

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 671**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 31/7135 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01947067 .3**
96 Fecha de presentación: **12.06.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1313853**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.05.2003**

54 Título: **Modulación de la expresión de Fas y FasL por un oligonucleótido-fosfodiéster sintético y un anticuerpo anti-Fas**

30 Prioridad:
29.08.2000 US 228925 P
12.12.2000 WO PCT/CA00/01467
12.12.2000 US 735363
02.02.2001 US 266229 P

73 Titular/es:
BIONICHE LIFE SCIENCES INC.
P.O. BOX 1570
BELLEVILLE, ONTARIO K8N 5J2, CA

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.06.2012

72 Inventor/es:
PHILLIPS, Nigel C. y
FILION, Mario C.

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.06.2012

74 Agente/Representante:
Lehmann Novo, Isabel

ES 2 383 671 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

Modulación de la expresión de Fas y FasL por un oligonucleótido-fosfodiéster sintético y un anticuerpo anti-Fas.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a composiciones útiles para modular la expresión de Fas y del ligando de Fas en las células y para modular la eficacia de agentes terapéuticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

WO 01/44465 describe oligonucleótidos sintéticos terapéuticamente útiles así como el uso de los mismos, inter alia, para el tratamiento del cáncer.

10 El sistema Fas (Apo-1, CD95) y ligando Fas (FasL, CD95L) es uno de los sistemas de muerte celular mejor estudiados. Fas es una proteína de membrana tipo I expresada abundantemente por las células en diversos tejidos y particularmente en células T activadas, células cardíacas, células del riñón y hepatocitos. FasL es una proteína transmembranal tipo II expresada particularmente en células T activadas y células agresoras naturales (Nagata, S. Ann. Rev. Genet. 33:29, 1999), y se expresa constitutivamente en sitios inmuno-privilegiados como, por ejemplo, el ojo y el testículo (Griffith et al. Science 270:630, 1995).

15 Las interacciones de Fas y FasL (Fas/FasL) juegan un papel esencial en la regulación de las células inmunes y en la eliminación de células autorreactivas (Sabelko-Downes et al. Curr. Opin. Immunol. 12:330, 2000). Adicionalmente, Fas/FasL media la muerte de células de cáncer y células infectadas por virus (Famularo et al. Med. Hypoth. 53:50, 1999; Owen-Schaub et al. Int. J. Oncol. 17:5, 2000). En contraste, FasL expresada en células de cáncer, puede atacar las células del sistema inmunitario (O'Connell, J. Exp. Med. 184:1075, 1996) o facilitar la invasión de tumores locales por destrucción del tejido circundante (Yoong et al. Am. J. Pathol. 154:693, 1999). FasL, expresada en células T activadas, puede participar también en el deterioro de los tejidos en la hepatitis fulminante y en la enfermedad de rechazo inverso (Kondo et al. Nature Med. 3:409, 1997; Braun et al. J. Exp. Med. 183:657, 1996).

25 La fijación de FasL a Fas, o reticulación de Fas con anticuerpos agonistas, induce apoptosis (Nagata, S. Ann. Rev. Genet. 33:29, 1999) que da como resultado la muerte celular. La apoptosis es un proceso de muerte celular activo caracterizado por cambios morfológicos distintivos que incluyen condensación de la cromatina nuclear, contracción de las células, desintegración nuclear, formación de vesículas en la membrana plasmática, y formación de cuerpos apoptóticos fijados a la membrana (Wyllie et al. Int. Rev. Cytol. 68:251, 1980). Un sello molecular de la apoptosis es la degradación del DNA celular nuclear en fragmentos de longitud oligonucleosómica como resultado de la activación de endonucleasas endógenas (Wyllie A. Nature 284:555, 1980). Las caspasas (proteasas específicas cisteína-aspartilo) han sido implicadas como enzimas clave en la ejecución de la última etapa de la apoptosis. La fijación de FasL a Fas activa una cascada de caspasas por la vía de un adaptador FADD (proteína asociada a Fas con dominio de muerte), que conduce a la escisión de diversos sustratos celulares y a fragmentación del DNA (Nagata, S. Ann. Rev. Genet. 33:29, 1999).

35 Los oligonucleótidos sintéticos son secuencias polianiónicas que pueden ser internalizadas por las células (Vlassov et al. Biochim. Biophys. Acta 1197:95, 1994) y se fijan selectivamente a los ácidos nucleicos (Wagner, R. Nature: 372:333, 1994), a proteínas celulares específicas (Bates et al. J. Biol. Chem. 274:26369, 1999) y a proteínas nucleares específicas (Scaggiante et al. Eur. J. Biochem. 252:207, 1998), e inhiben la proliferación celular. La proliferación es la culminación de la progresión de una célula a lo largo del ciclo celular, dando como resultado la división de una célula en dos células. Las alteraciones en la progresión del ciclo celular ocurren en todos los cánceres y pueden ser resultado de la sobre-expresión de genes, mutación de genes reguladores, o anulación de los puntos de comprobación del deterioro del DNA (Hochhauser D. Anti-Cancer Chemotherapeutic Agens 8:903, 1997).

45 Se ha comunicado que oligonucleótidos sintéticos de fosforotioato que contienen dinucleótidos CpG no metilados flanqueados por dos 5' purina y dos 3' pirimidina (motivos CpG) inducen la síntesis de citoquinas por macrófagos y células B, para aumentar la actividad de las células NK y los linfocitos T citotóxicos, y mejorar T-Natl. Acad. Sci. USA 93:2879, 1996; Lipford et al. Eur. J. Immunol. 27:2340, 1997). Se ha informado que un motivo sintético CpG de 20 bases bloquea la expresión de Fas en células B activadas y bloquea la apoptosis inducida por anticuerpos monoclonales anti-Fas (Wang et al. Cell. Immunol. 180:162, 1997). Se ha informado que la irradiación regula en sentido creciente la expresión de Fas en células de cáncer (Sheard et al. Int. J. Cancer 73:757, 1997; Nishioka et al. Int. J. Mol. Med. 3:275, 1999).

50 La capacidad para modular el sistema Fas/FasL tiene muchas aplicaciones clínicas para uso en enfermedades que incluyen, pero sin carácter limitante, enfermedades neoplásicas autoinmunes, degenerativas y cardiovasculares. Sin embargo, la mayoría de los agentes moduladores Fas/FasL de la técnica anterior han resultado no ser adecuados en aplicaciones clínicas. Además, muchos de estos agentes son ineficientes, tóxicos o tienen efectos adversos importantes.

55 Por consiguiente, existe una necesidad continuada de nuevas composiciones y nuevos métodos que modulen la expresión de Fas y FasL en las células. Existe también necesidad de nuevas composiciones y métodos que modulen

len la eficacia de los agentes moduladores de Fas y FasL en la enfermedad. Existe también la necesidad de nuevas composiciones y métodos que modulen la expresión de Fas y FasL en las células a fin de tratar enfermedades en animales o humanos asociadas con la expresión alterada de Fas o FasL en las células.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere por tanto al uso de una secuencia de oligonucleótido-fosfodiéster sintético de 6 bases seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 18 y un anticuerpo anti-Fas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad neoplásica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad proliferativa, una enfermedad linfoproliferativa, una enfermedad degenerativa, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad cardiovascular, un rechazo de injerto o una infección, en el cual el anticuerpo anti-Fas tiene por objeto administración en una dosis de 0,003 a 3 mg/kg, y en donde la secuencia de oligonucleótido modula la eficacia del anticuerpo anti-Fas.

