

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 442 462**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/117** (2010.01)

**A61P 35/02** (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 06705636 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2013 EP 1883647**

54 Título: **Oligonucleótido y composiciones que comprenden los mismos para tratar la neoplasia de células B**

30 Prioridad:

**17.05.2005 CN 200510069576**

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

**11.02.2014**

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 N;  
BAO, MU-SHENG y  
YU, YONG-LI**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 442 462 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 comprenden los mismos para tratar la neoplasia de células B

5 **CAMPO TÉCNICO**

La presente descripción proporciona nueve oligonucleótidos con las secuencias como se muestra en sec. con núm. de ident.: 1 a 9, o sus homólogos funcionales, una composición que comprende los mismos y un método para tratar la neoplasia de células B por medio del uso de oligonucleótidos para inducir apoptosis en células neoplásicas de células B, regular positivamente el CD40 en células neoplásicas de células B y estimular células neoplásicas de células B para producir IL-10. Los oligonucleótidos o sus homólogos funcionales pueden usarse individualmente o juntos, o usarse en combinación con quimioterapéuticos, inmunoterapéuticos y radiación para tratar la neoplasia de células B.

15 **ANTECEDENTES**

Basado en el sistema de clasificación WHO (American Journal of Surgical Pathology, 1997, 21(1): 114-121), las malignidades linfoides se agrupan en tres clases fundamentales: neoplasia de células B, neoplasia de células T/células asesinas naturales (NK) y linfomas de Hodgkin.

20 La neoplasia de células B se divide más aun en dos grupos: neoplasia de células B precursoras y neoplasia de células B periféricas. La neoplasia de células B precursoras incluye la leucemia linfoblástica aguda de precursores B (leucemia linfoblástica aguda de células B, B-ALL) / linfoma linfoblástico (LBL). La neoplasia de células B periféricas incluye la leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), linfoma de linfocitos pequeños, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmacítico/inmunocitoma, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma folicular cutáneo, linfoma de células B de zona marginal extranodal de tipo MAIT, linfoma de células B de zona marginal nodal (+/- células B monocitoides), linfoma de zona marginal esplénico (+/- linfocitos velludos), leucemia de células peludas, mieloma de células plasmacitomalplasma, linfoma de células B grandes difuso, linfoma de células B grandes del mediastino (tímico), linfoma de células B grandes intravascular, linfoma primario de cavidades y linfoma de Burkitt.

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

35 El linfoma de linfocitos pequeños es una neoplasia de células B. Las células de linfoma de linfocitos pequeños expresan CD19, CD5 y CD23 (Catherine Thieblemont, y otros Blood. 2004;103:2727-2737).

En dependencia de la neoplasia de células B diagnosticada, las opciones de tratamiento actuales son la quimioterapia, la radioterapia y la inmunoterapia.

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

50 El CD40 además se expresa en las células neoplásicas de células B. Se demostró que mejorar la expresión de CD40 promueve la apoptosis de células neoplásicas de células B (Peter Chu, y otros. PNAS, Marzo 19, 2002, vol. 99, núm: 6 3854-3859; Frank Dicker, y otros. BLOOD, 15 Abril 2005 volumen 105, Número 8: 3193-3198).

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

60 Se informó que promover la expresión de CD40 en células neoplásicas de células B mejoró la antigenicidad de las células neoplásicas de células B y consecuentemente estimuló la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos por estas células. Los CTL pueden matar eficientemente células neoplásicas de células B (Dilloo D, y otros. Blood. 1997;90:1927-1933; Kato K, y otros J Clin Invest. 1998;101:1133-1141; Wierda WG, y otros Blood. 2000;96:2917-2924; Takahashi S, y

otros Hum Gene Ther. 2001;12:659-670; Takahashi S, y otros Cancer Gene Ther.2001;8:378-387). En presencia de CD40L, los linfocitos T CD4 citotóxicos pueden matar las células de leucemia linfocítica crónica de células B células que expresan CD40 (Frank Dicker, y otros. Blood, 15 Abril 2005 Vol. 105, Núm. 8: 3193-3198). La interacción de CD40L y CD40 en las células de linfoma de Burkett puede promover que las células presenten antígenos tumorales a CTLs específicos (Khanna, R. y otros. 1997. J. Immunol. 159:5782). Experimentos in vivo y ensayos clínicos además demostraron que la activación de CD40 puede mejorar la inmunogenicidad de la leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) y consecuentemente inducir la generación de CTLs específicos por estas células (Kato, K., y otros. 1998.J. Clin. Invest. 101:1133; Wierda, W. G., y otros 2000. Blood 96: 2917).

En conjunto, estos datos indican que aumentar la expresión de CD40 en células neoplásicas de células B puede estimular la inmunidad anti-tumoral contra la neoplasia de células B. La inmunidad anti-tumoral incluye pero no se limita a lo siguiente:

1. promover la apoptosis de células neoplásicas de células B;
2. inhibir el crecimiento de células neoplásicas de células B;
3. mejorar la inmunogenicidad de células neoplásicas de células B y por lo tanto estimular la generación de CTLs específicas por las células.

La interleucina-10 (IL-10) es una citocina homodimérica producida por ciertas células T, monocitos, macrófagos y algunas de las células neoplásicas desarrolladas a partir de células B, células T o células NK (Kitabayashi y otros, 1995; Masood y otros, 1995; Sjoberg y otros, 1996; Beatty y otros, 1997; Boulland y otros, 1998; Jones y otros, 1999). La actividad de la IL-10 está mediada por su receptor de superficie celular específico expresado en las células presentadoras de antígeno, células linfocitos B y células de leucemia linfocítica crónica (B-CLL). Se encontró que la adición de IL-10 exógena inhibió la proliferación de células B-CLL aisladas frescas a partir de pacientes (Jesper Jurlander, Chun-Fai Lai, Jimmy Tan, y otros. Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. Blood, Vol. 89, Núm. 11 (Junio 1), 1997: págs. 4146-4152). Además se reportó que la IL-10 inhibió la proliferación de células B-CLL y mejoró la apoptosis de células 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). La estimulación de las propiedades anticáncer de la IL-10 se discutió en una revisión a partir de la cual se especula que la sobre-expresión de la IL-10 dentro del microambiente tumoral puede catalizar el rechazo inmunológico (Simone Mocellin, Francesco M. Marincola y Howard A. Young. In interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. Journal of Leukocyte Biology. 2005; 78:1043-1051).

## RESUMEN DE LA INVENCION

En un aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 1 para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B en un sujeto mamífero.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. núm.: 1 para usar en el tratamiento de la neoplasia de células 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 células B in vitro, que comprende poner en contacto dichas células neoplásicas de células B con una composición que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para mejorar la expresión de CD40 en células neoplásicas de células B, que comprende poner en contacto dichas células neoplásicas de células B in vitro con una composición que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un método para inducir células neoplásicas de células B para producir IL-10, que comprende poner en contacto dichas células neoplásicas de células B in vitro con una composición que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 1.

