

Terapia antisentido en oncología: situación actual

D. Morán González, A. Domínguez-Gil Hurlé

Servicio de Farmacia. Hospital Universitario de Salamanca

Resumen

La finalidad de la terapia antisentido es controlar la regulación de los genes que contribuyen a la progresión del cáncer sin afectar al crecimiento de las células normales, por lo que representa una nueva alternativa con menos efectos secundarios que la quimioterapia convencional. Los oligonucleótidos antisentido controlan la proliferación celular al bloquear específicamente la expresión de determinados genes, por lo que se están desarrollando como fármacos moleculares con potencial actividad en el tratamiento del cáncer. Se dispone de amplia información preclínica y de algunos ensayos clínicos con resultados esperanzadores. En esta revisión se recogen los aspectos más significativos de esta nueva alternativa terapéutica en oncología. Los ensayos clínicos realizados hasta la fecha han puesto de manifiesto su eficacia y seguridad a corto y medio plazo; sin embargo, son necesarios estudios a largo plazo para terminar de definir su efectividad clínica y su verdadero perfil toxicológico.

Palabras clave: Oligonucleótidos antisentido. Terapia oncológica. Inhibición de la expresión génica.

Summary

The purpose of antisense therapy is to control the regulation of genes contributing to cancer progression while sparing normal cell growth, which represents a novel alternative with fewer side effects when compared to conventional chemotherapy. Antisense

Morán González D, Domínguez-Gil Hurlé A. Terapia antisentido en oncología: situación actual. Farm Hosp 2005; 29: 269-282.

Recibido: 11-11-2004
Aceptado: 18-04-2005

Correspondencia: Dominica Morán González. Pº San Vicente, 58-182. 37007 Salamanca. e-mail: dmorang@usal.es

oligonucleotides control cell proliferation by specifically blocking the expression of selected genes, and hence they are being developed as molecular drugs with potential activity for cancer treatment. Extensive clinical information and a number of clinical trials show encouraging results. This review discusses the most significant aspects of this new therapeutic alternative in oncology. Clinical trials performed thus far have demonstrated their short- to mid-term efficacy and safety; however, long-term studies are needed to definitely define their clinical effectiveness and true toxic profile.

Key words: Antisense oligonucleotides. Oncologic therapy. Inhibition of gene expression.

INTRODUCCIÓN

La investigación en la tecnología antisentido está progresando rápidamente en la última década aunque sus posibilidades en el tratamiento del cáncer, infecciones virales y procesos inflamatorios habían sido anticipadas previamente. Los avances en el conocimiento del mecanismo de acción de la inhibición de la expresión génica por técnicas antisentido han permitido el desarrollo de fármacos moleculares eficaces y con toxicidad limitada. El fomivirsén (Vitravene®), utilizado en el tratamiento local de la retinitis por citomegalovirus, ha sido el primer oligonucleótido antisentido autorizado en Europa en 1999. En la actualidad varios oligonucleótidos antisentido se están desarrollando como fármacos moleculares con potencial actividad en el tratamiento del cáncer. En esta revisión se resumen las características estructurales,

farmacocinéticas y toxicológicas de los oligonucleótidos antisentido. Por otra parte, se describen los resultados de los ensayos preclínicos y clínicos realizados con oligonucleótidos antisentido de diferentes dianas biológicas, tanto solos como en combinación con diferentes fármacos citotóxicos para el tratamiento del cáncer.

METODOLOGÍA Y ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

Se efectuó una búsqueda en la base de datos Medline hasta marzo de 2005, utilizando los siguientes términos: "DNA antisense" (MeSH) y "Neoplasm" (MeSH), junto con el operador booleano AND. Se localizaron 848 artículos, de los cuales se seleccionaron sólo aquellos referentes a revisiones y a ensayos clínicos, obteniéndose finalmente 90 artículos. Por otra parte, se revisaron 32 abstracts procedentes de congresos internacionales.

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

Los oligonucleótidos antisentido (OAS) son moléculas cortas de ADN monocatenario complementarias a determinadas secuencias específicas de un ARNm diana –secuencia sentido–. La formación de un heteroduplex bicatenario sentido-antisentido bloquea la traducción del mensaje genético a proteína. El bloqueo de la traducción tiene lugar a través de dos mecanismos, obstaculizando la lectura normal del ARNm y, por otra parte, la unión del OAS al ARNm activa la ribonucleasa H, enzima que corta y destruye el ARNm que participa en la unión, dejando intacta la secuencia antisentido tal como se muestra en la figura 1¹⁻³.

Sin embargo, su utilización en clínica se ha visto dificultada por limitaciones farmacocinéticas como su rápido aclaramiento, debido a la degradación por enzimas nucleolíticas y su dificultad para acceder con actividad funcional al citoplasma y/o núcleo celular. Para superar estos problemas se han realizado diversas modificaciones estructurales en la molécula del oligonucleótido que están recogidas en la figura 2. Uno de los primeros intentos consistió en el reemplazamiento de un átomo de oxígeno de cada grupo fosfato por un grupo metilo, dando lugar a un metilfosfonato^{4,5}. Estas moléculas hidrofóbicas penetran mejor en las células y son resistentes a las endonucleasas, pero desafortunadamente los cambios estructurales introducidos conllevan cambios en la naturaleza química que parecen reducir su actividad antisentido. Por ello, se diseñaron los denominados OAS de "primera generación", en los que se ha sustituido un átomo de oxígeno de los grupos fosfato por un átomo de azufre, generando oligonucleótidos fosforotioatos (OF); esta sustitu-

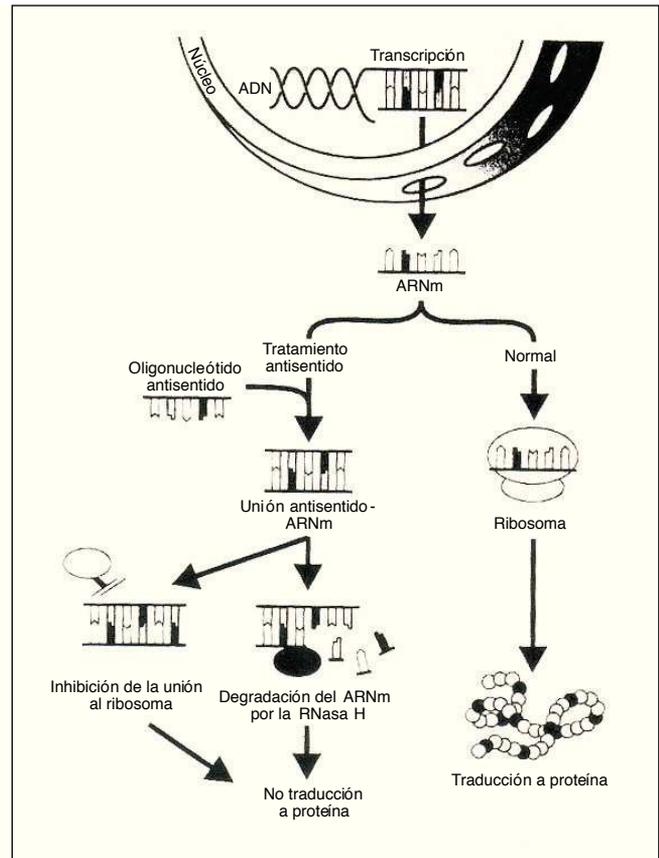


Fig. 1. Mecanismos por los cuales los oligonucleótidos antisentido interfieren en la expresión génica: inhibición de la unión al ribosoma y degradación del ARNm por RNasa H.

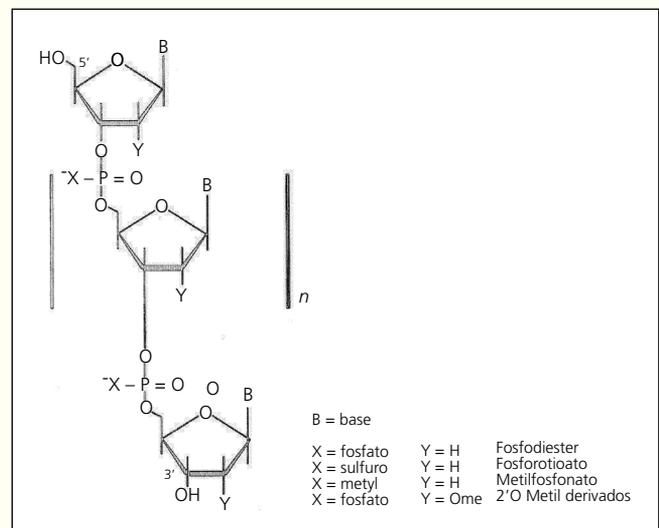


Fig. 2. Estructura química de oligonucleótidos antisentido.

ción aporta a la molécula carga negativa, alta solubilidad y resistencia a la degradación por nucleasas⁶. Estas propiedades determinan que los OF sean los OAS preferentemente utilizados en los ensayos preclínicos y clínicos.

Una modificación posterior ha dado lugar a los OAS de “segunda generación”, que contienen nucleótidos modificados en la posición 2' de la ribosa. Los principales miembros de esta clase son los 2'-O-metil y 2'-O-metoxi-etil RNA. Sin embargo, estas moléculas no pueden activar la RNasa-H, por lo que el efecto antisentido es menos potente⁷.

Recientemente se han desarrollado los OAS de “tercera generación” con el fin de mejorar la afinidad por la diana molecular, la resistencia a nucleasas y las propiedades farmacocinéticas. Así, se han diseñado una gran variedad de nucleótidos modificados como son los ácidos nucleicos peptídicos; N3'-P5' fosfoamidatos; 2'-desoxi-2'-fluoro-b-D-arabino ácidos nucleicos; ácidos nucleicos cerrados; morfolino oligonucleótidos; ácidos nucleicos ciclohexanos y DNA triples o tríplices⁸.

