitud de los telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos. En

algunas realizaciones, el inhibidor de la telomerasa comprende un oligonucleótido. En algunas realizaciones, el inhibidor de la telomerasa es imetelstat. En otra realización, el cáncer es cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de próstata o un cáncer hematológico. En otras realizaciones más, el individuo es un ser humano.

Puede usarse cualquier método para determinar la longitud relativa de los telómeros en el individuo, incluyendo cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En una realización, la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos se determina usando qPCR de ADN extraído de muestras biológicas fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE). Cuando se utiliza este método, la expresión "longitud relativa de los telómeros" se define como (i) la relación relativa del telómero con respecto al gen de copia única (T/S) o (ii) el  $\log_2$  del gen de copia única con respecto a la relación relativa de telómeros ( $\log_2$  S/T). En algunas realizaciones, dicho uno o más patrones conocidos son líneas celulares caracterizadas. Por "líneas celulares caracterizadas" se entiende que la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos de las células en las líneas celulares es conocida y relativamente constante. Los ejemplos no limitantes de líneas celulares caracterizadas incluyen células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. En otra realización, las líneas celulares caracterizadas se seleccionan de líneas celulares representativas de la muestra biológica del individuo. Los ejemplos no limitantes de estas líneas celulares pueden incluir líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, líneas celulares hepatocelulares o líneas celulares de ovario. En otras realizaciones más, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitud de telómero establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. En una realización, las células cancerosas de una pluralidad de tumores naturales pueden ser del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. En algunas realizaciones, se determina que la longitud de los telómeros en las células cancerosas presentes en la muestra biológica se encuentra en cualquiera del percentil 45, percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10, percentil 5, o menor que el intervalo de longitud de los telómeros, inclusive, incluyendo cualquier percentil entre estos números.

En otras realizaciones más, la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos se determina usando qPCR de ADN extraído de muestras biológicas fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE) y la expresión "longitud relativa de los telómeros" se define como el  $\log_2$  del gen de copia única con respecto a la relación relativa de telómeros ( $\log_2$  S/T). En algunas realizaciones, la relación  $\log_2$  S/T es menor que cualquiera de aproximadamente 0, -0,1, -0,2, -0,3, -0,4, -0,5, -0,6, -0,7, -0,8, -0,9, -1,0, -1,1, -1,2, -1,3, -1,4, -1,5, -1,6, -1,7, -1,8, -1,9, -2,0 o más.

En otra realización, la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos se determina usando telo-FISH. Cuando se usa este método, la expresión "longitud relativa de los telómeros" se define como el valor determinado usando la Ecuación 1 en los métodos descritos anteriormente. En algunas realizaciones, dicho uno o más patrones conocidos son líneas celulares caracterizadas. Por "líneas celulares caracterizadas" se entiende que los ácidos nucleicos teloméricos relativos de las células en las líneas celulares son conocidos y relativamente constantes. Los ejemplos no limitantes de líneas celulares caracterizadas incluyen células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. En otra realización, las líneas celulares caracterizadas se seleccionan de líneas celulares representativas de la muestra biológica del individuo. Los ejemplos no limitantes de estas líneas celulares pueden incluir líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, líneas celulares hepatocelulares o líneas celulares de ovario. En otras realizaciones más, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitud de telómero establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. En una realización, las células cancerosas de una pluralidad de tumores naturales pueden ser del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. En algunas realizaciones, se determina que la longitud de los telómeros en las células cancerosas presentes en la muestra biológica se encuentra en cualquiera del percentil 45, percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10, percentil 5, o menor que el intervalo de longitud de los telómeros, inclusive, incluyendo cualquier percentil entre estos números. En otras realizaciones, la longitud relativa de los telómeros según se determina utilizando la Ecuación 1 en los métodos descritos anteriormente es menor que cualquiera de aproximadamente 0, -0,1, -0,2, -0,3, -0,4, -0,5, -0,6, -0,7, -0,8, -0,9, -1,0, -1,5, -2,0, -2,5, -3,0, -3,5, -4,0, -4,5, -5,0, -5,5, -6,0, -6,5, -7,0, -7,5, -8,0, -8,5, -9,0, -9,5, -10,0 o más, inclusive, incluido cualquier número entre estos valores.

#### C. Métodos de tratamiento de los trastornos proliferativos celulares usando inhibidores de la telomerasa

Las referencias a los métodos de tratamiento mediante terapia o cirugía o métodos de diagnóstico in vivo en esta sección de la descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en esos métodos.

En algunos aspectos, la presente invención se dirige a métodos para inhibir los síntomas o afecciones (discapacidades, deficiencias) asociados con un trastorno de proliferación celular (tal como cáncer) como se describe en detalle anteriormente. Como tal, no se requiere que todos los efectos de la afección se prevengan o inviertan por completo, aunque los efectos de los métodos descritos en la actualidad probablemente se extienden a un beneficio terapéutico significativo para el paciente. Como tal, un beneficio terapéutico no es necesariamente una prevención o cura completa para una condición particular que resulta de un trastorno proliferativo celular (tal como cáncer), sino que puede abarcar un resultado que incluye reducir o prevenir los síntomas que resultan de un trastorno proliferativo celular, reducir o prevenir la aparición de tales síntomas (cuantitativa o cualitativamente), reducir la gravedad de tales

síntomas o efectos fisiológicos de los mismos, y/o mejorar la recuperación del individuo después de experimentar síntomas de un trastorno proliferativo celular.

Específicamente, una composición de la presente invención (tal como cualquiera de los compuestos inhibidores de la telomerasa descritos en este documento), cuando se administra a un individuo, puede tratar o prevenir uno o más de los síntomas o afecciones asociados con un trastorno proliferativo celular (tal como cáncer) y/o reducir o aliviar los síntomas o las afecciones asociadas con este trastorno. Como tal, proteger a un individuo de los efectos o síntomas resultantes de un trastorno proliferativo celular (tal como cáncer) incluye tanto prevenir como reducir la aparición y/o gravedad de los efectos del trastorno y tratar a un paciente en el que los efectos del trastorno ya están ocurriendo o comenzando a ocurrir. Un efecto beneficioso puede ser evaluado fácilmente por un experto en la técnica y/o por un médico capacitado que esté tratando al paciente. Preferiblemente, existe una diferencia positiva o beneficiosa en la gravedad o aparición de al menos una puntuación, valor o medida clínica o biológica utilizada para evaluar a dichos pacientes en aquellos que han sido tratados con los métodos de la presente invención en comparación con aquellos que no.

Los métodos se pueden practicar en un entorno adyuvante. "Entorno adyuvante" se refiere a un entorno clínico en el que un individuo ha tenido antecedentes de una enfermedad proliferativa, en particular cáncer, y en general (pero no necesariamente) ha respondido a la terapia, que incluye, pero no se limita a, cirugía (tal como resección quirúrgica), radioterapia y quimioterapia. Sin embargo, debido a su historial de enfermedad proliferativa (tal como cáncer), estos individuos se consideran en riesgo de desarrollar la enfermedad. El tratamiento o la administración en el "entorno adyuvante" se refiere a un modo de tratamiento posterior. El grado de riesgo (es decir, cuando un individuo en el entorno adyuvante se considera de "alto riesgo" o "bajo riesgo") depende de varios factores, más generalmente la extensión de la enfermedad cuando se trata por primera vez.

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

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

En otros aspectos, en el presente documento se proporcionan métodos para tratar a un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer, comprendiendo el método: administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la telomerasa al individuo cuando la longitud promedio relativa de los telómeros en las células cancerosas presentes en una muestra biológica del individuo se ha determinado que se encuentra en el percentil 50 o menos de un intervalo relativo de longitud de telómeros determinado a partir de uno o más patrones conocidos. En algunas realizaciones, el inhibidor de la telomerasa es imetelstat. En otra realización, el cáncer es cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de mama, cáncer de próstata o un cáncer hematológico. En otras realizaciones más, el individuo es un ser humano.

Puede usarse cualquier método para determinar la longitud relativa de los telómeros en el individuo, incluyendo cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En una realización, la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos se determina usando qPCR de ADN extraído de muestras biológicas fijadas con formalina e incluidas en parafina (FFPE). Cuando se utiliza este método, la expresión "longitud relativa de los telómeros" se define como (i) la relación relativa de los telómeros con respecto al gen de copia única (T/S) o (ii)  $\log_2$  del gen de copia única con respecto a la relación relativa de telómeros ( $\log_2$  S/T). En algunas realizaciones, dicho uno o más patrones conocidos son líneas celulares caracterizadas. Por "líneas celulares caracterizadas" se entiende que la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos de las células en las líneas celulares es conocida y relativamente constante. Los ejemplos no limitantes de líneas celulares caracterizadas incluyen células M14Mel, células A549, células SK-Mel-5 y células Ovar-5. En otra realización, las líneas celulares caracterizadas se seleccionan de líneas celulares representativas de la muestra biológica del individuo. Los ejemplos no limitantes de estas líneas celulares pueden incluir líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, líneas celulares hepatocelulares o líneas celulares de ovario. En otras realizaciones más, dicho uno o más de los patrones conocidos es un intervalo de longitud de telómero establecido a partir de una pluralidad de tumores de origen natural de una pluralidad de individuos. En una realización, las células cancerosas de una pluralidad de tumores naturales pueden ser del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica del individuo. En algunas realizaciones, se determina que la

longitud de los telómeros en las células cancerosas presentes en la muestra biológica se encuentra en cualquiera del percentil 45, percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10, percentil 5, o menor que el intervalo de longitud de los telómeros, inclusive, incluyendo cualquier percentil entre estos números.