En un aspecto adicional, la invención proporciona una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B que comprende: (1) un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 1 y (2) un agente anti-neoplasia de células B.

En un aspecto adicional, la invención se relaciona con el uso de un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la neoplasia de células B.

La presente descripción proporciona nueve oligonucleótidos de señalados además como Oligo1, Oligo3, Oligo4, Oligo5,

Oligo6, Oligo7, Oligo8, Oligo9, Oligo10 con las secuencias que se muestran en las sec. con núms. de ident. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 respectivamente y sus homólogos funcionales. Los oligonucleótidos o sus homólogos funcionales pueden tener una modificación en el esqueleto fosfato que es una modificación fosforotioato o fosforoditioato parcial o completa. Los oligonucleótidos o sus homólogos funcionales pueden tener modificaciones químicas o tener sustituciones con bases raras. Los oligonucleótidos o sus homólogos funcionales pueden ser partes funcionales de cualquier otro fragmento de ADN o clonarse en un plásmido, vector bacteriano, vector viral o vacuna de ADN respectivamente. Los oligonucleótidos con las secuencias de la sec. con núm. de ident.:1-9 se pueden modificar por la adición de una o más bases (preferentemente 1 a 10 bases) a cada uno de sus extremos o por el cambio de una o más bases en ellos. Aquellos con experiencia en la técnica pueden determinar usar los oligonucleótidos con las secuencias de sec. con núm. de ident.:1-9 o sus homólogos funcionales individualmente o juntos, o usar fragmentos de ADN que comprenden los oligonucleótidos con las secuencias (sec. con núm. de ident.:1-9) respectivamente para alcanzar el objetivo de la presente descripción basados en el buen conocimiento de la técnica y las enseñanzas de la presente descripción.

Se describe además un método para el tratamiento de la neoplasia de células B por medio del uso de los oligonucleótidos o sus homólogos funcionales de la presente descripción individualmente o juntos o por medio del uso de la composición que comprende los mismos en un sujeto. El sujeto es un humano o animal. La neoplasia de células B incluye pero no se limita a leucemia de células B, linfoma de células B y mieloma.

Se describe además un método para el tratamiento de la neoplasia de células B por medio del uso de los oligonucleótidos o sus homólogos funcionales de la presente descripción individualmente o juntos o por medio del uso de la composición que comprende los mismos por la inducción de la apoptosis de células neoplásicas de células B.

Se describe además un método para el tratamiento de la neoplasia de células B por medio del uso de los oligonucleótidos o sus homólogos funcionales de la presente descripción individualmente o juntos o por medio del uso de la composición que comprende los mismos por la regulación positiva de CD40 en las células neoplásicas de células B.

Se describe además un método para el tratamiento de la neoplasia de células B por medio del uso de los oligonucleótidos o sus homólogos funcionales de la presente descripción individualmente o juntos o por medio del uso de la composición que comprende los mismos por la estimulación de las células neoplásicas de células B para producir IL-10.

La presente descripción además proporciona una composición que comprende cantidades terapéuticamente eficaces de los oligonucleótidos o sus homólogos funcionales de la presente descripción solos o con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. La composición se administra a través de administración enteral, parenteral y tópica o por inhalación.

Se describe además un método para el tratamiento de la neoplasia de células B, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los oligonucleótidos o sus homólogos funcionales de la presente descripción individualmente o juntos o una composición que comprende los mismos o con al menos uno de los agentes anti-neoplasia de células B que incluye quimioterapéuticos, inmunoterapéuticos y los agentes usados en radioterapia.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

##### **Figura-1. Efecto de los oligonucleótidos en la regulación positiva de CD40 en las células B-CLL**

Las células B-CLL se incubaron con o sin los oligonucleótidos por 7 días y después se tiñeron con anticuerpo FITC-CD40 para el análisis de la expresión de CD40 por medio del uso de citometría de flujo. El nivel de expresión se indicó con el número de MFI.

##### **Figura-2. Efecto de los oligonucleótidos sobre la regulación positiva de CD40 en células de linfoma de linfocitos pequeños**

Las células de linfoma de linfocitos pequeños se incubaron con o sin los oligonucleótidos. En el día 7, las células se tiñeron con anticuerpo FITC-CD40 para el análisis de la expresión de CD40 por medio del uso de citometría de flujo. El nivel de expresión se indicó con el número de MFI.

##### **Figura 3. Efecto de los oligonucleótidos sobre la proliferación de PBMC humano normales**

Los PBMCs humanos normales se cultivaron con o sin los oligonucleótidos y después se incorporaron con [<sup>3</sup>H] timidina para determinar la proliferación de las células. La proliferación de las células se expresó como cpm.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

##### Definiciones

En la presente invención los siguientes términos tendrán los siguientes significados:

Un "oligonucleótido" significa múltiples nucleótidos (es decir moléculas que comprenden un azúcar (por ejemplo desoxirribosa) enlazada a un grupo fosfato y a una base orgánica intercambiable). Existen cuatro bases orgánicas citosina (C), timina (T), adenina (A) y guanina (G). El oligonucleótido se puede sintetizar mediante un sintetizador de oligonucleótidos automático disponible en el mercado o prepararse a partir de secuencias de ácidos nucleicos existentes por medio del uso

de técnicas conocidas.

Una "modificación del esqueleto" de oligonucleótido significará que un oligonucleótido puede tener un esqueleto fosfato modificado por fosforotioato (es decir al menos uno de los oxígenos del fosfato se reemplaza por sulfuro) u otro esqueleto modificado.

Una "modificación química" de oligonucleótido significará la modificación por el uso de grupos activos del nucleótido o la creación de análogos de nucleótidos. Las modificaciones pueden ocurrir ya sea durante o después de la síntesis del oligonucleótido. Durante la síntesis, las bases modificadas (que incluyen pero no se limitan a análogos de timidina) se pueden incorporar internamente o en el extremo 5'. Después de la síntesis, la modificación se puede llevar a cabo por medio del uso de grupos activos (vía un modificador amino, vía los grupos hidroxilo 3' o 5', o vía el grupo fosfato).

