

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 480**

51 Int. Cl.:

C12N 15/117 (2010.01)

A61K 31/711 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2008 E 12198310 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2573176**

54 Título: **Compuestos inhibidores de crecimiento tumoral y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

04.05.2007 US 927584 P

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

06.09.2016

73 Titular/es:

**INDEX PHARMACEUTICALS AB (100.0%)
Tomtebodavägen 23 A
171 77 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:

**KARLSSON, ÅSA;
VON STEIN, OLIVER;
ZARGARI, AREZOU y
KOUZNETSOV, NIKOLAI**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 581 480 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

Compuestos inhibidores de crecimiento tumoral y métodos de uso de los mismos

5 **Campo técnico**

La presente solicitud se refiere al campo de la medicina, y en particular a compuestos novedosos y a métodos para su uso en el tratamiento de cáncer o bien solos o bien en combinación con terapias existentes y futuras.

10 **Técnica anterior**

El tratamiento de cáncer está entrando en una era de enfoques de selección de diana. Un enfoque de este tipo es el uso del sistema inmunitario para reconocer y eliminar células malignas. Los oligonucleótidos CpG sintéticos (ADN CpG) son una clase relativamente nueva de agentes que tienen la capacidad de estimular una respuesta inmunitaria potente, organizada, específica de tumor (KRIEG, A M. Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. Trends Microbiol. 1996, vol .4, n.º 2, págs. 73-6; y KRIEG, A M, *et al.* Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory ADN CpG. Pharmacol Ther. 1999, vol .84, n.º 2, págs. 113-20.).

Estudios recientes demuestran que existen al menos tres clases de secuencias de ADN CpG, cada una con diferentes características físicas y efectos biológicos. Estudios preliminares en varios modelos animales de cáncer sugieren que el ADN CpG puede tener muchos usos en inmunoterapia contra el cáncer. Los ADN CpG tienen la capacidad de inducir regresión tumoral activando la inmunidad innata, potenciando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y sirviendo como adyuvantes de vacunas potentes que provocan una respuesta inmunitaria específica, protectora. Ensayos clínicos anteriores indican que el ADN CpG puede administrarse de manera segura a seres humanos y hay estudios en curso para entender cómo pueden desempeñar un papel estos agentes en la inmunoterapia contra el cáncer (WOOLDRIDGE, J E , *et al.* CpG DNA and cancer immunotherapy: orchestrating the antitumour immune antitumour. Curr Opin Oncol. Nov de 2003, vol. 15, n.º 6, págs. 440-5.)

Una patente anterior (documento US 6.498.147 B, THE SCRIPPS INSTITUTE, 2002-12-24) presentó oligonucleótidos antisentido y dio a conocer inhibición antisentido de células tumorales *in vitro*, así como un experimento con animales que muestra inhibición antisentido de crecimiento tumoral *in vivo* en ratones C57B1/6 singénicos. Se trató a los ratones con inyecciones intraperitoneales de 40 mg/g de oligodesoxinucleótidos sentido y antisentido. El análisis histológico mostró necrosis tumoral focal seguida por necrosis segmentaria extendida.

La leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) es la leucemia más común en el mundo occidental. La LLC-B es un cáncer de los glóbulos blancos y la médula ósea, caracterizada por proliferación descontrolada y/o muerte celular (apoptosis) reducida de células sanguíneas, específicamente de los linfocitos B, y es la forma más extendida de leucemia en adultos. Su incidencia se aproxima al 50 por 100.000 tras los setenta años de edad. La leucemia tiene habitualmente un transcurso natural prolongado de años e incluso décadas, pero en última instancia acelera a medida que las células adquieren defectos genéticos secuenciales. La LLC-B difiere de muchos otros tumores malignos en que las células monoclonales de la LLC-B se acumulan de manera continuada, debido a una vida prolongada de manera anómala, lo que probablemente es una consecuencia de interacciones alteradas entre células defectuosas de LLC-B y su entorno. Las citocinas son factores esenciales en la homeostasis celular y el diálogo célula-célula, y se propone que son críticas en este medio (CALIGARIS-CAPPIO *et al.*, 1999, ROZMAN *et al.*, 1995).

No se ha encontrado ningún acontecimiento de transformación inicial para la LLC-B. Las translocaciones cromosómicas, aunque se producen principalmente durante el proceso de transposición génica y son comunes en otros tumores malignos linfoides, son poco frecuentes en la LLC-B. Las anomalías tienden a aumentar en frecuencia y en número durante el transcurso de la enfermedad. Cuando se encuentran translocaciones, tienden a dar como resultado pérdida genética más que la formación de un gen de fusión o sobreexpresión de un oncogén. Las anomalías genéticas más comunes en la LLC-B son deleciones 13q (50% de los casos), deleciones 13q4 (asociadas con transcurso inactivo), trisomía 12 (12q13-15, con sobreexpresión de la oncoproteína MDMQ que suprime p53) y deleciones 11q22-q23 (20% de los casos) (GAIDAN *et al.*, 1991 *et al.*, DOHNER *et al.*, 1999).

Las células LLC-B expresan moléculas de superficie tales como CD23 (receptor de baja afinidad para IgE), CD25 (cadena α de IL-2R) y CD27 (molécula coestimuladora), que en otros entornos indican un estado de activación. La expresión y asociación de varias proteínas regulan estrechamente el proceso de apoptosis. El equilibrio relativo de estas proteínas controla la vida celular. Los genes responsables de este sistema incluyen la familia BCL-2, el factor de necrosis tumoral y genes tales como Myc y p53 (OSORIO *et al.*, 1999). Todas las rutas de muerte promovidas por estos genes parecen tener una cascada de "demolición" común, representada por la familia de proteasas de las caspasas. Las células de la LLC-B expresan de manera sistemática altos niveles de productos de los miembros anti-apoptóticos de la familia BCL-2 (bad-2, bcl-n, bax), mientras que el inhibidor de la función de Bcl-2, Bcl-6, está marcadamente reducido. El mecanismo implicado en la sobreexpresión de Bcl-2 no está claro actualmente. Las células leucémicas de LLC-B son negativas o débilmente positivas para Fas. Generalmente permanecen resistentes a la muerte mediada por el anticuerpo anti-Fas incluso tras la expresión de Fas inducida por estimulación. En casos

sensibles poco frecuentes, se produce muerte celular independientemente de la expresión de Bcl-2 por un mecanismo todavía no caracterizado. Parecería que la sobreexpresión de Bcl-2 y la ruta de Fas son mecanismos implicados en la patofisiología de LLC-B pero no necesariamente acontecimientos causantes críticos. Es probable que mediadores que incluyen citocinas unan el factor etiológico inicial con las rutas terminales de la apoptosis.

La mayoría de las células de LLC-B están en la fase G0 del ciclo celular y pueden no inducirse para entrar en fase proliferativa mediante métodos convencionales tales como concanavalina-A, ésteres de forbol o reticulación de receptor, que inducen la proliferación de linfocitos normales. Sólo un pequeño subconjunto de células parece ampliar la población clonal en respuesta a una señal promotora desconocida. Las citocinas que promueven la proliferación pueden proporcionar este estímulo *in vivo* (DANCESCU *et al.*, 1992).

Las células de LLC-B se acumulan a expensas de la reserva de células B normales. Por otra parte, las células T totales habitualmente están aumentadas. Los linfocitos T de médula ósea son predominantemente células CD4+ tal como se observa en trastornos autoinmunitarios tales como artritis reumatoide y sarcoidosis. Frecuentemente hay un fenotipo de citocina predominante de Th2 en sangre periférica. También se han notificado anomalías en el repertorio de TCR. Los informes indican que los linfocitos T y las células estromales pueden desempeñar un papel clave en soportar un entorno capaz de perpetuar la vida de las células de LLC-B. Tanto las células malignas como su célula séquito de células T expresan una variedad de moléculas de superficie y sus receptores: CD5 y su ligando CD72, CD27 y CD70. Estos hallazgos abren diversas posibilidades de interacción mutua que podrían dar como resultado directa o indirectamente (citocinas) la auto-conservación celular. Una supervivencia dilatada de este tipo podría aumentar a su vez las posibilidades de acumulación de mutaciones génicas e inestabilidad genética, lo que favorece la progresión de la enfermedad a través de regulación incorrecta de puntos de comprobación del ciclo celular, y resistencia a terapia citotóxica (KLEIN *et al.*, 2000).

La interacción simbiótica entre las células de LLC-B y su entorno está ciertamente casi medida por la secreción de citocinas y modulada por moléculas de adhesión. La investigación de la implicación de citocinas en LLC-B ha generado un volumen de datos sustancial que apoyan o refutan diversas citocinas como mediadores de la proliferación y la vida prolongada en esta leucemia. Las investigaciones sobre producción de citocinas han demostrado señales de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa para IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL7, TNF- β y TNF- α (PISTOIA *et al.*, 1997). Estos hallazgos se han contradicho por otros estudios que mostraron resultados negativos para IL4, IL3 y IL6 (TANGYE *et al.*, 1999). En contraposición, se ha demostrado la secreción de TGF- β , así como de IL10, en linfocitos B normales. No se ha notificado otra producción de citocinas como constitutiva para estas células.

La inmunoterapia del cáncer se ha explorado a lo largo de un siglo, pero ha sido sólo en la última década que se han introducido diversos productos basados en anticuerpos en el tratamiento de pacientes con diversas formas de cáncer. En la actualidad, es una de las áreas más activas de investigación clínica, con ocho productos terapéuticos ya aprobados en oncología. Los anticuerpos contra marcadores asociados a tumores han formado parte de la práctica médica en inmunohistología y en inmunoensayos *in vitro* durante varias décadas, y ahora están reconociéndose cada vez más como agentes biológicos importantes para la detección y el tratamiento de cáncer (STROME *et al.*, 2007). La ingeniería molecular ha mejorado las expectativas para tales agentes terapéuticos basados en anticuerpos, dando como resultado constructos diferentes y anticuerpos humanizados o humanos que pueden administrarse frecuentemente.

CD20 se expresa de manera variable sobre la superficie de las células B en pacientes con LLC, expresando algunas células B de pacientes bajos niveles del antígeno CD20. CD20 (antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B humanos) es una proteína transmembrana hidrófoba con un peso molecular de aproximadamente 35 kD ubicada en linfocitos pre-B y B maduros. El antígeno también se expresa en más del 90% de las células B en linfomas no Hodgkin (LNH), pero no se encuentra en células madre hematopoyéticas, células pro B, células plasmáticas normales u otros tejidos normales. CD20 regula una etapa(s) temprana en el proceso de activación para el inicio y la diferenciación del ciclo celular, y posiblemente funciona como canal de iones calcio. CD20 no se libera de la superficie celular y no se internaliza tras la unión del anticuerpo. El antígeno CD20 libre no se encuentra en la circulación (PESCOVITZ, 2006).