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

#### D. Administración de inhibidores de la telomerasa

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

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

Para la administración oral, el inhibidor de la telomerasa puede tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables tales como agentes aglutinantes; rellenos; lubricantes desintegrantes; o agentes humectantes. Las preparaciones líquidas para administración oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábica); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite mezclado, ésteres oleosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, metil o propil-p-hidroxibenzoatos o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, saborizantes y colorantes según sea apropiado.

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

En algunas realizaciones, la cantidad de inhibidor de la telomerasa en la composición (tal como una composición farmacéutica) se incluye en cualquiera de los siguientes intervalos: aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mg, aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg, aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg, aproximadamente 15 a aproximadamente 20 mg, aproximadamente 20 a aproximadamente 25 mg, aproximadamente 25 a aproximadamente 30 mg, aproximadamente 30 a aproximadamente 40 mg, aproximadamente 40 a aproximadamente 50 mg, aproximadamente 50 a aproximadamente 60 mg, aproximadamente 60 a aproximadamente 75 mg, aproximadamente 75 a aproximadamente 100 mg, o cualquier intervalo en el mismo, y comprendiendo el resto el o los excipientes o vehículos.

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

Cantidades eficaces ejemplares de un inhibidor de la telomerasa en la composición farmacéutica incluyen, pero no se limitan a, al menos aproximadamente cualquiera de 25 mg/m<sup>2</sup>, 30 mg/m<sup>2</sup>, 50 mg/m<sup>2</sup>, 60 mg/m<sup>2</sup>, 75 mg/m<sup>2</sup>, 80 mg/m<sup>2</sup>, 90 mg/m<sup>2</sup>, 100 mg/m<sup>2</sup>, 120 mg/m<sup>2</sup>, 125 mg/m<sup>2</sup>, 150 mg/m<sup>2</sup>, 160 mg/m<sup>2</sup>, 175 mg/m<sup>2</sup>, 180 mg/m<sup>2</sup>, 200 mg/m<sup>2</sup>, 210 mg/m<sup>2</sup>, 220 mg/m<sup>2</sup>, 250 mg/m<sup>2</sup>, 260 mg/m<sup>2</sup>, 300 mg/m<sup>2</sup>, 350 mg/m<sup>2</sup>, 400 mg/m<sup>2</sup>, 500 mg/m<sup>2</sup>, 540 mg/m<sup>2</sup>, 750 mg/m<sup>2</sup>, 1000 mg/m<sup>2</sup> o 1080 mg/m<sup>2</sup>. En diversas realizaciones, la composición farmacéutica incluye menos de aproximadamente cualquiera de 350 mg/m<sup>2</sup>, 300 mg/m<sup>2</sup>, 250 mg/m<sup>2</sup>, 200 mg/m<sup>2</sup>, 150 mg/m<sup>2</sup>, 120 mg/m<sup>2</sup>, 100 mg/m<sup>2</sup>, 90 mg/m<sup>2</sup>, 50 mg/m<sup>2</sup> o 30 mg/m<sup>2</sup> de un inhibidor de la telomerasa. En algunas realizaciones, la cantidad de inhibidor de la telomerasa por administración es menor que aproximadamente cualquiera de 25 mg/m<sup>2</sup>, 22 mg/m<sup>2</sup>, 20 mg/m<sup>2</sup>, 18 mg/m<sup>2</sup>, 15 mg/m<sup>2</sup>, 14 mg/m<sup>2</sup>, 13 mg/m<sup>2</sup>, 12 mg/m<sup>2</sup>, 11 mg/m<sup>2</sup>, 10 mg/m<sup>2</sup>, 9 mg/m<sup>2</sup>, 8 mg/m<sup>2</sup>, 7 mg/m<sup>2</sup>, 6 mg/m<sup>2</sup>, 5 mg/m<sup>2</sup>, 4 mg/m<sup>2</sup>, 3 mg/m<sup>2</sup>, 2 mg/m<sup>2</sup> o 1 mg/m<sup>2</sup>. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de un inhibidor de la telomerasa en la composición farmacéutica se incluye en cualquiera de los siguientes intervalos: aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 10 a aproximadamente 25 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 50 a aproximadamente 75 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 75 a aproximadamente 100 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 100 a aproximadamente 125 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 125 a aproximadamente 150 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 150 a aproximadamente 175 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 175 a aproximadamente 200 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 200 a aproximadamente 225 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 225 a aproximadamente 250 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 250 a aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 300 a aproximadamente 350 mg/m<sup>2</sup>, o aproximadamente 350 a aproximadamente 400 mg/m<sup>2</sup>. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de un inhibidor de la telomerasa en la composición farmacéutica es de aproximadamente 5 a aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup>, tal como de aproximadamente 20 a aproximadamente 300 mg/m<sup>2</sup>, de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 100 a aproximadamente 150 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 120 mg/m<sup>2</sup>, aproximadamente 130 mg/m<sup>2</sup>, o aproximadamente 140 mg/m<sup>2</sup>, o aproximadamente 260 mg/m<sup>2</sup>.

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

Los ejemplos de frecuencias de dosificación para las composiciones farmacéuticas (tales como una composición farmacéutica que contiene cualquiera de los inhibidores de la telomerasa descritos en este documento) incluyen, pero no se limitan a, diariamente; cada dos días; dos veces a la semana; tres veces por semana; semanal sin descanso; semanalmente, tres de cada cuatro semanas; una vez cada tres semanas; una vez cada dos semanas; semanalmente, dos de cada tres semanas. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra aproximadamente una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, una vez cada 4 semanas, una vez cada 6 semanas o una vez cada 8 semanas. En algunas realizaciones, la composición se administra al menos aproximadamente cualquiera de 1x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x o 7x (es decir, diariamente) a la semana, o tres veces al día, dos veces al día. En algunas realizaciones, los intervalos entre cada administración son menores que aproximadamente cualquiera de 6 meses, 3 meses, 1 mes, 20 días, 15 días, 12 días, 10 días, 9 días, 8 días, 7 días, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días o 1 día. En algunas realizaciones, los intervalos entre cada administración son más de aproximadamente 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 8 meses o 12 meses. En algunas realizaciones, no hay interrupción en el programa de dosificación. En algunas realizaciones, el intervalo entre cada administración no es más de aproximadamente una semana.

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

## Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación y conjugación de lípidos de oligonucleótidos fosforamidatos N3'→P5' (NP) o tiofosforamidatos N3'→P5' (NPS)

Este ejemplo muestra cómo sintetizar oligonucleótidos conjugados con lípidos fosforamidatos N3'→P5' (NP) o tiofosforamidatos N3'→P5' (NPS).

### Materiales y métodos

#### Compuestos de partida

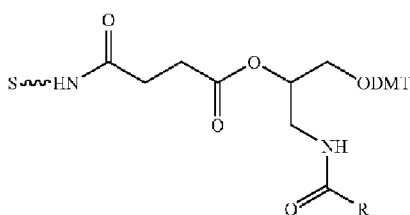
Estos compuestos se pueden preparar como se describe, por ejemplo, en McCurdy et al., Tetrahedron Letters 38: 207-210 (1997) o Pongracz & Gryaznov, Tetrahedron Letters 49: 7661-7664 (1999). Los monómeros de 3'-amino nucleósidos de partida se pueden preparar como se describe en Nelson et al., J. Org. Chem. 62: 7278-7287 (1997) o mediante los métodos descritos en Gryaznov et al., publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2006/0009636.

#### Fijación de lípidos

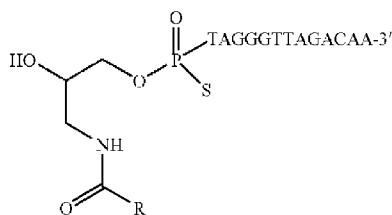
Puede usarse una variedad de enfoques sintéticos para conjugar una fracción lipídica L con el oligonucleótido, dependiendo de la naturaleza del enlace seleccionado; véase, por ejemplo, Mishra et al., Biochim. et Biophys. Acta 1264: 229-237 (1995), Shea et al., Nucleic Acids Res. 18: 3777-3783 (1995), o Rump et al., Bioconj. Chem. 9: 341 - 349 (1995). Normalmente, la conjugación se consigue mediante el uso de un grupo funcional adecuado en un extremo oligonucleotídico. Por ejemplo, el grupo amino 3' presente en el extremo 3' de los oligonucleótidos NP y NPS se puede hacer reaccionar con ácidos carboxílicos, cloruros de ácido, anhídridos y ésteres activos, usando catalizadores de acoplamiento adecuados, para formar un enlace amida. Los grupos tiol también son adecuados como grupos funcionales (véase Kupihar et al., Bioorg. Med. Chem. 9: 1241-1247 (2001)). Varios 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 de un oligonucleótido NP o NPS incluyen los descritos en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2005/0113325. Además de los enlaces amida indicados anteriormente, por ejemplo, los lípidos también se pueden unir a la cadena de oligonucleótidos usando un derivado fosforamidato del lípido, para producir un enlace fosforamidato o tiofosforamidato que conecta el lípido y el oligonucleótido. El 3'-amino libre del oligonucleótido unido al soporte totalmente protegido también se puede hacer reaccionar con un aldehído lipídico adecuado, seguido de reducción con cianoborohidruro de sodio, que produce un enlace amina.

