

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 129**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/117** (2010.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.02.2006 E 06705637 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 1883411**

54 Título: **Oligonucleótido y composiciones que lo comprenden para tratar neoplasia de linfocitos B**

30 Prioridad:

**17.05.2005 CN 200510069576**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.12.2013**

73 Titular/es:

**CHANGCHUN HUAPU BIOTECHNOLOGY CO.,  
LTD. (100.0%)  
4-28/1102-54 XINMIN STREET  
CHANGCHUN, JILIN 130021, CN**

72 Inventor/es:

**WANG, LI-YING;  
YU, YONG-LI y  
BAO, MU-SHENG**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 433 129 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

Oligonucleótido y composiciones que lo comprenden para tratar neoplasia de linfocitos B

5 **Campo técnico**

La presente invención proporciona un oligonucleótido con una secuencia como se muestra en la SEC ID N° 1 para su uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B en un sujeto mamífero, una composición que lo comprende y un método para inducir apoptosis de células neoplásicas de linfocitos B *in vitro*, regular positivamente CD40 en células neoplásicas de linfocitos B *in vitro* e inducir que las células neoplásicas de linfocitos B produzcan IL-10 *in vitro*. El oligonucleótido puede usarse solo o en combinación con productos quimioterapéuticos, productos inmunoterapéuticos y radiación para tratar neoplasia de linfocitos B.

15 **Antecedentes**

Basándose en el sistema de clasificación de la OMS (American Journal of Surgical Pathology, 1997, 21 (1): 114-121), los tumores malignos linfoides se agrupan en tres clases principales: neoplasia de linfocitos B, neoplasia de linfocitos citolíticos naturales (NK)/ linfocitos T y linfomas de Hodgkin.

La neoplasia de linfocitos B se divide adicionalmente en dos grupos: neoplasia de linfocitos B precursores y neoplasia de linfocitos B periféricos. La neoplasia de linfocitos B precursores incluye leucemia linfoblástica aguda B precursora (leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B, B-ALL)/linfoma linfoblástico (LBL). La neoplasia de linfocitos B periféricos incluye leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL), linfoma linfocítico pequeño, leucemia prolinfocítica de linfocitos B, linfoma linfoplasmácítico/inmunocitoma, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma folicular cutáneo, linfoma de linfocitos B de zona marginal extraganglionar de tipo MALT, linfoma de linfocitos B de zona marginal ganglionar (linfocitos B monocitoides +/-), linfoma de zona marginal esplénica (linfocitos vellosos +/-), leucemia de células pilosas, plasmacitoma/mieloma de células plasmáticas, linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma de linfocitos B grande mediastinal (tímico), linfoma de linfocitos B grande intravascular, linfoma de efusión primaria y linfoma de Burkitt.

La leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL) y leucemia linfocítica/linfoblástica aguda de linfocitos B (B-ALL) son dos tipos de leucemia de linfocitos B. Las células de B-CLL expresan CD19, CD5 y CD23 (Nicholas Chiorazzi, M.D., *et al.* N Engl J Med 2005; 352: 804-15). Las células B-ALL expresan marcadores CD19+ CD10+.

El linfoma linfocítico pequeño es una neoplasia de linfocitos B. La población monoclonal de linfocitos B en linfoma linfocítico pequeño expresa CD19, CD5 y CD23 (Catherine Thieblemont, *et al.* Blood. 2004; 103: 2727-2737).

Dependiendo de la neoplasia de linfocitos B diagnosticada, las opciones de tratamiento actuales son quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia.

CD40, que se expresa en la superficie celular de linfocitos B y células dendríticas normales, es un miembro de la familia del receptor de factor de necrosis tumoral (TNFR). CD40L (CD154), que se expresa en linfocitos T, es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (Castle, BE, *et al.* J Immunol 1993; 151: 1777-1788). La interacción de CD40L y CD40 promueve la proliferación, diferenciación y presentación de antígeno de linfocitos B, células dendríticas y monocitos (Ranheim EA, *et al.* J Exp Med 1993; 177: 925-935; Yellin MJ, *et al.* J Immunol 1994; 153: 666-674; Banchereau J, *et al.* Annu Rev Immunol 1994; 12: 881-922; M.von Bergwelt-Baildon MS, *et al.* Blood 2002; 99: 3319-3325).

CD40 también se expresa en las células neoplásicas de linfocitos B. Se ha demostrado que la potenciación de la expresión de CD40 promueve la apoptosis de células neoplásicas de linfocitos B (Peter Chu, *et al.* PNAS, 19 de marzo de 2002, vol. 99, N° 6 3854- 3859; Dicker Frank, *et al.* BLOOD, 15 de abril 2005, Volumen 105, Número 8: 3193-3198).

Los experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* indicaron que la estimulación y regulación positiva de CD40 indujo la inhibición del crecimiento de células neoplásicas de linfocitos B (Funakoshi *et al.* Blood 83: 2787-2794, 1994; Murphy *et al.* Blood 86: 1946-1953, 1995; Eliopoulos, A.G., *et al.* 1996. Oncogene 13:2243; Hirano, A., *et al.* 1999. Blood 93:2999; Tong, A.W., M. *et al.* 2001. Clin. Cancer Res. 7:691).

Se ha indicado que la promoción de la expresión de CD40 en células neoplásicas de linfocitos B potencia la antigenicidad de células neoplásicas de linfocitos B y en consecuencia fomenta la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de las células. El CTL puede destruir eficazmente células neoplásicas de linfocitos B (Dilloo D, *et al.* Blood. 1997; 90:1927-1933; Kato K, *et al.* J Clin Invest. 1998; 101:1133-1141; Wierda W.G., *et al.* Blood. 2000; 96:2917-2924; Takahashi S, *et al.* Hum Gene Ther. 2001; 12:659-670; Takahashi S, *et al.* Cancer Gene Ther. 2001; 8:378-387). En presencia de CD40L, las células de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B que expresan CD40 pueden destruirse por linfocitos T citotóxicos CD4 (Dicker Frank, *et al.* Blood, 15 de abril de 2005 Vol. 105, N° 8: 3193-3198). La interacción de D40L y CD40 en células de linfoma de Burkitt podría promover que la

célula presentara antígenos tumorales a CTL específicos (Khanna, R. *et al.* 1997. J. Immunol. 159: 5782). Los experimentos *in vivo* y ensayos clínicos también han demostrado que la activación de CD40 podría potenciar la inmunogenicidad de células de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL) y en consecuencia inducir la generación de CTL específicos para las células (Kato, K., *et al.* 1998. J. Clin. Invest. 101:1133; Wierda, W.G., *et al.* 2000. Blood 96: 2917).

Juntos, estos datos indican que la potenciación de la expresión de CD40 en células neoplásicas de linfocitos B puede estimular la inmunidad anti-tumoral contra neoplasia de linfocitos B. La inmunidad antitumoral incluye pero sin limitación lo siguiente:

1. Promover la apoptosis de células neoplásicas de linfocitos B;
2. Inhibir el crecimiento de células neoplásicas de linfocitos B;
3. Potenciar la inmunogenicidad de células neoplásicas de linfocitos B y de este modo fomentar la generación de CTL específicos de las células.