El anticuerpo anti-CD20, rituximab, que es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano obtenido por ingeniería genética dirigido contra CD20 humano (Rituxan® o MabThera®, de Genentech, Inc., South San Francisco, California, EE.UU.) se usa para el tratamiento de pacientes con LLC-B y linfoma no Hodgkin de células B, positivo para CD20, folicular o de bajo grado con recidiva o que no responde al tratamiento. Rituximab funciona reclutando las defensas naturales del organismo para atacar y destruir las células B a las que se une a través del antígeno CD20. Estudios del mecanismo de acción *in vitro* han demostrado que rituximab se une al complemento humano y lisa líneas linfoides de células B a través de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (REFF *et al.*, 1994). Adicionalmente, tiene actividad significativa en ensayos para citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Estudios preclínicos *in vivo* han demostrado que rituximab reduce células B de la sangre periférica, los ganglios linfáticos y la médula ósea de monos cinomolgos, presumiblemente a través de procesos mediados por células y el complemento (REFF *et al.*, 1994). Aunque rituximab se ha usado con cierto éxito en pacientes con LLC, en análisis de los pacientes con LLC muestra que la densidad de CD20 sobre la superficie de las

células de LLC-B es bastante variable con algunas células B de pacientes que expresan niveles muy bajos del antígeno CD20. El tratamiento típico para tumores malignos de células B, además de rituximab, es la administración de radioterapia y agentes quimioterápicos. En el caso del LLC, se usará radioterapia externa convencional para destruir células malignas. Sin embargo, los efectos secundarios son un factor limitante en este tratamiento. Otro tratamiento ampliamente usado para los tumores malignos hematológicos es la quimioterapia. La quimioterapia de combinación tiene cierto éxito en alcanzar remisiones parciales o completas. Desgraciadamente, estas remisiones obtenidas a través de quimioterapia a menudo no son duraderas.

A la inversa, se ha encontrado que la expresión de CD23 está presente de manera sistemática a niveles superiores en LLC-B. El antígeno de diferenciación de leucocitos CD23 es una glucoproteína transmembrana de tipo II de 45 kD expresada en varias líneas de linaje hematopoyético, que funciona como un receptor de baja afinidad para IgE (FcγRII) (PATHAN *et al.*, 2008). Es un miembro de la familia de lectina de tipo C y contiene un tallo de superhélice α -helicoidal entre el dominio de unión de lectina extracelular y la región transmembrana. Se cree que la estructura del tallo contribuye a la oligomerización de CD23 unido a membrana para dar un trímero durante la unión a su ligando (por ejemplo, IgE). Tras la proteólisis, el CD23 unido a membrana da lugar a varias especies de peso molecular de CD23 soluble (sCD23) (37 kD, 29 kD y 16 kD). Además de estar implicado en regular la producción de IgE, también se ha especulado que CD23 promueve la supervivencia de células B del centro germinal. La expresión de CD23 está altamente regulada por incremento en células B foliculares activadas normales y en las células de LLC-B.

Lumiliximab es un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CD23 (de Biogen Idec, ensayos clínicos actualmente en curso) que alberga regiones variables de macaco y regiones constantes humanas (IgG1, κ) y se desarrolló originalmente para inhibir la producción de IgE mediante células B de sangre humana activadas. Ahora está en un ensayo de Fase II para su uso en pacientes con LLC-B. Estudios *in vitro* han demostrado que lumiliximab induce apoptosis dependiente de caspasa en células de LLC-B a través de la ruta de muerte mitocondrial (PATHAN *et al.*, 2008). Por tanto, parece inducir apoptosis de células tumorales a través de un mecanismo diferente de rituximab.

Recientemente se han aprobado otros diversos anticuerpos para el tratamiento de cáncer. Alemtuzumab (Campath® o MabCampath®, un anticuerpo anti-CD52 de Ilex Pharmaceuticals) (KEATING *et al.*, 2002) se aprobó en 2001 para el tratamiento de la LLC. Bevacizumab (Avastin®, Genentech, Inc., South San Francisco, CA) es un AcM IgG1 humanizado dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) usado en el tratamiento del cáncer colorrectal, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de mama. Trastuzumab (Herceptin® de Roche) es un AcM IgG1 humanizado que es eficaz contra tumores de cáncer de mama metastásico que sobreexpresan la diana HER-2 (STROME *et al.*, 2007).

Con el fin de hacer que los fármacos de anticuerpos sean más eficaces, sería útil una regulación por incremento de las dianas antigénicas específicas sobre la superficie de las células tumorales. Una forma de obtener tal efecto podría ser estimular las células con oligonucleótidos inmunomoduladores. Pueden obtenerse efectos inmunoestimuladores a través del uso de oligodesoxinucleótidos (ODN) basados en ADN sintéticos que contienen motivos CpG no metilados. Tales ODN CpG tienen efectos altamente inmunoestimuladores sobre leucocitos humanos y murinos, induciendo proliferación de células B; secreción de citocinas e inmunoglobulinas; actividad lítica de linfocitos citolíticos naturales (NK) y secreción de IFN-gamma; y activación de células dendríticas (DC) y otras células presentadoras de antígenos para expresar moléculas coestimuladoras y secretar citocinas, especialmente las citocinas de tipo Th1 que son importantes en promover el desarrollo de respuestas de células T de tipo Th1 (KRIEG *et al.*, 1995). El aumento en la densidad de receptores por ODN CpG podría estar mediado a través de un efecto directo de los oligonucleótidos sobre las células, o a través de la inducción de citocinas. Un aumento en la densidad de antígenos o un aumento en la población de células que expresan los receptores diana permitiría que los anticuerpos destruyesen las células tumorales más eficazmente, o bien a través de promover la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o bien la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC).

El documento WO 95/35032 se refiere a oligonucleótidos (antisentido) que se hibridan con ARNm de NF-kB y a métodos de usar los mismos para suprimir procesos que dependen de la activación de NF-KB. Tales procesos están asociados normalmente con trastornos tales como los mediados por respuestas inmunitarias o de citocinas (por ejemplo, choque séptico o no séptico), así como aquellos trastornos inducidos por agentes infecciosos tales como retrovirus, más específicamente, HIV y VLTH.

Hay indicios de que el motivo CpG solo no es responsable de la eficacia de los oligonucleótidos. Hay incluso indicios de que este motivo no es necesario para la función deseada.

Independientemente de los esfuerzos considerables invertidos en desarrollar enfoques terapéuticos para el cáncer basados en oligonucleótidos, y el éxito ocasional notificado hasta ahora, todavía sigue existiendo la necesidad de nuevos compuestos y modos de administración, que muestren eficacia mejorada y efectos secundarios mínimos o ninguno.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que secuencias de oligonucleótido específicas cuando

se administran por vía subcutánea o en particular cuando se administran por vía tópica sobre una membrana mucosa, por ejemplo por vía oral, vía pulmonar, vía intranasal, vía rectal o vía intravaginal, tienen un profundo efecto sobre diversas formas de cáncer humano tal como se confirma *in vivo*, en estudios con animales, e *in vitro*, usando PBMC de pacientes con LLC y sujetos sanos.

Además, se han desarrollado y sometido a prueba secuencias novedosas que muestran efectos terapéuticos pronunciados o bien solas o bien en combinación con otros tratamientos. Los oligonucleótidos se usan para inducir apoptosis, para activar células NK, para inhibir la migración de neutrófilos y en particular para aumentar la expresión de receptores de la superficie celular. Los oligonucleótidos dados a conocer pueden usarse en combinación con enfoques inmunológicos para tratar el cáncer, por ejemplo anticuerpos monoclonales dirigidos a receptores específicos. Las realizaciones de la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas, incorporadas en el presente documento como referencia.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá en detalle más minucioso en la siguiente descripción, los ejemplos no limitativos y las reivindicaciones, con referencia a los dibujos adjuntos en los que

La figura 1 es un gráfico que muestra crecimiento tumoral medido como volumen tumoral (mm^3) a lo largo del tiempo para ratones con linfoma RMA subcutáneo inducido, tras la administración subcutánea de 150 μg de la sustancia de SEQ ID NO. 6, en comparación con control (PBS);

la figura 2 es un gráfico como la figura 1, que muestra en este caso una comparación entre la sustancia de SEQ ID NO. 6, administrada por vía subcutánea (bolo de 50 μg) y por vía intranasal (50 μg), en comparación con control (PBS);

la figura 3 es un gráfico que muestra crecimiento tumoral medido como volumen tumoral (mm^3) a lo largo del tiempo para ratones con linfoma RMA subcutáneo inducido, tras la administración subcutánea de 50 μg de la sustancia de SEQ ID NO. 7, en comparación con control (PBS);

la figura 4 es un gráfico que muestra crecimiento tumoral medido como volumen tumoral (mm^3) a lo largo del tiempo para ratones con linfoma RMA subcutáneo inducido, tras la administración subcutánea de 50 μg de la sustancia de SEQ ID NO. 1, en comparación con control (PBS);

la figura 5 es un gráfico que muestra crecimiento tumoral medido como volumen tumoral (mm^3) a lo largo del tiempo para ratones con linfoma RMA subcutáneo inducido, tras la administración subcutánea de 50 μg de la sustancia de SEQ ID NO. 2, en comparación con control (PBS);

la figura 6 es un gráfico que muestra crecimiento tumoral medido como volumen tumoral (mm^3) a lo largo del tiempo para ratones con linfoma RMA subcutáneo inducido, tras la administración subcutánea de 50 μg de la sustancia de SEQ ID NO. 3, en comparación con control (PBS);

la figura 7 es un gráfico que muestra crecimiento tumoral medido como volumen tumoral (mm^3) a lo largo del tiempo para ratones con linfoma RMA subcutáneo inducido, tras la administración subcutánea de 50 μg de la sustancia de SEQ ID NO. 4, en comparación con control (PBS);

la figura 8 es un diagrama de barras que muestra el efecto reductor del crecimiento sobre una línea de células de cáncer de colon humanas HCT116 *in vitro*, tras la administración de los compuestos según SEQ ID NO. 1 - 7, en la que "+" y "-" indican un control positivo y negativo, respectivamente.

La figura 9 es un diagrama de barras que muestra inducción de apoptosis en una línea de células de cáncer de colon humanas HCT116 *in vitro*, tras la administración de los compuestos según SEQ ID NO. 1 - 7, en la que "+" y "-" indican un control positivo y negativo, respectivamente.