Para la unión de un lípido al extremo 5', como también se describe en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2005/0113325, el oligonucleótido puede sintetizarse usando un soporte sólido modificado que contiene lípidos. La reacción de 3'-amino-1,2-propanodiol con un cloruro de acilo graso (RC(O)Cl), seguido de dimetoxitritilación del alcohol primario y succinilación del alcohol secundario, proporciona un compuesto intermedio que luego se acopla, a través del grupo succinil carboxilo, al soporte sólido. A continuación se muestra un ejemplo de un soporte modificado, en el que S representa un soporte CPG de alquilamina de cadena larga y R representa un lípido.



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



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

#### Ensayo con FlashPlate<sup>MR</sup>

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

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

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

#### Materiales y métodos

##### Diseño de ensayos clínicos

El propósito del estudio fase II de NSC (CP14B-012) era evaluar la eficacia y seguridad de Imetelstat (GRN163L) como terapia de mantenimiento para pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio avanzado que no han progresado después de 4 ciclos de terapia basada en platino. Los participantes fueron asignados al azar en una proporción de 2:1 a Imetelstat más tratamiento estándar versus tratamiento estándar solo. Los participantes que recibieron bevacizumab con su quimioterapia de inducción continuaron recibiendo bevacizumab en este estudio.

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

Los pacientes se dividieron en dos ramas. En la rama experimental, los pacientes recibieron Imetelstat más el estándar de atención (bevacizumab u observación). Específicamente, se administraron 9,4 mg/kg de Imetelstat (GRN163L) a los pacientes durante una infusión intravenosa de 2 horas el día 1 y el día 8 de cada ciclo de 21 días hasta la progresión de la enfermedad. Si se administra, bevacizumab se suministró el día 1 de cada ciclo de 21 días, con la dosis y la duración de acuerdo con el prospecto de bevacizumab aprobado por la FDA.

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

Se obtuvieron muestras de 61 de los 116 pacientes inscritos en el estudio de fase II de NSC (CP14B-012), y de estos, 57 dieron como resultado resultados de ensayo evaluables usados para el análisis de supervivencia libre de progresión (PFS).

#### Fijación con formalina e inclusión en parafina

Se prepararon muestras fijadas con formalina e incluidas en parafina utilizando el kit HistoGel (catálogo No. R904012: Richard Allen Scientific, una subsidiaria de ThermoFisher, Kalamazoo, MI). Las células se cultivaron hasta una confluencia del 80-90%. Los sedimentos celulares ( $10^6$ /sedimento) se mezclaron primero suavemente en 200 - 500  $\mu$ l de HistoGel fundido a  $50 \pm 5$  °C, luego se enfriaron en hielo para solidificar. Después de la solidificación, las muestras se centrifugaron rápidamente para eliminar el líquido residual. Se añadieron diez ml de formalina al 4% a los

sedimentos gelificados y los sedimentos celulares se fijaron durante 48 horas a temperatura ambiente. Los sedimentos de células fijas se incrustaron utilizando una técnica de histología estándar en el laboratorio Histo-Tec en Hayward, CA y luego se congelaron a -80 °C

## 5 Extracción de ADN

El ADN genómico de las muestras del estudio de fase II de NSCLC se aisló a partir de muestras procesadas con FFPE utilizando el kit de extracción de ADN FFPE fabricado por BioChain (BioChain Institute, catálogo No. K5019100, Hayward, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tejido se mezcló en 170 µl de tampón del kit y 30 µl de proteinasa K. La mezcla se incubó a 56 °C durante una hora, luego se aumentó la temperatura a 90 °C durante 60 minutos y luego a 98 °C durante 2 minutos y se colocó en hielo durante 2 minutos. La mezcla se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se obtuvo el sobrenadante. La concentración de ADN se determinó mediante el kit de ensayo de ADNbc Quant-iT Pico Green (Invitrogen, catálogo No. P7589, Carlsbad, CA). La concentración de ADN en el sobrenadante se ajustó a 0,1 ng/µl con H<sub>2</sub>O.

## 15 PCR cuantitativa (qPCR)

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

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

Cada reacción PCR para la amplificación de telómeros se realizó usando 1 ng/10 µl de muestra (0,1 ng/µl) y una mezcla de 40 µL de PCR que contenía 1,25 U de ADN Taq polimerasa Hotstart (BioChain), colorante fluorescente 6-ROX 150 nM, 0,04 x tinción con ácido nucleico SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad CA), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0,2 mM de cada trifosfato de desoxinucleósido (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), ditiotritol 5 mM, dimetilsulfóxido al 1% y Tris-HCl 15 mM pH 8,0 y par de cebadores Telg y Tele (ambos a 900 nM). Se prefiere la mayor concentración de cebadores para el ADN telomérico cuando se usa ADN FFPE, porque las altas concentraciones de cebadores permiten múltiples sitios de hibridación.

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

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

El número de ciclos para PCR de secuencia de telómeros en la etapa 2 se modificó a 5 ciclos para tener un valor de  $\Delta C_t$  apropiado ( $\Delta C_t_{\text{muestra}} = C_{t_{\text{telómero}}} - C_{t_{\text{referencia}}}$ ) cuando se usa 1 ng de ADN en cada reacción PCR. 1 ng - 10 ng de ADN por reacción tuvo una eficacia de PCR > 94% en los estudios de reproducibilidad. El número de ciclos para la PCR del gen de copia única debe ser nueve ciclos mayor que el de la PCR de telómeros para producir suficiente producto de PCR del gen de copia única.

Las diferencias en el número de ciclos promedio del gen de copia única con respecto al telómero ( $C_{t_{36B4}} - C_{t_{\text{telómero}}}$ , o  $\Delta C_t$ ) entre las muestras oscilaron entre 9,208 y 14,500.

El entrecruzamiento y fragmentación del ADN en el ADN genómico de muestras FFPE plantea un desafío único, especialmente para amplificar secuencias teloméricas largas y repetitivas, mientras que la amplificación de un fragmento de 76 pb de un gen de copia única para la fosfoproteína P ribosómica ácida (designado 36B4 en este documento) en la misma muestra a menudo no se ve afectado. Para resolver este problema, se modificaron varias condiciones de la PCR, es decir, la elección de los cebadores de la PCR, las condiciones del tampón de reacción de la PCR y las condiciones de los ciclos térmicos, para lograr el objetivo de acortar el tamaño del amplicón de los telómeros y mejorar la eficiencia de amplificación de la PCR.

## Resultados

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

El análisis de supervivencia libre de progresión en subgrupos de longitud de telómeros obtenidos por qPCR indicó que los pacientes con telómeros cortos que fueron tratados con Imetelstat fueron significativamente más sensibles en comparación con los controles que los pacientes con telómeros de longitud media (Figuras 1A y 1B).

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

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

El efecto del tratamiento aumenta de una manera no lineal con la reducción de la longitud de los telómeros del tumor (Figura 5).

Ejemplo 3: Telo-FISH en muestras incluidas en parafina fijadas con formalina del estudio en fase II de NSC (CP14B)

Se obtuvieron muestras de 61 de los 116 pacientes inscritos en el estudio en fase II de NSC (CP14B-012) descrito anteriormente. De estas 61 muestras de pacientes, 59 dieron como resultado resultados evaluables del ensayo Telo-FISH utilizados para el análisis de PFS. Cada ensayo produjo datos para entre 7 y 14545 focos de seis regiones ('campos') en un portaobjetos. Se registraron el área y la intensidad fluorescente para cada uno de los focos.

## Materiales y métodos

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

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

Los portaobjetos se sumergieron brevemente en agua para eliminar el Tween-20, luego se secaron y se sumergieron en un tanque de tampón de citrato 1X de 100 ml que contenía una solución de desenmascaramiento del Vector objetivo (dilución 100x en H<sub>2</sub>O). El tanque completo se colocó en un vaporizador precalentado (hirviendo) y se calentó al vapor durante 35 minutos, luego se sacó del vaporizador y se enfrió durante al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se sumergieron a continuación en agua desionizada durante 3 minutos, luego en etanol al 70% dos veces, en etanol al 95% dos veces y se secaron al aire.