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina homodimérica producida por ciertos linfocitos T, monocitos, macrófagos y algunas de las células neoplásicas desarrolladas a partir de linfocitos B, linfocitos T o linfocitos NK (Kitabayashi *et al.*, 1995; Masood *et al.*, 1995; Sjoberg *et al.*, 1996; Beatty *et al.*, 1997; Boulland *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1999). La actividad de IL-10 está mediada por su receptor de superficie celular específico. El receptor se expresa en células presentadoras de antígenos, linfocitos y también células de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL). Se ha descubierto que la adición de IL-10 exógena inhibe la proliferación de células de B-CLL recién aisladas de pacientes (Jesper Jurlander, Chun-Fai Lai, Jimmy Tan, *et al.* Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. Blood, Volumen 89, N° 11 (1 de junio), 1997: páginas 4146-4152). También se ha indicado que IL-10 inhibe la proliferación de células de B-CLL y potencia la apoptosis de células de B-CLL (Anne-Catherine Fluckiger, Isabelle Durand y Jacques Banchereau Interleukin 10 Induces Apoptotic Cell Death of B-Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. J. Exp. Med. Volumen 179 enero 1994 91-99). Las propiedades antineoplásicas inmunoestimuladoras de IL-10 se han analizado en una revisión a partir de la que se especula que la sobre-expresión de IL-10 dentro del microambiente tumoral puede catalizar el rechazo inmunitario de cáncer (Simone Mocellin, Francesco M. Marincola y Howard A. Young. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. Journal of Leukocyte Biology. 2005, 78:1043-1051).

En la presente invención, los inventores proporcionan un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1 para su uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B en un sujeto mamífero. El oligonucleótido induce la apoptosis de células neoplásicas de linfocitos B, promueve la expresión de CD40 en células neoplásicas de linfocitos B y estimula que las células neoplásicas de linfocitos B produzcan IL-10.

### Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1 para su uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B en un sujeto mamífero.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1 para su uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B, que está comprendido dentro de una composición farmacéutica.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para inducir apoptosis de células neoplásicas de linfocitos B *in vitro*, que comprende poner en contacto dichas células neoplásicas de linfocitos B con una composición que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para potenciar la expresión de CD40 en células neoplásicas de linfocitos B, que comprende poner en contacto dichas células neoplásicas de linfocitos B *in vitro* con una composición que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para inducir que las células neoplásicas de linfocitos B produzcan IL-10, que comprende poner en contacto dichas células neoplásicas de linfocitos B *in vitro* con una composición que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B que comprende: (1) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1 y (2) un agente anti-neoplasia de linfocitos B.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de neoplasia de linfocitos B.

Se desvela un oligonucleótido con una secuencia de 5'-TCGTCGACGTCGTTCTC-3' (diseñado como oligo-2 o indicado como SEC ID N° 1), o su homólogo funcional. El oligonucleótido o su homólogo funcional puede tener una modificación de cadena principal de fosfato que es una modificación de fosforotioato o fosforoditioato parcial o

completa. El oligonucleótido o su homólogo funcional pueden tener modificaciones químicas o tener sustituciones con bases poco comunes. El oligonucleótido o su homólogo funcional puede ser una parte funcional de cualquier otro oligonucleótido o fragmento de ADN o clonarse en un plásmido, vector bacteriano, vector viral o vacuna de ADN respectivamente. El oligonucleótido con la secuencia de SEC ID N° 1 puede modificarse añadiendo una o más bases (preferentemente de 1 a 10 bases) a cada uno de sus extremos o cambiando bases en él. Los expertos en la materia pueden determinar el uso del oligonucleótido con la secuencia de SEC ID N° 1 o su homólogo funcional, o el fragmento de ADN, monocatenario o bicatenario, que comprende una o más copias del oligonucleótido con la secuencia (SEC ID N° 1) para conseguir el objeto de la presente divulgación basándose en el buen conocimiento de la técnica y la enseñanza de la presente divulgación.

También se desvela un método para el tratamiento de neoplasia de linfocitos B, usando el oligonucleótido o su homólogo funcional de la presente divulgación o la composición que lo comprende en un sujeto. El sujeto es un ser humano o animal. La neoplasia de linfocitos B incluye pero sin limitación leucemia de linfocitos B, linfoma de linfocitos B y mieloma.

También se desvela un método para tratar neoplasia de linfocitos B usando el oligonucleótido o su homólogo funcional de la presente divulgación o la composición que los comprende induciendo la apoptosis de células neoplásicas de linfocitos B.

También se desvela un método para tratar neoplasia de linfocitos B usando el oligonucleótido o su homólogo funcional de la presente divulgación o la composición que los comprende regulando positivamente CD40 en células neoplásicas de linfocitos B.

También se desvela un método para tratar neoplasia de linfocitos B usando el oligonucleótido o su homólogo funcional de la presente divulgación o la composición que los comprende estimulando células neoplásicas de linfocitos B para producir IL-10.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del oligonucleótido o su homólogo funcional de la presente invención solo o en/con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. La composición puede administrarse mediante administración entérica, parenteral y tópica o por inhalación.

También se desvela un método para el tratamiento de neoplasia de linfocitos B que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del oligonucleótido o su homólogo funcional de la presente divulgación o la composición que lo comprende y al menos uno de agentes anti-neoplasia de linfocitos B incluyendo producto quimioterapéutico, producto inmunoterapéutico y los agentes usados en radioterapia.

#### Breve descripción de los dibujos

##### Figura 1. Apoptosis de células de B-CLL inducida por oligo-2 (dosificación)

Se cultivaron células de B-CLL en medio sin suero AB humano al 10 % con o sin diversas cantidades de oligo-2. El día 7, las células se tiñeron con TMRE. El número de células de B-CLL viables se calculó para el porcentaje de células positivas para TMRE.

##### Figura 2. El efecto de oligo-2 en la regulación positiva de CD40 en células de B-CLL

Las células de B-CLL se incubaron con o sin oligo 2 durante 7 días y después se tiñeron con anticuerpo de CD40-FITC para análisis de la expresión de CD40 usando citometría de flujo. El nivel de expresión se indicó con el número de MFI.

##### Figura 3. El efecto de oligo-2 en la regulación positiva de CD40 en células de linfoma linfocítico pequeño

Las células de linfoma linfocítico pequeño se incubaron con o sin oligo 2. El día 7, las células se tiñeron con anticuerpo de CD40-FITC para análisis de expresión de CD40 usando citometría de flujo. El nivel de expresión se indicó con el número de MFI.

##### Figura 4. Apoptosis de células de B-ALL inducida por oligo-2

Se incubaron células de B-ALL con o sin oligo-2. El día 3, 5 y 7 de la incubación, las células se tiñeron con TMRE, seguido de análisis de citometría de flujo. El número de células de B-ALL viables se calculó para el porcentaje de células positivas para TMRE.

##### Figura 5. Regulación positiva de CD40 en células de B-ALL por oligo 2

Se cultivaron células de B-ALL con o sin oligo-2 1 µg/ml. El día 3, 5 y 7 del cultivo, las células se tiñeron con mAb

anti-CD40 marcado con FITC para análisis de la expresión de CD40 usando citometría de flujo. El nivel de expresión se indicó con el número de MFI.

#### Figura 6. Producción de interleucina 10 a partir de células de B-CLL inducida por oligo-2

5 Las células de B-CLL se cultivaron con o sin oligo-2 en un medio sin suero. Los sobrenadantes se recogieron en el punto temporal indicado y se evaluaron con respecto a IL-10 usando un kit de ELISA.