La eficacia de los OAS para inhibir la expresión génica también depende de su capacidad de penetración en las células diana. Debido a su naturaleza polianiónica presentan dificultad para atravesar la membrana celular por difusión pasiva. La captación de los OAS tiene lugar por transporte activo dependiente de la temperatura⁹ y de la concentración de oligonucleótidos¹⁰. Se han llevado a cabo numerosos estudios con la finalidad de aumentar la eficacia terapéutica, entre ellos la conjugación con policionones y con receptores de superficie de células diana, el acoplamiento a colesterol y la encapsulación en partículas lipídicas como microesferas o liposomas. Asimismo, los estudios *in vivo* han revelado que el uso de vectores en la liberación de fármacos antisentido mejora sus efectos biológicos^{11,12}. Estudios muy recientes sugieren que modulando las propiedades fisicoquímicas de la superficie del transportador es posible controlar la liberación de los OAS internalizados en él¹³.

FARMACOCINÉTICA DE LOS OF

Los OF presentan una biodisponibilidad por vía oral muy baja pero son rápida y ampliamente absorbidos tras la administración parenteral. Así, tras la administración intradérmica de ISIS 2105 (Afovirsen®) en ratas a dosis de 3,6 mg/kg se observó una absorción del 70% en 4 horas y una biodisponibilidad sistémica total superior al 90%¹⁴. Resultados similares se observaron tras la administración intradérmica del mismo en humanos¹⁵. La administración subcutánea a ratas y monos resultó en una biodisponibilidad algo más baja, con una mayor distribución al sistema linfático¹⁶.

Los OF se unen a la albúmina y a la α -2 macroglobulina. La afinidad aparente por la albúmina es bastante baja (200-400 mM) y comparable a la de fármacos como aspirina y penicilina^{17,18}. La unión a estas proteínas séricas constituye una especie de reservorio que previene el rápido aclaramiento renal. Como esta unión es saturable a altas dosis, el OF intacto aparece en orina^{19,20}. Los estu-

dios realizados en ratas tratadas con un OF de 20 bases (ISIS 2105) han demostrado que la administración intravenosa de dosis de 15-20 mg/kg satura la capacidad de unión a dichas proteínas¹⁶.

La distribución del anterior OF tras la absorción o la administración intravenosa es extremadamente rápida, inferior a una hora²¹⁻²³. El aclaramiento plasmático presenta una cinética multi-exponencial, con una semivida de eliminación entre 40-60 horas en todas las especies estudiadas, excepto en el hombre que es algo superior¹⁵.

Se distribuyen ampliamente a todos los tejidos y se acumulan principalmente en hígado, riñón, médula ósea, músculo esquelético y piel^{14,24}. No se ha observado penetración a través de la barrera hematoencefálica. La tasa de incorporación tisular varía en función del órgano estudiado, siendo más rápido en el hígado, a donde llega el 20% de la dosis administrada en 1-2 horas. De forma similar, la eliminación del fármaco es más rápida desde el hígado que desde los otros órganos estudiados, así la vida media de eliminación hepática es de 62 horas y la de la médula renal de 156 horas²⁵.

Varios estudios de fluorescencia e inmunohistoquímica realizados en animales y humanos han mostrado que los OF penetran en las células, principalmente en las del túbulo contorneado proximal, de la médula ósea, del hígado y de la piel^{25,26}.

A dosis relativamente bajas, el aclaramiento de los OF tiene lugar principalmente por metabolismo, mediado por endo y exo-nucleasas que dan lugar a oligonucleótidos más cortos y finalmente, los nucleósidos son degradados por las vías metabólicas habituales. A concentraciones altas estos fármacos inhiben las nucleasas y tiene lugar una eliminación dependiente de la dosis^{14,24,27}.

CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS DE LOS OF

Se han realizado numerosos estudios toxicológicos preclínicos a corto y a largo plazo. Los resultados han demostrado que en roedores los efectos adversos más pronunciados parecen ser secundarios a la liberación de citocinas, mientras que en monos destaca la activación del complemento^{27,28}.

El perfil de seguridad de los OF viene avalado por la información relativa a estudios clínicos realizados con un amplio rango de dosis y durante periodos de hasta 3 años¹⁶. Los resultados han mostrado que los OF, generalmente, presentan una toxicidad baja, aunque tanto las dosis como el intervalo de administración condicionan el perfil toxicológico. El efecto más claramente relacionado con la dosis es el tiempo de tromboplastina parcial activada ya que se han observado cambios significativos tras la administración por infusión continua de dosis de 5 mg/kg/día. Con intervalos cortos el efecto es transitorio y no parece estar asociado con un riesgo significativo de sangrado o tiempos de sangrado prolongados. La relación

entre las concentraciones plasmáticas y la activación del complemento es bastante compleja ya que parece ser de origen multifactorial²⁹.

Además de la reacción local en el punto de administración³⁰, la trombocitopenia es el efecto más frecuente observado durante los intervalos de infusión continua, aunque generalmente no es severa y mejora a lo largo del tratamiento continuado³¹.

Por otra parte, la administración crónica de determinados OF a dosis de 40 a 50 veces superiores a las utilizadas en los ensayos clínicos ha mostrado que se acumulan en el hígado y riñón de ratón, rata y mono, produciendo degeneración del túbulo contorneado proximal, incrementos en la creatinina y nitrógeno uréico sanguíneo así como proteinuria. La acumulación en el hígado provoca elevación de las transaminasas^{32,33}.

Los ensayos clínicos controlados han mostrado que no existen diferencias significativas en las pruebas de funcionalidad hepática entre los pacientes tratados con OF y los tratados con placebo. Sin embargo, se han observado algunos cambios en los parámetros de funcionalidad renal, así como determinados síntomas constitucionales que parecen estar relacionados con la liberación de citocinas. Además, en los ensayos clínicos en los que los OAS se utilizaron en combinación con diferentes agentes antineoplásicos los efectos adversos más frecuentes resultaron ser neutropenia, leucopenia, trombocitopenia, fiebre, astenia, rash cutáneo y elevación transitoria de las transaminasas^{16,34}.

Finalmente, los estudios preclínicos y clínicos han mostrado que los OF pueden tener efectos no específicos, como consecuencia de interacciones no específicas, como por ejemplo la capacidad de unión a las proteínas de unión a la heparina y a sus receptores^{35,36}. Bajo ciertas circunstancias los OF pueden activar los factores de transcripción SP1 y sus productos de degradación pueden afectar a la proliferación y diferenciación celulares³⁷.

También se ha observado que pueden aumentar la actividad de las células *natural killer*¹¹.

DIANAS BIOLÓGICAS

El interés por la terapia antisentido deriva de la identificación de numerosas proteínas asociadas al cáncer que pueden representar dianas potenciales para una terapia anticancerosa selectiva con menos efectos tóxicos que la quimioterapia convencional. Hasta el momento *in vitro*, han tenido éxito OAS complementarios a secuencias específicas de los genes que se relacionan en la tabla I.

Familia bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 son reguladoras de la apoptosis, el programa suicida celular crítico para el desarrollo, la homeostasis celular y la protección contra patógenos. Las moléculas más similares a Bcl-2 promueven la supervivencia celular a través de la inhibición de los adaptadores necesarios para la activación de las caspasas, proteasas responsables de la destrucción celular. Por el contrario, aquellas moléculas relativamente más distanciadas de Bcl-2 promoverán la apoptosis, a través de mecanismos que incluyen el desplazamiento de dichos adaptadores a partir de proteínas de pro-supervivencia. Por lo tanto, por medio de algunas señales apoptóticas, el balance entre estas actividades competitivas determinará la forma celular. Los miembros de la familia Bcl-2 son esenciales para el mantenimiento de los sistemas de órganos, y las mutaciones que los afectan están implicadas en el cáncer.

El gen *bcl-2* constituye un blanco potencialmente importante debido a que se encuentra sobreexpresado en

Tabla I. Estudios preclínicos de OAS en terapia de combinación en tumores humanos

| <i>Gen diana</i> | <i>Mecanismo</i> | <i>Tipo de tumor</i> | <i>Combinación con terapia convencional</i> | <i>Combinación con inhibidores de dianas moleculares</i> |
|------------------|-------------------------|---|--|--|
| bcl-2 | Apoptosis | Linfoma, melanoma, cáncer de próstata, gástrico y de mama | DTIC, paclitaxel, DOX, ciclofosfamida, CDP | Inhibidor de MAPK, antisentido contra PKA-1 y PLK1 |
| Bcl-2/bcl-xl | Apoptosis | Carcinoma de mama y colon | DOX, paclitaxel, ciclofosfamida | Antisentido cobntra PKA-1, IRESSA |
| Clusterina | Apoptosis | Cáncer de próstata, vesícula y renal | CDP, paclitaxel, MTX, radiación ablación androgénica | ND |
| c-myb | Proliferación | Leucemia, cáncer de colon | CDP | ND |
| PKA-1 | Proliferación | Cáncer de colon, mama, pulmón y próstata | Taxol, irinotecán | IRESSA, antisentido bcl-2 y bcl-2/bcl-xl, hidroxycampotecina |
| c-myc | Proliferación/apoptosis | Melanoma | CDP | ND |
| Mdm-2 | Proliferación/apoptosis | Cáncer de próstata, mama y colon | Irinotecán, 5-FU, paclitaxel, CDP, DOX | ND |

PKA: *protein kinasa* tipo A; DTIC: dacarbacina; CDP: cisplatino; DOX: doxorubicina; MTX: mitoxantrona; 5-FU: 5-fluorouracilo; MAPK: *protein kinasa* activada por mitógenos; PKL1: *kinasa* 1 asociada a proliferación; ND: no datos.

la mayoría de los linfoma no-Hodgkin (LNH) de células B foliculares, en las leucemias linfáticas crónicas (LLC) y en aproximadamente un 25% de los LNH de células B, así como en melanomas y carcinomas pulmonar, colorrectal y de mama^{38,39}. La mayor expresión del gen es responsable del mantenimiento de la viabilidad de las células tumorales y de la inducción de la resistencia a fármacos antineoplásicos. También se correlaciona con una menor respuesta terapéutica en los LNH, leucemia mieloide aguda (LMA) y posiblemente LLC³⁸.