La figura 10 consiste en tres diagramas de barras (10 a, b y c) que muestran el efecto sobre la expresión de los marcadores de proliferación de células B, CD20, CD40 y CD54 en un modelo de linfoma de células B humanas *in vitro*, tras la administración de los compuestos según SEQ ID NO. 1 - 7;

la figura 11 consiste en dos diagramas de barras (11 a y b) que muestran el efecto sobre la expresión de los marcadores de activación de células B, CD69, CD80 y CD86 respectivamente en un modelo de linfoma de células B humanas *in vitro*, tras la administración de los compuestos según SEQ ID NO. 1 - 7; y

la figura 12 es un diagrama de barras que muestra el efecto sobre la expresión del marcador de apoptosis CD95 en un modelo de linfoma de células B humanas *in vitro*, tras la administración de los compuestos según SEQ ID NO. 1 - 7.

La figura 13 es un gráfico que muestra cómo inducen los compuestos experimentales la regulación por incremento de CD20n sobre células B de pacientes con LLC. A la concentración sometida a prueba, 10 μ M, los compuestos IDXs0022, 0038 y 0071 muestran todos ellos un efecto significativo. Estos compuestos corresponden a SEQ ID NO 3, 8 y 9 en la tabla 1.

5 La figura 14 muestra de manera similar la regulación por incremento de CD80 sobre células B de pacientes con LLC. También en este caso, los compuestos representados por SEQ ID NO 3, 8 y 9 muestran efecto en comparación con el control no tratado.

10 La figura 15 muestra cómo inducen los compuestos experimentales la activación de células NK en PBMC de pacientes con LLC. De nuevo, los compuestos representados por SEQ ID NO 3, 8 y 9 muestran efecto en comparación con el control no tratado.

15 La figura 16 muestra que los compuestos experimentales inducen apoptosis de células T en PBMC de pacientes con LLC. Los compuestos sometidos a prueba muestran efecto y el compuesto IDXs0022, correspondiente a SEQ ID NO 3 es lo más potente a la concentración sometida a prueba, 10 μ M.

20 La figura 17 muestra que los compuestos experimentales también inducen apoptosis de células B en PBMC de pacientes con LLC. Todos los compuestos sometidos a prueba muestran efecto, y el compuesto IDXs0022, correspondiente a SEQ ID NO 3 es de nuevo lo más potente a la concentración sometida a prueba, 10 μ M.

La figura 18 muestra la regulación por incremento de la citocina IL-6 en PBMC de un control sano para SEQ ID NO 3 a la concentración de 25 μ M, y tras 30 min, 2 h y 6 h de exposición, en comparación con pacientes no tratados.

25 La figura 19 muestra la regulación por incremento de la citocina IL-10 en PBMC de un control sano para SEQ ID NO 3 a la concentración de 25 μ M, y tras 30 min, 2 h y 6 h de exposición, en comparación con pacientes no tratados.

30 La figura 20 muestra la regulación por incremento de la citocina IP-10 en PBMC de un control sano para SEQ ID NO 3 a la concentración de 25 μ M, y tras 30 min, 2 h y 6 h de exposición, en comparación con pacientes no tratados.

La figura 21 muestra la regulación por incremento de la expresión de CD20 en PBMC de controles sanos para SEQ ID NO 3 a las concentraciones 0,1, 1, 10 y 25 μ M, y tras 30 min, 2 h y 6 h de exposición, en comparación con pacientes no tratados y 72 h de exposición.

35 La figura 22 muestra la activación de células NK en PBMC de controles sanos a diferentes concentraciones, y tras 30 min, 2 h y 6 h de exposición, en comparación con pacientes no tratados y 72 h de exposición, usando SEQ ID NO 3.

40 La figura 23 muestra la expresión de CD20 medida en PBMC de tres controles sanos, lograda mediante la administración de SEQ ID NO 3 a 10 μ M.

La figura 24 muestra la inducción de activación de células NK (CD69) lograda por SEQ ID NO 3 a 10 μ M, en comparación con pacientes no tratados y control positivo, SEQ ID NO 6.

45 **Descripción**

Antes de describir la invención en detalle, ha de entenderse que esta invención no se limita a las piezas componentes particulares de los dispositivos descritos ni a las etapas de procedimiento de los métodos descritos, ya que tales dispositivos y métodos pueden variar. También ha de entenderse que la terminología usada en el presente documento es únicamente para fines de describir las realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitativa. Debe observarse que, tal como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un,” “uno/una” y “el/la” también incluyen referentes en plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Por tanto, por ejemplo, la referencia a “una secuencia” incluye más de tal secuencia, y similares.

55 Además, el término “aproximadamente” se usa para indicar una desviación de +/- el 2% del valor dado, preferiblemente +/- el 5% y lo más preferiblemente +/- el 10% de los valores numéricos, cuando sea aplicable.

60 El término “cáncer” pretende significar cualquier enfermedad neoplásica maligna, es decir cualquier tumor o crecimiento maligno producido por división celular anómala y descontrolada. El término “cáncer” pretende incluir en particular tanto tumores sólidos, localizados, tal como se ejemplifica en los experimentos con animales incluidos en la presente descripción, como formas de cáncer no sólidas, tales como pero sin limitarse a leucemia linfocítica crónica (LLC) y linfoma folicular (LF), dos formas de leucemia investigadas en los ejemplos.

65 Los presentes inventores han identificado secuencias de oligonucleótido novedosas que pueden realizar al menos una de las siguientes funciones: inducción de apoptosis, activación de células NK, inhibición de neutrófilos y

regulación por incremento de la expresión de marcadores específicos de superficie celular. Los inventores también han hecho disponibles métodos de terapia novedosos y sorprendentemente han encontrado que una reducción en la dosis (desde 150 µg hasta 50 µg) mejoraba significativamente la respuesta en la administración subcutánea, y que la aplicación sobre una membrana mucosa, sometida a prueba aquí en forma de administración nasal, proporcionó un modo de administración igualmente eficaz.

Sin querer restringirse a ninguna teoría, los presentes inventores contemplan que las secuencias de oligonucleótido presentadas en el presente documento pueden inhibir la migración de células, en particular de neutrófilos, hasta el sitio del tumor, inhibiendo por tanto el crecimiento del tumor. Además, los experimentos en líneas celulares humanas *in vitro* indican que los oligonucleótidos según la invención pueden tanto reducir el crecimiento como inducir la apoptosis.

En contraposición a la teoría de que la deficiencia de la migración de neutrófilos es un efecto del cáncer, que hace que el individuo sea susceptible a infecciones, los presentes inventores contemplan que los tumores se aprovechan en cierta medida de, o pueden usar el sistema de defensa del organismo, es decir, las reacciones inflamatorias, en su beneficio. Los compuestos definidos por SEQ ID NO 1 - 5 y 8 - 9 presentados en la tabla 1 ofrecen la posibilidad de inhibir tales mecanismos.

Los inventores también muestran sorprendentemente que un oligonucleótido aislado que consiste en una secuencia según SEQ ID NO 4 puede provocar o aumentar la expresión de marcadores de superficie celular, ilustrados en el presente documento mediante CD20, CD23, CD25, CD40, CD54, CD69, CD80 y CD86.

Los inventores por tanto ponen a disposición compuestos y métodos para el tratamiento de cáncer, en los que un oligonucleótido aislado que consiste en una secuencia según SEQ ID NO 4 se usa o bien solo; para aumentar la apoptosis, para activar células NK, para regular por incremento la expresión de uno o más de los marcadores de superficie celular CD20, CD23, CD25, CD40, CD54, CD69, CD80 y CD86; o bien en combinación con una terapia antitumoral elegida entre extirpación quirúrgica del tumor, tratamiento con radiación, tratamiento hormonal, intervención quirúrgica, quimioterapia, terapias inmunológicas, terapia fotodinámica, terapia con láser, hipertermia, crioterapia, inhibición de angiogénesis, o una combinación de cualquiera de ellas. Lo más preferiblemente, dicho tratamiento antitumoral es un tratamiento inmunológico y comprende la administración de un anticuerpo al paciente.

Los ejemplos de anticuerpos disponibles actualmente incluyen, pero no se limitan a, rituximab (Rituxan®, MabThera®), lumiliximab, alentuzumab (Campath®, MabCampath®, bevacizumab (Avastin®) y trastuzumab (Herceptin®).

Cuando se administra en combinación con terapia antitumoral, un oligonucleótido aislado que consiste en una secuencia según SEQ ID NO 4 se administra preferiblemente antes de la terapia antitumoral, preferiblemente 30 min, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 6 horas o 12 horas antes de la terapia. Cuando se administra en combinación con una terapia inmunológica, y en particular una terapia que implica la administración de un anticuerpo, el oligonucleótido se administra preferiblemente antes de la administración del anticuerpo al paciente, y de la manera más preferible suficientemente antes con el fin de permitir la regulación por incremento de una molécula de la superficie celular o un marcador de la superficie celular hacia el que se dirige el anticuerpo específico.

La tabla 1 presenta diversos oligonucleótidos, incluyendo un oligonucleótido aislado que consiste en una secuencia según SEQ ID NO 4.

Tabla 1. Información de secuencias

Tabla 1

SEQ ID No.	Secuencia (5'-3')	IDX-No
1	C*C*G*GGGTCGCAGCTGAGCCCA*C*G*G	0011
2	A*T*C*GTCTGCCATGGTGAA*G*A*T	0013
3	T*C*G*TCGTTCTGCCATCGTC*G*T*T	s0022
4	G*G*G*GTCGTCTG*C*G*G	s0052
5	G*A*T*CGTCCGTCGG*G*G*G	s0058
6	G*G*A*ACAGTTCGTCCAT*G*G*C	0150
7	G*G*G*GAACAGTTCGTCCAT*G*G*C	0955
8	T*C*G*TCGTTCCGCCGATCG*T*C*C	9038
9	T*C*G*TTCGTCTGCTTGTTC*G*T*C	9071

Nota: * indica fosfotiolación

Los inventores han sintetizado las secuencias anteriores SEQ ID NO 1 - 5 y 8 - 9. SEQ ID NO 2 corresponde a una secuencia publicada en el documento WO 95/35032. SEQ ID NO 6 se publicó por primera vez en el documento US 6.498.147, y SEQ ID NO 7 se ha publicado entre otros por SOKOLOSKI, J A, *et al.* Antisense oligonucleotides to the

p65 subunit of NF-kB block CD11 b expression and alter adhesion properties of differentiated HL-60 granulocytes. Blood. 15 de julio de 1993, vol. 82, n.º 2, págs. 625-632.

5 La secuencia de oligonucleótido según SEQ ID NO 4 puede comprender al menos un nucleótido que tiene una modificación de la estructura principal de fosfato. Dicha modificación de la estructura principal de fosfato es preferiblemente una modificación de fosforotioato o fosforoditioato.

10 La presente invención también comprende el uso de una secuencia de oligonucleótido aislado según SEQ ID NO 4 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cáncer, en particular para el tratamiento de cáncer a través de la inhibición de crecimiento tumoral, por ejemplo a través de la inhibición de la migración de neutrófilos al sitio del tumor.