#### Figura 7. El efecto de oligo-2 en la proliferación de PBMC normales humanas

10 Las PBMC humanas normales se cultivaron con oligo-2, 2216 o 2006 durante 36 horas y después se incorporaron con [<sup>3</sup>H] timidina para determinar la proliferación de las células, respectivamente. Se analizaron las cinco muestras de sangre. La proliferación de las células se expresó como SI.

### 15 Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

20 En la presente invención los siguientes términos tendrán los significados a continuación:

25 Un "oligonucleótido" significa múltiples nucleótidos (es decir, moléculas que comprenden un azúcar (por ejemplo, desoxirribosa) ligado a un grupo fosfato y a una base orgánica intercambiable). Hay cuatro bases orgánicas citosina (C), timina (T), adenina (A) y guanina (G). El oligonucleótido puede sintetizarse por un sintetizador de oligonucleótidos automático disponible en el mercado o prepararse a partir de secuencias de ácido nucleico existentes usando técnicas conocidas.

30 Una "modificación de cadena principal" de oligonucleótido significará que un oligonucleótido tiene una cadena principal de fosfato modificada en fosforotioato (es decir, al menos uno de los oxígenos del fosfato se reemplaza por azufre) u otra cadena principal modificada.

35 Una "modificación química" de oligonucleótido significará la modificación utilizando los grupos activos del nucleótido o creando análogos de nucleótidos. Las modificaciones pueden producirse durante o después de la síntesis del oligonucleótido. Durante la síntesis, las bases modificadas (incluyendo pero sin limitación análogos de timidina) pueden incorporarse de forma interna o en el extremo 5'. Después de la síntesis, la modificación puede llevarse a cabo usando los grupos activos (mediante un modificador amino, mediante los grupos hidroxilo 3' o 5' o mediante el grupo fosfato).

40 Una "neoplasia de linfocitos B" significará enfermedades desarrolladas a partir de la proliferación anómala de las células de linaje de linfocitos B. La neoplasia de linfocitos B puede agruparse en leucemia de linfocitos B, linfoma de linfocitos B y mieloma (plasmacitoma/mieloma de células plasmáticas). La leucemia de linfocitos B incluye leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL), leucemia linfoblástica aguda B precursora (leucemia linfocítica aguda de linfocitos B, B-ALL), leucemia prolinfocítica de linfocitos B y leucemia de células pilosas. El linfoma de linfocitos B incluye linfoma linfocítico pequeño, linfoma linfoplasmacítico/inmunocitoma, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma folicular cutáneo, linfoma de linfocitos B de zona marginal extraganglionar de tipo MALT, linfoma de linfocitos B de zona marginal ganglionar (linfocitos B monocitoides +/-), linfoma de zona marginal esplénica (linfocitos vellosos +/-), linfoma de linfocitos B grande difuso, linfoma de linfocitos B grande mediastinal (tímico), linfoma de linfocitos B grande intravascular, linfoma de efusión primaria y linfoma de Burkitt.

50 Un "sujeto" significará un mamífero incluyendo pero sin limitación ser humano, mono, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, cabra, oveja, ratón y rata. El oligonucleótido de la invención puede administrarse a un sujeto con neoplasia de linfocitos B.

55 Un "agente antineoplasia de linfocitos B" significará un agente usado para tratar neoplasia de linfocitos B en un sujeto. El agente incluye el oligonucleótido de la presente invención, productos quimioterapéuticos, productos inmunoterapéuticos y los agentes usados en radioterapia. El oligonucleótido de la invención puede administrarse antes de, junto con o después de la administración de uno o más agentes anti-neoplasia de linfocitos B para conseguir efecto sinérgico en el tratamiento de una neoplasia de linfocitos B.

60 La "quimioterapia" significará la quimioterapia que trata neoplasia de linfocitos B en combinación con el oligonucleótido de la invención. El oligonucleótido de la presente invención puede usarse con uno o más productos quimioterapéuticos en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B. Los productos quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes tales como ciclofosfamida o clorambucilo, alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina y vinblastina), procarbazona, metotrexato, prednisona, antraciclina, L-asparaginasa, análogos de purina (por ejemplo, fludarabina monofosfato, 2-clorodesoxiadenosina y pentostatina), citosina, arabinósido, cisplatino, etopósido e ifosfamida. El oligonucleótido de la presente invención también puede usarse con una o más combinaciones terapéuticas en la quimioterapia. Las combinaciones incluyen, pero sin limitación, CVP

(ciclofosfamida, vincristina y prednisona), CHOP (CVP y doxorubicina), C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona y procarbazona), CAP-BOP (CHOP más procarbazona y bleomicina), m-BACOD (CHOP más metotrexato, bleomicina y leucovorina), ProMACE-MOPP (prednisona, metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido y leucovorina, más MOPP convencional), ProMACE-CytaBOM (prednisona, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, 5 citarabina, bleomicina, vincristina, metotrexato y leucovorina), MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona de dosis fija, bleomicina y leucovorina), IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato y etopósido), MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato y etopósido), DHAP (dexametasona, citarabina de dosis alta y cisplatino), ESHAP (etopósido, metilprednisolona, citarabina HD, cisplatino), CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona y bleomicina), CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona), CHOP más bleomicina, 10 metotrexato, procarbazona, mostaza de nitrógeno, arabinósido de citosina y etopósido. MOPP (mecletamina (mostaza de nitrógeno), vincristina (Oncovin), procarbazona y prednisona), ABVD (por ejemplo, adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina), CHIVPP (clorambucilo, vinblastina, procarbazona y prednisona), CABS (lomustina, doxorubicina, bleomicina y estreptozotocina), MOPP más ABVD, MOPP más ABV (doxorubicina, bleomicina y vinblastina) o BCVPP (carmustina, ciclofosfamida, vinblastina, procarbazona y prednisona) y CAP 15 (ciclofosfamida, doxorubicina y prednisona).

Los “productos inmunoterapéuticos” significarán los productos inmunoterapéuticos que tratan neoplasia de linfocitos B en combinación con el oligonucleótido de la invención. El oligonucleótido de la presente invención puede usarse 20 con uno o más productos inmunoterapéuticos en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B. Los productos inmunoterapéuticos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos anti-CD20. El anticuerpo de CD20 incluye inmunoglobulinas y sus fragmentos que son específicamente reactivos con una proteína CD20 en la superficie celular de células neoplásicas de linfocitos B. Los anticuerpos de CD20 pueden ser anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos biespecíficos y anticuerpos humanizados. Un “CD20” es una 25 proteína de membrana de linfocitos B (Tedder *et al*, Immunology Today 15: 450-454 (1994)) y se expresan en linfocitos B tanto normales como neoplásicos (John C. Byrd, *et al*. J Clin Oncol 2001; 19: 2165-2170; Huhn D, *et al*. Blood 2001, 98: 1326-1331).

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” indica uno o más de carga sólida o líquida, diluyentes o sustancias 30 encapsulantes que son adecuados para administrar el oligonucleótido de la invención a un sujeto. El vehículo puede ser orgánico, inorgánico, natural o sintético. El vehículo incluye todas y cada una de las soluciones, diluyentes, disolventes, medios de dispersión, liposomas, emulsiones, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y cualquier otro vehículo adecuado para administrar el oligonucleótido de la invención y su uso se conoce bien en la técnica.