Protein kinasa A (PKA)

La PKA es un mediador primario de la acción del AMPc en células de mamíferos. Presenta dos isoformas, tipo I (PKAI) y tipo II (PKAII), que difieren sólo en la subunidad reguladora, RI y RII, respectivamente. La isoforma PKAI activa el paso de la fase G1 a fase S del ciclo celular y la transducción de señales mitógenas de diferentes factores de crecimiento y hormonas. Su expresión está aumentada en la mayoría de los tumores humanos y la sobreexpresión se correlaciona con un peor pronóstico y un descenso de la supervivencia de los pacientes. Estos hechos han dirigido al desarrollo de varios inhibidores de la PKA, incluyendo OF que inhiben específicamente la expresión de PKAI.

C-myb

El oncogen *c-myb* codifica un factor de transcripción implicado en el control del paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. La proteína *c-Myb* fue la primera detectada en células hematopoyéticas, donde regula la proliferación y la diferenciación celulares. Se sobreexpresa en células leucémicas, carcinoma de colon, carcinoma pulmonar de células pequeñas (CPCP), teratocarcinoma y neuroblastoma⁴⁰⁻⁴³. Se ha observado que la sobreexpresión de *c-Myb* en una línea de colon tumoral produce una desregulación de la proteína Bcl-xL, aumenta la capacidad tumorogénica y disminuye la capacidad apoptótica de las células tumorales⁴⁴. También se ha demostrado que su sobreexpresión es un marcador de mal pronóstico en cáncer colorrectal, frecuentemente asociado con sobreexpresión de Bcl-xL y aneuploidía¹¹. Estas propiedades determinan que el gen *c-myb* sea una diana ideal para la investigación antisentido.

C-myc

El gen *c-myc* está implicado en la regulación del crecimiento celular y se ha encontrado alterado en una gran variedad de tumores como leucemias, melanomas y carcinomas de próstata, mama y colon⁴⁵, por lo que se han desarrollado OF contra *c-myc* como agentes terapéuticos potenciales.

Clusterina /trpm-2

La clusterina es una glicoproteína implicada en procesos fisiológicos muy variados como son la remodelación tisular, la reproducción, el transporte de lípidos, la regulación del complemento y la apoptosis. En modelos experimentales y en los ensayos clínicos relativos a cáncer de próstata se ha observado que la clusterina previene la muerte celular por apoptosis. Por ello, se han diseñado OF contra clusterina para reducir el RNAm y la expresión proteica con el fin de retrasar la progresión tumoral y aumentar la apoptosis celular mediada por agentes quimioterápicos.

Mdm-2

El gen *mdm-2* es un regulador negativo del gen supresor de tumores *p53* que interfiere con el control de la proliferación celular y la apoptosis, por lo que contribuye al desarrollo y mantenimiento del fenotipo maligno. La inhibición de la expresión de la proteína MDM-2 induce la expresión del gen *p-53* y la inhibición del crecimiento celular.

PKC- α

La PKC- α está implicada en la regulación de la proliferación y diferenciación celulares. Su sobreexpresión se asocia con un aumento del crecimiento tumoral, metástasis, inhibición de la apoptosis y desarrollo de resistencia a fármacos antineoplásicos.

Ras y Raf

Las proteínas Ras y Raf están implicadas en la vía de transmisión de señales activada por mitógenos, en la transformación oncogénica y en la proliferación de células tumorales.

ENSAYOS PRECLÍNICOS

Familia bcl-2

El G3139, un OAS desarrollado por Genta Inc. y Aventis, es la primera molécula antisentido estudiada ampliamente para el tratamiento de tumores en seres humanos. Es un OAS de 18 bases complementarias a los seis primeros codones del RNAm del gen *bcl-2*^{46,47}. Los ensayos preclínicos realizados en linfomas de células B, que presentan traslocación t(14; 18) y sobreexpresión de la proteína Bcl-2, demostraron que el tratamiento con G3139 reduce significativamente el crecimiento celular *in vitro* cuando se compara con el grupo control; por el contrario, no produce

ningún efecto sobre la viabilidad de fibroblastos que no expresan Bcl-2 ni sobre células linfoblastoides que expresan Bcl-2 pero sin traslocación t(14; 18)¹¹. Por otra parte, la administración de G3139 a ratones con linfoma produce un aumento de la supervivencia⁴⁸. Además, se ha observado que la combinación de G3139 con dosis bajas de ciclofosfamida es capaz de curar la mayoría de los animales tratados, mientras que la quimioterapia sola no produce ningún efecto sobre la supervivencia de los mismos⁴⁹. También se ha demostrado un aumento de la sensibilidad tumoral a los agentes citotóxicos en tumores de mama, próstata, pulmón y gástrico; en concreto, se observó una remisión tumoral completa al combinar G3139 con cisplatino, paclitaxel y docetaxel⁵⁰⁻⁵².

Se han observado resultados muy interesantes en melanomas que sobreexpresan Bcl-2; así, el tratamiento *in vitro* de algunas líneas celulares de melanoma humanas con G3139 produjo una reducción de la expresión de Bcl-2 y un incremento de la apoptosis, mientras que en el grupo tratado con distintos OAS control no se observaron efectos significativos¹¹. Asimismo, la administración de G3139 en melanomas de ratón produce una marcada inhibición del crecimiento tumoral cuando se compara con ratones no tratados o tratados con secuencias control. El análisis de la expresión de la proteína Bcl-2 y de la apoptosis en secciones tumorales demuestra que la eficacia del G3139 está asociada a la reducción de la proteína Bcl-2 y a un incremento en el número de células apoptóticas¹¹.

Por otra parte, el G3139 aumenta la eficacia de la dacarbacina; así, mientras que la dacarbacina sola reduce en dos terceras partes la masa tumoral en ratones tratados comparados con los no tratados, la combinación de dacarbacina con G3139 produce una remisión tumoral completa en 10 de los 13 animales tratados⁵³. En base a estos estudios preclínicos se ha iniciado un ensayo clínico randomizado, que se encuentra en fase III, en pacientes con melanoma avanzado cotratados con dacarbacina más G3139.

Otros OAS complementarios al sitio de iniciación de la traducción del RNAm del bcl-2 han sido probados en una gran variedad de modelos preclínicos, y han demostrado un efecto antitumoral en leucemias y cáncer de pulmón que sobreexpresan Bcl-2^{50,54}.

Por otra parte, otros estudios han demostrado que la proteína Bcl-2 está involucrada en procesos de angiogénesis a través de mecanismos que, al menos en parte, parecen ser independientes de su actividad antiapoptótica⁵⁵⁻⁵⁷.

Protein kinasa A (PKA)

Los OF contra PKAI inhiben el crecimiento y la diferenciación de diversas líneas celulares cancerosas y presentan actividad antitumoral en animales con tumores humanos^{58,59}.

El GEM 231 es un agente antisentido de "segunda generación" contra la subunidad R1 de la PKA. Se ha demostrado su actividad antitumoral cuando se administra por vía

oral a ratones en los que se han implantado tumores humanos⁶⁰. También ha demostrado actividad sinérgica con diferentes agentes antineoplásicos. Así, la administración oral de GEM 231 en combinación con taxol prolonga significativamente la supervivencia de los ratones con cáncer de colon humano cuando se compara con la administración de ambos agentes en tratamiento único⁶¹. Además, el GEM 231 sensibiliza a los tumores humanos de diferentes tipos histológicos al irinotecan^{56,62} y a la hidroxycamptotecina, inhibidor de la topoisomerasa I, al ejercer un efecto sinérgico sobre la inducción de la apoptosis y la reducción del crecimiento del carcinoma de colon y las células cancerosas de próstata insensibles a los andrógenos⁶³.

Por otra parte, la PKAI interacciona con el receptor del factor de crecimiento epidérmico y colabora en la transducción de señales mitógenas implicadas en la patogénesis y la progresión del cáncer⁶⁴. En base a esta interacción molecular se ha desarrollado una estrategia terapéutica basada en el uso combinado de GEM 231 y el inhibidor selectivo del factor de crecimiento epidérmico (Iresa, ZD1839). Además, dado que tanto la PKAI como el inhibidor del factor de crecimiento epidérmico han demostrado potenciar la eficacia de los taxanos, se ha evaluado la eficacia antitumoral de la triple combinación^{61,65}. Los resultados obtenidos demuestran un efecto cooperativo de los tres agentes para inhibir el crecimiento tumoral de diferentes tipos histológicos y para aumentar la supervivencia de los animales⁶⁶.

C-myb

Los resultados de los estudios realizados han demostrado que los OF contra c-myb inhiben el crecimiento *in vitro* de varias líneas celulares leucémicas procedentes de biopsias de pacientes y que incrementan la supervivencia de los animales tratados^{67,68}. Igualmente, el tratamiento de melanomas con OF contra c-myb inhibe el crecimiento celular *in vitro* y disminuye el crecimiento de tumores humanos implantados en ratones⁶⁹. También se ha demostrado que en cáncer de colon el tratamiento con un OF correspondiente a la región de transcripción del RNAm del c-myb inhibe el crecimiento celular *in vitro*, efecto asociado a la interrupción del ciclo celular inducida por los OF, ya que estos producen la acumulación de las células en las fases G0/G1 del ciclo celular, con una relativa depleción de la fase S. La administración sistémica del OF durante 7 días a ratones con tumores de colon producen un descenso significativo del peso del tumor. Sin embargo, la eficacia es reversible ya que a los 4 días de finalizado el tratamiento el crecimiento tumoral es similar al de los ratones no tratados¹¹. También se ha evaluado la eficacia de los OF contra c-myb para aumentar la eficacia de fármacos citotóxicos, concretamente con cisplatino, y se ha comprobado que la coadministración aumenta significativamente la inhibición de la proliferación celular⁷⁰.

C-myc

La terapia antisentido con OF contra c-myc se ha utilizado en el tratamiento de numerosos histotipos tumorales. Así, los estudios *in vitro* han demostrado que la desregulación específica del gen c-myc por los OF correspondientes disminuye la proliferación celular e induce diferenciación terminal en células leucémicas^{71,72}. Además, en un modelo de linfoma de Burkitt tratado con un OF contra c-myc se observó una inhibición o un retraso en la aparición del tumor⁷³⁻⁷⁵. También se ha observado que estos agentes reducen la viabilidad y la proliferación *in vitro* de células cancerosas humanas de próstata, mama e hígado¹¹.