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

Tampón de hibridación para sonda de telómero PNA		
reactivo	volumen	común
H <sub>2</sub> O destilada	190 µl	
Tris HCl 1 M (pH 7,5)	10 µl	dilución 1:2 de Tris HCl 2 M
Tampón de bloqueo	5 µl (1x)	(leche en polvo, en ácido maleico, patrón al 10%)
Formamida 100%	700 µl	

Se diluyó el patrón de sonda de telómero PNA de 10 µg/ml TelC-Cy3 (PNA Bio Inc.) CCCTAACCCTAACCCTAA (SEQ ID NO: 8) en tampón de hibridación con un factor de dilución adecuado (por ejemplo, 5x). Se añadieron 30-50 µl de sonda de PNA diluida a la muestra y luego se aplicó un cubreobjetos sin introducir burbujas de aire. Los portaobjetos se colocaron en la superficie de una incubadora de portaobjetos durante 6 minutos a 84 °C para desnaturalizar el ADN de los telómeros.

Los portaobjetos se trasladaron a un recipiente oscuro cerrado y se hibridaron durante 2 horas a temperatura ambiente. El recipiente se humedeció agregando agua o una toalla desechable húmeda Kimwipe para evitar la desecación.

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

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

5 Después de retirar los cubreobjetos, los portaobjetos se lavaron con tampón de lavado de PNA durante 15 minutos dos veces (15 minutos x 2) con agitación suave a temperatura ambiente. A continuación, se drenaron los portaobjetos y se contratiñeron los núcleos con una solución DAPI 1 µg/ml durante 5 minutos (dilución 1:5000 en agua de una solución patrón de DAPI de 5 mg/ml; por ejemplo, 20 µl de patrón de DAPI de 5 mg/ml en 100 ml de H<sub>2</sub>O).

10 Los portaobjetos se lavaron a continuación en agua destilada durante 3 minutos cuatro veces (3 minutos x 4), luego se drenaron y se secaron al aire. Se montaron cubreobjetos en los portaobjetos utilizando una solución de medio de montaje antidesvanecimiento mientras se evitaban las burbujas de aire. Los portaobjetos montados se mantuvieron durante la noche en un lugar oscuro para proteger los portaobjetos de la luz antes de probarlos bajo el microscopio. Los portaobjetos teñidos se examinaron con IN Cell Analyzer 2000 (GE Corp.) para recoger la intensidad de la señal fluorescente y el área de la señal fluorescente de DAPI (núcleos) y Cy3 (telómeros).

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

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

#### Resultados iniciales

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

El análisis de la supervivencia libre de progresión en subgrupos de longitud de telómeros obtenidos por Telo-FISH IN Cell-Quartile Split indicó un área grande y baja intensidad (es decir, una relación de baja intensidad con respecto al área) se asocia con una mejor eficacia de Imetelstat (Figura 2).

El análisis de supervivencia libre de progresión indicó lo siguiente: Eventos/N fueron 9/15; la mediana de control (IC del 95%) fue 1,18 (1,09, NA), y la mediana de Imetelstat (IC del 95%) fue 4,7 (1,41, NA) (Figura 2); el valor P del rango logarítmico fue de 0,044 y la relación de riesgo (IC del 95%) fue de 0,26 (0,06; 1,1) (Figura 2).

La predicción multivariada de Telo-FISH de supervivencia libre de progresión en pacientes tratados con Imetelstat dio como resultado los siguientes datos:

Medición por Telo-FISH	Relación de riesgo (HR)	Coefficiente lineal Log(HR)	Valor P
Log <sub>2</sub> (Intensidad)	3,960	1,376	0,22
Raíz cuadrada (Área)	0,002	-6,215	0,017

División de cuartiles del riesgo de PFS del modelo multivariado (relación de intensidad pequeña/área):

Intensidad pequeña/área
15/59 (25,4 %)

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

#### Resultados posteriores

Se llevó a cabo un análisis adicional de la población de pacientes en un momento posterior. Estos últimos datos se muestran en las Figuras 7 a 10.

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

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

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

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

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

PCR cuantitativa (qPCR)

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

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

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

Cada reacción PCR para la amplificación de telómeros en el ADN de la muestra FFPE o para el patrón de oligonucleótidos de telómeros se realizó utilizando 1 ng/10 µl de muestra (0,1 ng/µl) y una mezcla de PCR de 40 µl que contenía 1,25 U de ADN Taq. polimerasa Hotstart (BioChain), colorante fluorescente 6-ROX 150 nM, 0,4 x colorante de ácido nucleico SYBR Green I (Invitrogen, Carlsbad, CA), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 0,2 mM de cada uno de los trifosfatos de desoxinucleósido (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), Ditiotritol 5 mM, dimetilsulfóxido al 1% y Tris-HCl 15 mM pH 8,0 y par de cebadores Telg y Tele (ambos a 900 nM). Se prefiere la mayor concentración de cebadores para el ADN telomérico cuando se usa ADN FFPE, porque las altas concentraciones de cebadores permiten múltiples sitios de hibridación.

La amplificación del gen estándar de copia única 36B4 y el gen de copia única en la muestra FFPE se realizó usando mezcla maestra de PCR Power SYBR Green (Applied Biosystems). La amplificación de 36B4 se realizó utilizando 1 ng/10  $\mu$ l de muestras (0,1 ng/ $\mu$ l), 40  $\mu$ L de mezcla maestra Power SYBR Green (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) y el par de cebadores 36B4d (300 nM) y 36B4u (300 nM).

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

El número de ciclos en la etapa 2 fue de 3 ciclos para tener un valor de  $\Delta Ct$  adecuado ( $\Delta Ct_{\text{muestra}} = Ct_{\text{telómero}} - Ct_{\text{referencia}}$ ) cuando se utilizan 10 ng de ADN de muestra FFPE en cada reacción PCR. 1 ng - 10 ng de ADN de muestra FFPE por reacción tuvo una eficacia de PCR > 94% en los estudios de reproducibilidad.

## Resultados

El análisis de supervivencia libre de progresión en subgrupos de longitud de telómeros obtenidos por qPCR retrospectiva indicó que los pacientes con telómeros cortos que fueron tratados con Imetelstat fueron significativamente más sensibles en comparación con los controles que los pacientes con telómeros de longitud media (Figuras 11A y 11B).

Dieciocho de las 52 muestras (35%) tenían telómeros cortos (Figura 11A). Para estos, el análisis de supervivencia libre de progresión indicó lo siguiente: eventos/N fueron 13/18 (Figura 11A); la mediana de control (IC del 95%) fue 2,57 (1,18, NA), y la mediana de Imetelstat (IC del 95%) fue 1,91 (1,22, NA) (Figura 11A); el valor P de rango logarítmico fue de 0,325 y la relación de riesgo (IC del 95%) fue de 0,55 (0,17; 1,84) (Figura 11A).

Treinta y cuatro de las 52 muestras (65%) tenían telómeros de longitud media (Figura 11B). Para estos, el análisis de supervivencia libre de progresión indicó lo siguiente: eventos/N fueron 26/34 (Figura 11B); la mediana de control (IC del 95%) fue 2,66 (0,92, NA) y la mediana de Imetelstat (IC del 95%) fue 3,03 (1,58; 4,47) (Figura 11B); el valor P del rango logarítmico fue de 0,309 y la relación de riesgo (IC del 95%) fue de 0,65 (0,27; 1,56) (Figura 11B).

Los ejemplos, que pretenden ser puramente ejemplares de la invención y, por lo tanto, no deben considerarse que limitan la invención de ninguna manera, también describen y detallan aspectos y realizaciones de la invención discutidos anteriormente. Los ejemplos anteriores y la descripción detallada se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar la longitud relativa de telómeros en una muestra de un individuo diagnosticado o sospechoso de tener cáncer, comprendiendo el método:
  - 5 obtener una muestra biológica incluida en parafina fijada con formalina (FFPE) que comprende células cancerosas de un cáncer del individuo;  
analizar la longitud relativa de los ácidos nucleicos teloméricos en las células cancerosas de la muestra biológica FFPE mediante PCR cuantitativa (qPCR) o hibridación fluorescente *in situ* de telómeros (telo-FISH) y determinar si la longitud  
10 relativa promedio de los telómeros en las células cancerosas presentes en la muestra biológica FFPE del individuo está en el percentil 50 o menos de un intervalo relativo de longitud de los telómeros determinado de uno o más patrones conocidos,  
en el que:
    - 15 el uno o más patrones conocidos es un intervalo de longitud de telómero establecido a partir de una pluralidad de tumores naturales de una pluralidad de individuos en los que las células cancerosas de la pluralidad de tumores naturales son del mismo tipo que las células cancerosas presentes en la muestra biológica FFPE del individuo diagnosticado con el cáncer; o  
20 el uno o más patrones conocidos son líneas celulares caracterizadas.
  2. El método de la reivindicación 1, en el que el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer gastrointestinal, cáncer de vesícula biliar, cáncer de vejiga, glioblastoma, un sarcoma, melanoma, cáncer colorrectal y cáncer de páncreas.
  - 25 3. El método de la reivindicación 1, en el que la longitud relativa de los telómeros se determina mediante qPCR.
  4. El método de la reivindicación 2, en el que el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas.
  5. El método de la reivindicación 1, en el que el individuo es un ser humano.
  - 30 6. El método de la reivindicación 1, en el que las líneas celulares caracterizadas se seleccionan del grupo que consiste en: células M14, células A549, células SK-5 y células Ovar-5.
  7. El método de la reivindicación 1, en el que las líneas celulares caracterizadas se seleccionan de líneas celulares representativas de las células cancerosas presentes en la muestra biológica FFPE del individuo.
  - 35 8. El método de la reivindicación 7, en el que las líneas celulares caracterizadas son líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, líneas celulares hepatocelulares o líneas de células ováricas.
  - 40 9. El método de la reivindicación 1, en el que se determina que la longitud relativa promedio de los telómeros en las células cancerosas presentes en la muestra biológica FFPE está en el percentil 40, percentil 35, percentil 30, percentil 25, percentil 20, percentil 15, percentil 10 o percentil 5 o menos del intervalo relativo de longitud de los telómeros determinado a partir del uno o más patrones conocidos.
  - 45 10. El método de la reivindicación 1, en el que la longitud relativa de los telómeros se determina mediante telo-FISH.
  11. El método de la reivindicación 10, en el que el método comprende además la desparafinización de la muestra biológica FFPE.
  - 50 12. El método de la reivindicación 3, que comprende además extraer los ácidos nucleicos teloméricos de la muestra biológica FFPE antes de determinar la longitud relativa de los telómeros.