Una "neoplasia de células B" significará una enfermedad que se desarrolla a partir de la proliferación anormal de células del linaje de linfocitos B. Las neoplasias de células B se pueden agrupar en leucemia de células B, linfoma de células B y mieloma (plasmacitoma/mieloma de células plasmáticas). La leucemia de células B incluye la leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), leucemia linfoblástica aguda B precursora (leucemia linfocítica aguda de células B, B-ALL), leucemia prolinfocítica de células B y leucemia de células peludas. El linfoma de células B incluye el linfoma de linfocitos pequeños, linfoma linfoplasmacítico/inmunocitoma, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma folicular cutáneo, linfoma de células B de zona marginal extranodal de tipo MA LT, linfoma de células B de zona marginal nodal (+/- células B monocitoides), linfoma de zona marginal esplénico (+/- linfocitos velludos), linfoma de células B grandes difuso, linfoma de células B grandes del mediastino (tímico), linfoma de células B grandes intra vascular, linfoma primario de cavidades y linfoma de Burkitt.

Un "sujeto" significará un mamífero que incluye pero no se limita a humano, mono, perro, gato, caballo, vaca, cerdo, chivo, oveja, ratón y rata. El oligonucleótido de la presente invención se puede administrar a un sujeto con neoplasia de células B.

Un "agente anti-neoplasia de células B" significará un agente que se usa para tratar la neoplasia de células B en un sujeto. El agente incluye el oligonucleótido de la presente invención, quimioterapéuticos, inmunoterapéuticos y los agentes usados en radioterapia. El oligonucleótido de la presente invención se puede administrar antes de, junto con o después de la administración de uno o más agentes anti-neoplasia de células B para lograr un efecto sinérgico para tratar una neoplasia de células B.

Los "quimioterapéuticos" significarán los quimioterapéuticos que tratan la neoplasia de células B en combinación con el oligonucleótido de la presente invención. El oligonucleótido de la presente invención se puede usar con uno o más quimioterapéuticos en el tratamiento de la neoplasia de células B. Los quimioterapéuticos incluyen, pero no se limitan a agentes alquilantes tales como ciclofosfamida o clorambucil, vinca alcaloides (por ejemplo, vincristina y vinblastina), procarbazona, metotrexato, prednisona, antraciclina, L-asparaginasa, análogos de pirimidina (por ejemplo, fludarabina monofosfato, 2-clorodeoxiadenosina y pento statina), citosina, arabinósido, cisplatino, etopósido e ifosfamida. El oligonucleótido de la presente invención se puede usar con una o más combinaciones de quimioterapéuticos en la quimioterapia. Las combinaciones incluyen, pero no se limitan a 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 estándar MOPP), ProMACE-CytaBOM (prednisona, doxorubicina, ciclofosfamida, etopósido, citarabina, bleomicina, vincristina, metotrexato y leucovorina), MA-COP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dosis fijas de prednisona, bleomicina y leucovorina), IMVP-16 (ifosfamida, metotrexato y etopósido), MIME (metil-gag, ifosfamida, metotrexato y etopósido), DHAP (dexametasona, alta dosis de citarabina y cisplatino), ESHAP (etopósido, metilprednisolona, HD citarabina, cisplatino), CEPP(B) (ciclofosfamida, etopósido, procarbazona, prednisona y bleomicina), CAMP (lomustina, mitoxantrona, citarabina y prednisona), CHOP más bleomicina, metotrexato, procarbazona, mostaza de nitrógeno, arabinósido de citosina y etopósido. MOPP (meclizamina, mostaza de nitrógeno), vincristina (Oncovin), procarbazona y prednisona), ABVD (por ejemplo, adriamicina, bleomicina, vinblastina y dacarbazina), CHiVPP (clorambucil, vinblastina, procarbazona y prednisona), CABS (lomustina, doxorubicina, bleomicina y streptozotocina), MOPP más ABVD, MOPP más ABV (doxorubicina, bleomicina y vinblastina) o BCVPP (carmustina, ciclofosfamida, vinblastina, procarbazona y prednisona) y CAP (ciclofosfamida, doxorubicina y prednisona).

Los "inmunoterapéuticos" significarán los inmunoterapéuticos que tratan la neoplasia de células B en combinación con el oligonucleótido de la presente invención. El oligonucleótido de la presente invención se puede usar con uno o más

5 inmunoterapéuticos en el tratamiento de la neoplasia de células B. Los inmunoterapéuticos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos anti-CD20. El anticuerpo CD20 incluye inmunoglobulinas y sus fragmentos que son específicamente reactivos con una proteína CD20 en la superficie celular de células neoplásicas de células B. Los anticuerpos CD20 pueden ser anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos bi-específicos y anticuerpos humanizados. Una "CD20" es una proteína de membrana de células B (Tedder y otros, *Immunology Today* 15: 450-454 (1994)) y se expresa en la célula B normal y neoplásica (John C. Byrd, y otros *J Clin Oncol* 2001; 19: 2165-2170; Huhn D, y otros, *Blood* 2001, 98: 1326-1331).

10 Un "portador farmacéuticamente aceptable" denota uno o más rellenos sólidos o líquidos, diluyentes o sustancias encapsulantes que son adecuadas para administrar el oligonucleótido de la presente invención a un sujeto. El portador puede ser orgánico, natural o sintético. El portador incluye cualquiera y todas las soluciones, diluyentes, solventes, medios de dispersión, liposomas, emulsiones, recubrimientos, agentes anti-bacterianos y anti-fúngicos, isotónicos y agentes que retardan la absorción, y cualquier otro portador adecuado para administrar el oligonucleótido de la presente invención y su uso es bien conocido en la técnica.

15 La "cantidad terapéuticamente eficaz" del oligonucleótido de la presente invención se referirá a una dosis usada para alcanzar un resultado deseado de tratamiento de la neoplasia de células B en un sujeto. La dosis se puede determinar por técnicas estándar bien conocidas para aquellos con experiencia en la técnica y pueden variar en dependencia de factores que incluyen, pero no se limitan al tamaño o/y salud general del sujeto o la severidad de la enfermedad. La introducción del oligonucleótido de la invención se puede llevar a cabo como un único tratamiento o sobre una serie de tratamientos. Las dosis del sujeto del oligonucleótido de la presente invención para la administración se encuentran en el intervalo desde aproximadamente 1 µg a 100 mg por administración. Sin embargo, las dosis para el tratamiento de la neoplasia de células B se pueden usar en un intervalo de 10 a 1,000 veces más altas que las dosis escritas anteriormente. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar el efecto terapéutico óptimo por aquellos con experiencia en la técnica.

20 La "ruta" para administrar el oligonucleótido de la presente invención significará la administración enteral, parenteral y tópica o inhalación. El término "enteral" como se usa en la presente descripción incluye la administración oral, gástrica, intestinal y rectal. El término "parenteral" incluye la administración intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. El término "tópico" denota la aplicación del oligonucleótido externamente a la epidermis, a la cavidad bucal y dentro de la oreja, ojo y nariz.