Por otra parte, se ha puesto de manifiesto la posibilidad de controlar la proliferación de las células tumorales mediante el tratamiento combinado con diferentes agentes antineoplásicos. Así, se ha observado que el cotratamiento con tamoxifeno en cáncer de mama antagoniza el incremento inducido por tamoxifeno en los niveles de RNAm de c-myc y la expresión proteica⁷⁶. Además, el cotratamiento con ácido trans-retinoico inhibe la proliferación celular en el CPCP⁷⁷. Asimismo, el tratamiento de algunas líneas celulares de melanoma humano con un OF contra la región iniciadora de la traducción del RNAm del c-myc reduce la proliferación celular e induce apoptosis al inhibir específicamente el RNAm de c-myc y la expresión proteica⁷⁸. Además, el tratamiento de combinación con cisplatino produce un efecto antiproliferativo y activador de la apoptosis superior al de ambos agentes por separado. Los estudios *in vivo* realizados en ratón con tumores de melanoma humano han demostrado la inhibición del crecimiento tumoral y el incremento de la supervivencia de los animales tras el cotratamiento con cisplatino, comparado con los animales tratados con ambos agentes por separado⁷⁹. Además, usando células de melanoma metastásico humano resistente a cisplatino se ha demostrado que el tratamiento con OF contra c-myc es capaz de superar la resistencia al cisplatino activando el programa apoptótico⁸⁰.

Por otra parte, se ha utilizado un OF contra c-myc encapsulado en partículas lipídicas, denominado INX-6295. La administración sistémica de esta molécula mejora la farmacocinética del oligonucleótido, dando lugar a una mejora significativa en su acumulación y distribución tumoral. Se ha observado que los animales tratados muestran una reducción prolongada en la expresión de la proteína c-Myc, una disminución del crecimiento tumoral y un incremento en la supervivencia; así, la terapia de combinación con cisplatino produjo una regresión tumoral completa en aproximadamente el 30% de los animales tratados⁸¹.

Clusterina/trpm-2

Se ha demostrado que la administración sistémica de los OF contra clusterina en tumores de ratón previamente castrados determinó un inicio más temprano de la apoptosis y un retraso significativo de la aparición de tumores recu-

rrentes independientes de andrógenos comparado con el tratamiento control⁸². Por otra parte, el tratamiento con OF contra clusterina como agente único no presentó efectos sobre el crecimiento de tumores de próstata, uroteliales y renales; sin embargo, el tratamiento combinado con paclitaxel en cáncer de próstata independiente de andrógenos disminuyó el crecimiento tumoral comparado con el tratamiento con ambos agentes solos, lo que indica que los OF contra clusterina incrementan los efectos citotóxicos de la quimioterapia en cáncer de próstata refractario a hormonas^{83,84}. También se ha observado sensibilización a los agentes quimioterápicos e inhibición del crecimiento tumoral tras el tratamiento con OF contra clusterina en combinación con radiación o con quimioterapia en cáncer de próstata, de vesícula y renal⁸⁵⁻⁸⁷. Por otra parte, se ha observado la muerte de células apoptóticas tanto *in vitro* como *in vivo* tras el tratamiento combinado de OF contra clusterina más paclitaxel o cisplatino, pero no tras el tratamiento de estos últimos agentes solos¹¹.

También se ha diseñado un OAS de “segunda generación” complementario al sitio de iniciación de la traducción del gen de clusterina, el OGX-011 desarrollado por Oncogenex e ISIS Pharmaceuticals. Los ensayos preclínicos ponen de manifiesto que esta molécula parece ser más efectiva que los OF para disminuir los niveles de RNAm y la expresión de clusterina presenta una mayor vida media tisular *in vivo*, sin efectos adversos adicionales. La administración semanal de OGX-011 es equivalente al tratamiento diario con OF contra clusterina para aumentar la eficacia de paclitaxel *in vivo*⁸⁸. En base a estos resultados se ha iniciado un ensayo clínico en fase I en pacientes con cáncer de próstata.

Mdm-2

Los OF contra el RNAm del mdm-2 han sido utilizados en una gran variedad de líneas tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*. Para solventar algunas de las limitaciones *in vivo* de los OF se han sintetizado oligonucleótidos de “segunda generación” contra mdm-2 que se han probado en cáncer de mama, colon y próstata. Los resultados han demostrado que inducen apoptosis y aumentan marcadamente la actividad apoptótica de diferentes fármacos antineoplásicos; así, su administración *in vivo* presenta actividad sinérgica con irinotecan, 5-FU, paclitaxel, cisplatino y doxorubicina⁸⁹⁻⁹². El efecto inhibidor del crecimiento tumoral y la inducción de la apoptosis se observa tanto en tumores con fenotipo p-53 salvaje como en el mutante, lo que sugiere que su acción tiene lugar a través de mecanismos dependientes e independientes del p-53^{90,91}.

ENSAYOS CLÍNICOS

Actualmente se están desarrollando numerosos ensayos clínicos en los que se utilizan OAS tanto en

monoterapia como en combinación con diferentes agentes antineoplásicos. Los OAS probados son complementarios a determinadas dianas biológicas como bcl-2, PKC- α , c-raf-1 y h-ras, entre otros. La mayoría de los OAS utilizados en ensayos clínicos en humanos

para el tratamiento del cáncer son OF, aunque también se están estudiando OAS de “segunda y de tercera generación” tanto en el tratamiento del cáncer como de otras patologías, tal como se muestra en las tablas II y III.

Tabla II. Ensayos clínicos de los oligonucleótidos antisentido en el tratamiento del cáncer solos o en combinación con agentes citostáticos

| <i>Diana/oligo</i> | <i>Química</i> | <i>Fase</i> | <i>Tipo de tumor</i> | <i>Fármaco en combinación</i> |
|------------------------------|----------------|-------------|----------------------|--------------------------------------|
| Bcl-2 (G3139) | OF | I/II | Colorrectal | Irinotecán |
| | | I/II | Próstata | Docetaxel |
| | | II | LNH | CHOP |
| | | II | LMA | Gemtuzumab |
| | | II | CPCNP | |
| | | II | Colorrectal | |
| | | III | Melanoma | Dacarbacina |
| | | III | MM | Dexametasona |
| PKA (GEM 231) | 2ª generación | I | Todos los tipos | Docetaxel |
| | | I | Todos los tipos | Paclitaxel |
| | | II | Colon | |
| PKC- α (ISIS 3521) | OF | I | Todos los tipos | 5-FU/leucovorin o Carboplatina/Taxol |
| | | II | Ovario | |
| | | II | Próstata | |
| | | II | Mama | |
| | | II | Cerebro | |
| | | II | Colon | |
| | | II | CPCP | |
| | | II | Melanoma | |
| | | III | CPCNP | Carboplatino/Taxol |
| | | III | CPCNP | Gemcitabina/Cisplatino |
| H-ras (ISIS 2503) | OF | II | CPCNP | |
| | | II | Páncreas | |
| C-raf-1 (ISIS 5132) | OF | II | Mama | |
| | | II | CPCP | |
| | | II | CPCNP | |
| | | II | Colon | |
| | | II | Ovario | |
| | | II | Páncreas | |
| II | Próstata | | | |

LNH: Linfoma no- Hodgkin; LMA: leucemia mieloide aguda; CPCNP: cáncer pulmonar de células no pequeñas; CPCP: cáncer pulmonar de células pequeñas; MM: mieloma múltiple; LLC: leucemia linfática crónica; CHOP: doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona.

Tabla III. Otros oligonucleótidos antisentido en ensayo clínico

| <i>Producto</i> | <i>Diana</i> | <i>Enfermedad</i> | <i>Química</i> | <i>Estado</i> |
|----------------------------|-------------------------------|---|----------------|---------------|
| MG 98 | DNA metiltransferasa | Tumores sólidos, carcinoma de células renales, cáncer de cabeza y cuello, leucemia mieloide aguda refractaria, mielodisplasia | OF | Fase I/II |
| GTI 2040 + capecitabina | Ribonucleótido reductasa (R2) | Carcinoma de células renales | OF | Fase II |
| GTI 2040 | Ribonucleótido reductasa (R2) | Carcinoma de células renales | OF | Fase II |
| Avi 4126 | c-myc | Cáncer, restenosis, enfermedad poliquística renal | 3ª generación | Fase I/II |
| GTI 2051 | Ribonucleótido reductasa (R1) | Cáncer | OF | Fase I |
| LR-3001 | c-myb | Leucemia mieloide crónica | OF | Fase I |
| OGX-011 | Clusterina | Cáncer de próstata | 2ª generación | Fase I |

G3139, antisentido contra bcl-2

Los estudios realizados con G3139 (GENASENSE®), en más de 300 pacientes con cáncer avanzado han puesto de manifiesto tanto la seguridad del fármaco a las dosis y los intervalos de administración ensayados, como la eficacia del mismo en la regulación de la expresión del gen bcl-2.

En un estudio en fase I realizado en pacientes con LNH que sobreexpresan Bcl-2, en los que habían fracasado al menos dos regímenes de quimioterapia estándar, se administró el fármaco por infusión subcutánea diaria durante 14 días con un amplio intervalo de dosis, de 4,6 a 195,8 mg/m²/día. La toxicidad limitante de la dosis fue trombocitopenia, hipotensión, fiebre y astenia. La trombocitopenia revirtió rápidamente y no estuvo asociada a sangrado, se piensa que fue debida al aumento de la destrucción periférica, sin supresión de la médula ósea. La dosis máxima tolerada (DMT) fue 147,2 mg/m²/día. Uno de los pacientes que recibió dosis intermedias presentó respuesta completa, 2 pacientes presentaron respuestas menores y en 9 la enfermedad permaneció estable. Además, 7 pacientes presentaron reducción de los niveles de la proteína bcl-2 en nódulos linfáticos y en células monocleares de sangre periférica o médula ósea⁹³.