La “cantidad terapéuticamente eficaz” del oligonucleótido de la invención se referirá a una dosis usada para 35 conseguir un resultado deseado de tratamiento de neoplasia de linfocitos B en un sujeto. La dosis puede determinarse por técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en este campo y puede variar dependiendo de los factores incluyendo, pero sin limitación, el tamaño y/o salud global del sujeto o la gravedad de la enfermedad. La introducción del oligonucleótido de la invención puede llevarse a cabo como un tratamiento 40 individual o a lo largo de una serie de tratamientos. Las dosis del sujeto del oligonucleótido de la invención para la administración varían de aproximadamente 1 µg a 100 mg por administración. Sin embargo, las dosis para el tratamiento de neoplasia de linfocitos B pueden usarse en un intervalo de 10 a 1000 veces más que las dosis descritas anteriormente. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar el efecto terapéutico óptimo por los expertos en la materia.

La “ruta” de administración del oligonucleótido de la invención significará la administración entérica, parenteral o 45 tópica o inhalación. El término “entérico” como se usa en el presente documento incluye administración oral, gástrica, intestinal y rectal. El término “parenteral” incluye administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. El término “tópico” indica la aplicación del oligonucleótido de forma externa a la 50 epidermis, a la cavidad bucal y al oído, ojo y nariz.

Una “composición farmacéutica” significará la composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del oligonucleótido de la invención con o sin un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición incluye pero sin 55 limitación soluciones acuosas o salinas, partículas, aerosoles, sedimentos, gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro) cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas y otras composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en una diversidad de sistemas de suministro de fármacos. Las composiciones son adecuadas para inyección, uso oral, bucal, rectal y vaginal, inhalación y aplicación en depósito. En todos los casos, la composición debe ser estéril y estable en las condiciones de preparación y almacenamiento y conservarse frente a la contaminación microbiana. Para inyección, la composición incluirá soluciones o dispersiones 60 acuosas y polvos para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables. “Polvo” en la presente invención se refiere a una composición que contiene partículas sólidas finamente dispersadas que contienen el oligonucleótido de la invención. El polvo puede formularse con otros vehículos farmacéuticamente aceptados (por ejemplo, agua, PBS, solución salina y otros tampones farmacéuticamente aceptados) antes de su uso. Las soluciones pueden prepararse incorporando el oligonucleótido en uno o más disolventes apropiados y otros 65 ingredientes requeridos. Las dispersiones pueden prepararse incorporando el oligonucleótido en un vehículo, que contiene un medio de dispersión (por ejemplo, glicerol, polietilenglicoles líquidos y aceites) y los otros ingredientes

requeridos. Para administración oral, la composición se formulará con vehículos comestibles para formar comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares. Para administración bucal, la composición será en comprimidos o grageas de manera convencional. Para inhalación, las composiciones serán una pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador o un polvo seco y puede seleccionarse por un experto en la materia. El oligonucleótido también puede formularse como composiciones farmacéuticas aceptables para aplicaciones rectal o vaginal y para aplicación de liberación prolongada. El oligonucleótido de la invención en la composición puede usarse solo o en combinación con uno o más agentes adicionales que incluyen pero sin limitación productos quimioterapéuticos, productos inmunoterapéuticos y un ligando reconocido por un receptor específico o molécula de célula diana. El oligonucleótido de la invención en combinación con otro agente puede estar en composiciones separadas y usarse de la siguiente manera: (1) el oligonucleótido está mezclado con un segundo agente antes de la administración; (2) el oligonucleótido y un segundo agente se administran a un sujeto en momentos diferentes; (3) el oligonucleótido y un segundo agente se administran a sitios diferentes de un sujeto. Además, la composición puede contener plásmido, vectores bacterianos, vectores virales y vacunas de ácido nucleico que portan la secuencia del oligonucleótido de la invención.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención.

#### Ejemplo 1. Síntesis del oligonucleótido

Se ha diseñado y sintetizado un oligonucleótido con una secuencia de 5'-TCGTGACGTCGTTTCGTTCTC-3' (diseñado como oligo-2, SEC ID N° 1).

Para analizar las funciones del oligo-2, también se sintetizaron dos oligonucleótidos de control de 2006 con la secuencia de 5'-tcgtcgttttgcgttttgcgtt-3' (SEC ID N° 2) y 2216 con la secuencia de 5'-gggggacgatcgtcggggg-3' (SEC ID N° 3). Se sintetizaron tres de los oligonucleótidos en Sangon Biotech Company (Shanghai, China), se ensayaron con respecto a endotoxina usando el ensayo de lisado de amebocitos *Limulus* (Associates of Cape Cod, Inc) y se manipularon en reactivos sin pirógenos. 2006 (J Immunol 2000; 164: 1617) es un oligonucleótido bien estudiado que activa fuertemente linfocitos B normales. 2216 (Eur J Immunol 2001; 31:2154) es otro oligonucleótido bien estudiado que induce altas cantidades de interferón de tipo I en células dendríticas plasmacitoides.

Los métodos para sintetizar el oligonucleótido se conocen bien por los expertos en la materia y, entre otros, se usa en general síntesis de fase sólida. Específicamente, en el proceso de la síntesis, el soporte sólido usado es perla de vidrio poroso controlado (CPG). Esta perla tiene una superficie con orificios y canales y es en estos donde se une el nucleótido protegido. La síntesis del oligonucleótidos comienza con el nucleótido más 3' y continúa a través de una serie de ciclos compuestos de cinco etapas que se repiten hasta que se une el nucleótido más 5'. Estas etapas son desprotección, activación, acoplamiento, recubrimiento y estabilización.

#### Etapas 1. Desprotección

El grupo protector en el nucleósido protegido unido a una perla de CPG (vidrio poroso controlado) se retira por ácido tricloroacético (TCA) formando un grupo hidroxilo 5' reactivo.

#### Etapas 2. Activación

En esta etapa, el tetrazol ataca el nucleósido de fosforamidita de acoplamiento formando un intermedio de tetrazolil fosforamidita.

#### Etapas 3. Acoplamiento

El intermedio de tetrazolil fosforamidita reacciona con el grupo hidroxilo del receptor y se forma el enlace 5 'a 3'. El tetrazol se reconstituye y continúa el proceso.

#### Etapas 4. Recubrimiento

En esta etapa, se usa un reactivo de acetilación compuesto de anhídrido acético y N-metil-imidazol para bloquear un grupo hidroxilo reactivo en su extremo más 5' de los oligonucleótidos para evitar fallo de acoplamiento.

#### Etapas 5. Estabilización

Una vez que se ha realizado la etapa de recubrimiento, la última etapa en el ciclo es la etapa de oxidación, que estabiliza el enlace fosfato entre la cadena oligonucleotídica creciente y la base más recientemente añadida. Esta etapa se lleva a cabo en presencia de yodo como un oxidante suave en tetrahidrofurano (THF) y agua.

Después de esta etapa final, el ciclo se repite para cada nucleótido en la secuencia. Después de la compleción de la síntesis, la molécula de ADN monocatenaria se purifica por métodos tales como HAP, PAGE, HPLC, C18 y OPC.