15 Según una realización preferida, el medicamento se administra por vía nasal en una dosis eficaz para lograr al menos una de regulación por incremento de un marcador de la superficie celular, inducción de apoptosis, activación de células NK e inhibición de la migración de neutrófilos en el tratamiento de cáncer. Dicha dosis está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 µg para el tratamiento de cáncer.

20 De manera correspondiente, la invención también comprende el uso de una secuencia de oligonucleótido aislado según SEQ ID NO 4 para la fabricación de un medicamento para la administración subcutánea en una dosis eficaz para lograr al menos una de regulación por incremento de un marcador de la superficie celular, inducción de apoptosis, activación de células NK e inhibición de la migración de neutrófilos en el tratamiento de cáncer. Dicha dosis está preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 µg para el tratamiento de cáncer.

25 Una realización de la invención comprende el uso tal como se definió anteriormente, en el que se administra un tratamiento antitumoral antes de, después de o esencialmente simultáneamente con la administración de dicho oligonucleótido. Este tratamiento antitumoral se elige entre tratamiento con radiación, tratamiento hormonal, intervención quirúrgica, quimioterapia, terapia inmunológica, terapia fotodinámica, terapia con láser, hipertermia, crioterapia, inhibición de angiogénesis, o una combinación de cualquiera de ellas.

30 El tratamiento antitumoral es preferiblemente una terapia inmunológica que implica la administración de un anticuerpo al paciente.

35 Según una realización del método de tratamiento según la invención, dicho oligonucleótido se administra por vía mucosa, es decir por vía tópica a un

40 En una cualquiera de las realizaciones anteriores de la invención, dicho oligonucleótido se administra en una dosis eficaz para provocar o aumentar o regular por incremento la expresión de al menos una molécula de la superficie celular o marcador de la superficie celular, en particular un marcador de la superficie celular elegido entre CD20, CD23, CD25, CD40, CD54, CD69, CD80 y CD86.

45 Un experto es consciente del hecho de que hay numerosos enfoques para el tratamiento de cáncer. Es característico para la batalla contra el cáncer que se usen varias terapias, dependiendo del tipo de cáncer, su localización y estado de progresión y el estado del paciente. De modo que frecuentemente se usan varias terapias de manera subsiguiente o en combinación. Aunque algunas terapias tales como la intervención quirúrgica, la radioterapia y la quimioterapia se han puesto en práctica durante muchas décadas, otras se han concebido recientemente y muchas están todavía en uso experimental. Naturalmente, están desarrollándose constantemente nuevos enfoques y se concibe que los oligonucleótidos, su uso y métodos de tratamiento, encuentren utilidad también en combinación con tratamientos futuros. Los inventores creen actualmente que los oligonucleótidos dados a conocer, su uso y métodos de tratamiento serían útiles en combinación con los siguientes tratamientos antitumorales, sin embargo sin desear limitarse a los mismos; tratamiento con radiación, tratamiento hormonal, intervención quirúrgica, quimioterapia, terapia inmunológica, terapia fotodinámica, terapia con láser, hipertermia, crioterapia, inhibición de angiogénesis, o una combinación de cualquiera de ellas.

55 El tratamiento antitumoral es preferiblemente una terapia inmunológica que implica la administración de un anticuerpo al paciente.

60 El oligonucleótido se administra en una dosis terapéuticamente eficaz. La definición de una "dosis terapéuticamente eficaz" depende de la enfermedad y del entorno de tratamiento, siendo una "dosis terapéuticamente eficaz" una dosis que sola o en combinación con otros tratamientos da como resultado una mejora medible del estado del paciente.

65 Las cantidades eficaces de oligonucleótidos para tratar cáncer oscilarían ampliamente entre aproximadamente 0,01 µg y aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 µg y aproximadamente 10 µg, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 5 µg por kg de peso corporal de un mamífero receptor. El oligonucleótido puede administrarse en una única dosis o en dosis

repetidas. La realización más preferida en la actualidad supone una única dosis del nucleótido según la invención, administrada a una membrana mucosa, por ejemplo administrada por vía intranasal, vía oral, vía rectal o vía intravaginal en una cantidad de 50 µg.

5 Los nucleótidos pueden administrarse por vía subcutánea o por vía tópica sobre una membrana mucosa. El término "por vía tópica sobre una membrana mucosa" incluye administración oral, pulmonar, rectal, vaginal y nasal. Los nucleótidos pueden administrarse por vía intranasal. Se conoce bien que la accesibilidad y la estructura vascular de la nariz hacen de la administración nasal de fármacos un método atractivo para administrar tanto fármacos como productos biológicos de moléculas pequeñas, de manera sistémica así como a través de la barrera hematoencefálica al SNC. Los nucleótidos pueden administrarse en cualquier formulación adecuada, tal como tampones acuosos adecuados, por ejemplo pero sin limitarse a solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se contempla que los nucleótidos se administren en una formulación adecuada, diseñada para aumentar la adhesión a la membrana mucosa, tal como polímeros de formación de gel adecuados, por ejemplo, quitosano, etc.; una formulación que potencia la captación celular de los nucleótidos, tal como un vehículo de administración lipófilo, liposomas o micelas; o ambos.

Hay varios métodos y dispositivos disponibles para la administración nasal; dosificación individual o múltiple de formulaciones tanto líquidas como en polvo, con acción o bien tópica o bien sistémica. Usando técnicas de administración o dispositivos apropiados, es posible seleccionar como diana la región del bulbo olfativo para administrar al SNC. La presente divulgación no se limita a métodos o dispositivos particulares para administrar los nucleótidos a la membrana mucosa nasal. Los estudios con animales iniciales han mostrado que la simple instilación mediante pipeta funciona satisfactoriamente, aunque para el uso en seres humanos, se preferirían dispositivos para la administración fiable de dosis individuales o múltiples.

25 Los oligonucleótidos pueden administrarse a la membrana mucosa del colon a través de instilación rectal, por ejemplo en forma de un enema acuoso que comprende los oligonucleótidos suspendidos en un tampón adecuado.

Los oligonucleótidos pueden administrarse a la membrana mucosa de los pulmones o a las vías respiratorias a través de inhalación de un aerosol, que comprende los oligonucleótidos suspendidos en un tampón adecuado, o realizando un lavado, comprendiendo también los oligonucleótidos suspendidos en un tampón adecuado.

Los oligonucleótidos pueden administrarse a la membrana mucosa del tracto urogenital, tal como la uretra, la vagina etc., a través de la aplicación de una disolución, un tampón, un gel, ungüento, pasta o similar, que comprende los oligonucleótidos suspendidos en un vehículo adecuado.

Aunque se ha demostrado que el efecto de la aplicación a la mucosa nasal es sistémico, se contempla que la aplicación a otras ubicaciones, tales como las membranas mucosas del tracto urogenital, las vías respiratorias o los intestinos, es más adecuada para el tratamiento de tumores ubicados en estos órganos o en las proximidades de los mismos.

La invención encuentra utilidad en el tratamiento de cáncer, tal como se respalda por los datos *in vivo* e *in vitro* presentados en la sección experimental e ilustrados en las figuras adjuntas.

Las realizaciones de la invención tienen muchas ventajas. Hasta ahora, la administración de un oligonucleótido en las dosis definidas por los inventores no ha provocado ningún efecto secundario evidente. Además, la administración mucosa es fácil, rápida e indolora, y sorprendentemente da como resultado un efecto sistémico. Se cree que la influencia sobre las condiciones en el sitio del tumor, por ejemplo a través de inhibición de la migración de neutrófilos al sitio del tumor es uno, pero no el único, factor responsable para la reducción del crecimiento y la inducción de apoptosis observada en los experimentos. Se sostiene que este efecto, o bien solo, o bien en combinación con tratamientos anticancerosos existentes y futuros, ofrece un enfoque prometedor para luchar contra el cáncer.

Ejemplos

1. Experimentos con animales

Se investigó el efecto del crecimiento subcutáneo de células de linfoma RMA *in vivo*, en ratones C57BL/6 (B6) singénicos tras la administración de oligonucleótidos. El objetivo del estudio fue investigar el efecto inhibitor del crecimiento tumoral de diferentes oligonucleótidos en un modelo murino experimental de crecimiento tumoral subcutáneo. Se conoce que los tumores subcutáneos experimentales pueden inducirse por la inoculación de ratones B6 receptores con células tumorales RMA mantenidas *in vivo*.

El estudio implicó 10 grupos de ocho ratones C57BL/6 (B6) cada uno, un total de 80 ratones.

1.1 Sistemas de prueba

Tipo de células tumorales e inducción

La inducción de un tumor subcutáneo en ratones se logra mediante la inoculación de una suspensión celular (10^3) de células de linfoma inducido por el virus de Raucher crecido *in vivo* (RMA) en el costado derecho del animal.

5 *Formulación y preparación del artículo de prueba*

Los oligonucleótidos que iban a investigarse se suministraron y se administraron por Index Pharmaceuticals AB, Estocolmo, Suecia, a temperatura ambiente en concentraciones "listas para usar" (2,5-1,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y se mantuvieron a -20°C hasta el día de la instilación.

10 1.2 Material animal y condiciones

Especies, variedad y proveedor

15 Los ratones usados son ratones C57BL/6/By consanguíneos obtenidos a través de cría realizada en las instalaciones de MTC, Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia.

Especificaciones

20 El peso de los ratones fue de aproximadamente 20 gramos. En los experimentos se usaron 80 ratones divididos en 10 grupos experimentales. Los ratones se manejaron según las rutinas habituales para animales inmunocompetentes en las instalaciones para animales de MTC, que incluían alojamiento en jaulas abiertas, manejo con guantes en bancos abiertos.

Entorno

25 Se mantuvieron los ratones en jaulas abiertas convencionales de tipo M3 (anchura:longitud:altura = 25:40:16 cm). Se alojaron las jaulas en estanterías abiertas con flujo de aire continuo tras cortinas de plástico. Se adquirieron lechos convencionales de Scanbur - BK, Sollentuna, Suecia. Se cambiaron los lechos una vez a la semana. La temperatura en la sala para animales se mantuvo en el intervalo de 18°C - 22°C y se controló a través del sistema de ventilación ambiental en el laboratorio. El ciclo de luz fue de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz (luces encendidas a las 06:00).

Comida y agua

35 Se facilitó a los ratones una dieta para ratones normal adquirida de Scanbur - BK, Sollentuna, Suecia. Se rellenaron las botellas de agua cuando fue necesario durante la aclimatación y experimentación. La comida y el agua estuvieron disponibles a voluntad.

40 1.3 Procedimientos pre-experimentales

Aclimatación y procedimientos sanitarios

Se importaron los ratones al laboratorio al menos 5 días antes del comienzo del procedimiento experimental con el fin de conseguir una aclimatación apropiada.