Por otra parte, en otro estudio en fase I el fármaco se administró a 15 pacientes, 11 con cáncer de próstata, a dosis de 0,6 a 2,3 mg/kg/día en infusión continua durante 14 días o en inyección subcutánea cada 21 días. En uno de los pacientes que recibió las dosis más altas se observó neutropenia grado 3, y en 3 pacientes la enfermedad permaneció estable durante 2-3 ciclos de tratamiento⁹⁴.

En cuanto a la terapia de combinación, en un estudio realizado en 24 pacientes con melanoma, se administró el fármaco por vía subcutánea a dosis de 0,6 a 6,5 mg/kg/día durante 14 días, o de 5 a 9 mg/kg/día durante 5 días; todos los pacientes recibieron además dosis estándar de dacarbicina. No se observó toxicidad limitante de la dosis, pero sí apareció fiebre, leucopenia y elevación transitoria de las transaminasas hepáticas. Las dosis iguales o superiores a 1,7 mg/kg se asociaron a descensos medios del 40% en los niveles de la proteína Bcl-2 determinados en las biopsias de las lesiones malignas. Se observaron una respuesta completa, 2 parciales y 3 menores⁹⁵.

Además, 21 pacientes con cáncer de próstata refractario a hormonas fueron tratados con G3139 a dosis de 0,6 a 3,1 mg/m²/día por infusión intravenosa continua durante 14 días. En el día 8 todos los pacientes recibieron de 4 a 12 mg/m² de mitoxantrona. Se observó un caso de neutropenia grado 3 y en un paciente el antígeno específico de cáncer de próstata descendió más de un 50%⁹⁶.

En otros 27 pacientes, la mayoría con cáncer de próstata, se administró el fármaco a dosis de 0,6 a 4,1 mg/kg/día por infusión intravenosa durante 14-21 días; otros 8 pacientes recibieron dosis de 4,1; 5,3 ó 6,9 mg/kg/día durante 1 ciclo, seguido de la misma dosis de G3139 junto con 100 mg/m² de paclitaxel semanalmente durante tres semanas, el tratamiento se repitió durante

dos ciclos. No se ha descrito DMT. En un paciente apareció fatiga grado 3, *rash* cutáneo y leucopenia. En 3 pacientes se observó elevación transitoria de las transaminasas. Uno de los pacientes que recibió dosis altas presentó respuesta parcial y otros tres enfermedad estable. Los niveles de la proteína Bcl-2 en linfocitos de sangre periférica a los 8-15 días de iniciado el tratamiento disminuyeron hasta un tercio del valor inicial⁹⁷.

Otros dos estudios en fase I evaluaron la seguridad del G3139 administrado en terapia de combinación con docetaxel. Por una parte, 8 pacientes fueron tratados por infusión continua a dosis de 1, 2 ó 3 mg/kg/día durante 21 días junto con 35 mg/m² de docetaxel los días 8, 15 y 22. El tratamiento se repitió al día 28. No se estableció DMT. Se observaron dos casos de trombocitopenia grado 3. Los niveles de la proteína Bcl-2 en linfocitos de sangre periférica disminuyó en los pacientes tratados con dosis iguales o superiores a 2 mg/kg/día⁹⁸. Por otra parte, 16 pacientes recibieron de 5 a 7 mg/kg/día de G3139 por infusión intravenosa continua durante 5-7 días junto con 60-100 mg/m² de docetaxel en el día 5. En 4 pacientes se presentó neutropenia grado 4 no complicada. También se observó una reducción significativa en la expresión de la proteína Bcl-2 en monocitos de sangre periférica⁹⁹.

Además, en otro estudio 13 pacientes con LMA refractaria fueron tratados con G3139 a dosis de 4-7 mg/kg/día por infusión intravenosa continua durante 10 días junto con fludarabina y citarabina a dosis de 15 y 1 mg/m², respectivamente, los días 6 a 10. No se observó toxicidad dependiente de la dosis; además, 4 pacientes presentaron respuesta completa y 2 permanecieron en remisión durante más de tres meses¹⁰⁰.

Se están realizando numerosos estudios en fase II en diferentes tipos de tumores hematológicos y sólidos¹⁰¹. También se han iniciado ensayos randomizados en fase III en terapia de combinación en pacientes con melanoma maligno, mieloma múltiple y LLC¹⁰².

ISIS 3521, antisentido contra PKC- α

El OAS contra la PKC- α , ISIS 3521 (AFFINITAK®), desarrollado por ISIS *Pharmaceuticals* ha sido ampliamente evaluado en ensayos clínicos en fase I y II. En cuanto a los ensayos clínicos en fase I, inicialmente el fármaco se administró a 21 pacientes a dosis de 0,5 a 3,0 mg/kg/día por infusión intravenosa continua durante 21 días. Se observaron trombocitopenia y fatiga, y la DMT fue de 2,0 mg/kg/día. En tres pacientes con cáncer de ovario se observaron respuestas significativas durante 11 meses¹⁰³.

Un régimen alternativo se estudió en otros 36 pacientes utilizando dosis de 0,15 a 6,0 mg/kg/día por infusión intravenosa de dos horas tres días a la semana. No se estableció DMT. En un paciente apareció trombocitopenia grado 3. Dos pacientes con LNH presentaron respuestas completas durante 17 ciclos de tratamiento¹⁰⁴. Por otra parte, cuando el fármaco se administró a dosis de 6 a 24

mg/kg por infusión intravenosa de 24 horas, se observaron incrementos dependientes de la dosis en el tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada y productos derivados del complemento. Un paciente que recibió 18 mg/kg presentó hemorragia grado 3. En un paciente la enfermedad permaneció estable durante más de tres meses^{105,106}.

En cuanto a la terapia de combinación, 10 pacientes fueron tratados con ISIS 3521 a dosis de 1 a 2 mg/kg/día por infusión intravenosa continua durante 21 días junto con 425 mg/m²/día de 5-FU y 20 mg/m²/día de leucovorín en los días 1 a 5. No se alcanzó DMT. Dos pacientes presentaron respuestas parciales¹⁰⁷. Al igual que en el caso de ISIS 5132, los resultados de los estudios han demostrado que los perfiles de dosis continua presentan ventajas frente a los de administración semanal.

En cuanto a los ensayos clínicos en fase II, por una parte 22 pacientes con astrocitoma de alto grado recurrente fueron tratados con 2 mg/kg/día por infusión intravenosa continua durante 21 días. Se observó un caso de trombocitopenia grado 3 y otro caso de elevación de las transaminasas hepáticas grado 4. El tiempo medio para la progresión y la supervivencia fueron de 35 y 93 días, respectivamente¹⁰⁸.

Por otra parte, 15 mujeres con cáncer de mama metastásico fueron tratadas con ISIS 3521 a dosis de 2 mg/kg/día por infusión intravenosa continua durante 21 días. Dos pacientes presentaron trombocitopenia en grado 3 ó 4 y cuatro pacientes sufrieron infecciones en grado 3 ó 4. En una paciente la enfermedad permaneció estable durante cuatro meses¹⁰⁹.

Además, el fármaco se ha utilizado en terapia de combinación en 18 pacientes, 12 con cáncer pulmonar de células no pequeñas (CPCNP), a dosis de 2 mg/kg/día por infusión intravenosa continua durante 14 días junto con carboplatino (AUC 6) y paclitaxel (175 mg/m²) en el día 4. No se observó toxicidad dependiente de la dosis. Al mismo tiempo, otros 53 pacientes con CPCNP recibieron el mismo régimen pero durante 21 días también en combinación con carboplatino y paclitaxel. Se administró una media de cuatro ciclos por paciente. En 40 pacientes apareció neutropenia grado 3 ó 4 y en 13 trombocitopenia grado 3 ó 4. En cuanto a la respuesta, se evaluaron 48 pacientes, de los cuales 20 tuvieron una respuesta objetiva a la terapia y otros 20 presentaron enfermedad estable. La supervivencia media y el tiempo para la progresión fueron 19 y 6,6 meses, respectivamente¹¹⁰.

Estos resultados ponen de manifiesto la seguridad de ISIS 3521 solo y en combinación, así como un incremento en la actividad antitumoral cuando dicho fármaco se añade a la quimioterapia estándar en pacientes con CPCNP.

Finalmente, se han realizado dos ensayos clínicos en fase III en pacientes con CPCNP, en el primero los pacientes recibieron carboplatino y paclitaxel con y sin ISIS 3521, y en el segundo gemcitabina y cisplatino con y sin ISIS 3521. Los resultados aún no han sido publicados.

ISIS 2503, antisentido contra h-ras

El ISIS 2503 es un inhibidor de la traducción del gen h-ras. Se ha estudiado solo y en combinación con quimioterapia convencional en tres ensayos clínicos en fase I. En uno de los estudios, 13 pacientes recibieron una dosis semanal de 3 a 18 mg/kg/semana por infusión intravenosa de 24 horas. No se estableció DMT, pero con las dosis más altas se observó un caso de urticaria sistémica y otro de síndrome urémico hemolítico. La mayoría de los pacientes presentaron durante la infusión fiebre grado 2 ó 3 y escalofríos. Un paciente alcanzó enfermedad estable al final de nueve semanas de tratamiento¹¹¹.

Por otra parte, en otros 23 pacientes se administró una dosis de 10 mg/kg/día en infusión continua durante 14 días, el ciclo se repitió cada 21 días. No se observó toxicidad limitante de la dosis. Tres pacientes presentaron enfermedad estable durante 6, 8 y 10 ciclos. La expresión de h-ras fue reducida en polimorfonucleares incluso con las dosis más bajas¹¹².

Además, en cuanto a la terapia de combinación, 11 pacientes fueron tratados con el fármaco a dosis de 4 a 6 mg/kg/día por infusión intravenosa continua durante 14 días junto con 1.000 mg/m² de gemcitabina los días 1 y 8. Cuatro pacientes presentaron neutropenia grado 3 ó 4 y dos pacientes trombocitopenia grado 3, estas toxicidades fueron independientes de las dosis administradas¹¹³.

En base a los resultados de los estudios anteriores se iniciaron los ensayos clínicos en fase II utilizando dosis de 6 mg/kg/día por infusión intravenosa durante 14 días. En uno de los estudios, 17 pacientes con cáncer colorrectal avanzado fueron tratados con el fármaco como agente de primera línea durante una media de dos ciclos de tratamiento. De los 7 pacientes evaluados 2 presentaron enfermedad estable durante 3 y 6 ciclos de terapia. No se observó toxicidad significativa¹¹⁴.