10 La presente invención se refiere adicionalmente a una secuencia de oligonucleótido-fosfodiéster sintético de 6 bases seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 18 y un anticuerpo anti-Fas para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad neoplásica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad proliferativa, una enfermedad linfoproliferativa, una enfermedad degenerativa, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad cardiovascular, un rechazo de injerto o una infección, en el cual el anticuerpo anti-Fas se emplea en una dosis de 0,003 a 3 mg/kg, y en donde la secuencia de oligonucleótido modula la eficacia del anticuerpo anti-Fas.

15 La presente invención satisface estas necesidades por proporcionar un nuevo uso que emplea composiciones que comprenden un oligodesoxinucleótido fosfodiéster sintético (en lo sucesivo, "secuencia") seleccionado del grupo constituido por $(GG)_n$, $(GT)_n$, $a(GT)_nb$, $a(GA)_nb$, y $a(GC)_nb$, en donde n es un número entero entre 1 y 3, y a y b son independientemente nada o uno o más de As, Cs, Gs, o Ts, o combinaciones de los mismos, en donde el número total de bases en la composición está comprendido entre 2 y 10, preferiblemente 4 a 8, más preferiblemente 5 a 7, y muy preferiblemente 6, es decir composiciones que comprenden una secuencia de oligonucleótido-fosfodiéster sintético de 6 bases seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 18.

20 La presente invención proporciona nuevos usos para estas composiciones.

25 Esta composición se combina también con un portador farmacéuticamente aceptable, y se administra a un animal o un humano que sufre una enfermedad en una cantidad eficaz para modular la expresión de Fas y FasL con objeto de tratar la enfermedad en el animal o el humano. Esta composición se administra también a un animal o humano para modular la eficacia de los agentes moduladores Fas y FasL, comprendiendo la administración de la composición en una cantidad eficaz para modular la eficacia de los agentes moduladores de Fas y FasL a fin de modular Fas y FasL, o para tratar un animal o un humano que padece una enfermedad.

30 Un nuevo uso para esta composición de la presente invención es modular, y preferentemente potenciar, la eficacia de un agente terapéutico para tratar una enfermedad, que comprende la administración de la composición en un portador farmacéuticamente aceptable en combinación con un agente terapéutico, en una cantidad eficaz para modular la eficacia del agente terapéutico administrado a un animal o un humano. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse en cualquier momento antes, durante, o después de la administración del agente terapéutico, a fin de modular la eficacia del agente terapéutico. Las composiciones de la presente invención pueden administrarse también *in vitro*, por ejemplo a células o tejidos animales o humanos.

35 La composición utilizada en la presente invención comprende una secuencia seleccionada del grupo constituido por $(GG)_n$, $(GT)_n$, $a(GT)_nb$, $a(GA)_nb$, y $a(GC)_nb$, en donde n es un número entero entre 1 y 3, y a y b son independientemente nada o uno o más As, Cs, Gs, o Ts, o combinaciones de los mismos, con la condición de que el número total de bases en la composición es 6, es decir una secuencia de oligonucleótido-fosfodiéster sintético de 6 bases seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 18. En otra realización preferida, la composición de la presente invención comprende esta secuencia de 6 bases en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. La composición de la presente invención comprende esta secuencia de 6 bases en combinación con un agente terapéutico, a saber un anticuerpo anti-Fas y opcionalmente con un portador farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden utilizarse en cualquiera de los métodos descritos en los párrafos precedentes y a todo lo largo de la memoria descriptiva.

40 La capacidad inesperada y sorprendente de las secuencias de la presente invención aborda una necesidad no satisfecha en las técnicas médicas y proporciona un beneficio importante para los animales, con inclusión de los humanos.

45 Se describe en esta memoria una composición que comprende un oligodesoxinucleótido fosfodiéster sintético (en lo sucesivo, "secuencia") seleccionado del grupo constituido por $(GG)_n$, $(GT)_n$, $a(GT)_nb$, $a(GA)_nb$, y $a(GC)_nb$, en donde n es un número entero entre 1 y 3, y a y b son independientemente nada o uno o más As, Cs, Gs, o Ts, o combinaciones de los mismos, en donde el número total de bases en la composición es 2 a 10.

Se describe adicionalmente una composición que comprende un oligodesoxinucleótido fosfodiéster sintético (en lo sucesivo, "secuencia") seleccionado del grupo constituido por $(GG)_n$, $(GT)_n$, $a(GT)_nb$, $a(GA)_nb$, y $a(GC)_nb$, en donde n es un número entero entre 1 y 3, y a y b son independientemente nada o uno o más As, Cs, Gs, o Ts, o combinaciones de los mismos, en donde el número total de bases en la composición es 4 a 8.

- 5 Se describe adicionalmente una composición que comprende un oligodesoxinucleótido fosfodiéster sintético (en lo sucesivo, "secuencia") seleccionado del grupo constituido por $(GG)_n$, $(GT)_n$, $a(GT)_nb$, $a(GA)_nb$, y $a(GC)_nb$, en donde n es un número entero entre 1 y 3, y a y b son independientemente nada o uno o más As, Cs, Gs, o Ts, o combinaciones de los mismos, en donde el número total de bases en la composición es 5 a 7.

- 10 Se describe adicionalmente una composición que comprende un oligodesoxinucleótido fosfodiéster sintético (en lo sucesivo, "secuencia") seleccionado del grupo constituido por $(GG)_n$, $(GT)_n$, $a(GT)_nb$, $a(GA)_nb$, y $a(GC)_nb$, en donde n es un número entero entre 1 y 3, y a y b son independientemente nada o uno o más As, Cs, Gs, o Ts, o combinaciones de los mismos, en donde el número total de bases en la composición es 6.

Se describen adicionalmente composiciones que comprenden cualquiera de las secuencias descritas en esta memoria, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

- 15 Se proporciona en esta memoria composiciones que comprenden cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 18 en combinación con un agente terapéutico, a saber un anticuerpo anti-Fas y opcionalmente un portador farmacéuticamente aceptable.

Se proporcionan en esta memoria el uso de cualquiera de estas composiciones para la fabricación de un medicamento.

- 20 Un objeto de la presente invención es proporcionar nuevos usos para estas composiciones.

Se describe en esta memoria un método para modular la expresión de Fas en las células.

Se describe adicionalmente un método para modular la expresión de FasL en las células.

Se describe adicionalmente un método para modular la expresión de Fas en células inmunes.

Se describe adicionalmente un método para modular la expresión de FasL en células inmunes.

- 25 Se describe adicionalmente un método para modular la expresión de Fas en células de cáncer.

Se describe adicionalmente un método para modular la expresión de FasL en células de cáncer.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para tratar una enfermedad en un animal, con inclusión de un humano.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para tratar una enfermedad neoplásica.

- 30 Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para tratar una enfermedad autoinmune.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para tratar una enfermedad inflamatoria.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para tratar una enfermedad proliferativa.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para tratar una enfermedad linfoproliferativa.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para tratar una enfermedad degenerativa.

- 35 Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para tratar una enfermedad cardiovascular.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para tratar un rechazo de injerto.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método eficaz para tratar una infección.