25 Una "composición farmacéutica" significará la composición que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz del oligonucleótido con o sin un portador farmacéuticamente aceptable. La composición incluye pero no se limita a soluciones acuosas o salinas, partículas, aerosoles, pastillas, gránulos, polvos, comprimidos, comprimidos recubiertos, (micro) cápsulas, supositorios, jarabes, emulsiones, suspensiones, cremas, gotas y otras composiciones farmacéuticas adecuadas para usar en una variedad de sistemas de administración de fármacos. Las composiciones son adecuadas para usar en inyección, oral, bucal, rectal y vaginal, inhalación y aplicación en depósito. En todos los casos, la composición debe ser estéril y estable bajo condiciones de fabricación y almacenamiento y preservarse contra la contaminación microbiana. Para inyección, la composición incluirá soluciones o dispersiones acuosas y polvos para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables. "Pulvo" es esta invención y se refiere a una composición que contiene partículas sólidas finamente dispersadas que contienen el oligonucleótido. El polvo se puede formular con otros portadores farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, agua, PBS, salina y otros amortiguadores farmacéuticamente aceptados) antes de usar. Las soluciones se pueden preparar al incorporar el oligonucleótido en uno o más solventes adecuados y otros ingredientes requeridos. Las dispersiones se pueden preparar al incorporar el oligonucleótido dentro de un vehículo, que contiene un medio de dispersión (por ejemplo, glicerina, polietilenglicoles líquidos y aceites) y los otros ingredientes requeridos. Para la administración oral, la composición se formulará con portadores comestibles para formar comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, siropes, pastas, suspensiones y similares. Para la administración bucal, la composición será comprimidos o pastillas de manera convencional. Para la inhalación, la composición será un aerosol atomizado a partir del paquete presurizado o un nebulizador o un polvo seco y se puede seleccionar por uno con habilidades en la técnica. El oligonucleótido además se puede formular como una composición farmacéuticamente aceptable para aplicaciones rectales o vaginales y para aplicación de depósito. El oligonucleótido en la composición se puede usar solo o en combinación con uno o más agentes que incluyen pero no se limitan a quimioterapéuticos, inmunoterapéuticos y un ligando reconocido por un receptor específico o molécula de la célula objetivo. El oligonucleótido en combinación con otro agente pueden ser composiciones separadas y usarse como las siguientes: (1) el oligonucleótido se mezcla con un segundo agente antes de la administración; (2) el oligonucleótido y un segundo agente se administran a un sujeto en diferentes momentos; (3) el oligonucleótido y un segundo agente se administran a diferentes sitios de un sujeto. Adicionalmente, la composición puede contener plásmidos, vectores bacterianos, vectores virales y vacunas de ácidos nucleicos que portan la secuencia del oligonucleótido de la presente invención.

**EJEMPLOS**

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención. Se proporcionan además ejemplos comparativos.

**Ejemplo 1 Síntesis del oligonucleótido**

5

Se diseñaron y sintetizaron los oligonucleótidos con las siguientes secuencias y nomenclaturas:

- Oligo 1: 5'-TCgACgTTCgTCgTTCgTCgTTC-3' (indicado en la sec. con núm. de ident.:1)
- Oligo 3: 5'-TCggCACgCgACgTgCTggCCgTCgTTTCC-3' (indicado en la sec. con núm. de ident.:2)
- Oligo 4: 5'-TCgTCgTCgTCgTTgTCgTTgggg-3' (indicado en la sec. con núm. de ident.:3)
- Oligo 5: 5'-TCgTTgCCgTCgg-3' (indicado en la sec. con núm. de ident.:4)
- Oligo 6: 5'-TCgTCgggTgCgACgTCgCAGggggg-3' (indicado en la sec. con núm. de ident.:5)
- Oligo 7: 5'-TCgTCgggTgCgATCgCAGggggg-3' (indicado en la sec. con núm. de ident.:6)
- Oligo 8: 5'-TCgTCgggTgCATCgATgCAGggggg-3' (indicado en la sec. con núm. de ident.:)
- Oligo 9: 5'-tcgtcgggtgcgacgtcgca-3' (indicado en la sec. con núm. de ident.:8)
- Oligo 10: 5'-TCggggACgATCgTCggggg-3' (indicado en la sec. con núm. de ident.:9)

10

15

Para analizar las funciones de los Oligos anteriores, se sintetizaron además dos oligonucleótidos de control de 2006 con la secuencia de 5'-tcgtcgttttgcgttttgcgtt-3' y 2216 con la secuencia de 5'-gggggacgatcgtcggggg-3'.

20

Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en la compañía Sangon Biotech (Shanghai, China), se probaron para endotoxinas por medio del uso del ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (Associates of Cape Cod, Inc) y se manipularon en reactivos libres de pirógenos. 2006 (J Immunol 2000; 164: 1617) es un oligonucleótido bien estudiado que activa fuertemente las células B normales. 2216 (Eur J Immunol 2001; 31:2154) es otro oligonucleótido bien estudiado que induce altas cantidades de interferón tipo I en las células dendríticas plasmacitoides.

25

Los métodos para sintetizar el oligonucleótido son bien conocidos para aquellos con experiencia en la técnica y entre otros, se usa generalmente la síntesis en fase-sólida. Específicamente, en el proceso de la síntesis, el soporte sólido usado es la perla de cristal poroso controlado (CPG). Esta perla tiene una superficie con agujeros y canales y es en estos que se une el nucleótido protegido. La síntesis del oligonucleótido comienza con el nucleótido más 3' y procede 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.

30

**Etapas 1. Desprotección**

35

El grupo protector en el nucleósido protegido unido a una perla de CPG (cristal de poro controlado) se retira mediante ácido tricloroacético (TCA) que deja un grupo hidroxilo 5' reactivo.

**Etapas 2. Activación**

40

En esta etapa, el tetrazol ataca el nucleósido fosforamídita de acoplamiento lo que forma un intermediario tetrazolil fosforamídita.

**Etapas 3. Acoplamiento**

45

El intermediario tetrazolil fosforamídita reacciona con el grupo hidroxilo del recipiente y se forma el enlace 5' a 3'. El tetrazol se reconstituye y el proceso continúa.

**Etapas 4. Recubrimiento**

50

En esta etapa, un agente acetilante compuesto de anhídrido acético y N-metilimidazol se usa para bloquear el grupo hidroxilo reactivo en el extremo más 5' del oligonucleótido para evitar la falla de acoplamiento.