Figura 1A

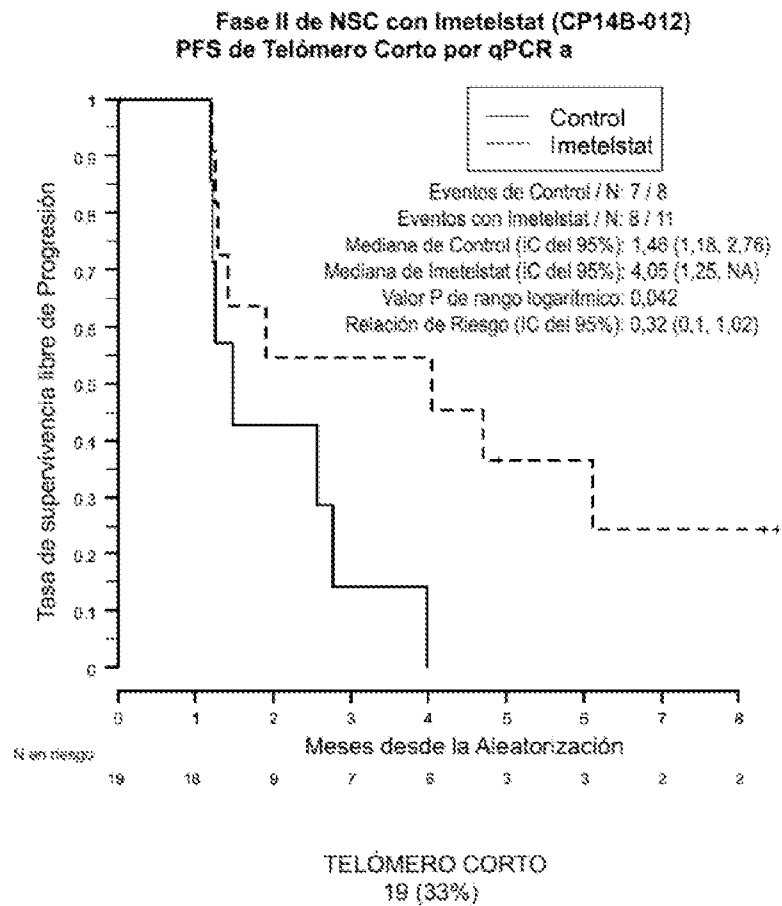


Figura 1B

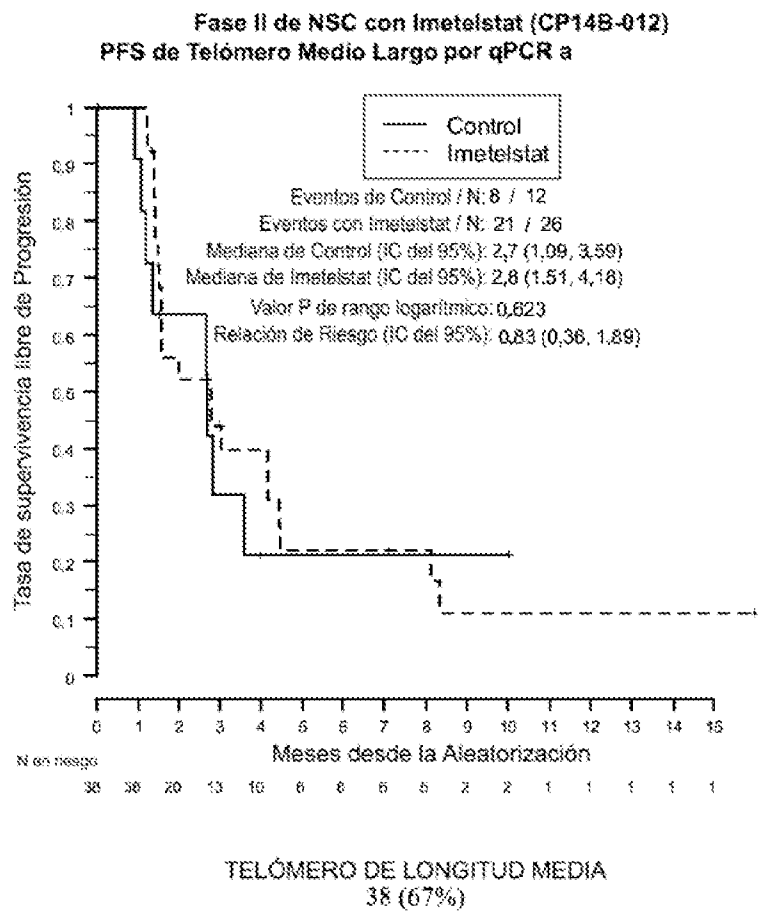
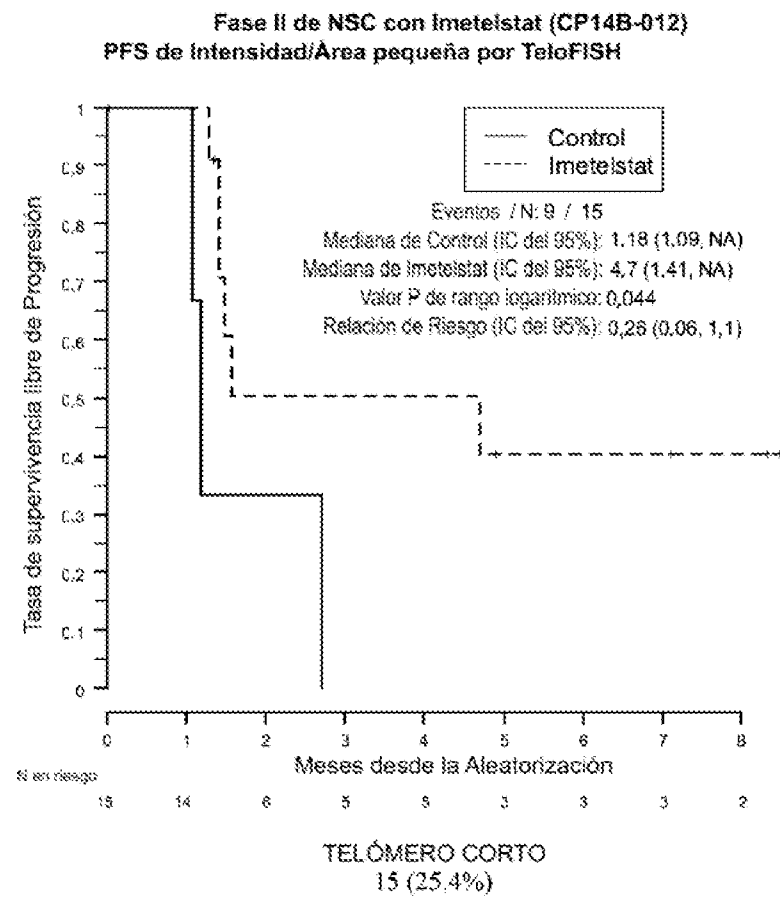