- 40 Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método que modula el efecto de un agente terapéutico para tratar enfermedades.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método que potencia el efecto de un agente terapéutico para tratar enfermedades.

Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método que potencia el efecto de un agente modulador de Fas.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método que potencia el efecto de un agente modulador de FasL.

- 5 Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método que potencia el efecto de un agente anti-neoplástico.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método que potencia el efecto de un agente inmunoestimulador.

- 10 Otro objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método que potencia el efecto de un agente inmunosupresor.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método que potencia el efecto de un agente anti-inflamatorio.

Se describe adicionalmente una composición que es sencilla de preparar.

Se describe adicionalmente una composición que es mínimamente tóxica para el receptor.

- 15 Estos y otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes después de una revisión de la descripción detallada que sigue de la realización descrita y las reivindicaciones adjuntas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- La presente invención satisface estas necesidades por proporcionar composiciones y nuevos métodos de utilización de estas composiciones. Las composiciones comprenden un oligodesoxinucleótido fosfodiéster sintético (en lo sucesivo, "secuencia") seleccionado del grupo constituido por $(GG)_n$, $(GT)_n$, $a(GT)_nb$, $a(GA)_nb$, y $a(GC)_nb$, en donde n es un número entero entre 1 y 3, y a y b son independientemente nada o uno o más As, Cs, Gs, o Ts, o combinaciones de los mismos, en donde el número total de bases en la composición está comprendido entre 2 y 10, preferiblemente 4 a 8, más preferiblemente 5 a 7, y muy preferiblemente 6, a saber una secuencia de oligonucleótido fosfodiéster sintético de 6 bases seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 18. Las composiciones de la presente invención comprenden adicionalmente cualquiera de estas secuencias en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones utilizadas en la presente invención comprenden cualquiera de estas secuencias en combinación con un agente terapéutico, a saber un anticuerpo anti-Fas y opcionalmente con un portador farmacéuticamente aceptable.

- La presente invención proporciona nuevos usos para estas composiciones. Esta composición se combina con un portador farmacéuticamente aceptable, y se administra a un animal o un humano una cantidad eficaz para modular la expresión de Fas y FasL en el animal o el humano. Esta composición se combina también con un portador farmacéuticamente aceptable, y se administra a un animal o un humano que padece una enfermedad en una cantidad eficaz para modular la expresión de Fas y FasL a fin de tratar la enfermedad en el animal o el humano. Esta composición se administra también a un animal o humano para modular la eficacia de agentes moduladores de Fas y FasL, comprendiendo la administración de la composición en una cantidad eficaz para modular la eficacia de los agentes moduladores de Fas y FasL para modular Fas y FasL, o para tratar un animal o un humano que padece una enfermedad. Otro nuevo uso para esta composición de la presente invención es modular, y preferentemente potenciar, la eficacia de un agente terapéutico para tratar una enfermedad,

- La secuencia de oligonucleótido-fosfodiéster sintético en combinación con un agente terapéutico, en una cantidad eficaz para modular la eficacia del agente terapéutico, a saber un anticuerpo anti-Fas, se administra a un animal o un humano. La composición de la presente invención puede administrarse en cualquier momento antes, durante, o después de la administración del agente terapéutico, con objeto de modular la eficacia del agente terapéutico.

- La composición utilizada en la presente invención comprende una secuencia seleccionada del grupo constituido por $(GG)_n$, $(GT)_n$, $a(GT)_nb$, $a(GA)_nb$, y $a(GC)_nb$, en donde n es un número entero entre 1 y 3, y a y b son independientemente nada o uno o más As, Cs, Gs, o Ts, o combinaciones de los mismos, con la condición de que el número total de bases en la composición es 6, a saber una secuencia de oligonucleótido-fosfodiéster sintético de 6 bases seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 18. En otra realización preferida, la composición de la presente invención comprende esta secuencia de 6 bases en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. La composición de la presente invención comprende esta secuencia de 6 bases en combinación con un agente terapéutico, a saber un anticuerpo anti-Fas y opcionalmente con un portador farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones pueden utilizarse en cualquiera de los métodos descritos en esta solicitud de patente.

Como se utiliza en esta memoria, el término "secuencia" se refiere a un oligodesoxinucleótido fosfodiéster sintético que comprende adenina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T), con un número total de bases de 2 a 10, preferiblemente 4 a 8, más preferiblemente 5 a 7 y muy preferiblemente 6.

Como se utiliza en esta memoria, el término "expresión" se refiere a la concentración de Fas o de FasL en la superficie celular.

Como se utiliza en esta memoria, el término "respuesta" se refiere a la regulación creciente (aumento) o regulación decreciente (disminución) de la expresión de Fas o de FasL.

5 Como se utiliza en esta memoria, el término "modula" se refiere a cambios en la expresión de Fas o de FasL. Tales cambios incluyen regulación creciente y regulación decreciente de la expresión de Fas o de FasL. El término "modula" se emplea también para describir la capacidad de las nuevas secuencias de la presente invención para modular la eficacia de agentes terapéuticos, con inclusión de agentes moduladores de Fas y FasL, para tratar enfermedades o para modular la expresión de Fas o FasL.

10 Como se utiliza en esta memoria, las expresiones "terapéuticamente eficaz", "cantidad eficaz", y "cantidad eficaz para" se refieren a una cantidad de una secuencia que es eficaz para modular la expresión de Fas o de FasL.

Como se utiliza en esta memoria, el término "enfermedad" se refiere a una condición en la cual la salud corporal está deteriorada.

15 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "agente terapéutico" es cualquier agente aprobado por una agencia reguladora de un país o un gobierno estatal o citada en la Farmacopea de los EE.UU. u otra farmacopea reconocida generalmente para uso con objeto de tratar una enfermedad en un animal, con inclusión de un humano.

Como se utiliza en esta memoria, el término "antineoplástico" se refiere a prevención del desarrollo, la maduración, la proliferación o la propagación de células de cáncer.

Como se utiliza en esta memoria, el término "potencia" se refiere a un grado de sinergia que es mayor que el aditivo.

20 Como se utiliza en esta memoria, el término "sinergia" se refiere a la acción coordinada de dos o más agentes.

La administración de una cantidad eficaz de una secuencia de la presente invención a un animal, con inclusión de un humano, es un tratamiento terapéutico que previene, trata o elimina una enfermedad que incluye, pero sin carácter limitante, enfermedad neoplástica, autoinmune, proliferativa, linfoproliferativa, degenerativa, y cardiovascular; infección; inflamación; y rechazo de injertos, tejidos y células.

25 Las composiciones que comprenden una o más secuencias y un portador farmacéuticamente aceptable se preparan por puesta en asociación uniforme e íntimamente de la secuencia y el portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones que comprenden una o más secuencias, un agente terapéutico y un portador farmacéuticamente aceptable se preparan poniendo en asociación uniforme e íntimamente la secuencia, el agente terapéutico y el portador farmacéuticamente aceptable. Portadores farmacéuticamente aceptables incluyen portadores líquidos, portadores sólidos o ambos. Los portadores líquidos son portadores acuosos, portadores no acuosos o ambos tipos e incluyen, pero sin carácter limitante, soluciones, suspensiones y emulsiones. Las emulsiones incluyen, pero sin carácter limitante, emulsiones en aceite, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de agua en aceite en agua,

30 emulsiones de acción específica, los portadores de larga duración son portadores biológicos, portadores químicos o ambos e incluyen, pero sin carácter limitante, sistemas vectoriales, plásmidos, partículas, micropartículas, nanopartículas, microesferas, nanoesferas, paredes de células bacterianas, minibombas, y polímeros biodegradables o no biodegradables naturales o sintéticos que permiten la liberación sostenida de las secuencias.