En otro de los estudios, 24 pacientes con CPCNP, que no habían recibido más de un protocolo de terapia previa, fueron tratados durante una media de 3,1 ciclos. De los 20 pacientes evaluados 7 presentaron enfermedad estable, y el tiempo medio para la progresión de la enfermedad y la supervivencia fue mayor o igual a 2,0 y superior a 3,8 meses, respectivamente. La única toxicidad significativa observada fue un caso de trombocitopenia grado 3 y de fiebre grado 3¹¹⁵.

Finalmente, otros 30 pacientes con cáncer avanzado de páncreas, sin tratamiento previo, fueron tratados con ISIS 2503. Los 6 pacientes evaluados fueron tratados durante una media de 3 ciclos y dos de ellos presentaron enfermedad estable. La toxicidad más significativa fue un caso de astenia grado 3 y otro de trombocitopenia grado 3¹¹⁶.

Los resultados preliminares de estos tres estudios confirman que el régimen utilizado es bien tolerado, aunque la eficacia del ISIS 2503 como agente único en este tipo de tumores no ha sido suficientemente demostrada.

ISIS 5132, antisentido contra c-raf-1

El ISIS 5132 es un OAS contra el gen c-raf-1 que ha sido objeto de tres ensayos clínicos en fase I con distintos regímenes de tratamiento. Por una parte, se utilizó un régimen de tres dosis semanales de 0,5 a 6,0 mg/kg por infusión intravenosa de dos horas. Se observaron 5 casos de anemia grado 3 y 2 casos de fatiga grado 3. Dentro de las 48 horas de tratamiento la reducción media en los niveles de ARNm de c-raf-1 en linfocitos polimorfonucleares fue del 42%. La supresión de dichos niveles se mantuvo durante los 15 días siguientes al inicio del tratamiento. Dos pacientes presentaron enfermedad estable durante un periodo de diez ciclos¹¹⁷.

Por otra parte, el fármaco fue administrado a otros 34 pacientes por infusión intravenosa a dosis de 0,5 a 5 mg/kg/día durante 21 días. No fue definida la DMT dado que no se observó toxicidad severa¹¹⁸.

Además, en otro estudio el fármaco se administró a 21 pacientes por infusión intravenosa durante 24 horas semanalmente. En dos de los 4 pacientes que recibieron una dosis de 30 mg/kg/semana se observó anemia hemolítica y fallo renal agudo. La DMT fue de 24 mg/kg/semana. No se estableció relación entre la dosis y la supresión de los niveles de ARNm de c-raf-1, y tampoco se observaron respuestas ni parciales ni completas¹¹⁹.

En cuanto a la terapia de combinación, se realizó otro

ensayo clínico en fase I en el que 12 pacientes fueron tratados con ISIS 5132 a dosis de 1 a 3 mg/kg/día por infusión intravenosa durante 21 días junto con 425 mg/m² de 5-FU y 20 mg/m² de leucovorín por *bolus* intravenoso los días 1 a 5, repitiendo el ciclo cada 28 días. La toxicidad limitante de la dosis se observó a los 3 mg/kg/día con neutropenia grado 4 en tres pacientes, mucositis grado 4 en dos pacientes y trombocitopenia grado 4 en un paciente. Tres pacientes presentaron enfermedad estable durante al menos 6 ciclos de tratamiento¹²⁰.

OTROS

Se ha diseñado un agente antisentido contra c-myb que se ha ensayado en un pequeño grupo de pacientes con LMC a dosis de 2 mg/kg/día en infusión continua durante 7 días. Los resultados han puesto de manifiesto que el fármaco produce un descenso significativo de la expresión la proteína c-Myb; además, el análisis citogenético mostró una respuesta completa/parcial en el 45% de los pacientes. No se ha observado toxicidad dependiente de la dosis¹²¹.

También se ha diseñado un agente antisentido contra c-myc. Los resultados de un ensayo clínico en fase I en combinación con cisplatino en pacientes con cáncer de ovario han demostrado que es bien tolerado y que no incrementa la toxicidad del cisplatino¹²².

Bibliografía

- Baker BF, Monia BP. Novel mechanisms for antisense-mediated regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 3-18.
- Crooke ST. Molecular mechanisms of action of antisense drugs. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 31-44.
- Koller E, Gaarde WA, Monia BP. Elucidating cell signaling mechanisms using antisense technology. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 142-8.
- Herdewijn P. Heterocyclic modifications of oligonucleotides and antisense technology. *Antisense Nucleic Acids Drug Dev* 2000; 10: 297-310.
- Miller PS, Ts'o PO. A new approach to chemotherapy based on molecular biology and nucleic acid chemistry: Matagen (masking tape for gene expression). *Anticancer Drug Des* 1987; 2: 117-28.
- Lonnberg H, Vuorio E. Towards genomic drug therapy with antisense oligonucleotides. *Ann Med* 1996; 28: 511-22.
- Kurreck J, Wyszko E, Gillen C, Erdmann VA. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1911-8.
- Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 2003; 270: 1628-44.
- Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Ryte AS, Yurchenko, et al. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6454-8.
- Vlassov VV, Balakireva LA, Yakubov LA. Transport of oligonucleotides across natural and model membranes. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1197: 95-108.
- Biroccio A, Leonetti C, Zupi G. The future of antisense therapy: combination with anticancer treatments. *Oncogene* 2003; 22: 6579-88.
- Maksimenko A, Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, Couvreur P, Malvy C. Therapeutic potentialities of EWS-Fli-1 mRNA-Targeted vectorized antisense oligonucleotides. *Ann N.Y. Acad Sci* 2003; 1002: 72-7.
- Shi F, Hoekstra D. Effective intracellular delivery of oligonucleotides in order to make sense of antisense. *J Control Release* 2004; 97: 189-209.
- Cossum PA, Truong L, Owens SR, Markham PM, Shea JP, Crooke ST. Pharmacokinetics of a 14C-labeled phosphorothioate oligonucleotide, ISIS 2105, after intradermal administration to rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269: 89-94.
- Crooke ST, Grillone LR, Tendolkar A, Garrett A, Fratkin MJ, Leeds J. A pharmacokinetic evaluation of 14C-labeled afovirsen sodium in patients with genital warts. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 56: 641-6.
- Crooke ST. Potential roles of antisense technology in cancer chemotherapy. *Oncogene* 2000; 19: 6651-9.
- Crooke ST, Graham MJ, Zuckerman JE, Brooks D, Conklin BS, Cummins LL, et al. Pharmacokinetic properties of several novel oligonucleotide analogs in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 923-37.
- Srinivasan SK, Tewary HK, Iversen PL. Characterization of binding sites, extent of binding, and drug interactions of oligonucleotides with albumin. *Antisense Res Dev* 1995; 5: 131-9.
- Agrawal S, Tamsamani J, Tang JY. Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc Nat Acad Sci USA* 1991; 88: 7595-9.