Figura 2



**Figura 3**

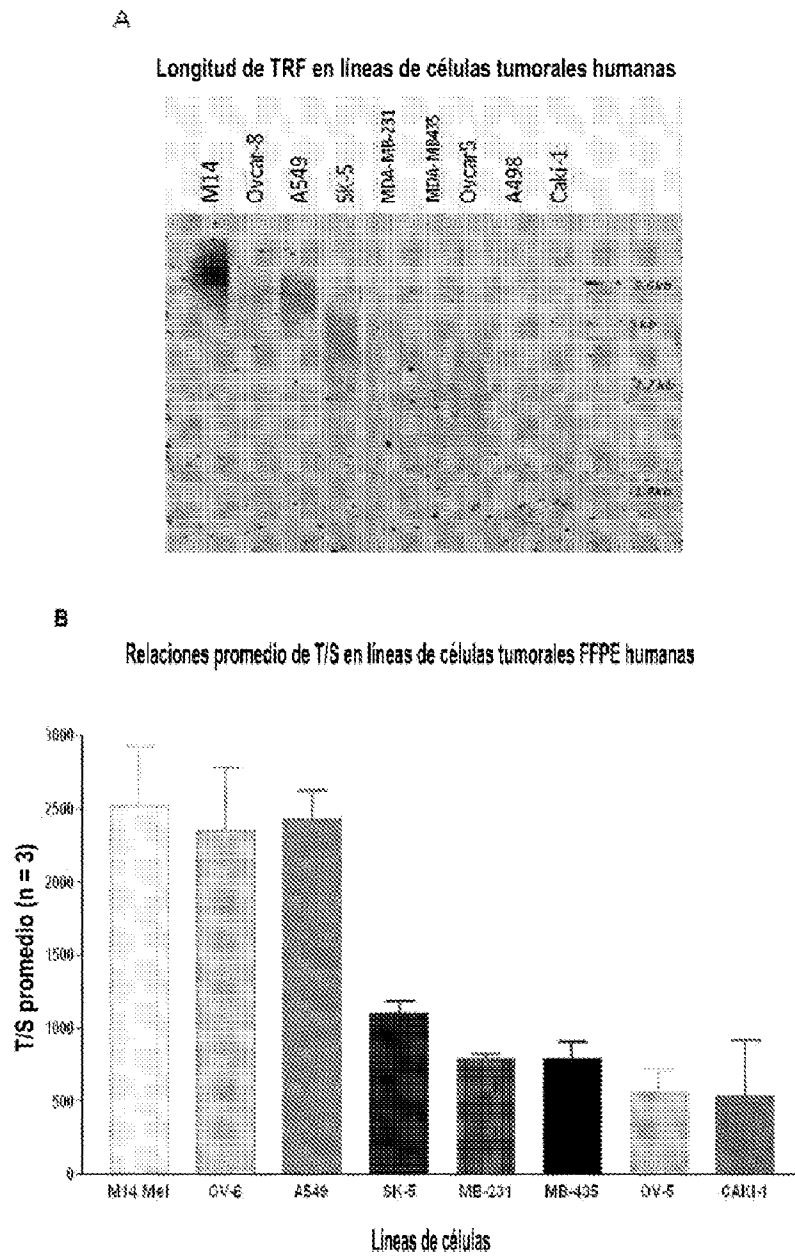
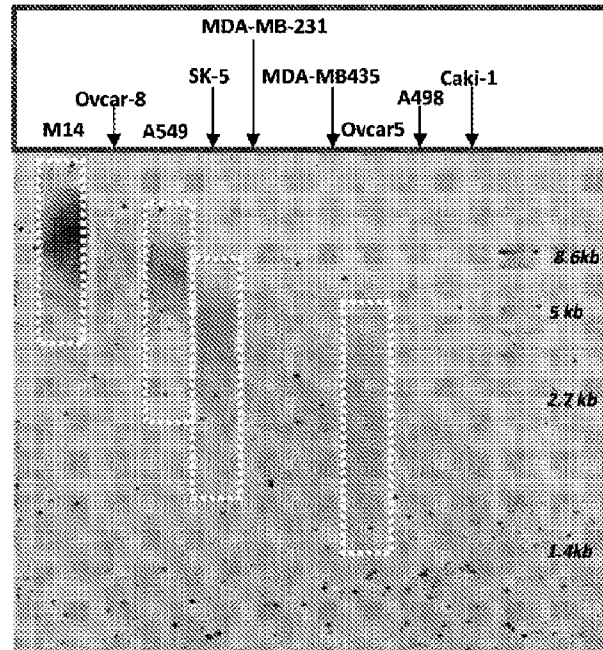


Figura 4

A)



B)