45 *Asignación aleatoria a grupos de tratamiento*

Tras la inspección y la autorización sanitaria, se cogieron aleatoriamente los ratones de las jaulas, se marcaron individualmente mediante marcas en la oreja y se asignaron a los grupos experimentales.

50 1.4. Procedimientos experimentales /diseño experimental

Configuración

55 Los procedimientos experimentales se iniciaron al menos 5 días tras la llegada de los ratones a la unidad de investigación. Los grupos se asignaron aleatoriamente y se trataron según el protocolo experimental.

Procedimientos experimentales

60 En resumen, el experimento comprendió las siguientes acciones: se hicieron crecer células tumorales RMA como un tumor ascítico en ratones B6 para proporcionar una fuente de células tumorales adaptadas a crecimiento *in vivo*. Tras la recuperación, se inoculó una dosis baja de células tumorales RMA en el costado derecho en ratones B6/By receptores. Para este experimento se usó una dosis de células tumorales de 10^3 células.

65 Tras la inoculación de las células tumorales, se monitorizó a todos los ratones dos veces por semana mediante palpación en el sitio de inyección. A los primeros signos de crecimiento tumoral en cualquier ratón, se subdividieron

los ratones en grupos y se les administraron 3 dosis (100 µl) a una dosis de las sustancias de prueba cada tres días. Las sustancias de prueba se administraron por vía subcutánea en el costado izquierdo de los animales. En un grupo de ratones, la sustancia de prueba también se administró por vía intranasal. Para este grupo, se administraron 50 µg (40 µl) de la sustancia.

5 Los animales de control recibieron un total de 3 dosis, divididas en una dosis cada tres días del vehículo únicamente (PBS). El número de ratones receptores fue de ocho por grupo experimental, para un total de 10 grupos, es decir un total de 80 ratones. Se monitorizó continuamente a los ratones y se midieron los crecimientos de los tumores subcutáneos y se expresaron como volúmenes en masa de cáncer.

10 *Tratamiento de tumores RMA subcutáneos*

15 Los animales recibieron en total tres inyecciones subcutáneas (100 µL) de los oligonucleótidos en el costado izquierdo, una inyección cada tres días comenzando en el punto del tiempo de los primeros signos de crecimiento tumoral medible. Se midió el tamaño del tumor usando un calibre y se expresó como volumen en masa de cáncer (mm³).

Evaluación de la tasa de crecimiento tumoral

20 Cada ratón se siguió mediante palpación manual. En cuanto apareció un tumor, se midió su tamaño usando un calibre cada día.

Procedimientos terminales

25 Se sacrificó a los animales portadores de tumores cuando el tamaño de su tumor en crecimiento alcanzó 1500 mm³. Cualquier animal que no desarrolló un tumor se monitorizó durante un máximo de dos meses, punto en el cual se sacrificó el ratón.

30 *Recogida de muestras de tumor de los ratones*

35 Se extirpó el tumor usando guantes, bisturí y pinzas estériles una vez realizadas todas las mediciones. Una parte de la masa tumoral, aproximadamente 400-500 mg, se extrajo, se cortó con un bisturí estéril y se transfirió a disolución de almacenamiento en un tubo Eppendorf etiquetado preparado. Se cerró el tubo herméticamente y se mezcló el contenido mediante inversión 5-6 veces. Se almacenaron las muestras recogidas a 4°C hasta que se analizaron.

1.5 Resultados

40 Cada compuesto sometido a prueba mostró un efecto sobre el crecimiento tumoral durante el periodo de observación de un máximo de 10 días. Para SEQ ID NO 7, se observó sorprendentemente que una dosis inferior (50 µg frente a 150 µg) daba como resultado una reducción pronunciada del crecimiento tumoral. Resultó altamente sorprendente que la misma dosis (50 µg) cuando se administró por vía nasal dio como resultado una reducción del crecimiento igual de grande (véanse las figuras 1 y 2).

45 Entre las SEQ ID NO 1, 2, 3, 4 y 7 (figuras 3 - 7) el efecto fue los más pronunciado para SEQ ID NO 1 y 7, al menos en este entorno experimental.

2. Experimentos *in vitro* con líneas celulares humanas

50 Se usaron dos modelos reconocidos de líneas celulares para cáncer humano. El objetivo del estudio fue investigar la capacidad de diferentes oligonucleótidos para inhibir el crecimiento de células tumorales y para inducir apoptosis en células tumorales. Otro objetivo fue correlacionar los datos obtenidos en estudios con animales con otras configuraciones, predictivos para el efecto sobre el cáncer en seres humanos. Se usó un control positivo (un oligonucleótido inmunestimulador disponible comercialmente), así como un control negativo (una secuencia artificial que contenía un sitio CpG invertido).

2.1 Línea de células de linfoma humana

60 Se estimuló la línea de células de linfoma de Burkitt humana Daudi con uno cada de los nucleótidos inventivos, SEQ ID NO 1 - 6 en medio de cultivo tisular durante 48 y 72 h. Se analizó la expresión de diversos marcadores de expresión en superficie mediante FACS tal como se describe en la bibliografía (véase por ejemplo GURSEL, *et al.* Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. J Leuk Biol. 2002, vol. 71, págs. 813-820.; JAHRSDORFER, *et al.* ADN CpG increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. J Leuk Biol. 2001, vol. 69, págs. 81-88.; JAHRSDORFER, *et al.* B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. Clin Can Res. 2005, vol. 11, págs. 1490-1499.; y JAHRSDORFER, *et al.* Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic

lymphocytic leukemia cells. J Leuk Biol. 2005, vol. 77, págs. 378-387) usando el instrumento FACSarray (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.).

2.2 Línea de células de cáncer de colon humana

Se estimuló la línea de células de cáncer de colon humana HCT116 con cada uno de los nucleótidos inventivos, SEQ ID NO 1 - 5 y 7 en medio de cultivo tisular durante 72 h. Se analizaron la proliferación celular y la muerte celular mediante análisis de FACS usando Ki-67 y 7-amino-actinomicina (7-AAD), respectivamente, tiñendo según procedimientos conocidos por un experto. Ki- 67 se expresa por las células en proliferación, y usando 7-AAD, pudieron identificarse células apoptóticas.

2.4 Resultados

Tal como se observa en la figura 8, todos los compuestos según SEQ ID NO 1 - 7 pudieron reducir el crecimiento tumoral en cierta medida. Sin embargo, en particular SEQ ID NO 2 - 5 y 7 lograron reducción marcada de crecimiento tumoral en comparación con las células no tratadas (control positivo).

La figura 9 muestra la capacidad de los mismos compuestos para inducir apoptosis, y en este caso los compuestos, en particular SEQ ID NO 1, 5 y 7 indujeron una alta tasa de apoptosis en comparación con las células no tratadas.

Tal como se muestra en la figura 10, todas las secuencias, excepto SEQ ID NO 7, estimularon la expresión de los marcadores de proliferación de células B, CD20, CD40 y CD54.

La figura 11, por otra parte, muestra la regulación por incremento de los marcadores de activación de células B, CD69, CD80 y CD86, tras el tratamiento con todas las secuencias, siendo SEQ ID NO 7 el agente inductor más débil de la activación de células B.

La figura 12 muestra que el tratamiento con todas las secuencias, excepto SEQ ID No 7, dio como resultado un marcado aumento del receptor apoptótico CD95 (también conocido como receptor de FAS).

Experimentos realizados durante el año de prioridad

3. Expresión de receptor en PBMC aisladas de sujetos sanos

3.1 Materiales y métodos

Se obtuvo sangre periférica heparinizada de sujetos sanos (n= 3). Se aisló la fracción de células mononucleares mediante centrifugación en gradiente con Ficoll-Hypaque (Seromed, Berlín, Alemania). Se incubaron las células inmediatamente a 37°C en un volumen de 500 µl de medio RPMI completo (que contenía FCS al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM y piruvato de sodio 1 mM) en placas de 48 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/ml y se trataron con 1, 10 y 25 µM de cada uno de 10 compuestos de oligonucleótido diferentes. Se tiñó una fracción de las células con dos mezclas de 4 anticuerpos cada una (CD19, CD20, CD23, CD80 y CD3, CD25, CD56, CD69) para el análisis directo de la expresión de antígenos de superficie mediante FACS.

Tras 48 horas, se centrifugaron 200 µl de las células en placas de 96 pocillos, se resuspendieron en 100 µl de FCS al 2% (en PBS) y se incubaron con dos conjuntos de mezclas de anticuerpos (igual que anteriormente) durante 30 min a 4°C. Entonces se lavaron las células dos veces en PBS pura y posteriormente se analizaron mediante FACS usando un bioanalizador FACSArray para el análisis de la expresión de antígenos de superficie. Tras 4 días desde el día 0, se recogió el resto de las células para el análisis de la apoptosis. Se centrifugaron las células en placas de 96 pocillos, se resuspendieron en FCS al 2% igual que anteriormente y se incubaron con una mezcla de anticuerpos de CD19 y CD3 (BD Pharmingen) durante 30 min a 4°C. Se lavaron las células dos veces con PBS y se tiñeron posteriormente con anexina V y 7-AAD durante 10 min a TA para el análisis de la apoptosis temprana y tardía, respectivamente. Se analizaron las células mediante citometría de flujo igual que anteriormente.

3.2 Resultados

Los resultados indican que la expresión de CD20 y CD23 se reguló por incremento mediante la administración de SEQ ID NO 3 a 10 µM (figura 23 y datos no mostrados) y que se logró la inducción de activación de células NK (CD69) mediante SEQ ID NO 3 a 10 µM, en comparación con pacientes no tratados y control positivo, SEQ ID NO 6 (figura 24). Tras una incubación de 4 d con compuestos de oligonucleótido, la apoptosis de células T y B no resultó alterada (datos no mostrados).

4. Expresión de receptor en PBMC aisladas de pacientes con LLC y LF

4.1 Materiales y métodos

Se obtuvo sangre periférica heparinizada tras el consentimiento informado de pacientes (n=5) con leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) y linfoma folicular (LF) con enfermedad circulante significativa. Se diagnosticó a todos los pacientes mediante criterios inmunofenotípicos, morfológicos y clínicos de rutina.

Se aisló la fracción de células mononucleares mediante centrifugación en gradiente con Ficoll-Hipaque (Seromed, Berlín, Alemania). Se incubaron inmediatamente las células a 37°C en un volumen de 500 µl de medio RPMI completo (que contenía FCS al 10%, penicilina-estreptomicina al 1%, L-glutamina 2 mM, HEPES 10 mM y piruvato de sodio 1 mM) en placas de 48 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/ml y se trataron con 1, 10 y 25 µM de cada uno de 10 compuestos de oligonucleótido diferentes. Se tiñó una fracción de las células con dos mezclas de 4 anticuerpos cada una (CD19, CD20, CD23, CD80 y CD3, CD25, CD56 CD69) para el análisis directo de la expresión de antígenos de superficie mediante FACS.