35 Portadores acuosos preferidos incluyen, pero sin carácter limitante, agua, solución salina y tampones farmacéuticamente aceptables. Portadores preferidos no acuosos incluyen, pero sin carácter limitante, un aceite mineral o un aceite neutro con inclusión, pero sin carácter limitante, de un diglicérido, un triglicérido, un fosfolípido, un lípido, un aceite y mixturas de los mismos, en donde el aceite contiene una mezcla apropiada de ácidos grasos poliinsaturados y saturados. Opcionalmente, puede incluirse agentes estabilizadores y excipientes con indiferencia del portador farmacéuticamente aceptable utilizado para presentar la secuencia a las células.

40 La eficacia terapéutica de una secuencia puede aumentarse por métodos que incluyen, pero sin carácter limitante, modificación química de la base, el azúcar o la cadena principal de fosfato, complementar químicamente o amplificar por medios biotecnológicos las secuencias utilizando plásmidos bacterianos que contienen las secuencias apropiadas, complejar las secuencias con portadores biológicos o químicos o acoplar las secuencias a ligandos o anticuerpos dirigidos al tipo de tejido o al tipo de célula.

45 La composición de la presente invención comprende una composición que comprende una secuencia y un agente terapéutico, a saber un anticuerpo anti-Fas, en donde, cuando la secuencia y el agente terapéutico se combinan con un portador farmacéuticamente aceptable y se administran a un animal o un humano que padece una enfermedad, la secuencia modula y preferentemente potencia el efecto del agente terapéutico sobre la enfermedad.

50 Los agentes terapéuticos en general incluyen, pero sin carácter limitante, agentes moduladores anti-neoplásticos, anti-inflamatorios, anti-autoinmunes, anti-degenerativos, moduladores de Fas y moduladores de FasL, o cualquier combinación de los mismos, y terapia de radiación, o una combinación de terapia de radiación con agentes terapéu-

5 ticos. Estos agentes terapéuticos incluyen, pero sin carácter limitante, productos biológicos, fármacos, fármacos quimioterapéuticos, inmunoestimuladores, inmunomoduladores, inmunoterapéuticos, anti-virales, anti-infectantes, antibióticos, citoquinas, antígenos, anticuerpos, ácidos nucleicos, vacunas, aptabases, ácidos nucleicos, ácidos nucleicos antisentido, inhibidores de telomerasas, agentes de caspasas modificados biológicamente y sintetizados químicamente de caspasas, y agentes que están direccionados a moléculas de muerte celular para activación o desactivación.

10 Fármacos quimioterapéuticos incluyen, pero sin carácter limitante, agentes de deterioro del DNA, alquilantes del DNA, reticuladores del DNA, antibióticos anti-tumorales, inhibidores de topoisomerasas, inhibidores de purinas, inhibidores de pirimidinas, estabilizadores de microtúbulos, anti-metabólicos, antagonistas de hormonas, inhibidores de proteína-quinasas, inhibidores de HMG-CoA, inhibidores de metaloproteinasas, inhibidores de CDK, inhibidores de ciclina, inhibidores de angiogénesis, mejoradores de la diferenciación y agentes virales, bacterianos y exotóxicos modificados por biología molecular.

15 Las rutas de administración incluyen, pero sin carácter limitante, oral, tópica, subcutánea, transdérmica, subdérmica, intra-muscular, intra-peritoneal, intra-vesical, intra-articular, intra-prostática, intra-arterial, intra-venosa, intra-dérmica, intra-craneal, intra-lesional, intra-tumoral, intra-ocular, intra-pulmonar, intra-espinal, ubicación en el interior de cavidades del cuerpo, inhalación nasal e impresión en la piel. Debe entenderse que la administración de las composiciones de la presente invención puede tener lugar *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden administrarse a células o tejidos animales o humanos *in vitro*. Dosis apropiadas para administración *in vitro* son aproximadamente 1 nM a 1 mM, con preferencia aproximadamente 10 nM a 100 μ M, y de modo más preferible aproximadamente 100 nM a 10 μ M.

20 Dependiendo de la ruta de administración, el volumen por dosis es con preferencia aproximadamente 0,001 a 100 ml por dosis, de modo más preferible aproximadamente 0,01 a 50 ml por dosis y de modo muy preferible aproximadamente 0,1 a 30 ml por dosis. Una secuencia en un portador farmacéuticamente aceptable, o secuencia más agente terapéutico en un portador farmacéuticamente aceptable, puede administrarse en un tratamiento monodosis, en tratamientos multidosis o por infusión continua con arreglo a un protocolo y a lo largo de un periodo de tiempo apropiado para la enfermedad de que se trate, la condición del receptor y la vía de administración. Además, el agente terapéutico puede administrarse antes, simultáneamente a, o después de la administración de la secuencia.

25 Con preferencia, la cantidad de secuencia administrada por dosis es de aproximadamente 0,001 a 100 mg/kg, de modo más preferible desde aproximadamente 0,01 a 10 mg/ml y de modo muy preferible desde aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg. La secuencia modula y preferentemente potencia, el efecto del agente terapéutico. Con preferencia, la cantidad de agente terapéutico administrada por dosis es de aproximadamente 0,001 a 1000 mg/m² o desde aproximadamente 0,01 a 1000 mg/kg, de modo más preferible desde aproximadamente 0,01 a 500 mg/m² o aproximadamente 0,1 a 500 mg/kg y de modo muy preferible desde aproximadamente 0,1 a 100 mg/m² o aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg. De acuerdo con la invención, en una realización de un agente terapéutico, se emplean anticuerpos anti-Fas y se administran en una dosis de aproximadamente 0,003 a aproximadamente 0,3 mg/kg, con preferencia 0,01 a aproximadamente 0,1 mg/kg.

30 La secuencia particular y el agente terapéutico particular administrados, la cantidad por dosis, el protocolo de dosificación y la ruta de administración deben ser decididos por el especialista utilizando métodos conocidos por los expertos en la técnica y dependerán del tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad, la localización de la enfermedad y otros factores clínicos tales como el volumen, peso y estado físico del receptor. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar los intervalos óptimos para la secuencia y para la administración de la secuencia más el agente terapéutico.

35 Los ejemplos que siguen servirán para ilustrar adicionalmente la presente invención sin constituir al mismo tiempo, no obstante, una limitación de la misma. Por el contrario, se comprenderá claramente que puede recurrirse a diversas otras realizaciones, modificaciones, y equivalentes de las mismas que, después de la lectura de la descripción de esta memoria, pueden ser ideadas por los expertos en la técnica sin desviarse del espíritu de la invención

Ejemplo 1

Preparación de las secuencias

40 Se prepararon secuencias de fosfodiésteres por Sigma-Genosys (Woodlands, TS) utilizando la Tecnología de Síntesis Segmentada Abacus. A no ser que se indique otra cosa, las secuencias se dispersaron en agua desionizada tratada en autoclave o en un tampón farmacéuticamente aceptable tal como, pero sin carácter limitante, solución salina inmediatamente antes de su utilización

Ejemplo 2

Células

Todas las líneas de células se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) y se cultivaron en el medio recomendado por la ATCC. La Tabla 1 muestra las líneas de células, sus orígenes y sus propiedades.