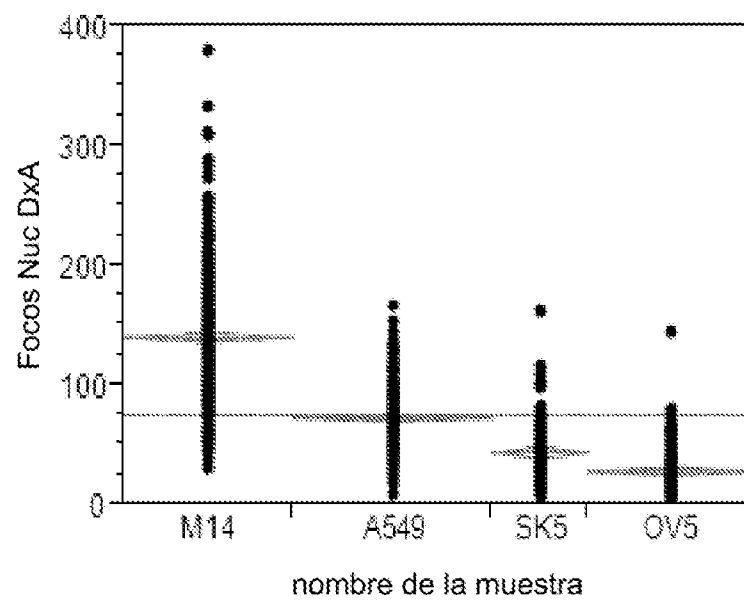


Figura 5

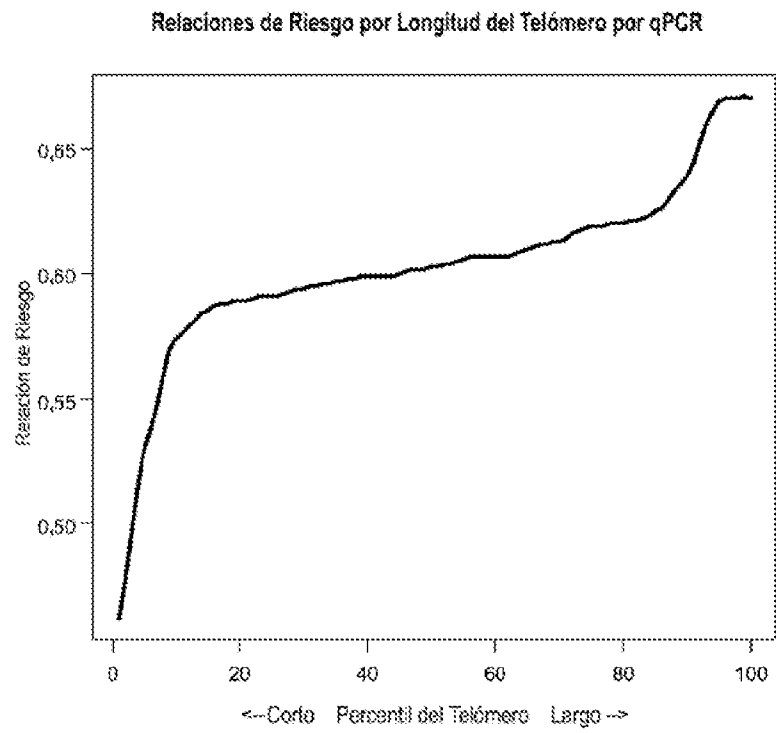


Figura 6

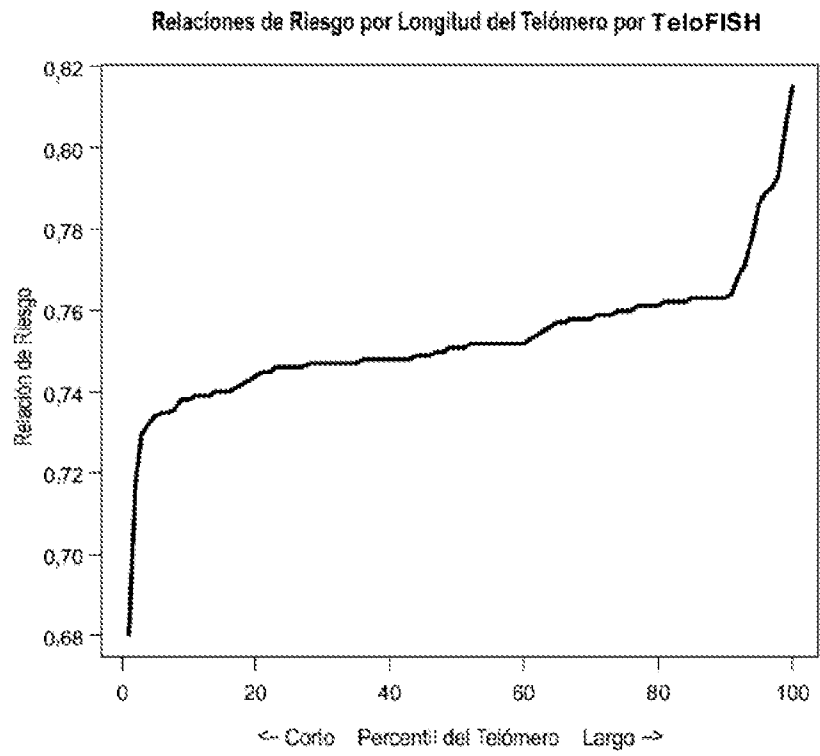
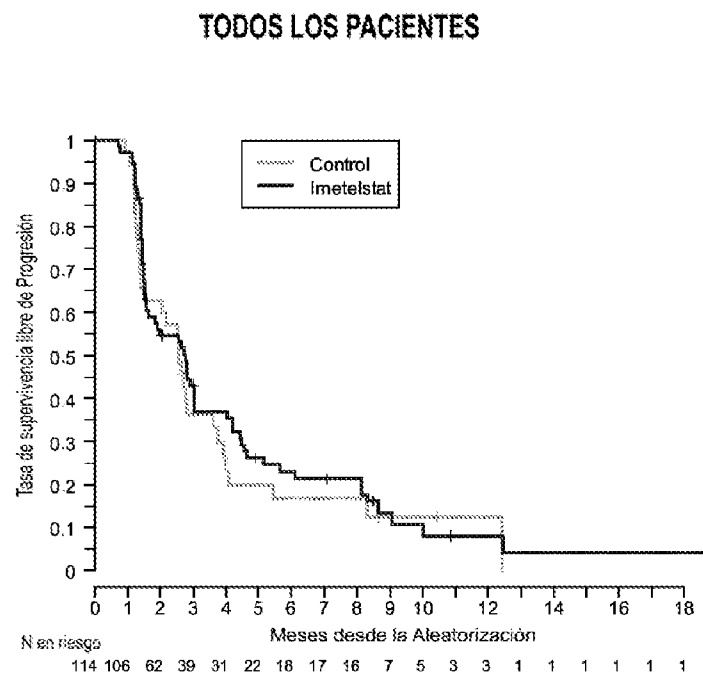


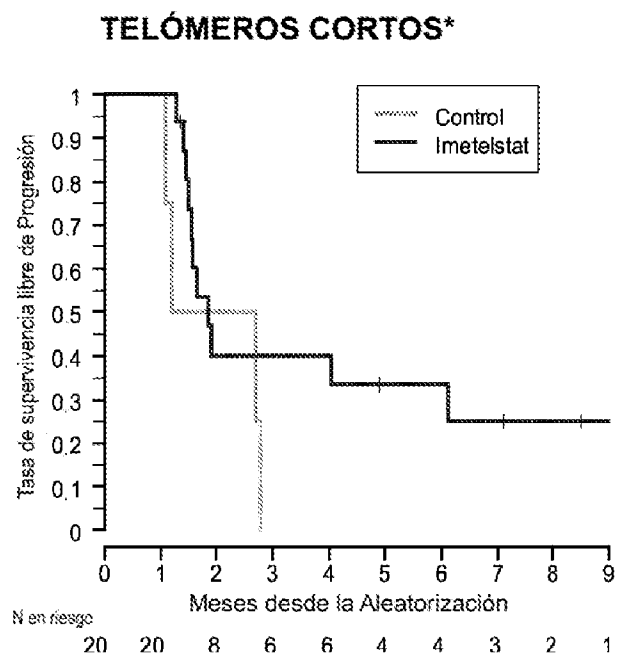
Figura 7



Resultados de PFS (N=114, Eventos=92, FU Mediana (2,6 mo))	
Mediana de Control (IC del 95%)	2,57 (1,41, 3,62)
Mediana de Imetelstat (IC del 95%)	2,76 (1,58, 3,03)
Relación de Riesgo (IC del 95%)	0,84 (0,54, 1,31)
Valor P (Prueba de Puntuación)	0,446

Figura 8

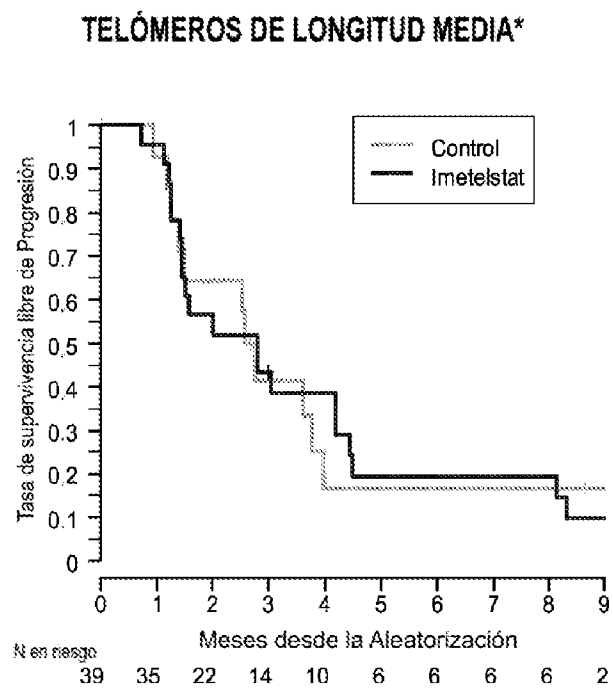
A)



Resultados de TL cortos N=20, Eventos=18	
Mediana de Control (IC del 95%)	1,94 (1,09, NA)
Mediana de Imetelstat (IC del 95%)	1,84 (1,48, 6,12)
Relación de Riesgo (IC del 95%)	0,45 (0,14, 1,48)
Valor P (Prueba de Puntuación)	0,177

Figura 8

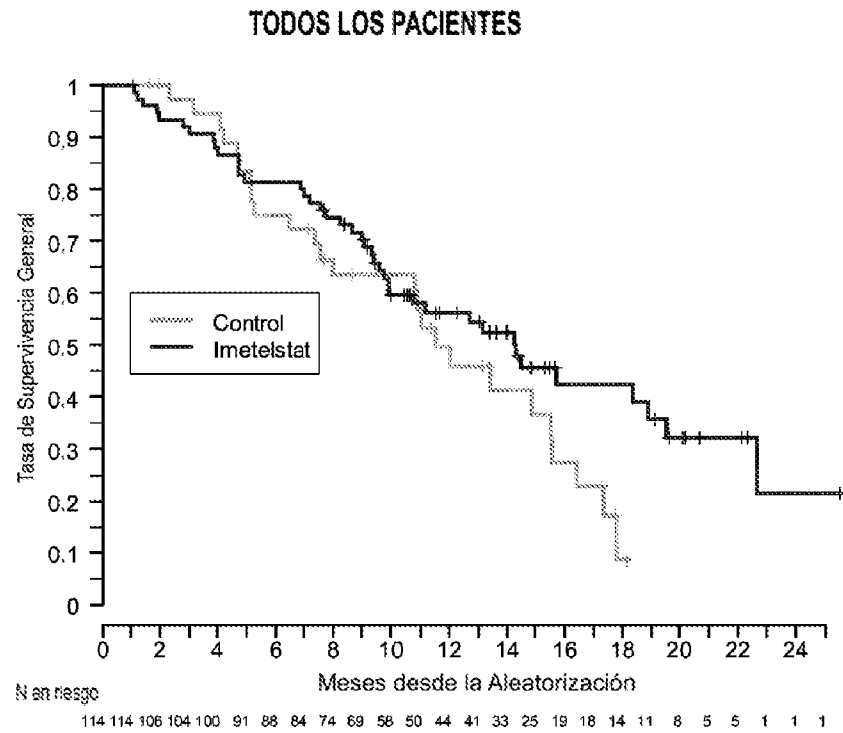
B)



**\*Interacción P=0,175**

Resultados de TL de Longitud Media	
N=39, Eventos=32	
	2,56 (1,25, 3,75)
	2,80 (1,45, 4,18)
	0,92 (0,45, 1,89)
	0,801