### Ejemplo 2. Apoptosis de células de B-CLL humanas inducida por oligo-2

5

#### 1. Preparación de células de B-CLL humanas

Se extrajeron muestras de sangre de pacientes con B-CLL no tratados (identificados patológicamente) (The First Hospital, Jilin University, China) después de obtener consentimiento informado por escrito aprobado. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Paque (Pharmacia). Se purificaron células de B-CLL CD5+ CD19+ CD23+ en PBMC usando el kit de aislamiento de linfocitos B (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) a > 95 % de células CD5+ CD19+ CD23+ (células de B-CLL). La preparación celular se realizó bajo las directrices de Miltenyi Biotec.

#### 15 2. Apoptosis de células de B-CLL humanas inducida por oligo-2

Las células de B-CLL se incubaron con oligo 2 o 2006 o 2216 a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 con suero AB humano al 10 % (Hyclone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos. El oligo 2, 2006 o 2216 se diluyó en medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone). Se usó un volumen igual de la dilución (medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone)) como un control (medio).

El día 3, 5 y 7 después de la incubación, las células se contaron y se tiñeron con tetrametil-rodamina etil éster (TMRE) (Molecular Probes Inc) (Lena Thyrell, *et al.* The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, N° 23, Ejemplar del 4 de junio, páginas 24152-24162, 2004) durante 10 minutos. Las células de B-CLL positivas para TMRE (viables) y negativas para TMRE (apoptóticas) se determinaron por citometría de flujo (B.D. FACS Aria). El número de células de B-CLL viables se calculó multiplicando el recuento de células total con el porcentaje de células positivas para TMRE en cada punto temporal. El experimento se repitió con diez muestras de sangre de pacientes con B-CLL y el resultado medio (n = 10) mostró que oligo-2 inducía significativamente la apoptosis de células de B-CLL (Tabla-1) y el efecto inducido por oligo-2 es aproximadamente 2 veces más fuerte que el inducido por 2006. Además, también se observó el efecto de la dosis de oligo-2 y 2006 en la apoptosis de las células de B-CLL. El resultado mostró que el oligo-2 a diversas dosificaciones que varían de 0,1 a 10 µg/ml indujo obviamente la apoptosis de células de B-CLL (Figura 1). En comparación, a la dosificación de 1 µg/ml, el efecto inductor de apoptosis de oligo-2 es aproximadamente 3 veces más fuerte que el de 2006. Juntos, estos resultados demuestran que el oligo-2 puede usarse para tratar B-CLL induciendo la apoptosis de células de B-CLL.

35

**Tabla 1. Apoptosis de células de B-CLL inducida por oligo-2 (cinética)**

Células de B-CLL viables (%) (n = 10)			
Grupo	Tiempo de incubación (días)		
	3	5	7
Medio	82,2 ± 12,2	79,5 ± 9,25	81,3 ± 11,0
2216	67,7 ± 18,2	57,7 ± 16,7	50,7 ± 13,5
2006	66,5 ± 12,1	44,4 ± 15,0	40,2 ± 10,8
Oligo 2	45,5 ± 9,5	17,6 ± 5,6	14,2 ± 3,1

### Ejemplo 3. Regulación positiva de CD40 en células de B-CLL humanas por oligo-2

#### 40 1. Preparación de células de B-CLL humanas

Se aislaron células de B-CLL humanas de pacientes con B-CLL con los procedimientos descritos en el Ejemplo 2.

#### 45 2. Regulación positiva de CD40 en células de B-CLL humanas por oligo-2

Las células de B-CLL se incubaron con oligo 2 o 2006 o 2216 a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 con suero AB humano al 10 % (Hyclone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos. El oligo 2, 2006 o 2216 se diluyó en medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone). Se usó un volumen igual de la dilución (medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone)) como control (medio).

50

El día 7 días después de la incubación, las células se contaron y se tiñeron con anticuerpo de CD40-FITC (Becton Dickinson) (Molecular Probes Inc) (Lena Thyrell, *et al.* The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, N° 23, Ejemplar del 4 de junio, páginas 24152-24162, 2004) durante 10 minutos. Las células de B-CLL teñidas con anticuerpo de CD40 se determinaron por citometría de flujo (B.D. FACS Aria). El resultado (Figura 2) mostró que el oligo 2 regula

positivamente de forma significativa la expresión de CD40 en células de B-CLL, lo que indica que el oligo-2 puede usarse para tratar B-CLL regulando positivamente CD40 en las células. La regulación positiva de CD40 promueve la apoptosis de células de B-CLL, induce la inhibición del crecimiento de células de B-CLL y hace a las células de B-CLL más inmunogénicas para estimular la generación de CTL específicos de células de B-CLL. El experimento se repitió con al menos diez muestras de sangre de pacientes con B-CLL con resultados similares.

#### Ejemplo 4. La apoptosis de células de linfoma linfocítico pequeño humano inducida por oligo 2

##### 1. Preparación de células de linfoma linfocítico pequeño humano

Las células de linfoma linfocítico pequeño se aislaron del tejido de biopsia de ganglio linfático de pacientes (The First Hospital, Jilin University, China) con linfoma linfocítico pequeño (identificado patológicamente) después de obtener consentimiento informado por escrito aprobado. El tejido de biopsia se picó por portaobjetos de vidrio de superficie rugosa para liberar las células en 5 ml de medio RPMI 1640 con suero AB humano al 10 % (Hyclone) en una placa de cultivo de 6 cm. Las células liberadas se filtraron a través de malla de acero inoxidable y se recogieron en un tubo cónico de 50 ml que contenía 15 ml de medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone). El tubo se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos y después se descartó el sobrenadante. Se purificaron células de linfoma linfocítico pequeño CD5+ CD19+ CD23+ usando el kit de aislamiento de linfocitos B (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) a > 95% de células CD5+ CD19+ CD23+ (células de linfoma linfocítico pequeño). La preparación de células se realizó bajo las directrices de Miltenyi Biotec.

##### 2. Apoptosis de células de linfoma linfocítico pequeño inducida por oligo-2

Las células de linfoma linfocítico pequeño se incubaron con oligo 2 o 2006 o 2216 a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 con suero AB humano al 10 % (Hyclone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos. El oligo 2, 2006 o 2216 se diluyó en medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone). Se usó un volumen igual de la dilución (medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone)) como un control (medio).

El día 3, 5 y 7 después de la incubación, las células se contaron y se tiñeron con tetrametil-rodamina etil éster (TMRE) (Molecular Probes Inc) (Lena Thyrell, *et al.* THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 279, N ° 23, Ejemplar del 4 de junio, páginas 24152-24162, 2004) durante 10 minutos. Las células de linfoma linfocítico pequeño positivas para TMRE (viables) y negativas para TMRE (apoptóticas) se determinaron por citometría de flujo (B.D. FACS Aria). El número de células de linfoma linfocítico pequeño viables se calculó multiplicando el recuento de células total con el porcentaje de células positivas para TMRE en cada punto temporal. El experimento se repitió con cinco muestras de los pacientes con linfoma linfocítico pequeño y el resultado medio (n = 5) mostró que el oligo-2 induce significativamente la apoptosis de las células de linfoma linfocítico pequeño (Tabla-2), lo que indica que el oligo-2 puede usarse para tratar linfoma linfocítico pequeño induciendo la apoptosis de células de linfoma linfocítico pequeño.