5

Tabla 1
Líneas de células

| LÍNEA DE CÉLULAS | ORIGEN | PROPIEDADES |
|------------------|-------------------------------|--|
| JURKAT | Leucemia de células T humanas | Modelo de tumor en suspensión Resistencia atípica a multifármacos asociada con la proteína p190-MRP |
| UMUC-3 | Cáncer de vejiga humano | Sobreexpresión de glicoproteína p |
| T-24 | Cáncer de vejiga humano | Mutada en p53 |
| LNCaP | Cáncer de próstata humano | Modelo de tumor sólido; receptor-negativa de TGF beta 1 metastásica; dependiente de andrógenos |
| OVCAR-3 | Cáncer de ovario humano | Modelo de tumor sólido; metastásica mutada en p53; delecionada en p21/waf-1/Cip-1 |
| SK-OV-3 | Cáncer de ovario humano | Modelo de tumor sólido; receptor-negativa de TGF beta 1 metastásica; dependiente de andrógenos |
| MCF-7 | Cáncer de mama humano | Modelo de tumor sólido; negativa a la Caspasa-3 no metastásica; dependiente de estrógenos |

10 Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (en lo sucesivo, "PBMCs") de sangre humana por centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfée, Québec, Canadá).

Se sembraron células de cáncer y PBMCs en microplacas de 6 pocillos con fondo plano y se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂. A no ser que se indique otra cosa, se incubaron 2 x 10⁵ células/ml durante 48 horas con 0 µg/ml (control) o 100 µg/ml (5,5 µM) (tratadas) de las secuencias.

Ejemplo 3

15 *Medida de Fas y de FasL en la superficie de las células*

La expresión de Fas y de FasL se midió por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales anti-Fas conjugados a FITC y anticuerpos monoclonales anti-FasL conjugados a PE en un Citómetro de Flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.) utilizando el programa CELLQuest (Becton Dickinson).

Los resultados se expresan como aumento porcentual (%) en la expresión de Fas

20

Ejemplo 4 (comparativo)

Modulación de Fas y de FasL en células T de leucemia Jurkat

Las células T de la leucemia humana Jurkat son un modelo de células tumorales atípicas humanas en suspensión multifármaco-resistentes. Las células T Jurkat se incubaron con las secuencias de 6 bases que se muestran en la Tabla 2.

5

Tabla 2

Aumento porcentual de Fas y de FasL en células T de la leucemia humana Jurkat

| SECUENCIA | % AUMENTO | |
|----------------------------------|-----------|------|
| | Fas | FasL |
| TGTGTG SEQ ID NO:1 - (6 bases) | 52 | 93 |
| GTGTGT SEQ ID NO:2 - (6 bases) | 52 | 43 |
| TTTGTT SEQ ID NO:3 - (6 bases) | 258 | 497 |
| GGTGGG SEQ ID NO:4 - (6 bases) | 61 | 22 |
| GGGTGG SEQ ID NO:5 - (6 bases) | 150 | 145 |
| TTGTTT SEQ ID NO:6 - (6 bases) | 126 | 140 |
| AAGTAA SEQ ID NO:7 - (6 bases) | -4 | -21 |
| CCGTCC SEQ ID NO:8 - (6 bases) | 107 | 151 |
| TGGTTG SEQ ID NO:9 - (6 bases) | 362 | 952 |
| ATGTAT SEQ ID NO:10 - (6 bases) | 246 | 393 |
| CTGTCT SEQ ID NO:11 - (6 bases) | 203 | 413 |
| TCG TTC SEQ ID NO:12 - (6 bases) | 121 | 75 |
| GGTTGG SEQ ID NO:13 - (6 bases) | 99 | 86 |
| GGAAGG SEQ ID NO:14 - (6 bases) | 67 | 88 |
| GGCCGG SEQ ID NO:15 - (6 bases) | 75 | 41 |
| GGGGGG SEQ ID NO:16 - (6 bases) | 118 | 49 |
| GGGAGG SEQ ID NO:17 - (6 bases) | 77 | 91 |
| GGGCGG SEQ ID NO:18 - (6 bases) | 208 | 356 |

Ejemplo 5 (comparativo)

Modulación de Fas y de FasL en PBMCs

Se incubaron PBMCs con las secuencias de 6 bases que se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

5

Aumento porcentual de Fas y de FasL en PBMCs

| SECUENCIA | % AUMENTO | |
|---------------------------------|-----------|------|
| | Fas | FasL |
| TGTGTG SEQ ID NO:1 - (6 bases) | 126 | 260 |
| GTGTGT SEQ ID NO:2 - (6 bases) | 94 | 99 |
| TITGTT SEQ ID NO:3 - (6 bases) | 1165 | 1528 |
| GGTGGG SEQ ID NO:4 - (6 bases) | 57 | 59 |
| GGGTGG SEQ ID NO:5 - (6 bases) | 3 | -20 |
| TTGTTT SEQ ID NO:6 - (6 bases) | 338 | 441 |
| AAGTAA SEQ ID NO:7 - (6 bases) | 13 | -26 |
| CCGTCC SEQ ID NO:28 - (6 bases) | 1046 | 1147 |
| TGGTTG SEQ ID NO:9 - (6 bases) | 1043 | 1322 |
| ATGTAT SEQ ID NO:10 - (6 bases) | 377 | 457 |
| CTGTCT SEQ ID NO:11 - (6 bases) | 310 | 476 |
| TCGTTC SEQ ID NO:12 - (6 bases) | 597 | 847 |
| GGTTGG SEQ ID NO:13 - (6 bases) | -3 | -32 |
| GGAAGG SEQ ID NO:14 - (6 bases) | 112 | 162 |
| GGCCGG SEQ ID NO:15 - (6 bases) | 6 | -29 |
| GGGGGG SEQ ID NO:16 - (6 bases) | 38 | 42 |
| GGGAGG SEQ ID NO:17 - (6 bases) | 266 | 356 |
| GGGCGG SEQ ID NO:18 - (6 bases) | 523 | 850 |

Ejemplo 6 (comparativo)

10 *Modulación de Fas y de FasL en células de cáncer de vejiga T-24*

Las células de cáncer de vejiga T-24 son una línea de células humanas mutadas en p53. Se incubaron células T-24 ($1,0 \times 10^5$ células/ml) con las secuencias de 6 bases que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4