**Etapas 5. Estabilización**

55

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

A continuación de esta etapa final el ciclo se repite para cada nucleótido en la secuencia. Después de completada la síntesis, la molécula de ADN de simple hebra se purifica por métodos tales como HAP, PAGE, HPLC, C18 y OPC.  
Ejemplo 2 Apoptosis de células B-CLL humanas inducida por los oligonucleótidos

5

1. Preparación de células B-CLL humanas

Se extrajeron muestras de sangre a partir de pacientes de B-CLL no tratados (patológicamente identificados) (El Primer Hospital, Universidad Jilin, China) después de obtener el consentimiento informado escrito aprobado. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) se aíslan por centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Pharmacia). Las células B-CLL CD5+CD19+CD23+ en PBMCs se purificaron por medio del uso del kit de aislamiento de células B (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) para > 95% de las células CD5+CD19+ CD23+ (células B-CLL). La preparación de las células se realizó bajo la guía de Miltenyi Biotec.

15 2. Apoptosis de las células B-CLL humanas inducida por los oligonucleótidos

Las células B-CLL se incubaron con Oligo1, Oligo3, Oligo4, Oligo5, Oligo6, Oligo7, Oligo8, Oligo9, Oligo10, 2006 o 2216 respectivamente a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 10% de suero AB humano (HyClone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos. Los oligonucleótidos se diluyeron en medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone). Un volumen igual del diluido (medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone)) se usó como un control (Medio).

En los días 3, 5 y 7 después de la incubación, las células se contaron y tiñeron con tetrametil-rodamina etiléster (TMRE) (Molecular Probes Inc)(Lena Thyrell, y otros. The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, Núm. 23, Edición de Junio 4, págs. 24152-24162, 2004) por 10 minutos. Las células B-CLL TMRE positivas (viables) y TMRE-negativas (apoptóticas) se determinaron por citometría de flujo (B.D. FACS Aria). El número de células B-CLL viables se calculó por la multiplicación del conteo de células total con el porcentaje de células TMRE-positivas en cada punto de tiempo. El experimento se repitió con diez muestras de sangre a partir de pacientes B-CLL y el resultado promediado (n=10) mostró que los oligonucleótidos significativamente indujeron la apoptosis de las células B-CLL (Tabla-1).

30

**Tabla-1. Apoptosis de células B-CLL inducida por los oligonucleótidos**

Células de leucemia linfocítica crónica de células B viables (%) (n=10)			
Grupos	Tiempo de incubación (día)		
	3	5	7
Oligo 1	55.7	27.7	19
Oligo 3	85.5	37.3	31.6
Oligo 4	60.1	38.8	27.5
Oligo 5	58.1	38.1	23.2
Oligo 6	52.3	34.9	31.7
Oligo 7	59.6	38.4	30.2
Oligo 8	51.1	34.2	29.6
Oligo 9	52.8	37.9	24.3
Oligo 10	54.6	35.4	28.3
Medio	82.2	79.5	81.3
2006	66.5	44.4	40.2
2216	67.7	57.7	50.7

**Ejemplo 3 Regulación positiva de CD40 en células B-CLL humanas por los oligonucleótidos**

35 1. Preparación de células B-CLL humanas

Las células B-CLL humanas se aislaron a partir de pacientes B-CLL con los procedimientos descritos en el ejemplo 2.



2. Regulación positiva de CD40 en células B-CLL humanas por los oligonucleótidos

Las células B-CLL se incubaron con Oligo1, Oligo3, Oligo4, Oligo5, Oligo6, Oligo7, Oligo8, Oligo9, Oligo10, 2006 o 2216 respectivamente a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 10% de suero AB humano (HyClone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos. Los oligonucleótidos se diluyeron en medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone). Un volumen igual del diluido (medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone)) se usó como un control (Medio).

En el día 7 después de la incubación, las células se contaron y tiñeron con anticuerpo FITC-CD40 (Becton Dickinson) (Molecular Probes Inc)(Lena Thyrell, y otros. The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, Núm. 23, Edición de Junio 4, págs. 24152-24162, 2004) por 10 minutos. Las células B-CLL teñidas con el anticuerpo CD40 se determinaron por citometría de flujo (B.D. FACS Aria). El resultado (Figura-1) mostró que los oligonucleótidos regularon positivamente significativamente la expresión de CD40 en células B-CLL, lo que indica que los oligonucleótidos se pueden usar para tratar B-CLL a través de la regulación positiva de CD40 en las células. La regulación positiva de CD40 promueve la apoptosis de células B-CLL, induce la inhibición del crecimiento de células B-CLL y rinde células B-CLL más inmunogénicas para estimular la generación de CTLs específicas a las células B-CLL. El experimento se repitió con al menos diez muestras de sangre a partir de pacientes B-CLL con resultados similares.

**Ejemplo 4 La apoptosis de células humanas de linfoma de linfocitos pequeños inducida por los oligonucleótidos**

1. Preparación de las células humanas de linfoma de linfocitos pequeños

Las células de linfoma de linfocitos pequeños se aislaron a partir de biopsia de tejido del nódulo linfático a partir de pacientes (El Primer Hospital, Universidad Jilin, China) con linfoma de linfocitos pequeños (identificado patológicamente) después de obtener el consentimiento informado escrito aprobado. El tejido de biopsia se trituró mediante láminas de cristal de superficie porosa para liberar las células en 5 ml de medio RPMI 1640 10% de suero AB humano (HyClone) en una placa de cultivo de 6 cm. Las células liberadas se filtraron a través de una malla de acero inoxidable y se recogieron en un tubo cónico de 50mL que contenía 15 ml de medio RPMI 1640 libre de suero. El tubo se centrifugó a 300 × g por 10 minutos y después el sobrenadante se desechó. Las células de linfoma de linfocitos pequeños CD5+CD19+CD23+ se purificaron por medio del uso del kit de aislamiento de células B (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) a > 95% de células CD5+CD19+ CD23+ (células de linfoma de linfocitos pequeños). La preparación de las células se realizó bajo la guía de Miltenyi Biotec.

2. Apoptosis de células de linfoma de linfocitos pequeños inducida por los oligonucleótidos

Las células de linfoma de linfocitos pequeños se incubaron con Oligo1, Oligo3, Oligo4, Oligo5, Oligo6, Oligo7, Oligo8, Oligo9, Oligo10, 2006 o 2216 respectivamente a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 10% de suero AB humano (HyClone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos. Los oligonucleótidos se diluyeron en medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone). Un volumen igual del diluido (medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone)) se usó como un control (Medio).

En los días 3, 5 y 7 después de la incubación, las células se contaron y tiñeron con tetrametil-rodamina etil éster (TMRE molecular Probes Inc)(Lena Thyrell, y otros. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 279, Núm. 23, Edición de Junio 4, págs. 24152-24162, 2004) por 10 minutos. Las células de linfoma de linfocitos pequeños TMRE positivas (viables) y TMRE-negativas (apoptóticas) se determinaron por citometría de flujo (B.D. FACS Aria). El número de células de linfoma de linfocitos pequeños viables se calculó por la multiplicación del conteo de células total con el porcentaje de células TMRE-positivas en cada punto de tiempo. El experimento se repitió con cinco muestras de pacientes con linfoma de linfocitos pequeños y el resultado promediado (n=5) mostró que los oligonucleótidos inducen significativamente la apoptosis de las células de linfoma de linfocitos pequeños (Tabla-2), lo que indica que los oligonucleótidos se pueden usar para tratar el linfoma de linfocitos pequeños al inducir la apoptosis de las células.