**Tabla 2. Apoptosis de células de linfoma linfocítico pequeño inducida por oligo-2.**

Células de linfoma linfocítico pequeño viables (%) n = 5			
Grupo	Tiempo de incubación (días)		
	3	5	7
Medio	81,2 ± 7,7	78,4 ± 9,1	77,1 ± 13,2
2216	68,5 ± 15,0	58,7 ± 12,3	52,1 ± 10,2
2006	67,6 ± 10,3	45,3 ± 8,9	41,1 ± 8,2
Oligo 2	60,3 ± 12,2	23,2 ± 5,6	15,5 ± 6,2

#### Ejemplo 5. Regulación positiva de CD40 de células de linfoma linfocítico pequeño inducida por oligo 2

##### 1. Preparación de células de linfoma linfocítico pequeño humanas

Se aislaron células de linfoma linfocítico pequeño humanas de pacientes con los procedimientos descritos en el Ejemplo 4.

##### 2. Regulación positiva de CD40 de células de linfoma linfocítico pequeño inducida por oligo-2

Las células de linfoma linfocítico pequeño se incubaron con oligo 2 o 2006 o 2216 a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 con suero AB humano al 10 % (Hyclone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos. El oligo 2, 2006 o 2216 se diluyó en medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone). Se usó un volumen igual de la dilución (medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone)) como un control (medio).

El día 7 después de la incubación, las células se contaron y se tiñeron con anticuerpo de CD40-FITC (Becton Dickinson) (Molecular Probes Inc) (Lena Thyrell, *et al.* The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, N° 23, Ejemplar del 4 de junio, páginas 24152- 24162, 2004) durante 10 minutos. Las células de linfoma linfocítico pequeño teñidas con anticuerpo de CD40 se determinaron por citometría de flujo (B.D. FACS Aria). El resultado (Figura 3) mostró que el oligo 2 regula positivamente de forma significativa la expresión de CD40 en células de linfoma linfocítico pequeño, lo que indica que el oligo 2 puede usarse para tratar linfoma linfocítico pequeño regulando positivamente CD40 en las células. La regulación positiva del CD40 promueve la apoptosis de células de linfoma linfocítico pequeño, induce la inhibición del crecimiento de células de linfoma linfocítico pequeño y hace a las células de linfoma linfocítico pequeño más inmunogénicas para estimular la generación de CTL específicos de las células. El experimento se repitió con cinco muestras con resultados similares.

### **Ejemplo 6. Apoptosis de células de leucemia linfocítica/linfoblástica aguda de linfocitos B (B-ALL) humanas inducida por oligo-2**

#### 1. Preparación de células de B-ALL humanas

Se extrajeron muestras de sangre de pacientes con B-ALL (identificado patológicamente) no tratados (The First Hospital, Jilin University, China) después de obtener consentimiento informado por escrito aprobado. Se aislaron PBMC mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque (Pharmacia). Se purificaron células de B-ALL CD19+ CD10+ en PBMC usando el kit de aislamiento de linfocitos B (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) a > 95 % de células CD19+ CD10+ (células B-ALL). La preparación celular se realizó bajo las directrices de Miltenyi Biotec.

#### 2. Apoptosis de células de B-ALL inducida por oligo-2

Las células de B-ALL se incubaron con oligo 2 o 2216 a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 con suero AB humano al 10% (Hyclone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos. El oligo 2 o 2216 se diluyó en medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone). Se usó un volumen igual de la dilución (medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone)) como un control (medio).

El día 3, 5 y 7 después de la incubación, las células se contaron y se tiñeron con tetrametil-rodamina etil éster (TMRE) (Molecular Probes Inc) (Lena Thyrell, *et al.* The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, N° 23, Ejemplar del 4 de junio, páginas 24152-24162, 2004) durante 10 minutos. Las células de B-ALL positivas para TMRE (viables) y negativas para TMRE (apoptóticas) se determinaron por citometría de flujo (B.D. FACS Aria). El número de células de B-ALL viables se calculó multiplicando el recuento de células total con el porcentaje de células positivas para TMRE en cada punto temporal. El resultado mostró que el oligo 2 induce significativamente la apoptosis de células de B-ALL (Figura 4), lo que demuestra que el oligo 2 puede usarse para tratar B-ALL induciendo la apoptosis de células de B-ALL. El experimento se realizó con diez muestras de sangre de pacientes con B-ALL con resultados similares.

### **Ejemplo 7. La regulación positiva de CD40 en células de B-ALL por oligo-2**

#### 1. Preparación de células de B-ALL humanas

Se prepararon células de B-ALL humanas a partir de las muestras de sangre de pacientes con los procedimientos descritos en el Ejemplo 6.

Las células de B-ALL se incubaron con oligo 2 o 2216 a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 con suero AB humano al 10 % (Hyclone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos. El oligo 2 o 2216 se diluyó en medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone). Se usó un volumen igual de la dilución (medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone)) como un control (medio).

El día 3, 5, 7 después de la incubación, las células se contaron y se tiñeron con anticuerpo de CD40-FITC (Becton Dickinson) (Molecular Probes Inc) (Lena Thyrell, *et al.* The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, N ° 23, Ejemplar del 4 de junio, páginas 24152-24162, 2004) durante 10 minutos. Las células de B-ALL teñidas con anticuerpo de CD40 se determinaron por citometría de flujo (B.D. FACS Aria). El resultado (Figura 5) mostró que el oligo 2 regula positivamente de forma significativa la expresión de CD40 en células de B-ALL, lo que indica que el oligo 2 puede usarse para tratar B-ALL regulando positivamente CD 40 en las células. La regulación positiva del CD40 promueve la apoptosis de células de B-ALL, induce la inhibición del crecimiento de células de B-ALL y hace a las células de B-ALL más inmunogénicas para estimular la generación de CTL específicos de células de B-ALL. El experimento se repitió con diez muestras de los pacientes con B-ALL con resultados similares.

### **Ejemplo 8. La producción de IL-10 de B-CLL inducida por oligo 2**

#### 1. Preparación de células de B-CLL humanas

Se aislaron células de B-CLL humanas de pacientes con B-CLL con los procedimientos descritos en el Ejemplo 2.

2. La producción de IL-10 de B-CLL inducida por oligo 2

- 5 Las células de B-CLL se cultivaron con oligo 2 a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos por triplicado. El oligo 2 se diluyó en medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone). Se usó un volumen igual de la dilución (medio RPMI 1640 sin suero (Hyclone)) como un control (medio). Los sobrenadantes de cultivo se recogieron a las 72 horas o en los puntos temporales indicados y se evaluaron con respecto a IL-10 en sistema de inmunomatriz de MAP Fluorokine (R&D Systems). Los datos de los inventores mostraron que la activación con oligo 2 condujo a la producción de un alto nivel de IL-10 a partir de células de B-CLL (Figura 6). Se detectó un gran aumento de producción de IL-10 a las 6 horas, alcanzó un máximo a las 24 horas y permaneció a niveles altos durante el cultivo de 72 horas. Adicionalmente, los datos de los inventores mostraron además que la adición de rh-IL-10 exógeno (Schering Corp) en cultivos celulares de B-CLL indujo células de B-CLL apoptóticas de una manera dependiente de dosis de IL-10, que podrían bloquearse específicamente mediante anticuerpo anti-IL-10 (R&D Systems). Estos hallazgos demuestran que el oligo 2 puede usarse para tratar B-CLL induciendo la producción de IL-10, lo que provoca la apoptosis de células de B-CLL de una manera autocrina. El experimento se repitió usando al menos diez muestras de paciente con B-CLL.