Aumento porcentual de Fas y de FasL en células de cáncer de vejiga T-24

| SECUENCIA | % AUMENTO | |
|---------------------------------|-----------|------|
| | Fas | FasL |
| TGTGTG SEQ ID NO:1 - (6 bases) | 84 | 213 |
| GTGTGT SEQ ID NO:2 - (6 bases) | 93 | 77 |
| TTTGTT SEQ ID NO:3 - (6 bases) | 279 | 549 |
| GGTGGG SEQ ID NO:4 - (6 bases) | 106 | 29 |
| GGGTGG SEQ ID NO:5 - (6 bases) | 80 | 13 |
| TTGTTT SEQ ID NO:6 - (6 bases) | 116 | 152 |
| AAGTAA SEQ ID NO:7 - (6 bases) | 16 | -10 |
| CCGTCC SEQ ID NO:8 - (6 bases) | 282 | 459 |
| TGGTTG SEQ ID NO:9 - (6 bases) | 180 | 397 |
| ATGTAT SEQ ID NO:10 - (6 bases) | 90 | 150 |
| CTGTCT SEQ ID NO:11 - (6 bases) | 107 | 165 |
| TCGTTC SEQ ID NO:12 - (6 bases) | 105 | 74 |
| GGTTGG SEQ ID NO:13 - (6 bases) | 75 | 25 |
| GGAAGG SEQ ID NO:14 - (6 bases) | 46 | 14 |
| GGCCGG SEQ ID NO:15 - (6 bases) | 56 | 18 |
| GGGGGG SEQ ID NO:16 - (6 bases) | 35 | -14 |
| GGGAGG SEQ ID NO:17 - (6 bases) | 124 | 75 |
| GGGCGG SEQ ID NO:18 - (6 bases) | 139 | 205 |

5

Ejemplo 7 (comparativo)

Modulación de Fas y de FasL en células de cáncer de vejiga UMUC-3

10 Las células de cáncer de vejiga UMUC-3 son una línea de células humanas que sobreexpresan la glicoproteína P. Se incubaron células UMUC-3 ($1,0 \times 10^5$ células/ml) con las secuencias de 6 bases que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Aumento porcentual de Fas y de FasL en células de cáncer de vejiga UMUC-3

| SECUENCIA | % AUMENTO | |
|---------------------------------|-----------|------|
| | Fas | FasL |
| TGTGTG SEQ ID NO:1 - (6 bases) | 72 | 112 |
| GTGTGT SEQ ID NO:2 - (6 bases) | 72 | 154 |
| TTTGTT SEQ ID NO:3 - (6 bases) | 108 | 231 |
| GGTGGG SEQ ID NO:4 - (6 bases) | 62 | 113 |
| GGGTGG SEQ ID NO:5 - (6 bases) | 67 | 143 |
| TTGTTT SEQ ID NO:6 - (6 bases) | 57 | 132 |
| AAGTAA SEQ ID NO:7 - (6 bases) | 6 | -1 |
| CCGTCC SEQ ID NO:8 - (6 bases) | 55 | 149 |
| TGGTTG SEQ ID NO:9 - (6 bases) | 143 | 300 |
| ATGTAT SEQ ID NO:10 - (6 bases) | 42 | 95 |
| CTGTCT SEQ ID NO:11 - (6 bases) | 45 | 156 |
| TCGTTC SEQ ID NO:12 - (6 bases) | 47 | 112 |
| GGTTGG SEQ ID NO:13 - (6 bases) | 47 | 98 |
| GGAAGG SEQ ID NO:14 - (6 bases) | 1 | 8 |
| GGCCGG SEQ ID NO:15 - (6 bases) | 23 | 58 |
| GGGGGG SEQ ID NO:16 - (6 bases) | -5 | 10 |
| GGGAGG SEQ ID NO:17 - (6 bases) | 39 | 106 |
| GGGCGG SEQ ID NO:18 - (6 bases) | 72 | 250 |

5

Ejemplo 8 (comparativo)

Modulación de Fas y de FasL en células de cáncer de ovario OVCAR-3

- 10 Las células de cáncer de ovario OVCAR-3 son un modelo de tumor sólido humano metastásico mutado en P53, y deletado en p21/waf-1/Cip. Se incubaron células OVCAR-3 con las secuencias de 6 bases que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6

Aumento porcentual de Fas y de FasL en células de cáncer de ovario OVCAR-3

| SECUENCIA | % AUMENTO | |
|----------------------------------|-----------|------|
| | Fas | FasL |
| TGTGTG SEQ ID NO:1 - (6 bases) | 64 | 70 |
| GTGTGT SEQ ID NO:2 - (6 bases) | 77 | 69 |
| TTTGTT SEQ ID NO:3 - (6 bases) | 193 | 341 |
| GGTGGG SEQ ID NO:4 - (6 bases) | 41 | 14 |
| GGGTGG SEQ ID NO:5 - (6 bases) | 43 | 9 |
| TTGTTT SEQ ID NO:6 - (6 bases) | 65 | 98 |
| AAGTAA SEQ ID NO:7 - (6 bases) | 16 | -2 |
| CCGTCC SEQ ID NO:8 - (6 bases) | 83 | 95 |
| TGGTTG SEQ ID NO:9 - (6 bases) | 221 | 270 |
| ATGTAT SEQ ID NO:10 - (6 bases) | 93 | 114 |
| CTGTCT SEQ ID NO:11 - (6 bases) | 52 | 93 |
| TCG TTC SEQ ID NO:12 - (6 bases) | 126 | 224 |
| GGTTGG SEQ ID NO:13 - (6 bases) | 22 | 10 |
| GGAAGG SEQ ID NO:14 - (6 bases) | 15 | 1 |
| GGCCGG SEQ ID NO:15 - (6 bases) | 19 | -2 |
| GGGGGG SEQ ID NO:16 - (6 bases) | -1 | 7 |
| GGGAGG SEQ ID NO:17 - (6 bases) | 49 | 59 |
| GGGCGG SEQ ID NO:18 - (6 bases) | 65 | 142 |

5

Ejemplo 9 (comparativo)

Modulación de Fas y de FasL en células de cáncer de ovario SK-OV-3

Las células de cáncer de ovario SK-OV-3 son un modelo de tumor sólido humano metastásico mutado en p53, deletado en p21/waf-1/Cip, y deletado en p15^{ink4B}, p16^{ink}. Las células SK-OV-3 (1,0 x 10⁵ células/ml) se incubaron con las secuencias de 6 bases que se muestran en la Tabla 7.

10

Tabla 7

Aumento porcentual de Fas y de FasL en células de cáncer de ovario SK-OV-3

| SECUENCIA | % AUMENTO | |
|----------------------------------|-----------|------|
| | Fas | FasL |
| TGTGTG SEQ ID NO:1 - (6 bases) | 49 | 37 |
| GTGTGT SEQ ID NO:2 - (6 bases) | 60 | 24 |
| TTTGTT SEQ ID NO:3 - (6 bases) | 108 | 103 |
| GGTGGG SEQ ID NO:4 - (6 bases) | -1 | -17 |
| GGGTGG SEQ ID NO:5 - (6 bases) | 3 | -31 |
| TTGTTT SEQ ID NO:6 - (6 bases) | 41 | 24 |
| AAGTAA SEQ ID NO:7 - (6 bases) | -12 | -22 |
| CCGTCC SEQ ID NO:8 - (6 bases) | 58 | 32 |
| TGGTTG SEQ ID NO:9 - (6 bases) | 63 | 53 |
| ATGTAT SEQ ID NO:10 - (6 bases) | 34 | 33 |
| CTGTCT SEQ ID NO:11 - (6 bases) | 15 | 26 |
| TCG TTC SEQ ID NO:12 - (6 bases) | 9 | -3 |
| GGTTGG SEQ ID NO:13 - (6 bases) | 16 | -3 |
| GGAAGG SEQ ID NO:14 - (6 bases) | -15 | -31 |
| GGCCGG SEQ ID NO:15 - (6 bases) | 0 | -27 |
| GGGGGG SEQ ID NO:16 - (6 bases) | -14 | -28 |
| GGGAGG SEQ ID NO:17 - (6 bases) | -6 | -16 |
| GGGCGG SEQ ID NO:18 - (6 bases) | 29 | 42 |