Tras 48 horas, se centrifugaron 200 µl de las células en placas de 96 pocillos, se resuspendieron en 100 µl de FCS al 2% (en PBS) y se incubaron con dos conjuntos de mezclas de anticuerpos (igual que anteriormente) durante 30 min a 4°C. Entonces se lavaron las células dos veces en PBS pura y posteriormente se analizaron mediante FACS usando un bioanalizador FACSArray para el análisis de la expresión de antígenos de superficie. Tras 4 días desde el día 0, se recogió el resto de las células para el análisis de la apoptosis. Se centrifugaron las células en placas de 96 pocillos, se resuspendieron en FCS al 2% igual que anteriormente y se incubaron con una mezcla de anticuerpos de CD19 y CD3 (BD Pharmingen) durante 30 min a 4°C. Se lavaron las células dos veces con PBS y se tiñeron posteriormente con anexina V y 7-AAD durante 10 min a TA para el análisis de la apoptosis temprana y tardía, respectivamente. Se analizaron las células mediante citometría de flujo igual que anteriormente.

4.2 Resultados

Los resultados muestran que las SEQ ID NO 3, 8, y 9 inducen regulación por incremento de CD20 sobre células B de pacientes con LLC (figura 13), así como la regulación por incremento de CD80 sobre células B de pacientes con LLC (figura 14). La expresión de CD23 y CD25 también se reguló por incremento (datos no mostrados).

También se mostró que las SEQ ID NO 3, 8 y 9 inducen activación de células NK tal como se mide mediante la tinción de CD69 (figura 15).

Los resultados también indican que las SEQ ID NO 3, 8 y 9 inducen apoptosis de células T y células B en PBMC de pacientes con LLC (figuras 16 y 17).

5. Experimento de pulsos

5.1 Configuración experimental

Se determinó el perfil de citocinas y la expresión de marcadores de superficie en un experimento denominado de pulsos usando PBMC de un control sano. Se determinó el perfil de citocinas tras el cultivo de 48 h *in vitro* y se realizó la tinción de marcadores de superficie (FACS) tras 72 h.

Se prepararon las PBMC y se cultivaron tal como se describe en los ejemplos 3 y 4. Entonces se sometieron las PBMC a los compuestos experimentales durante un periodo predeterminado, seguido por lavado. El lavado se realizó tal como sigue: En primer lugar, se centrifugaron las placas a 1500 rpm durante 5 min. Entonces se desechó el sobrenadante y se añadió medio nuevo. Se repitió la centrifugación y se desechó el segundo sobrenadante y se añadió medio recién preparado. Tras esto, se cultivaron las PBMC adicionalmente hasta los puntos de tiempo deseados de 48 h (perfil de citocinas) o 72 h (tinción de marcadores de superficie).

Se determinó el perfil de citocinas tras 48 h de cultivo *in vitro*. En el primer lote, las PBMC se cultivaron sólo 48 h sin haberse sometido al compuesto experimental. En un segundo lote, se sometieron las PBMC a un pulso de 30 min con SEQ ID NO 3 (IDXs0022), o en otras palabras, se expusieron a SEQ ID NO 3 durante 30 min, se lavaron tal como se describió anteriormente y luego se cultivaron durante 48 h. En un tercer lote, se sometieron las PBMC a un pulso de 2 h, y en un cuarto lote, se sometieron a SEQ ID NO 3 durante 6 h. Se analizaron las siguientes citocinas: IL-6, IL-10 y IP-10. La concentración de citocina se facilita como pg/ml.

Se realizó tinción de marcadores de superficie 72 h tras el cultivo *in vitro*. En el primer lote, las PBMC se cultivaron sólo 72 h sin haberse sometido al compuesto experimental. En un segundo lote, se sometieron las PBMC a un pulso de 30 min con SEQ ID NO 3 (IDXs0022), o en otras palabras, se expusieron a SEQ ID NO 3 durante 30 min, se lavaron tal como se describió anteriormente y luego se cultivaron durante 72 h. En un tercer lote, se sometieron las PBMC a un pulso de 2, y en un cuarto lote, se sometieron a SEQ ID NO 3 durante 6 h. Se realizó análisis de marcadores de superficie mediante análisis directo de la expresión de antígenos de superficie de CD19, CD20, CD56 y CD69 mediante FACS.

3.2. Resultados

Los resultados muestran que también hay un efecto a largo plazo pronunciado cuando el oligonucleótido se ha retirado lavando tras sólo 30 min, lo que respalda la viabilidad de la administración nasal, o administración a otras membranas mucosas donde no se espera que el oligonucleótido resida durante más de aproximadamente 30 min.

Los resultados también muestran un efecto pronunciado cuando el oligonucleótido se retiró mediante lavado tras 2 h e incluso tras 6 h, lo que corresponde por ejemplo a administración rectal, donde se espera un tiempo de residencia mayor. Los resultados se muestran en las figuras 18, 19 y 20 para el análisis de citocinas y en las figuras 21 y 22 para la tinción de marcadores de superficies.

También debe indicarse que este experimento se realizó usando PBMC humanas lo que hace que los resultados sean transferibles a un entorno *in vivo* con mejor precisión que experimentos realizados con líneas de células humanas inmortalizadas, otro entorno experimental habitual. De manera notable, las PBMC obtenidas a partir de un paciente enfermo contendrán por ejemplo las células B y el efecto de los compuestos experimentales se observa directamente sobre dianas relevantes para la terapia.

Referencias

- Documento US 6.498.147 B (THE SCRIPPS INSTITUTE) 24.12.2002.
- KRIEG, A M. Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. Trends Microbiol. 1996, vol. 4, n.º 2, págs. 73-6.
- KRIEG, A M, *et al.* Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory cpG DNA. Pharmacol Ther. 1999, vol. 84, n.º 2, págs. 113-20.
- WOOLDRIDGE, J E , *et al.* CpG DNA and cancer immunotherapy: orchestrating the antitumour immune response. Curr Opin Oncol. Nov de 2003, vol. 15, n.º 6, págs. 440-5.
- CALIGARIS-CAPPIO, F., Hamblin, T.J.: Bal1 chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. J Clin Oncol. 1999 17:399406.
- ROZMAN, C., Montserrat, E.: Chronic lymphocytic leukemia. New Engl J Med. 1995 333: 1052-1059.
- GAIDAN, G.L., Ballerini, P., Gong JZ, *et al.* p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. Proc Nat Acad Sci USA. 1991 88:541 3-541 8.
- DOHNER, H., Stilgenbauer, S., Doner, K., Bentz, M., Lichter, P.: Chromosome aberration in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular genetic analysis. J Mol Med. 1999 77:266-270.
- OSORIO, L.M., Jondal, M., Aguilar-Santelises, M.; Regulation of BCLL Apoptosis Through Membrane Receptors and Bcl-2 Family Proteins; Leukemia and Lymphoma. 1999 30:247-256.
- DANCESCU, M., Rubio-Trujillo M, Biron G, Bron D, Delespesse G, Sarfati M. Interleukin 4 protects chronic lymphocytic leukemic B cells from death by apoptosis and upregulates Bcl-2 expression. J Exp Med. 1 de nov de 1992;176(5):1319-26.
- KLEIN, A., Miera, O., Bauer, O., Golfier, S., Schriever, F.; Chemosensitivity of 8 cell chronic lymphocytic leukemia and correlated expression of proteins regulating apoptosis, cell cycle and DNA repair; Leukemia. 2000 14.40-46.
- PISTOIA, V.: Production of cytokines by human B cells in health and disease. Immunol Today. 1997 18:343-346.
- TANGYE, S.G., Weston, K.M., Raison, R.L.; Interleukin-10 Inhibits the In vitro Proliferation of Human Activated Leukemic CD5+ B-cells; Leukemia and Lymphoma. 1999 30: 121-130.
- PESCOVITZ, M.D. Rituximab, an Anti-CD20 Monoclonal Antibody: History and Mechanism of Action. Am J Transpl. 2006 (6): 859-866.
- REFF M.E., Carner K., Chambers K.S., Chinn P.C., Leonard J.E., Raab R., Newman R.A., Hanna N., Anderson D.R. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood. 15 de ene de 1994 15;83(2):435-45.
- PATHAN, N.I., Chu P., Hariharan K., Cheney C., Molina A., Byrd J. Mediation of apoptosis by and antitumour

activity of lumiliximab in chronic lymphocytic leukemia cells and CD23+ lymphoma cell lines. *Blood*. 1 de feb de 2008;111 (3):1594-602.

- 5 • SOKOLOSKI, J A, *et al.* Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF- κ B block CD11 b expression and alter adhesion properties of differentiated HL-60 granulocytes. *Blood*. 15 de julio de 1993, vol. 82, n.º 2, págs. 625-632.
- 10 • GURSEL, *et al.* Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leuk Biol*. 2002, vol. 71, págs. 813-820.
- 15 • JAHRSDORFER, *et al.* CpG DNA increases primary malignant B cell expression of costimulatory molecules and target antigens. *J Leuk Biol*. 2001, vol. 69, págs. 81-88.
- JAHRSDORFER, *et al.* B-cell lymphomas differ in their responsiveness to CpG oligodeoxynucleotides. *Clin Can Res*. 2005, vol. 11, págs. 1490-1499.
- JAHRSDORFER, *et al.* Immunostimulatory oligodeoxynucleotides induce apoptosis of B cell chronic lymphocytic leukemia cells. *J Leuk Biol*. 2005, vol. 77, págs. 378-387

20 Lista de secuencias

<110> Index Pharmaceuticals AB
 KARLSSON, Åsa
 VON STEIN, Oliver
 25 ZARGARI, Arezou

<120> Compuestos inhibidores de crecimiento tumoral y métodos de uso de los mismos

<130> MH58828

30 <150> Documento US 60/927.584
 <151> 04-05-2007

<160> 9

35 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
 <211> 23
 40 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 45 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 1
 ccggggtcgc agctgagccc acg 23

<210> 2
 50 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 55 <223> Oligonucleótido sintético

<400> 2
 atcgtctgcc atggtgaaga t 21

60 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

65 <220>
 <223> Oligonucleótido sintético

	<400> 3 tcgtcgttct gccatcgtcg tt	22
5	<210> 4 <211> 14 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
15	<400> 4 ggggtcgtct gcgg	14
20	<210> 5 <211> 16 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
30	<400> 5 gatcgtccgt cggggg	16
35	<210> 6 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
45	<300> <302> Suppression of nuclear factor-kB dependent processes using oligonucleotides	
50	<310> Documento US 6.498.147 <311> 20-08-1993 <312> 17-01-2002	
55	<400> 6 ggaacagtc gtccatggc	19
60	<210> 7 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> Oligonucleótido sintético	
70	<300> <301> Sokoloski, J. <i>et al.</i>	
75	<302> Antisense oligonucleotides to the p65 subunit de NF-kB block CD11b expression and alter adhesion properties of diferentiated HL-60 granulocytes	
80	<303> Sangre <304> 82 <305> 2	
85	<306> 625-632 <307> 01-07-1993	
90	<400> 7 ggggaacagt tcgtccatgg c	21
95	<210> 8	