**Tabla-2. Apoptosis de células de linfoma de linfocitos pequeños inducida por los oligonucleótidos**

Células viables de linfoma de linfocitos pequeños (%) (n=5)			
Grupos	Tiempo de incubación (día)		
	3	5	7
Oligo 1	53.5	2	6.7
Oligo 3	83.9	3	8.4

Células viables de linfoma de linfocitos pequeños (%) (n=5)			
Grupos	Tiempo de incubación (día)		
	3	5	7
Oligo 4	61.1	3	6.9 29.7
Oligo 5	57.2	3	7.4 21.3
Oligo 6	56.2	3	6.1 32.1
Oligo 7	60.5	4	0.3 31.1
Oligo 8	50.2	3	7.4 30.2
Oligo 9	54.2	3	9.7 25.4
Oligo 10	56.5	3	7.6 29.3
Medio	81.2	7	8.4 77.1
2006	67.6	4	5.3 41.1
2216	68.5	5	8.7 52.1

#### **Ejemplo 5. Regulación positiva de CD40 de células de linfoma de linfocitos pequeños inducida por los oligonucleótidos**

##### 5 1. Preparación de las células humanas de linfoma de linfocitos pequeños

Las células humanas de linfoma de linfocitos pequeños se aislaron de pacientes con los procedimientos descritos en el ejemplo 4.

##### 10 2. Regulación positiva de CD40 de células de linfoma de linfocitos pequeños inducida por los oligonucleótidos

15 Las células de linfoma de linfocitos pequeños se incubaron con Oligo1, Oligo3, Oligo4, Oligo5, Oligo6, Oligo7, Oligo8, Oligo9, Oligo10, 2006 o 2216 respectivamente a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 10% de suero AB humano (HyClone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos. Los oligonucleótidos se diluyeron en medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone). Un volumen igual del diluido (medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone)) se usó como un control (Medio).

20 En el día 7 después de la incubación, las células se contaron y teñieron con anticuerpo FITC-CD40 (Becton Dickinson) (molecular Probes Inc)(Lena Thyrell, y otros. The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, Núm. 23, Edición de Junio 4, págs. 24152-24162, 2004) por 10 minutos. Las células de linfoma de linfocitos pequeños teñidas con el anticuerpo CD40 se determinaron por citometría de flujo (B.D. FACS Aria). El resultado (Figura-2) mostró que los oligonucleótidos regulan positivamente significativamente la expresión de CD40 en las células de linfoma de linfocitos pequeños, lo que indica que los oligonucleótidos se pueden usar para tratar el linfoma de linfocitos pequeños a través de la regulación positiva de CD40 en las células. La regulación positiva de CD40 promueve la apoptosis de células de linfoma de linfocitos pequeños, induce la inhibición del crecimiento las células de linfoma de linfocitos pequeños y rinde células de linfoma de linfocitos pequeños más inmunogénicas para estimular la generación de CTLs específicos por células de linfoma de linfocitos pequeños. El experimento se repitió cinco veces con resultados similares.

#### **Ejemplo 6 Apoptosis de células B-ALL humanas inducida por los oligonucleótidos**

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

35 Se extrajeron muestras de sangre de pacientes B-ALL no tratados (patológicamente identificados) (El Primer Hospital, Universidad Jilin, China) después de obtener el consentimiento informado escrito aprobado. Las PBMCs se aislaron por centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll-Paque (Pharmacia). Las células B-ALL CD19+CD10+ en las PBMCs se purificaron por medio del uso del kit de aislamiento de células B (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) para > 95% de células CD19+CD10+ (células B-ALL). La preparación de las células se realizó bajo la guía de Miltenyi Biotec.

##### 40 2. Apoptosis de células B-ALL inducida por los oligonucleótidos

Las células B-ALL se incubaron con Oligo1, Oligo3, Oligo4, Oligo5, Oligo6, Oligo7, Oligo8, Oligo9, Oligo10, 2006 o 2216 respectivamente a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 10% de suero AB humano (HyClone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos. Los oligonucleótidos se diluyeron en medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone). Un volumen igual del diluido (medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone)) se usó como un control (Medio).

En los días 3, 5 y 7 después de la incubación, las células se contaron y tñieron con tetrametil-rodamina etiléster (TMRE) molecular Probes Inc)(Lena Thyrell, y otros. The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, Núm. 23, Edición de Junio 4, págs. 24152-24162, 2004) por 10 minutos. Las células B-ALL TMRE positivas (viables) y TMRE-negativas (apoptóticas) se determinaron por citometría de flujo (B.D. FACS Aria). El número de células B-ALL viables se calculó por la multiplicación del conteo de células total con el porcentaje de células TMRE-positivas en cada punto de tiempo. El experimento se realizó con diez muestras de sangre de pacientes B-ALL y el resultado promediado (n= 10) mostró que los oligonucleótidos significativamente indujeron la apoptosis de las células B-ALL (Tabla-3), lo que demostró que los oligonucleótidos se pueden usar para tratar B-ALL al inducir la apoptosis de células B-ALL.

**Tabla-3. La apoptosis de células B-ALL inducida por los oligonucleótidos**

Grupos	Células B-ALL viables (%) (n=10)		
	Tiempo de incubación (días)		
	3	5	7
Oligo 1	66.9	60.1	59.5
Oligo 3	67.9	64.1	65
Oligo 4	69.2	66.2	65.7
Oligo 5	70.6	68.2	67
Oligo 6	66.4	61	60.3
Oligo 7	75.9	70.1	69.2
Oligo 8	80.1	74.9	72.3
Oligo 9	67.2	63.1	62.9
Oligo 10	72.6	68.1	65.3
Medio	91.5	92.7	93.1
2216	94.9	95	93.5
2006	62.9	58.4	59

**Ejemplo 7 Regulación positiva de CD40 en células B-ALL por los oligonucleótidos**

1. Preparación de células B-ALL humanas

Las células B-ALL humanas se prepararon a partir de muestras de sangre de pacientes con los procedimientos descritos en el ejemplo 6.

Las células B-ALL se incubaron con o sin el Oligo1, Oligo3, Oligo4, Oligo5, Oligo6, Oligo7, Oligo8, Oligo9, Oligo10, 2006 o 2216 respectivamente a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 10% de suero AB humano (HyClone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos. Los oligonucleótidos se diluyeron en medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone). Un volumen igual del diluido (medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone)) se usó como un control (Medio).