20. Iversen P. In vivo studies with phosphorothioate oligonucleotides: pharmacokinetics prologue. *Anticancer Drug Des* 1991; 6: 531-8.
21. Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 280-4.
22. Milner N, Mir KU, Southern EM. Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1997; 15: 537-41.
23. Scherr M, Rossi JJ. Rapid determination and quantitation of the accessibility to native RNAs by antisense oligodeoxynucleotides in murine cell extracts. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 5079-85.
24. Cossum PA, Sasmor H, Dellinger D, Truong L, Cummins L, Owens SR, et al. Disposition of the 14C-labeled phosphorothioate oligonucleotide ISIS 2105 after intravenous administration to rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267: 1181-90.
25. Rappaport J, Hanss B, Cop JB, Copeland TD, Bruggeman LA, Coffman TM, et al. Transport of phosphorothioate oligonucleotides in kidney: implications for molecular therapy. *Kidney Int* 1995; 47: 1462-9.
26. Butler M, Stecker K, Bennett CF. Cellular distribution of phosphorothioate oligodeoxynucleotides in normal rodent tissues. *Lab Invest* 1997; 77: 379-88.
27. Monteith DK, Henry SP, Howard RB, Flournoy S, Levin AA, Bennett CF, et al. Immune stimulation-a class effect of phosphorothioate oligodeoxynucleotides in rodents. *Anticancer Drug Des* 1997; 12: 421-32.
28. Levin AA. A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 69-84.
29. Henry SP, Giclas PC, Leeds J, Pangburn M, Auletta C, Levin AA, et al. Activation of the alternative pathway of complement by a phosphorothioate oligonucleotide: potential mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 281: 810-6.
30. Ho P, Parkinson DR. Antisense oligonucleotides as therapeutics for malignant diseases. *Semin Oncol* 1997; 24: 187-202.
31. Zhang R, Yan J, Shahinian H, Amin G, Lu Z, Liu T, et al. Pharmacokinetics of an anti-human immunodeficiency virus antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate (GEM 91) in HIV-infected subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58: 44-53.
32. Geary RS, Leeds JM, Henry SP, Monteith DK, Levin AA. Antisense oligonucleotide inhibitors for the treatment of cancer: 1 pharmacokinetic properties of phosphorothioate oligonucleotides. *Anticancer Drug Des* 1997; 12: 383-93.
33. Henry SP, Monteith DK, Levin AA. Antisense oligonucleotide inhibitors for the treatment of cancer: 2 toxicological properties of phosphorothioate oligonucleotides. *Anticancer Drug Des* 1997; 12: 395-407.
34. Flaherty KT, Stevenson JP, O'Dwyer PJ. Antisense therapeutics: lessons from early clinical trials. *Curr Opin Oncol* 2001; 13: 499-505.
35. Fennewald SM, Rando RF. Inhibition of high affinity basic fibroblast growth factor binding by oligonucleotides. *J Biol Chem* 1995; 270: 21718-21.
36. Guvakova MA, Yakubov LA, Vlodayvsky I, Tonkinson JL, Stein CA. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix. *J Biol Chem* 1995; 270: 2620-7.
37. Pérez JR, Li Y, Stein CA, Majumder S, van Oorschot A, Narayanan R. Sequence-independent induction of Sp1 transcription factor activity by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5957-61.
38. Cheson BD, Dancy J, Wright J. Novel agents for Non-Hodgkin's Lymphomas. *Hematology* 2002; 245-50.
39. Reed, J.C. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol* 1995; 7: 541-6.
40. Alitalo K, Winqvist R, Lin CC, de la Chapelle A, Schwab M, Bishop JM. Aberrant expression of an amplified c-myc oncogene in two cell lines from a colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 4534-8.
41. Griffin CA, Baylin SB. Expression of the c-myc oncogene in human small cell lung carcinoma. *Cancer Res* 1985; 45: 272-5.
42. Janssen JW, Vernole P, de Boer PA, Oosterhuis JW, Collard JG. Sublocalization of c-myc to 6q21-q23 by in situ hybridization and c-myc expression in a human teratocarcinoma with 6q rearrangements. *Cytogenet Cell Genet* 1986; 41: 129-35.
43. Thiele CJ, McKeon C, Triche TJ, Ross RA, Reynolds CP, Israel MA. Differential protooncogene expression characterizes histopathologically indistinguishable tumors of the peripheral nervous system. *J Clin Invest* 1987; 80: 804-11.
44. Biroccio A, Benassi B, D'Agnano I, D'Angelo C, Buglioni S, Mottolese M, et al. c-Myb and Bcl-x overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer: clinical and experimental findings. *Am J Pathol* 2001; 158: 1289-99.
45. Dang CV. C-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1-11.
46. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce C. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 1985; 228: 1440-3.
47. Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 1986; 47: 19-28.
48. Cotter FE. Antisense therapy for lymphomas. *Hematol Oncol* 1997; 15: 3-11.
49. Klasa RJ, Bally MB, Ng R, Goldie JH, Gascoyne RD, Wong FM. Eradication of human non-Hodgkin's lymphoma in SCID mice by BCL-2 antisense oligonucleotides combined with low-dose cyclophosphamide. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2492-500.
50. Zangemeister-Wittke U, Schenker T, Luedke GH, Stahel RA. Synergistic cytotoxicity of bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides and etoposide, doxorubicin and cisplatin on small-cell lung cancer cell lines. *Br J Cancer* 1998; 78: 1035-42.
51. Gleave ME, Miayake H, Goldie J, Nelson C, Tolcher A. Targeting bcl-2 gene to delay androgen-independent progression and enhance chemosensitivity in prostate cancer using antisense bcl-2 oligodeoxynucleotides. *Urology* 1999; 54 (Supl. 2): 36-46.
52. Chi KC, Wallis AE, Lee CH, de Menezes DL, Sartor J, Dragowska WH, et al. Effects of Bcl-2 modulation with G3139 antisense oligonucleotide on human breast cancer cells are independent of inherent Bcl-2 protein expression. *Breast Cancer Res Treat* 2000; 63: 199-212.
53. Wacheck V, Krepler C, Strommer S, Heere-Ress E, Klem R, Pehamberger H, et al. Antitumor effect of G3139 Bcl-2 antisense oligonucleotide is independent of its immune stimulation by CpG motifs in SCID mice. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002; 12: 359-67.
54. Lebedeva I, Rando R, Ojwang J, Cossum P, Stein CA. Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. *Cancer Res* 2000; 60: 6052-60.
55. Biroccio A, Candiloro A, Mottolese M, Saporita O, Albini A, Zupi G, et al. Bcl-2 overexpression and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression and in vivo angiogenesis in a breast carcinoma line. *FASEB J* 2000; 14: 652-60.
56. Agrawal S, Kandimall ER, Yu D, Ball R, Lombardi G, Lucas T, et al. GEM 231, a second-generation antisense agent complementary to protein kinase A R1alpha subunit, potentiates antitumor activity of irinotecan in human colon, pancreas, prostate and lung cancer xenografts. *Int J Oncol* 2002; 21: 65-72.
57. Iervolino A, Trisciuglio D, Ribatti D, Candiloro A, Biroccio A, Zupi G, et al. Bcl-2 overexpression in human melanoma cells increases angiogenesis through VEGF mRNA stabilization and HIF-1-mediated transcriptional activity. *FASEB J* 2002; 16: 1453-5.
58. Yokozaki H, Budillon A, Tortora G, Meissner S, Beaucage SL, Miki K, et al. An antisense oligodeoxynucleotide that depletes R1 alpha subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase induces growth inhibition in human cancer cells. *Cancer Res* 1993; 53: 868-72.
59. Cho-Chung YS. Antisense DNA toward type I protein kinase A produces sustained inhibition of tumor growth. *Proc Assoc Am Physicians* 1997; 109: 23-32.
60. Wang H, Cai Q, Zeng X, Yu D, Agrawal S, Zhang R. Antitumor activity and pharmacokinetics of a mixed-backbone antisense oligonucleotide targeted to the R1alpha subunit of protein kinase A after oral administration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 13989-94.

61. Tortora G, Bianco R, Damiano V, Fontanini G, De Placido S, Bianco AR, et al. Oral antisense that targets protein kinase A cooperates with taxol and inhibits tumor growth, angiogenesis, and growth factor production. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 2506-12.
62. Wang H, Hang J, Shi Z, Li M, Yu D, Kandimalla ER, et al. Antisense oligonucleotide targeted to R1alpha subunit of cAMP-dependent protein kinase (GEM231) enhances therapeutic effectiveness of cancer chemotherapeutic agent irinotecan in nude mice bearing human cancer xenografts: in vivo synergistic activity, pharmacokinetics and host toxicity. *Int J Oncol* 2002; 21: 73-80.
63. Cho YS, Cho-Chung YS. Antisense protein kinase A R1alpha acts synergistically with hydroxycamptothecin to inhibit growth and induce apoptosis in human cancer cells: molecular basis for combinatorial therapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 1171-8.
64. Tortora G, Damiano V, Bianco C, Baldassarre G, Bianco AR, Lanfrancone L, et al. The R1alpha subunit of protein kinase A (PKA) binds to Grb2 and allows PKA interaction with the activated EGF-receptor. *Oncogene* 1997; 14: 923-8.
65. Tortora G, Ciardiello F. Targeting of epidermal growth factor receptor and protein kinase A: molecular basis and therapeutic applications. *Ann Oncol* 2000; 11: 777-83.
66. Tortora G, Caputo R, Damiano V, Bianco R, Fontanini G, Cuccato S, et al. Combined blockade of protein kinase A and bcl-2 by antisense strategy induces apoptosis and inhibits tumor growth and angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 2537-44.
67. Calabretta B, Sims RB, Valtieri M, Caracciolo D, Szczylik C, Venturelli D, et al. Normal and leukemic hematopoietic cells manifest differential sensitivity to inhibitory effects of c-myc antisense oligodeoxynucleotides: an in vitro study relevant to bone marrow purging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 2351-5.
68. Ratajczak MZ, Kant JA, Luger SM, Hijiya N, Zhang J, Zon G, et al. In vivo treatment of human leukemia in a scid mouse model with c-myc antisense oligodeoxynucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11823-7.
69. Hijiya N, Zhang J, Ratajczak MZ, Kant JA, DeRiel K, Herlyn M, et al. Biologic and therapeutic significance of MYB expression in human melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 4499-503.
70. Funato T, Satou J, Kozawa K, Fujimaki S, Miura T, Kaku M. Use of c-myc antisense oligonucleotides to increase the sensitivity of human colon cancer cells to cisplatin. *Oncol Rep* 2001; 8: 807-10.
71. Holt JT, Redner RL, Nienhuis AW. An oligomer complementary to c-myc mRNA inhibits proliferation of HL-60 promyelocytic cells and induces differentiation. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 963-73.
72. Wickstrom EL, Bacon TA, González A, Freeman DL, Lyman GH, Wickstrom E. Human promyelocytic leukemia HL-60 cell proliferation and c-myc protein expression are inhibited by an antisense pentadecadeoxynucleotide targeted against c-myc mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1028-32.
73. Huang Y, Zinder R, Kligshstein M, Wickstrom E. Prevention of tumor formation in a mouse model of Burkitt's lymphoma by 6 weeks of treatment with anti-c-myc DNA phosphorothioate. *Mol Med* 1995; 6: 647-58.
74. Smith JB, Wickstrom E. Antisense c-myc and immunostimulatory oligonucleotide inhibition of tumorigenesis in a murine B-cell lymphoma transplant model. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 1146-54.
75. Smith JB, Wickstrom E. Inhibition of tumorigenesis in a murine B-cell lymphoma transplant model by c-Myc complementary oligonucleotides. *Adv Exp Med Biol* 1998; 451: 17-22.
76. Kang Y, Cortina R, Perry RR. Role of c-myc in tamoxifen-induced apoptosis estrogen-independent breast cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 279-84.
77. Akie K, Dosaka-Akita H, Murakami A, Kawakami Y. A combination treatment of c-myc antisense DNA with all-trans-retinoic acid inhibits cell proliferation by downregulating c-myc expression in small cell lung cancer. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2000; 10: 243-9.
78. Leonetti C, D'Agnano I, Lozupone F, Valentín A, Geiser T, Zon G, et al. Antitumor effect of c-myc antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotides on human melanoma cells in vitro and in mice. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 419-29.
79. Citro G, D'Agnano I, Leonetti C, Perini R, Bucci B, Zon G, et al. c-myc antisense oligodeoxynucleotides enhance the efficacy of cisplatin in melanoma chemotherapy in vitro and in nude mice. *Cancer Res* 1998; 58: 283-9.
80. Leonetti C, Biroccio A, Candiloro A, Citro G, Fornari C, Mottolese M, et al. Increase of cisplatin sensitivity by c-myc antisense oligodeoxynucleotides in a human metastatic melanoma inherently resistant to cisplatin. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2588-95.
81. Leonetti C, Biroccio A, Benassi B, Stringaro A, Stoppacciaro A, Sempile SC, et al. Encapsulation of c-myc antisense oligodeoxynucleotides in lipid particles improves antitumoral efficacy in vivo in a human melanoma line. *Cancer Gene Ther* 2001; 8: 459-68.
82. Liu Q, Gazitt Y. Potentiation of dexamethasone-, paclitaxel-, and Ad-p53-induced apoptosis by Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotides in drug-resistant multiple myeloma cells. *Blood* 2003; 101: 4105-14.
83. Miyake H, Chi KN, Gleave ME. Antisense TRPM-2 oligodeoxynucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1655-63.
84. Miyake H, Nelson C, Rennie PS, Gleave ME. Acquisition of chemoresistant phenotype by overexpression of the antiapoptotic gene testosterone-repressed prostate message-2 in prostate cancer xenograft models. *Cancer Res* 2000; 2: 60: 2547-54.
85. Miyake H, Hara I, Kamidono S, Gleave ME. Synergistic chemosensitization and inhibition of tumor growth and metastasis by the antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in a human bladder cancer model. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 4245-52.
86. Zellweger T, Chi K, Miyake H, Adomat H, Kiyama S, Skov K, et al. Enhanced radiation sensitivity in prostate cancer by inhibition of the cell survival protein clusterin. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 3276-84.
87. Zellweger T, Miyake H, July LV, Akbari M, Kiyama S, Gleave ME. Chemosensitization of human renal cell cancer using antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene clusterin. *Neoplasia* 2001; 3: 360-7.
88. Zellweger T, Miyake H, Cooper S, Chi K, Conklin BS, Monia BP, et al. Antitumor activity of antisense clusterin oligonucleotides is improved in vitro and in vivo by incorporation of 2'-O-(2-methoxyethyl) chemistry. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 934-40.
89. Tortora G, Caputo R, Damiano V, Bianco R, Chen J, Agrawal S, et al. A novel MDM2 anti-sense oligonucleotide has anti-tumor activity and potentiates cytotoxic drugs acting by different mechanisms in human colon cancer. *Int J Cancer* 2000; 88: 804-9.
90. Wang H, Han L, Yu D, Agrawal S, Zhang R. Antisense anti-MDM2 oligonucleotides as a novel therapeutic approach to human breast cancer: in vitro and in vivo activities and mechanisms. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3613-24.
91. Wang H, Nan L, Yu D, Lindsey JR, Agrawal S, Zhang R. Antitumor efficacy of a novel antisense anti-MDM2 mixed-backbone oligonucleotide in human colon cancer models: p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Mol Med* 2002; 8: 185-99.
92. Wang H, Yu D, Agrawal S, Zhang R. Experimental therapy of human prostate cancer by inhibiting MDM2 expression with novel mixed-backbone antisense oligonucleotides: in vitro and in vivo activities and mechanisms. *Prostate* 2003; 54: 194-205.
93. Webb A, Cunningham D, Cotter F, Clarke PA, di Stefano F, Ross P, et al. BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 1997; 349: 1137-41.
94. Morris M, Tong W, Osman I, Maslak P, William K, Terry K, et al. A phase I/IIA dose-escalating trial of bcl-2 anti-sense (G3139) treatment by 14-days continuous intravenous infusion (CI) for patients with androgen-independent prostate cancer or other advanced solid tumor malignancies. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999, 1243.
95. Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, et al. Chemosensitization of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy. *Lancet* 2000; 356: 1728-33.
96. Chi K, Gleave M, Klasa R, Murray N, Bryce C, Tolcher A. A phase I trial of an antisense oligonucleotide to Bcl-2 (G3139, Genta) and mitoxantrone in patients with metastatic hormone refractory prostate cancer (HRPC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000, 1299.
97. Scher HI, Morris MJ, Tong WP. A phase I trial of G3139 (Genta, Inc.), a Bcl-2 antisense drug, by continuous infusion (CI) as a single agent and with weekly Taxol (T). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000, 774.