**Ejemplo 9. El efecto de oligo 2 en la proliferación de PBMC normales humanas**

- 20 Se aislaron PBMC humanas de capas leucocitarias de donantes de sangre normal (The Blood Center of Jilin Province, China) mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Pharmacia). La viabilidad de las PBMC fue del 95-99 % como se determinó mediante exclusión con azul de tripano.
- 25 Las PBMC (6x10<sup>5</sup>/pocillo) se sembraron en placas de fondo en U de 96 pocillos (Costar) y se cultivaron con o sin el oligo 2 (6 µg/ml) por triplicado durante 36 horas, seguido de aplicación por pulsos de [<sup>3</sup>H] timidina (New England Nuclear, Boston, MA) durante 16 horas. Las células se recogieron en filtros de fibra de vidrio y se detectaron en un contador de centelleo. La proliferación celular se expresó como SI (índice de estimulación) (a partir de pocillos por triplicado). Se muestran los datos de cinco muestras de sangre normales. Se usaron 2006 y 2216 en los controles.
- 30 Los resultados demostraron que el oligo 2 podría estimular que las PBMC proliferaran de forma obvia (Figura 7), lo que indica que el oligo 2, en lugar de inducir la apoptosis, es estimulador de la proliferación para PBMC humanas normales y no es tóxico para las células cultivadas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> Changchun Huapu Biotechnology Co.,Ltd
- <120> Un oligonucleótido o su homólogo funcional, una composición que lo comprende y un método para tratar neoplasia de linfocitos B
- 40 <130> IP060010
- <160> 3
- 45 <170> PatentIn versión 3.1
- <210> 1
- <211> 21
- <212> ADN
- 50 <213> Secuencia artificial
- <400> 1
- tcgtcgacgt cgttcgttct c 21
- 55 <210> 2
- <211> 24
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 60 <400> 2
- tcgtcgtttt gtcgtttgt cgtt 24
- <210> 3
- <211> 20
- <212> ADN
- 65 <213> Secuencia artificial

# ES 2 433 129 T3

<400> 3  
gggggacgat cgtcgggggg 20

## REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1 para uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B en un sujeto mamífero.
- 5 2. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el oligonucleótido es para inducir apoptosis de células neoplásicas de linfocitos B.
- 10 3. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el oligonucleótido es para regulación positiva de CD40 en células neoplásicas de linfocitos B.
- 15 4. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 para uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el oligonucleótido es para estimular células neoplásicas de linfocitos B para producir IL-10.
- 20 5. El oligonucleótido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde dicha neoplasia de linfocitos B es leucemia de linfocitos B, linfoma de linfocitos B o mieloma.
- 25 6. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicha leucemia de linfocitos B es leucemia linfocítica crónica de linfocitos B o leucemia linfocítica aguda de linfocitos B.
- 30 7. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho linfoma de linfocitos B es linfoma linfocítico pequeño.
- 35 8. El oligonucleótido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, donde dicho sujeto mamífero es un sujeto humano.
9. El oligonucleótido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que es para administración por vía entérica, vía parenteral o vía tópica o por inhalación.
- 40 10. Un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1 para uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B, que está comprendido dentro de una composición farmacéutica.
- 45 11. Un método para inducir apoptosis de células neoplásicas de linfocitos B *in vitro*, que comprende poner en contacto dichas células neoplásicas de linfocitos B con una composición que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1.
- 50 12. Un método para potenciar la expresión de CD40 en células neoplásicas de linfocitos B, que comprende poner en contacto dichas células neoplásicas de linfocitos B *in vitro* con una composición que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1.
- 55 13. Un método para inducir células neoplásicas de linfocitos B para producir IL-10, que comprende poner en contacto dichas células neoplásicas de linfocitos B *in vitro* con una composición que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1.
- 60 14. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que dichas células neoplásicas de linfocitos B son células de leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL), o células de leucemia linfocítica aguda de linfocitos B (B-ALL), o células de linfoma linfocítico pequeño.
- 65 15. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de neoplasia de linfocitos B que comprende: (1) un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1 y (2) un agente anti-neoplasia de linfocitos B.
16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicho agente anti-neoplasia de linfocitos B se selecciona de productos quimioterapéuticos, productos inmunoterapéuticos o agentes usados en radioterapia.
17. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, en la que dichos productos quimioterapéuticos se seleccionan del grupo que consiste en: fludarabina, pentostatina, vincristina, ciclofosfamida, prednisona, CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona) y CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona).
18. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, donde dichos productos inmunoterapéuticos son un anticuerpo anti-CD20.

19. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, en la que dicha radioterapia es radiación externa o un tratamiento con anticuerpo radiomarcado.

5 20. El uso de un oligonucleótido que tiene la secuencia de SEC ID N° 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de neoplasia de linfocitos B.

21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la neoplasia de linfocitos B se selecciona de leucemia de linfocitos B, linfoma de linfocitos B o mieloma.