5

Ejemplo 10 (comparativo)

Modulación de Fas y de FasL en células de cáncer de próstata LNCaP

10 Las células de cáncer de próstata LNCaP son un modelo de tumor sólido humano metastásico negativo al receptor de TGF-beta1, independiente de andrógenos. Las células LNCaP se incubaron con las secuencias de 6 bases que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Aumento porcentual de Fas y de FasL en células de cáncer de próstata LNCaP

| SECUENCIA | % AUMENTO | |
|---------------------------------|-----------|------|
| | Fas | FasL |
| TGTGTG SEQ ID NO:1 - (6 bases) | 29 | 40 |
| GTGTGT SEQ ID NO:2 - (6 bases) | 34 | 5 |
| TTTGTT SEQ ID NO:3 - (6 bases) | 199 | 344 |
| GGTGGG SEQ ID NO:4 - (6 bases) | 21 | 8 |
| GGGTGG SEQ ID NO:5 - (6 bases) | 15 | -1 |
| TTGTTT SEQ ID NO:6 - (6 bases) | 40 | 73 |
| AAGTAA SEQ ID NO:7 - (6 bases) | 0 | -16 |
| CCGTCC SEQ ID NO:8 - (6 bases) | 0 | 311 |
| TGGTTG SEQ ID NO:9 - (6 bases) | 184 | 241 |
| ATGTAT SEQ ID NO:10 - (6 bases) | 44 | 68 |
| CTGTCT SEQ ID NO:11 - (6 bases) | 17 | 55 |
| TCGTTC SEQ ID NO:12 - (6 bases) | 111 | 171 |
| GGTTGG SEQ ID NO:13 - (6 bases) | 23 | -3 |
| GGAAGG SEQ ID NO:14 - (6 bases) | 26 | -4 |
| GGCCGG SEQ ID NO:15 - (6 bases) | 12 | -4 |
| GGGGGG SEQ ID NO:16 - (6 bases) | 6 | 13 |
| GGGAGG SEQ ID NO:17 - (6 bases) | 48 | 55 |
| GGGCGG SEQ ID NO:18 - (6 bases) | 55 | 126 |

5

Ejemplo 11 (comparativo)

Modulación de Fas y de FasL en células de cáncer de mama MCF-7

Las células de cáncer de mama humano MCF-7 son un modelo de tumor sólido humano negativo a la caspasa-3, dependiente de estrógenos. Se incubaron las células MCF-7 (1×10^5 células/ml) con las secuencias de 6 bases que se muestran en la Tabla 9.

10

Tabla 9

Aumento porcentual de Fas y de FasL en células de cáncer de mama MCF-7

| SECUENCIA | % AUMENTO | |
|---------------------------------|-----------|------|
| | Fas | FasL |
| TGTGTG SEQ ID NO:1 - (6 bases) | 122 | 121 |
| GTGTGT SEQ ID NO:2 - (6 bases) | 155 | 135 |
| TTTGTT SEQ ID NO:3 - (6 bases) | 361 | 528 |
| GGTGGG SEQ ID NO:4 - (6 bases) | 106 | 110 |
| GGGTGG SEQ ID NO:5 - (6 bases) | 93 | 81 |
| TTGTTT SEQ ID NO:6 - (6 bases) | 143 | 159 |
| AAGTAA SEQ ID NO:7 - (6 bases) | 12 | 21 |
| COGTCC SEQ ID NO:8 - (6 bases) | 200 | 322 |
| TGGTTG SEQ ID NO:9 - (6 bases) | 255 | 481 |
| ATGTAT SEQ ID NO:10 - (6 bases) | 129 | 214 |
| CTGTCT SEQ ID NO:11 - (6 bases) | 73 | 128 |
| TCGTTC SEQ ID NO:12 - (6 bases) | 56 | 98 |
| GGTTGG SEQ ID NO:13 - (6 bases) | 99 | 83 |
| GGAAGG SEQ ID NO:14 - (6 bases) | 62 | 84 |
| GGCCGG SEQ ID NO:15 - (6 bases) | 63 | 78 |
| GGGGGG SEQ ID NO:16 - (6 bases) | -7 | 18 |
| GGGAGG SEQ ID NO:17 - (6 bases) | 127 | 194 |
| GGGCGG SEQ ID NO:18 - (6 bases) | 165 | 322 |

5

Ejemplo 12 (comparativo)

Inhibición de la expresión de Fas en células T de leucemia humana Jurkat por la cicloheximida

Las células T de la leucemia humana Jurkat se preincubaron con 0,0 µg/ml (-CHX) o con 0,1 µg/ml de cicloheximida (+CHX) durante 1 hora. Se añadieron 10µg/ml o 100 µg/ml de SEQ ID NO: 5 de 6 bases (GGGTGG) tanto a las células -CHX como a las +CHX y se continuó la incubación durante 24 horas y durante 48 horas (Tabla 10).

10

Tabla 10

Aumento porcentual de Fas en células T de la leucemia humana Jurkat

| SECUENCIA | % AUMENTO | | | |
|--|-----------|-------|-------|-------|
| | 24 h | | 48 h | |
| | - CHX | + CHX | - CHX | + CHX |
| GGGTGG SEQ ID NO:5 - (6 bases) 10 µg/ml | 63 | 5 | 91 | 51 |
| GGGTGG SEQ ID NO:5 -(6 bases) 100 µg/ml | 62 | 22 | 150 | 115 |

5

Como se muestra en la Tabla 10, SEQ ID NO: 5 regulaba en sentido creciente la expresión de Fas en las células T Jurkat. Con 10 µg/ml de SEQ ID NO: 5, la cicloheximida reducía la expresión de Fas 92% después de 24 horas y 44% después de 48 horas. Con 100µg/ml de SEQ ID NO: 5, la cicloheximida reducía la expresión de Fas 65% después de 24 h y 23% después de 48 h. Estos datos sugieren que SEQ ID NO: de 6 bases estimula la síntesis de Fas de novo.

10

Ejemplo 13

Efecto sinérgico de SEQ ID NO: 5 (GGGTGG) y anticuerpos agonistas anti-Fas sobre la inhibición de la proliferación de las células de cáncer de vejiga UMUC-3

Se incubaron células de cáncer de vejiga UMUC-3 durante 48 horas con 0,00, 0,02 y 0,20 µg/ml de anticuerpos monoclonales agonistas anti-Fas (clon CH-11: Coulter-Immunotech, Marsella, Francia) + 0 ó 10 µg/ml de SEQ ID NO: 5. La proliferación celular se midió utilizando reducción con dimetiltiazol-difeniltetrazolio (MTT) (Mosman et al. J. Immunol. Methods 65:55, 1983). Se midió el MTT a una longitud de onda de 570 nm utilizando un lector espectrofotométrico multiplaca (ELX800, Bio-TEK Instruments Inc., Winooski, VT).