En los días 3, 5, 7 después de la incubación, las células se contaron y tñieron con anticuerpo FITC-CD40 (Becton Dickinson) molecular Probes Inc)(Lena Thyrell, y otros. The Journal of Biological Chemistry Vol. 279, Núm. 23, Edición de Junio 4, págs. 24152-24162, 2004) por 10 minutos. Las células de linfoma de linfocitos pequeños teñidas con el anticuerpo CD40 se determinaron por citometría de flujo (B.D. FACS Aria). El experimento se repitió con diez muestras y el resultado promediado (Tabla-4) mostró que los oligonucleótidos regularon positivamente significativamente la expresión de CD40 en las células B-ALL, lo que indicó que los oligonucleótidos se pueden usar para tratar B-ALL por la regulación positiva de CD40 en las células. La regulación positiva de CD40 promueve la apoptosis de células B-ALL, induce la inhibición del crecimiento de células B-ALL y rinde células B-ALL más inmunogénicas para estimular la generación de CTLs específicas a las células B-ALL.

**Tabla-4. Regulación positiva de CD40 en células B-ALL por los oligonucleótidos**

Expresión de CD40 en células de leucemia linfocítica aguda de células B (MFI) (n=10)			
Grupos	Tiempo de incubación (días)		
	3	5	7
Oligo 1	33.6	3	3.9 34.2
Oligo 3	29.9	2	9.1 30.2
Oligo 4	30.1	2	9.9 31.6
Oligo 5	25.3	2	6.6 26.9
Oligo 6	32.9	3	2.8 33.1
Oligo 7	27.8	2	8.1 29.2
Oligo 8	15.9	1	7.2 17.8
Oligo 9	28.2	2	8.1 29.2
Oligo 10	26.9	2	7.4 27.8
Medio	7.2	7	.9 8.5
2216 9	.9		9.5 10.6
2006	33.7	3	3.8 34.1

**Ejemplo 8 La producción de IL-10 por B-CLL inducida por los oligonucleótidos**

5

1. Preparación de células B-CLL humanas

Las células B-CLL humanas se aislaron a partir de pacientes B-CLL con los procedimientos descritos en el ejemplo 2.

10

2. Producción de IL-10 por B-CLL inducida por los oligonucleótidos

Las células B-CLL se cultivaron con o sin el Oligo1, Oligo3, Oligo4, Oligo5, Oligo6, Oligo7, Oligo8, Oligo9, Oligo10 respectivamente a una concentración final de 3 µg/ml en medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone) a 10<sup>6</sup> células/pocillo en una placa de 48 pocillos por triplicado. Los oligonucleótidos se diluyeron en medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone). Un volumen igual del diluido (medio RPMI 1640 libre de suero (HyClone)) se usó como un control (Medio).

15

Los sobrenadantes de cultivo se recogieron a las 24 h o a los puntos de tiempo indicados y se evaluaron para IL-10 en el sistema de Inmunoarreglo Fluorokine MAP (R&D Systems). Nuestros datos mostraron que la activación con los oligonucleótidos llevó a la producción de un alto nivel de IL-10 a partir de las células B-CLL (Tabla-5). Adicionalmente, nuestros datos mostraron más aun que la adición de rh-IL-10 exógena (Schering Corp) en cultivos de células B-CLL indujo células B-CLL apoptóticas en una manera dependiente de la dosis de IL-10, que podía bloquearse específicamente por anticuerpos anti-IL-10 (R & D Systems). Estos descubrimientos demostraron que los oligonucleótidos se pueden usar para tratar B-CLL por inducir la producción de IL-10 que provoca la apoptosis de células B-CLL de manera autocrina. El experimento se repitió con al menos diez muestras de sangre de pacientes B-CLL con resultados similares.

20

25

**Tabla-5. Producción de interleucina-10 a partir de células B-CLL inducida por los oligonucleótidos**

Producción de IL-10 por células B-CLL	
Grupo pg	/ml
Oligo 1	800
Oligo 3	621
Oligo 4	469
Oligo 5	523

Producción de IL-10 por células B-CLL	
Grupo pg	/ml
Oligo 6	112
Oligo 7	576
Oligo 8	502
Oligo 9	455
Oligo 10	752
Medio 0	1.2

**Ejemplo 9 El efecto de los oligonucleótidos en la proliferación de PBMC humanas normales**

5 Las PBMCs humanas se aislaron a partir de concentrados leucocitarios de donantes de sangre normales (Centro de Sangre de la provincia Jilin, China) por gradiente de centrifugación con Ficoll-Hypaque (Pharmacia). La viabilidad de los PBMCs fue 95-99% según se determinó por exclusión con azul tripán.

10 Los PBMC (6X10<sup>5</sup>/pocillo) se colocaron en placas de 96-pocillos de fondo en U (Costar) y se cultivaron con o sin el Oligo1, Oligo3, Oligo4, Oligo5, Oligo6, Oligo7, Oligo8, Oligo9, Oligo10, 2006 o 2216 respectivamente a una concentración final de 6 µg/ml por triplicado por 36 h, seguido por el pulsado con [<sup>3</sup>H] timidina (New England Nuclear, Boston, MA) por 16 h. Las células se cosecharon en filtros de fibra de cristal y se detectaron en un contador de centelleo. La proliferación celular se expresó como cpm (conteos por minuto) (a partir de tripletes de pozos). Se muestran los datos de cinco muestras de sangre normal. 2006 y 2216 se usaron en los controles. Los resultados mostraron que los oligonucleótidos podían estimular las PBMCs a proliferar obviamente (Figura-3), lo que indica que los oligonucleótidos, en lugar de inducir la apoptosis, son estimuladores de la proliferación para los PBMCs humanos normales y no son tóxicos para las células cultivadas.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

20 <110> Changchun Huapu Biotechnology Co.,Ltd

<120> Oligonucleótidos o sus homólogos funcionales, una composición que comprende los mismos y un método para tratar la neoplasia de células B

25 <130> IP060011

<160> 11

<170> Patente en versión 3.1

30 <210>1

<211>23

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

35 <400>1

tcgacgttcg tcgttcgctg ttc 23

<210>2

<211>30

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

40 <400>2

tcggcacgcg acgtgctggc cgctcgttcc 30

45 <210>3

<211>24

<212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <400>3  
 5 tcgtcgtcgt cgttgcgtt gggg 24  
  
 <210>4  
 <211>13  
 <212>ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
  
 <400>4  
 tcgtgccgt cgg 13  
 15  
 <210>5  
 <211>26  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <400>5  
 tcgtcgggtg cgacgtcgca gggggg 26  
  