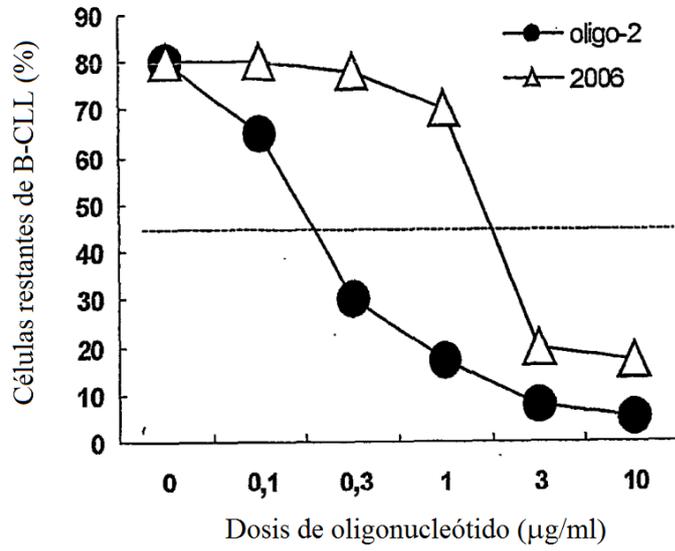


Fig.1

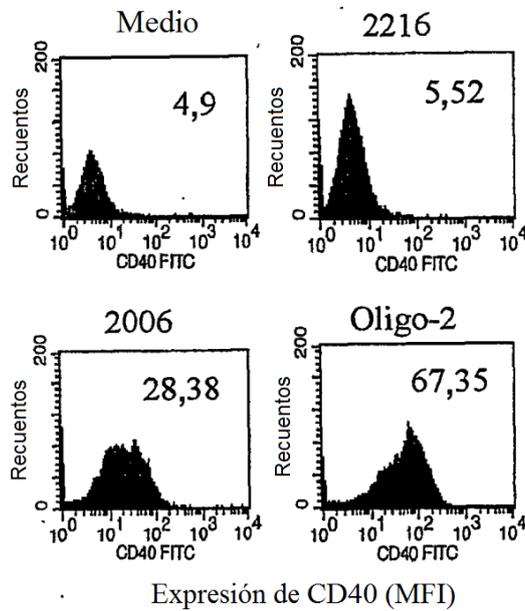


Fig.2

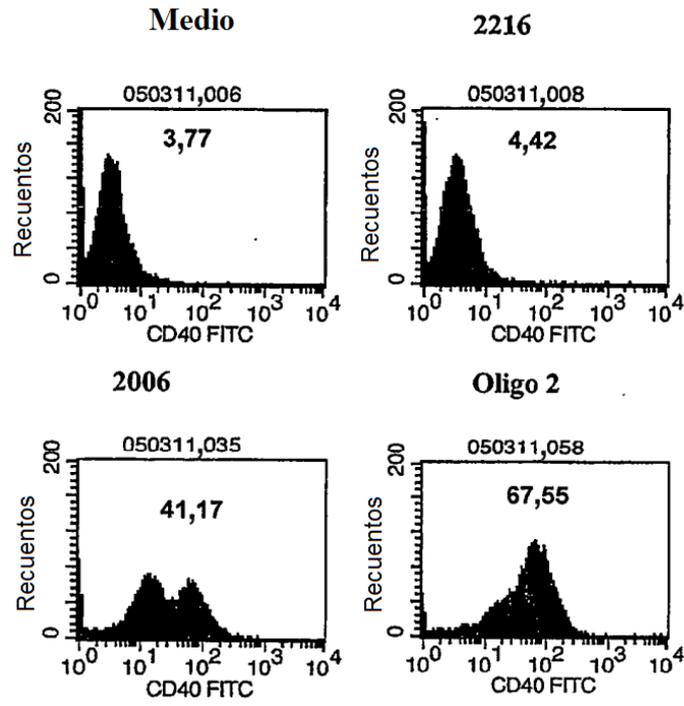


Fig.3

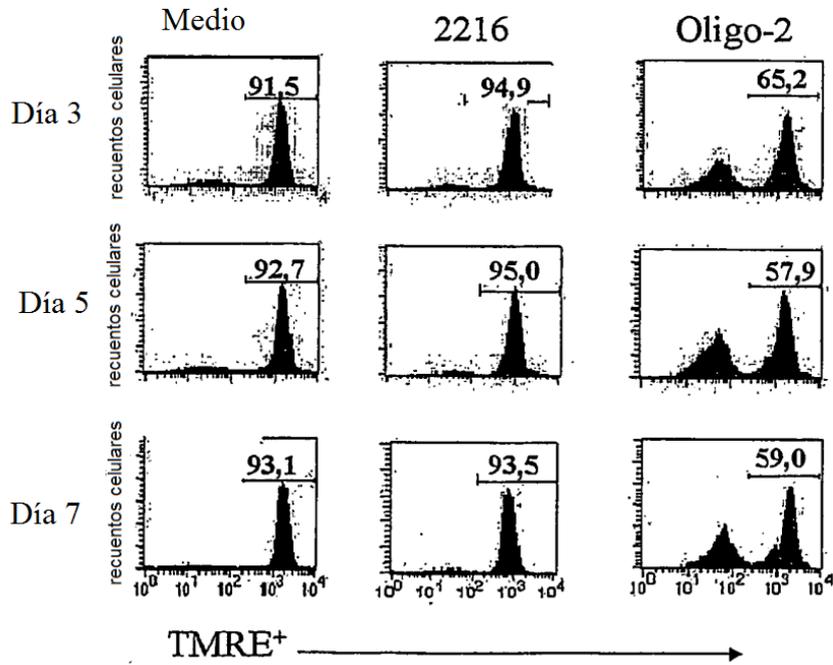


Fig.4

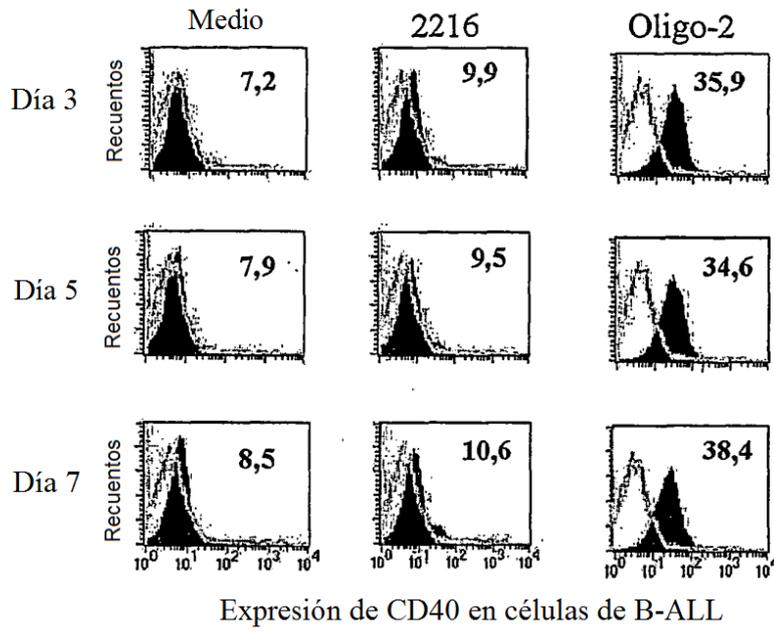


Fig.5

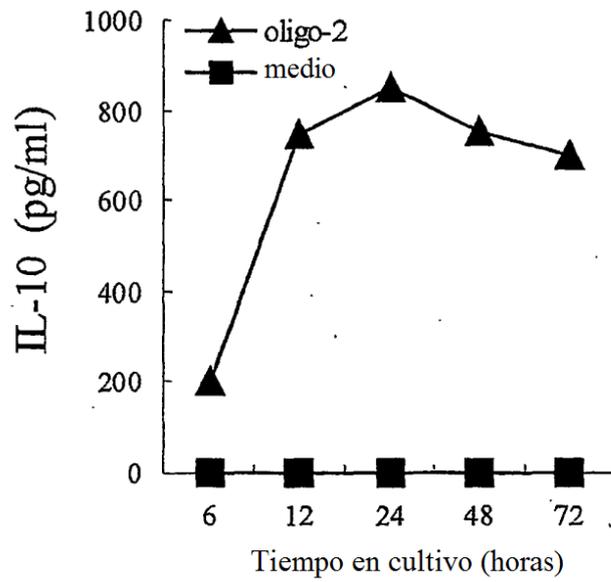


Fig.6

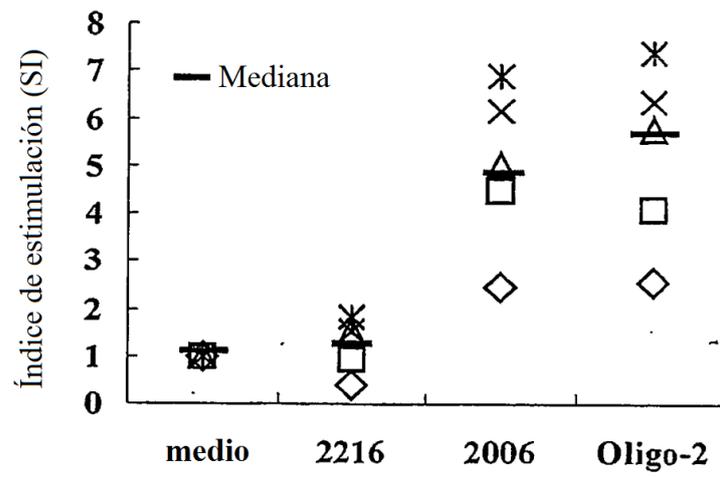


Fig.7