ES 2 581 480 T3

	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 8	
	tcgtcgttcg gccgatcgtc c	21
10	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
	<400> 9	
20	tcgttcgtct gcttggtcgt c	21

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido aislado que consiste en una secuencia según SEQ ID NO 4.
- 5 2. Oligonucleótido según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cáncer en el que dicho tratamiento es una terapia inmunológica y comprende la administración de un anticuerpo al paciente, y en el que dicho oligonucleótido se administra antes de la administración de un anticuerpo.
- 10 3. Oligonucleótido según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido se administra 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 6 horas o 12 horas antes de la administración del anticuerpo.
- 15 4. Oligonucleótido según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido se administra por vía tópica a una membrana mucosa o por vía subcutánea en una dosis eficaz para inducir apoptosis en el tratamiento de cáncer y en el que dicha dosis está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal.
- 20 5. Oligonucleótido según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido se administra por vía tópica a una membrana mucosa o por vía subcutánea en una dosis eficaz para regular por incremento la expresión de al menos uno de los marcadores de superficie celular CD20, CD23, CD25, CD40, CD54, CD69, CD80 y CD86 y en el que dicha dosis está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal.
- 25 6. Oligonucleótido según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 2, en el que el oligonucleótido se administra por vía tópica a una membrana mucosa o por vía subcutánea en una dosis eficaz para activar células NK y en el que dicha dosis está en el intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 µg por kg de peso corporal.
- 30 7. Oligonucleótido según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 2, en el que el tratamiento de cáncer implica la regulación por incremento de la expresión de al menos uno de los marcadores de superficie celular CD20 y CD23 antes de la administración de un anticuerpo al paciente.
- 35 8. Oligonucleótido según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 2, en el que el tratamiento de cáncer implica la activación de células NK.
9. Oligonucleótido según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de cáncer según la reivindicación 2, en el que el tratamiento de cáncer implica la inducción de apoptosis.
- 40 10. Secuencia de oligonucleótido aislado según la reivindicación 1, en el que al menos un nucleótido tiene una modificación de estructura principal de fosfato.