98. De Bono JS, Rowinsky EK, Kuhn J, Basler J, Ochoa L, Schwartz G, et al. Phase I pharmacokinetic (PK) and pharmacodynamic (PD) trial of bcl-2 antisense (Genasense) and docetaxel (D) in hormone refractory prostate cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001, 474.
99. Chen H, Marshall J, Trocky N, Ling Y, Baidas S, Rizvi N, et al. A phase I study of Bcl-2 antisense G3139 (Genta) and weekly docetaxel in patients with advanced breast cancer and other solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000, 692.
100. Marcucci G, Bloomfield CD, Balcerzak SP, Fingert H, Maghaby EA, Kourlas P, et al. Biologic activity of G3139 (Genasense), a Bcl-2 antisense (AS), in refractory (REF) or relapsed (REL) acute leukemia (AL). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001, 1149.
101. Piro LD. Apoptosis, Bcl-2 antisense, and cancer therapy. *Oncology* 2004; 18 (13 Supl. 10): 5-10.
102. Buchele T. Proapoptotic therapy with oblimersen (bcl-2 antisense oligonucleotide)- review of preclinical and clinical results. *Onkologie* 2003; 26 (Supl. 7): 60-9.
103. Yuen AR, Halsey J, Fisher GA, Holmlund JT, Geary RS, Kwoh TJ, et al. Phase I study of an antisense oligonucleotide to protein kinase C.alpha (ISIS 3521/CGP 64128^a) in patients with cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 3357-63.
104. Nemunaitis J, Holmlund JT, Kaaynak M, Richards D, Bruce J, Ognoskie N, et al. Phase I evaluation of ISIS 3521, an antisense oligodeoxynucleotide to protein kinase C.alpha, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3586-95.
105. Advani R, George F, Grant P, Alan Y, Holmlund JT, Kwoh TJ, et al. A phase I trial of an antisense oligonucleotide targeted to protein kinase C-a (ISIS 3521/ISI641A) delivered as a 24-hour continuous infusion (CI). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999, 609.
106. Advani R, Fisher G, Lum B, Halsey J, Yuen A, Holmlund J, et al. Coagulation and complement effects of an antisense phosphorothioate oligonucleotide targeting protein kinase C-a (ISIS 3521) are schedule and dose dependent. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000, 809.
107. Mani S, Shulman K, Kunkel K, Geary R, Holmlund JT, Dorr A, et al. Phase I trial of protein kinase C-a antisense oligonucleotide (ISIS 3521; ISI641A) with 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin (LV) in patients with advanced cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999, 608.
108. Alavi J, Grossman S, Supko J, Carson K, Priet R, Dorr A, et al. Efficacy, toxicity, and pharmacology of an antisense oligonucleotide directed against protein kinase C-a (ISIS 3521) delivered as a 21 day continuous intravenous infusion in patients with recurrent high grade astrocytomas (HGA). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000, 647.
109. Gradishar WJ, O'Neill A, Cobleigh M, Goldstein LJ, Davidson NE. A phase II trial with antisense oligonucleotide ISIS 3521 /Cgp 64128^a in patients (pts) with metastatic breast cancer (MBC): ECOG trial 3197. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001, 171.
110. Yuen A, Halsey J, Fisher G, Advani R, Moore M, Saleh M, et al. Phase I/II trial of ISIS 3521, an antisense inhibitor of PKC-a, with carboplatin and paclitaxel in non-small cell lung cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001, 1234.
111. Gordon MS, Sandler AB, Holmlund JT, Dorr A, Battiao L, Fife K, et al. A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, administered by a 24-hour (hr) weekly infusion to patients (pts) with advanced cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999, 604.
112. Dorr A, Bruce J, Monia B, Johnston J, Geray R, Kwoh TJ, et al. Phase I and pharmacokinetic trial of ISIS 2503, a 20-mer antisense oligonucleotide against H-ras, by 14-day continuous infusion (CIV) in patients with advanced cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999, 603.
113. Adjei A, Erlichman C, Sloan J, Hanson L, Reid J, Atherton P, et al. A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000, 722.
114. Saleh M, Posey J, Pleasant L, Lobuglio A, Moore M, Soltan A, et al. A phase II trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, as first line therapy for advanced colorectal carcinoma. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2000, 1258.
115. Dang T, Jonson DH, Kelly K, Rizvi N, Holmlund J, Dorr A. Multi-center phase II trial of an antisense inhibitor of H-ras (ISIS-2503) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001, 1325.
116. Pérez RP, Smith III JW, Alberts SR, Kaufman H, Posey J, Ritch P, et al. Phase II trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, in patients (pts) with advanced pancreatic carcinoma (CA). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2001, 628.
117. Stevenson JP, Yao K-S, Gallagher M, Friedland D, Mitchell EP, Cassella A, et al. Phase I clinical/pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of the c-raf-1 antisense oligonucleotide ISIS 5132 (CGP 69846^a). *J Clin Oncol* 1999; 17: 2227-36.
118. Cunningham CC, Holmlund JT, Schiller JH, Geary RS, Kwoh TJ, Dorr A, et al. A phase I trial of c-Raf kinase antisense oligonucleotide ISIS 5132 administered as a continuous intravenous infusion in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1607-10.
119. Rudin CM, Holmlund J, Fleming CF, Mani S, Stadler WM, Schumm P, et al. Phase I trial of ISIS 5132, an antisense oligonucleotide inhibitor of c-raf-1, administered by 24-hour weekly infusion to patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1214-20.
120. Stevenson JP, Gallagher M, Ryan W, Fox K, Algazy K, Schuster LM, et al. Phase I trial of the c-raf-1 antisense oligonucleotide (ODN) ISIS 5132 administered as a 21-day continuous IV infusion in combination with 5-fluorouracil (5-FU) and leucovorin (LV) as a daily x 5 IV bolus. *Proc AACR/NCI/EORTC* 1999, 579.
121. Luger SM, O'Brien SG, Ratajczak J, Ratajczak MZ, Mick R, Stadtmayer EA, et al. Oligodeoxynucleotide-mediated inhibition of c-myc gene expression in autografted bone marrow: a pilot study. *Blood* 2002; 99: 1150-8.
122. Iba T, Kigawa J, Kanamori Y, Itamochi H, Oishi T, Simada M, et al. Expression of the c-myc gene as a predictor of chemotherapy response and a prognostic factor in patients with ovarian cancer. *Cancer Sci* 2004; 95: 418-23.