15

Tabla 11

Inhibición de la proliferación de células de cáncer de vejiga UMUC-3

| SECUENCIA | % INHIBICIÓN | | |
|---|----------------------|------------|-----------|
| | Anticuerpos anti-Fas | | |
| | 0.0 µg/ml | 0.02 µg/ml | 0.2 µg/ml |
| Sin secuencia | 0 | 7 | 17 |
| GGGTGG SEQ ID NO:5 - (6 bases) 10 µg/ml | 23 | 38 | 44 |

Como se muestra en la Tabla 11, SEQ ID NO: 5 de 6 bases potenciaba la actividad inhibidora de 0,02 y 0,2 µg/ml de los anticuerpos agonistas anti-Fas sobre la proliferación de las células UMUC-3.

25

Ejemplo 14

Efecto aditivo de SEQ ID NO: 5 (GGGTGG) y anticuerpos agonistas anti-Fas sobre la inhibición de la proliferación de las células T de la leucemia Jurkat

Se incubaron células de T leucemia Jurkat durante 48 horas con 0,00, 0,02 y 0,20 µg/ml de anticuerpos monoclonales agonistas anti-Fas (clon CH-11) + 0 y 10 µg/ml de SEQ ID NO: 5. La proliferación celular se midió como en el Ejemplo 13.

30

Tabla 12

Inhibición de la proliferación de células T de la leucemia humana Jurkat

| SECUENCIA | % INHIBICIÓN | | |
|---|----------------------|------------|-----------|
| | Anticuerpos anti-Fas | | |
| | 0.0 µg/ml | 0.02 µg/ml | 0.2 µg/ml |
| Sin secuencia | 0 | 16 | 33 |
| GGGTGG SEQ ID NO:5 - (6 bases) 10 µg/ml | 16 | 28 | 48 |

- 5 Como se muestra en la Tabla 12, los efectos de SEQ ID NO: 5 de 6 bases y de 0,02 y 0,2 µg/ml de anticuerpos agonistas anti-Fas sobre la proliferación de las células T Jurkat eran aditivos.

Ejemplo 15

Efecto de secuencias de 6 bases y anticuerpos agonistas anti-Fas sobre T murinas EL-4

- 10 Se tratan células de T de linfoma murino EL-4 en C57/BL6 lpr/lpr (ratones Fas-negativos). Los ratones se dividen en 30 grupos de 10 ratones. El día 0, los ratones del grupo 1 reciben solución salina, los ratones del grupo 2 reciben 1, 10 ó 100 mg/kg de SEQ ID NO: 5, los ratones del grupo 3 reciben 1, 10 ó 100 mg/kg de SEQ ID NO: 16, los del grupo 4 reciben 1, 10 ó 100 mg/kg de SEQ ID NO: 17, los ratones del grupo 5 reciben 1, 10 ó 100 mg de SEQ ID NO: 18, los ratones del grupo 6 reciben anticuerpos anti-Fas, los ratones del grupo 7 reciben 1, 10 ó 100 mg/kg de SEQ ID NO: 5 + anticuerpos anti-Fas, los ratones del grupo 8 reciben 1, 10 o 100 mg/kg de [SEQ. ID](#) NO: 16 + anticuerpos anti-Fas, el grupo 9 reciben 1, 10 o 100 mg/kg de [SEQ. ID](#) NO: 17 + anticuerpos anti-Fas, los ratones del grupo 10 reciben 1, 10 o 100 mg/kg de [SEQ. ID](#) NO: 18 + anticuerpos anti-Fas. En estos diferentes grupos, se administran anticuerpos anti-Fas a cualquier dosis en el intervalo de aproximadamente 0,003 a aproximadamente 0,3 mg/kg. Los ratones del grupo 1 tienen la mayor masa tumoral, los grupos 2, 3, 4, 5 y 6 tienen menos masa tumoral que los ratones del grupo 1, y los ratones de los grupos 7, 8, 9 y 10 tienen la masa tumoral mínima. La eficacia de las secuencias SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 es dependiente de la dosis.

Ejemplo 16

- 25 Se inyectan ratones hembra (SJL/J x PL/J) F1 subcutáneamente en ambas regiones femorales con una emulsión que contiene 0,5 mg de proteína básica mielina (MBP) mezclada con adyuvante completo de Freund. Después de 24 horas, se administran intraperitonealmente 400 ng de la toxina de *Bordetella pertussis*. El día de comienzo (día 0), los ratones del grupo 1 reciben solución salina, los ratones del grupo 2 reciben 1, 10 ó 100 mg/kg de SEQ ID NO: 5, los ratones del grupo 3 reciben 1, 10 ó 100 mg/kg de SEQ. ID NO: 16, los ratones del grupo 4 reciben 1, 10 o 100 mg/kg de SEQ. NO: 17, los ratones del grupo 5 reciben 1, 10 o 100 mg/kg de SEQ. NO: 18, los ratones del grupo 6 reciben anticuerpos anti-Fas, los ratones del grupo 7 reciben 1, 10 o 100 mg/kg de [SEQ. ID](#) NO: 5 + anticuerpos anti-Fas, los ratones del grupo 8 reciben 1, 10 o 100 mg/kg de [SEQ. ID](#) NO: 16 + anticuerpos anti-Fas, el grupo 9 reciben 1, 10 o 100 mg/kg de [SEQ. ID](#) NO: 17 + anticuerpos anti-Fas, los ratones del grupo 10 reciben 1, 10 o 100 mg/kg de SEQ. ID NO: 18 + anticuerpos anti-Fas durante 3 días por administración intracisternal (200 µg/día). En estos diferentes grupos, los anticuerpos anti-Fas se administran a cualquier dosis en el intervalo de aproximadamente 0,003 a aproximadamente ratones de los grupos 1, 2, 3, 4 y 5. Los ratones de los grupos 7, 8, 9 y 10 exhiben la progresión mínima de EAE. La eficacia de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 es dependiente de la dosis.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una secuencia de oligonucleótido-fosfodiéster sintético de 6 bases seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 18 y un anticuerpo anti-Fas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad neoplásica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad proliferativa, una enfermedad linfoproliferativa, una enfermedad degenerativa, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad cardiovascular, un rechazo de injerto o una infección, en el cual el anticuerpo anti-Fas tiene por objeto administración en una dosis de 0,003 a 3 mg/kg, y en donde la secuencia de oligonucleótido modula la eficacia del anticuerpo anti-Fas.
5
2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual el anticuerpo anti-Fas es para administración en una dosis de 0,01 a 0,1 mg/kg.
10
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
4. Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el cual el cáncer se selecciona del grupo constituido por cáncer de ovario, próstata, mama, vejiga y leucemia.
5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 de una secuencia de fosfodiéster-oligonucleótido sintético de 6 bases seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 y un anticuerpo anti-Fas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.
15
6. Una secuencia sintética de fosfodiéster-oligonucleótido de 6 bases seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 18 y un anticuerpo anti-Fas para uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada de una enfermedad neoplásica, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad proliferativa, una enfermedad linfoproliferativa, una enfermedad degenerativa, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad cardiovascular, un rechazo de injerto o una infección, en el cual el anticuerpo anti-Fas se encuentra en una dosis de 0,003 a 3 mg/kg, y en donde la secuencia de oligonucleótido modula la eficacia del anticuerpo anti-Fas.
20
25