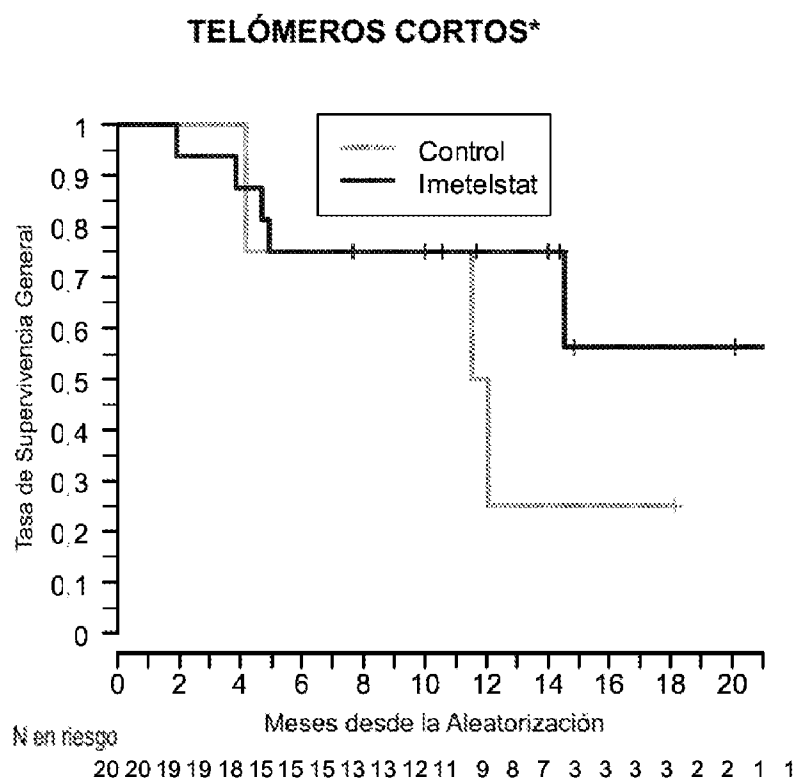
Figura 9



Resultados de Supervivencia General (N=114, Eventos=66, FU Mediana: 10,5 mo)		
	Imetelstat	Control
Mediana (IC del 95%)	14,3 (9,9, 18,9)	11,5 (7,6, 15,5)
Tasa de Supervivencia a los 6 Meses (IC del 95%)	81%	75%
Relación de Riesgo (IC del 95%)	0,68 (0,41, 1,12)	
Valor P (Prueba de Puntuación)	0,129	

Figura 10

A)

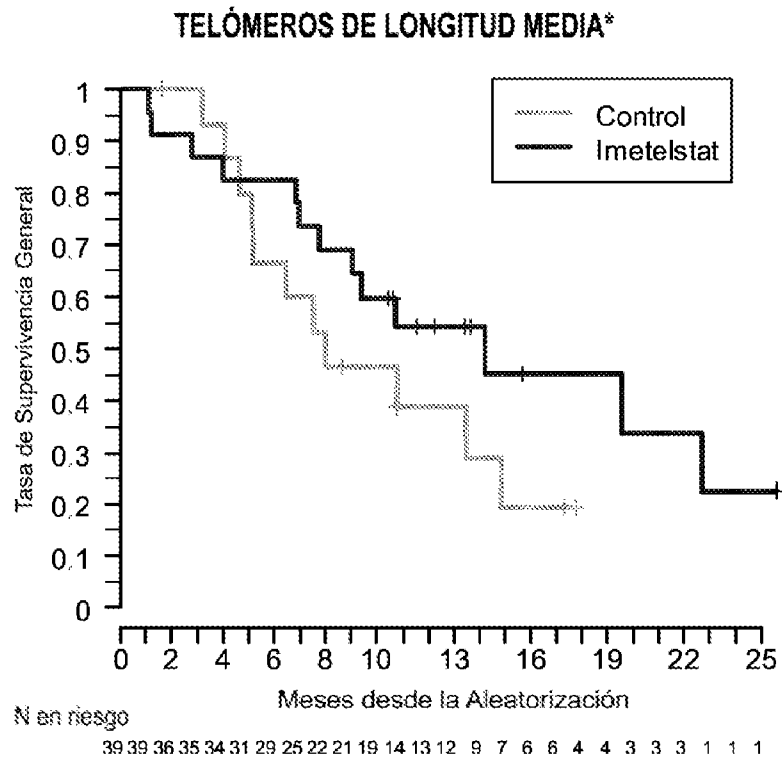


\*Interacción P=0,689

	Resultados de TL Cortos N=26, Eventos=8
Mediana de Control (IC del 95%)	11,79 (4,18, NA)
Mediana de Imetelstat (IC del 95%)	NA (4,93, NA)
Relación de Riesgo (IC del 95%)	0,44 (0,11, 1,87)
Valor P (Prueba de Puntuación)	0,256

Figura 10

B)

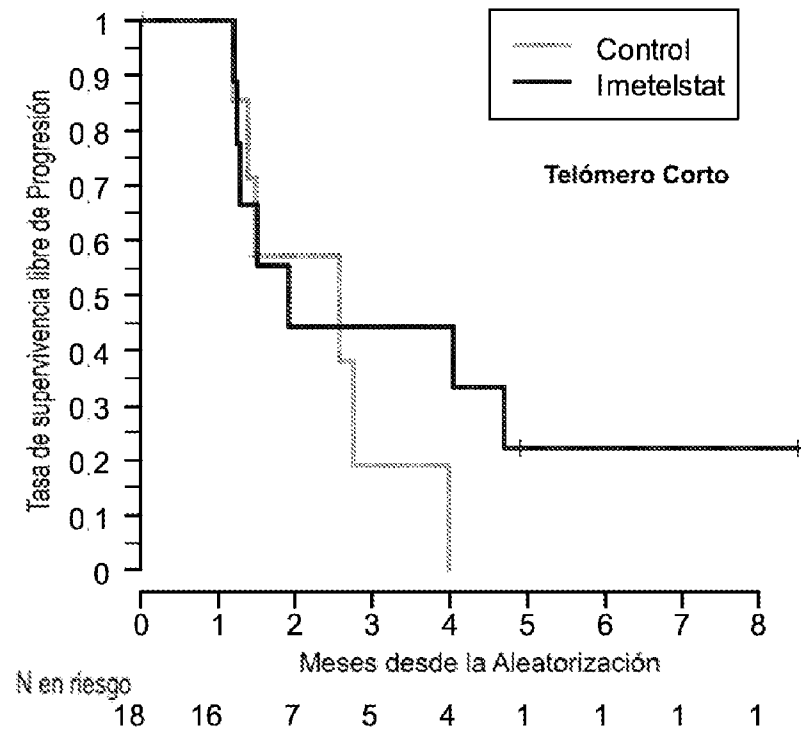


\*Interacción P=0,689

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

Figura 11

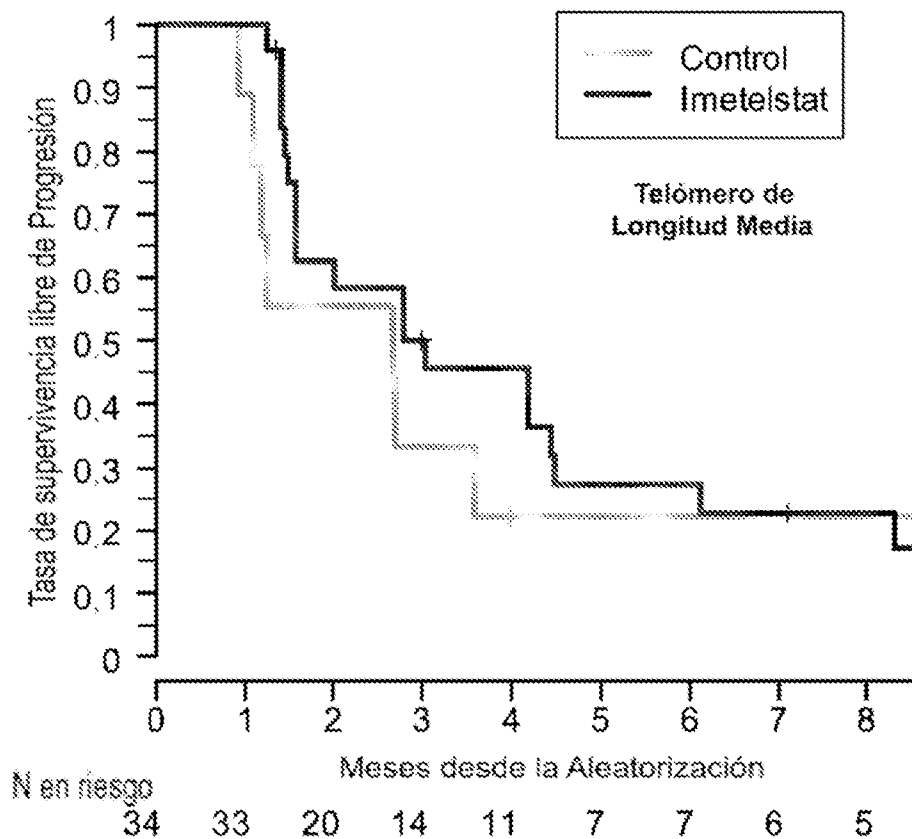
A)



	Resultados de PFS de Telómero Corto N=18 (35%), Eventos=13
Mediana de Control (IC del 95%)	2,57 (1,18, NA)
Mediana de Imetelstat (IC del 95%)	1,91 (1,22, NA)
Relación de Riesgo (IC del 95%)	0,55 (0,17, 1,84)
Valor P (Prueba de Puntuación)	0,325

Figura 11

B)



Resultados de PFS de Telómero de longitud Media N=1460, Eventos=28	
Mediana de Control (IC del 95%)	2,66 (0,92, NA)
Mediana de Imetelstat (IC del 95%)	3,03 (1,58, 4,47)
Relación de Riesgo (IC del 95%)	0,65 (0,27, 1,56)
Valor P (Prueba de Puntuación)	0,309