 <210>6  
 <211>24  
 25 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <400>6  
 30 tcgtcgggtg cgatcgcagg gggg 24  
  
 <210>7  
 <211>26  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <400>7  
 tcgtcgggtg catcgtcgca gggggg 26  
  
 <210>8  
 <211>20  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <400>8  
 45 tcgtcgggtg cgacgtcgca 20  
  
 <210>9  
 <211>21  
 <212>ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <400>9  
 tcggggacga tcgtcggggg g 21  
 55  
 <210>10  
 <211>24  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

# ES 2 442 462 T3

<400>10  
tcgtcgttt gtcgtttgt cgtt 24

5  
<210>11  
<211>20  
<212>ADN  
<213> Secuencia artificial

10  
<400>11  
gggggacgat cgtcggggg 20

15

**REIVINDICACIONES**

1. Un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.:1 para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B en un sujeto mamífero.
2. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el oligonucleótido es para inducir la apoptosis de las células neoplásicas de células B.
3. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el oligonucleótido es para regular positivamente CD40 en las células neoplásicas de células B.
4. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** el oligonucleótido es para estimular las células neoplásicas de células B para producir IL-10.
5. El oligonucleótido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde dicha neoplasia de células B es leucemia de células B, linfoma o mieloma de células B.
6. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 5 para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicha leucemia de células B es leucemia linfocítica crónica de células B o leucemia linfocítica aguda de células B.
7. El oligonucleótido de acuerdo con la reivindicación 5 para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B de acuerdo con la reivindicación 5, en donde dicho linfoma de células B es linfoma de linfocitos pequeños.
8. El oligonucleótido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en donde dicho sujeto mamífero es un sujeto humano.
9. El oligonucleótido de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, el cual es para la administración enteral, parenteral o en forma tópica o por inhalación.
10. Un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 1 para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B, que está comprendido dentro de una composición farmacéutica.
11. Un método para inducir apoptosis de células neoplásicas de células B in vitro, que comprende poner en contacto dichas células neoplásicas de células B con una composición que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.: 1.
12. Un método para mejorar la expresión de CD40 en células neoplásicas de células B, que comprende poner en contacto dichas células neoplásicas de células B in vitro con una composición que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.:1.
13. Un método para inducir células neoplásicas de células B para producir IL-10, que comprende poner en contacto dichas células neoplásicas de células B in vitro con una composición que comprende un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.:1.
14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en donde dichas células neoplásicas de células B son células de leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL), o células de leucemia linfocítica aguda de células B (B-ALL), o células de linfoma de linfocitos pequeños.
15. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento de la neoplasia de células B que comprende: (1) un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.:1 y (2) un agente anti-neoplasia de células B.
16. La composición de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicho agente anti-neoplasia de células B es quimioterapéuticos, inmunoterapéuticos, o agentes usados en radioterapia.



- 5
17. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dichos quimioterapéuticos se seleccionan del grupo que consiste de: fludarabina, pentosatina, vincristina, ciclofosfamida, prednisona, CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona), y CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona).
18. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicho inmunoterapéutico es un anticuerpo anti-CD20.
- 10 19. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, en donde dicha radioterapia es radiación externa o tratamiento con un anticuerpo radiomarcado.
20. El uso de un oligonucleótido que tiene la secuencia de sec. con núm. de ident.:1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la neoplasia de células B.
- 15 21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la neoplasia de células B es leucemia de células B, linfoma o mieloma de células B.

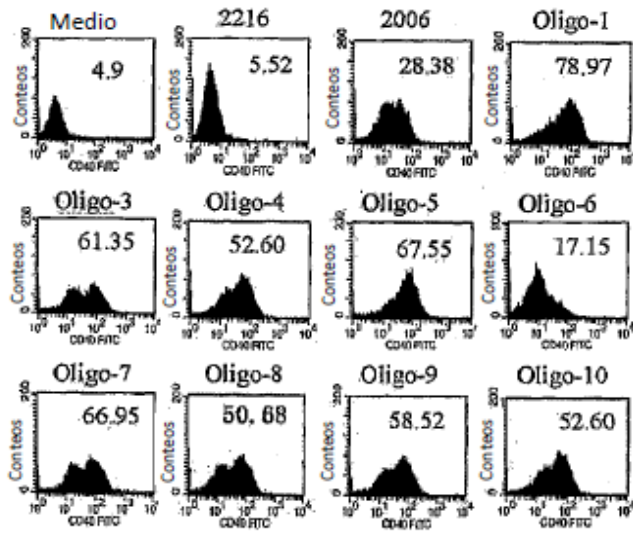


Figura 1

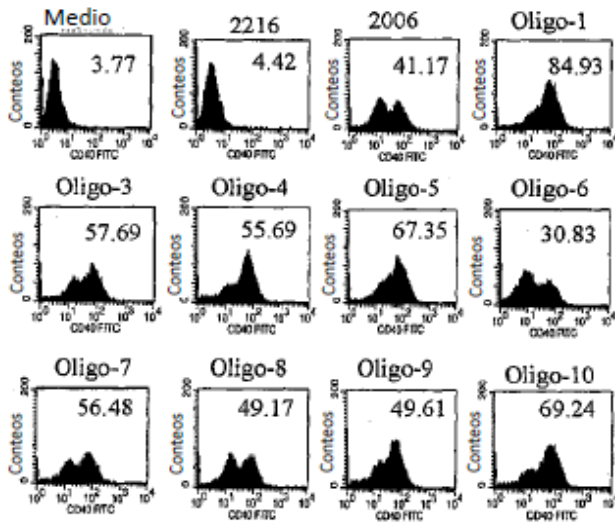


Figura 2

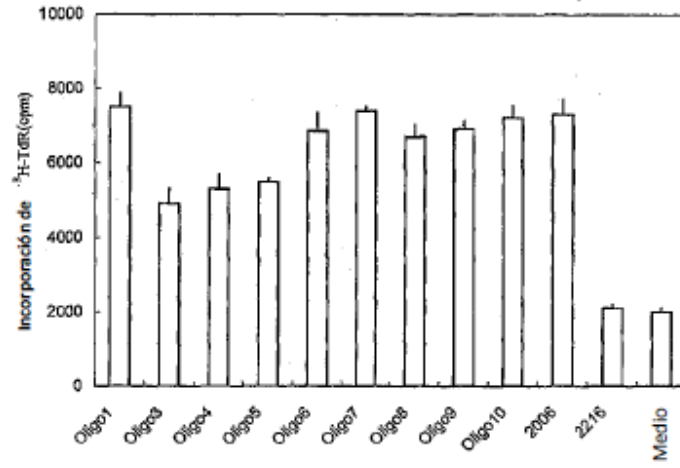


Figura 3