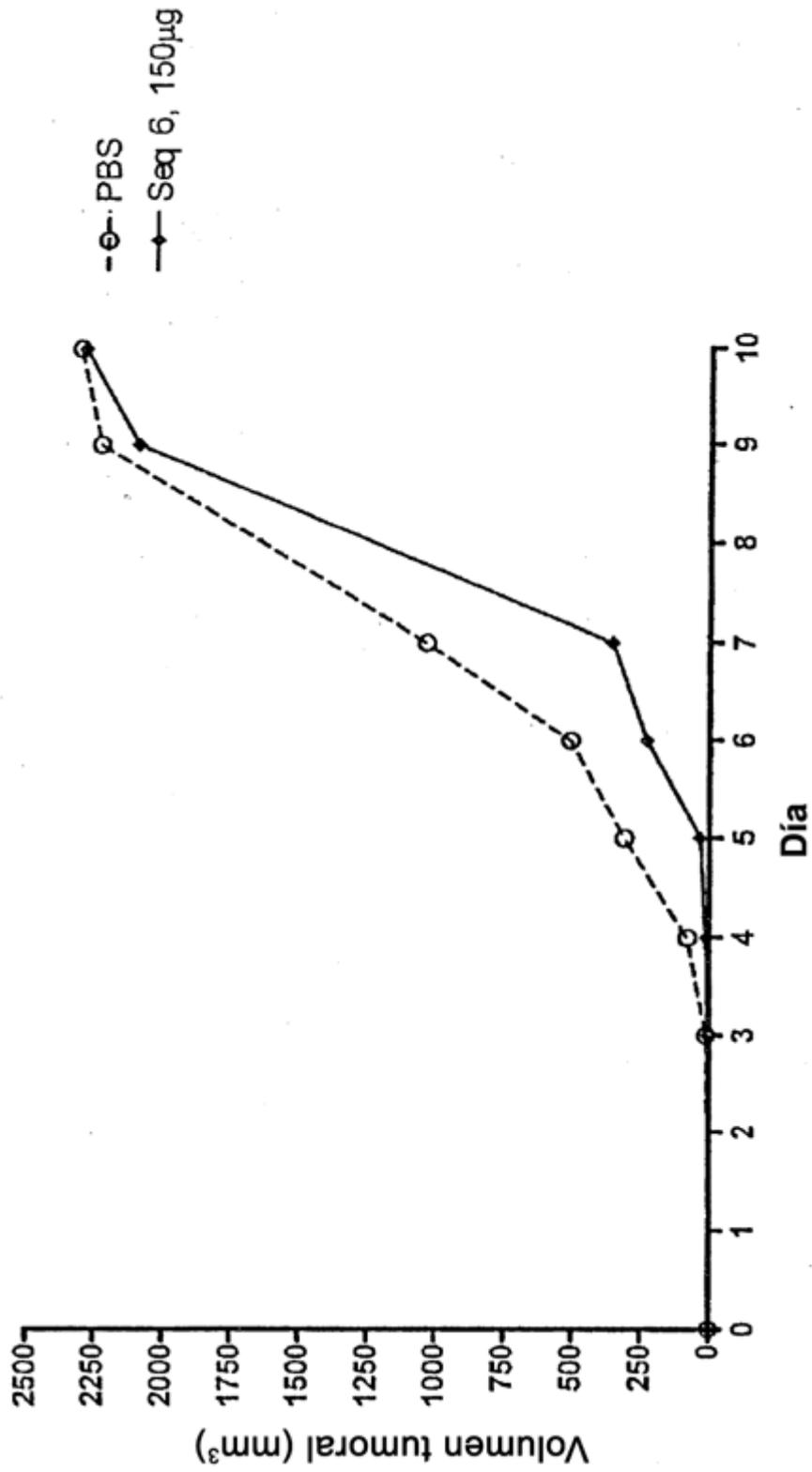


Fig. 1

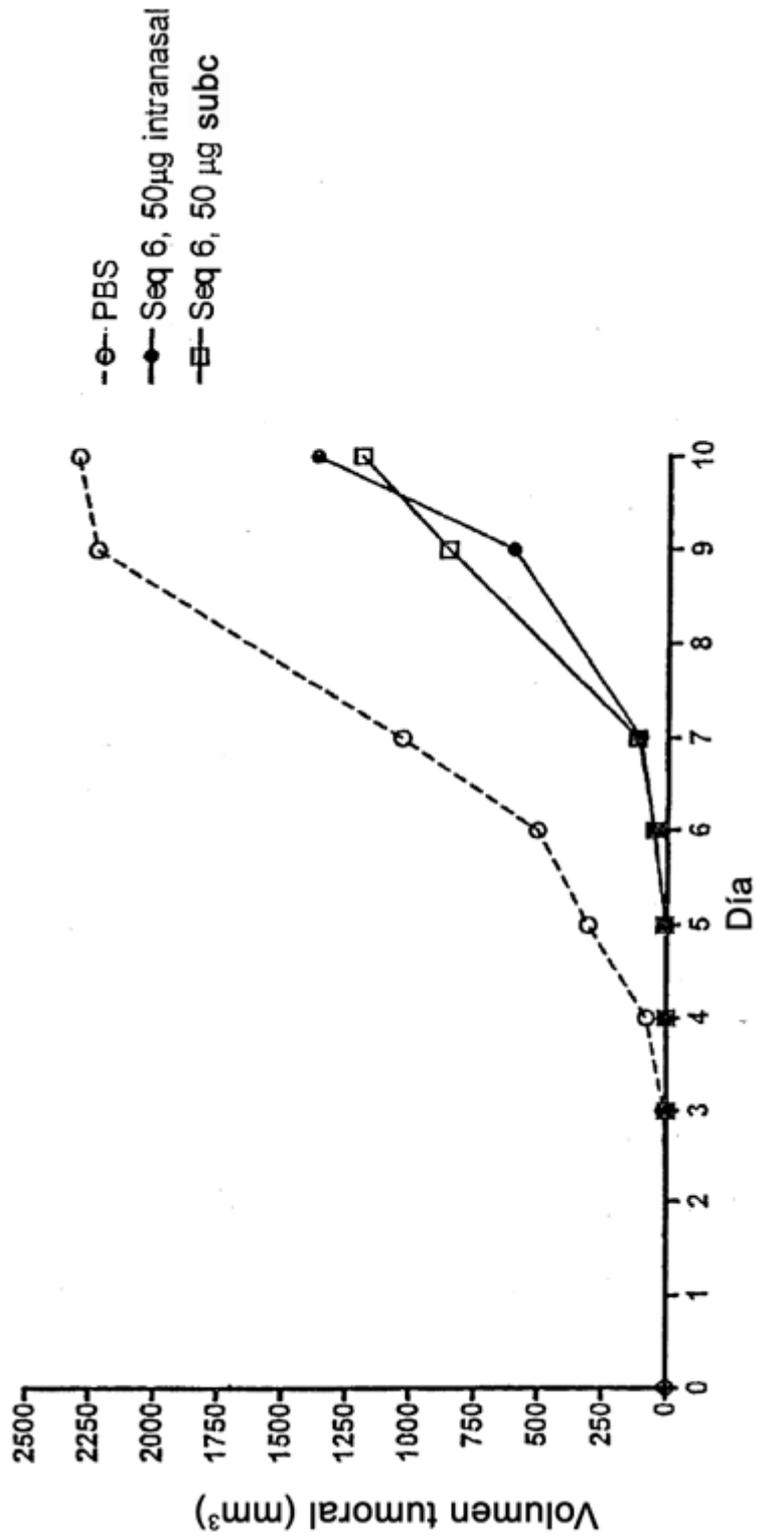


Fig. 2

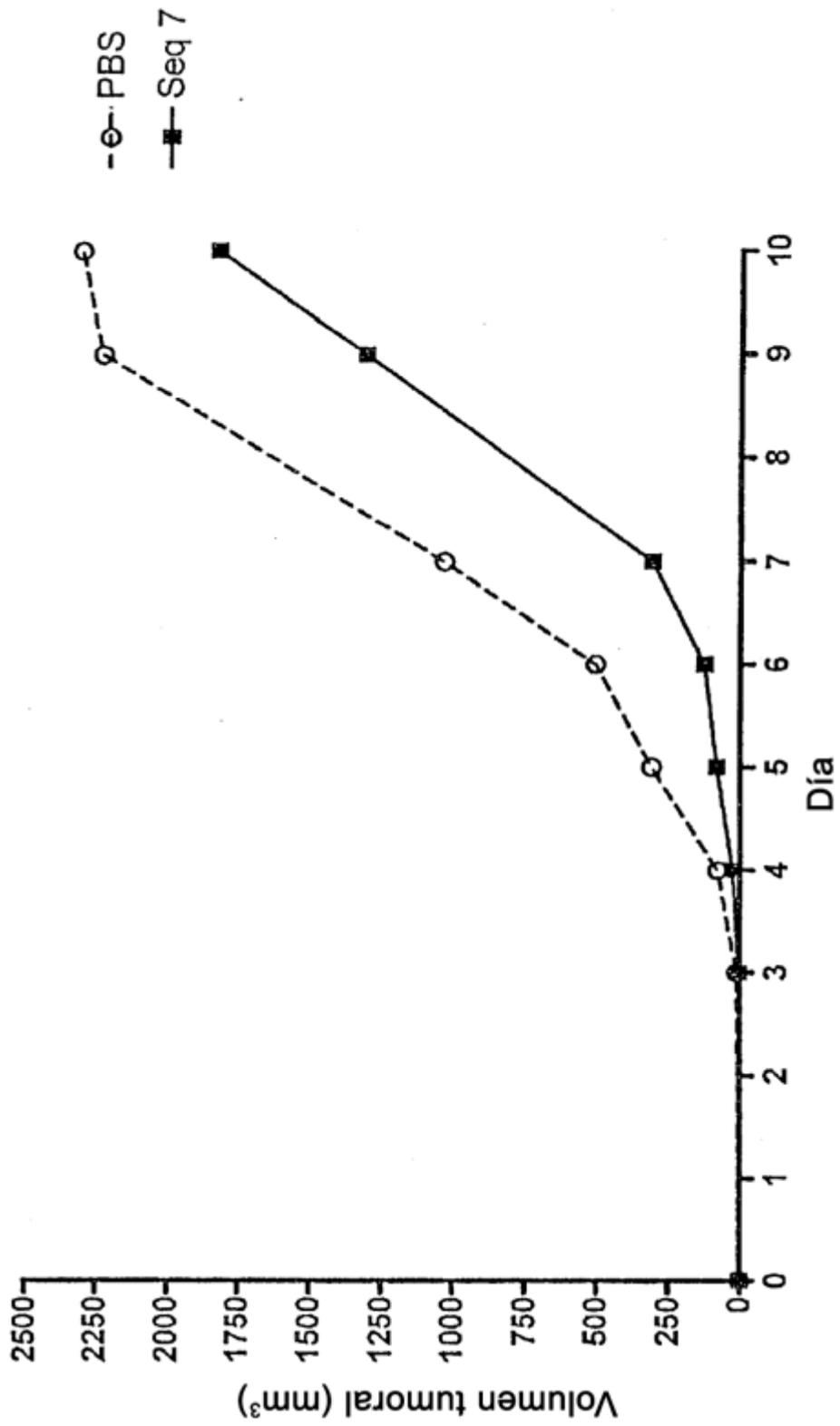


Fig. 3

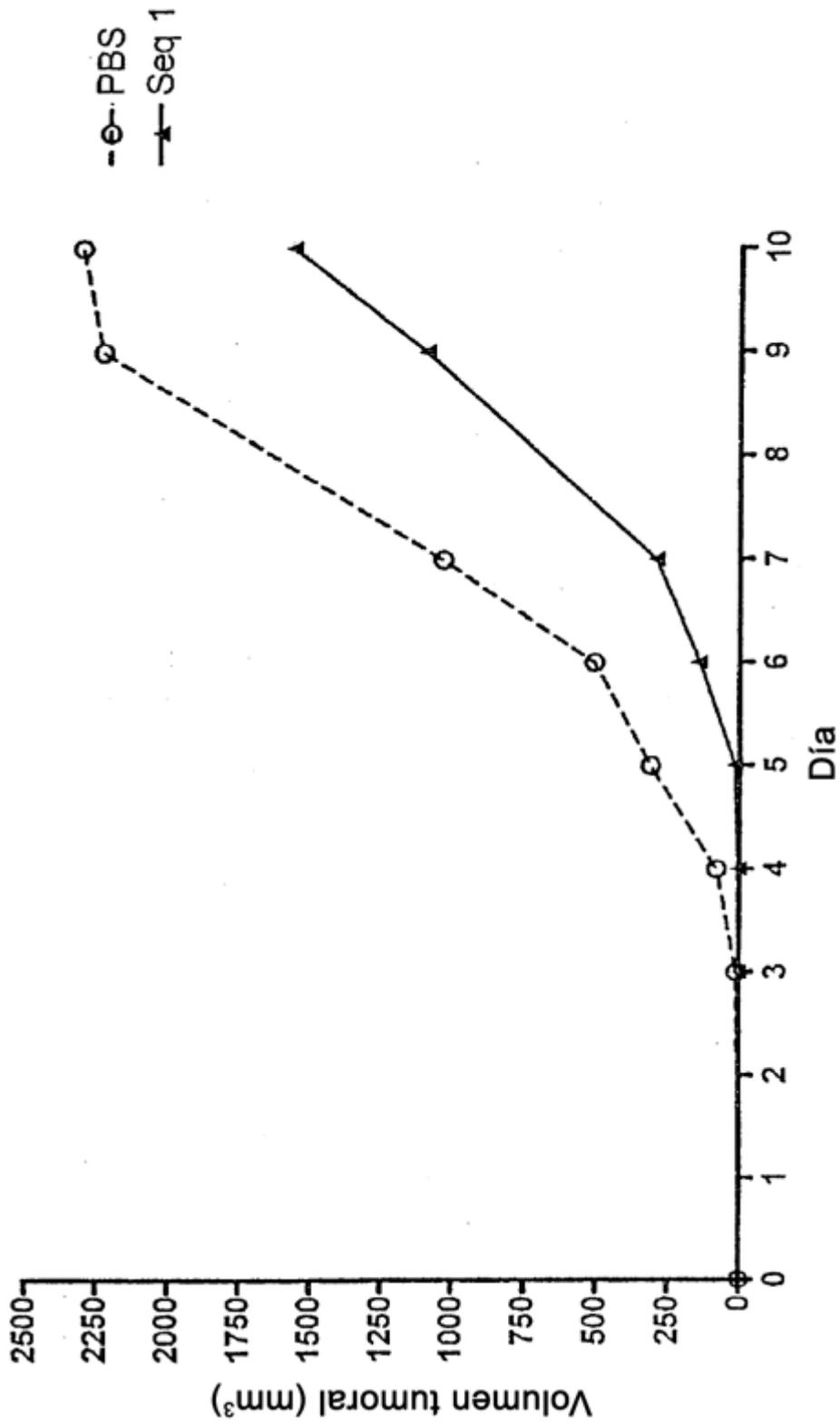


Fig. 4

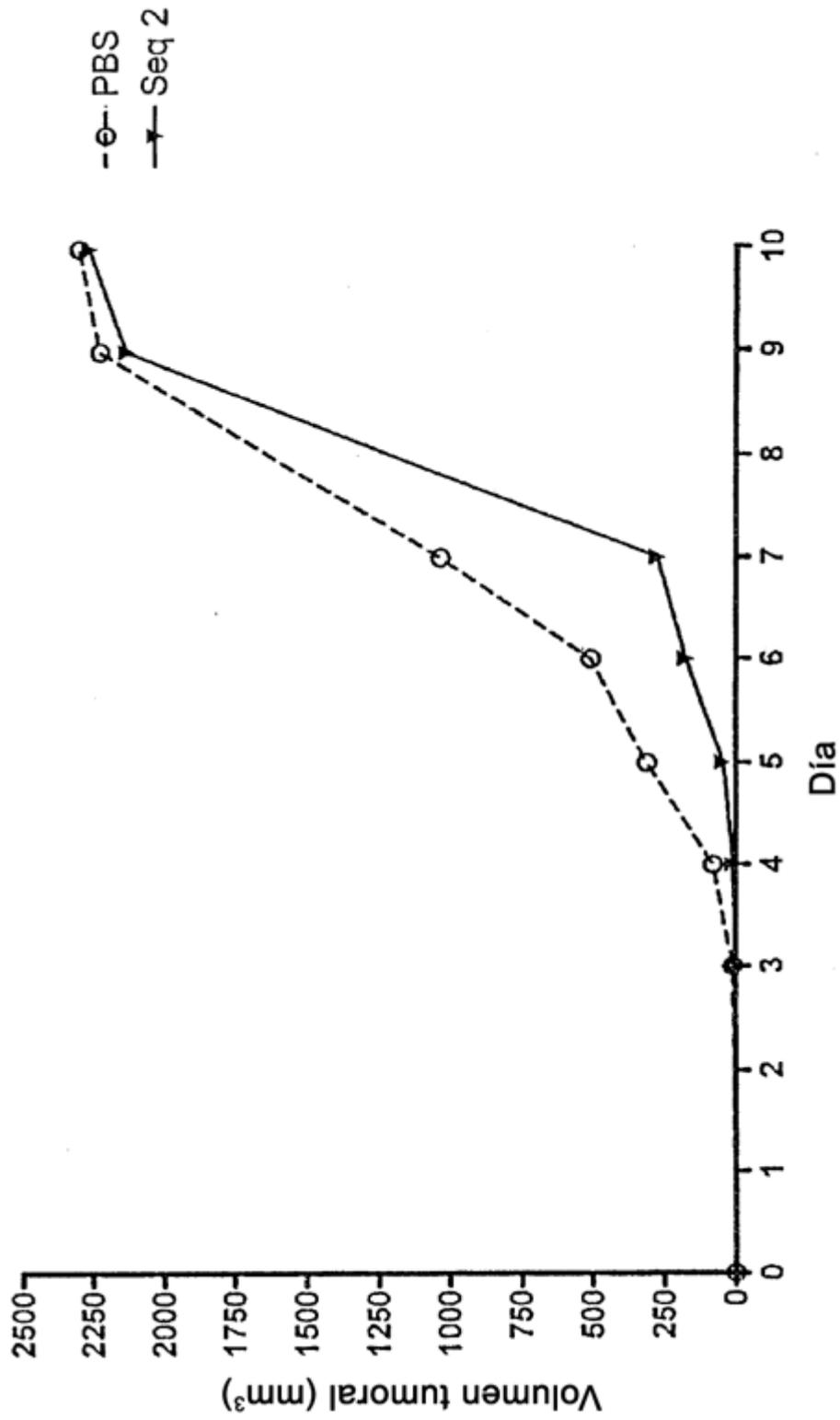


Fig. 5

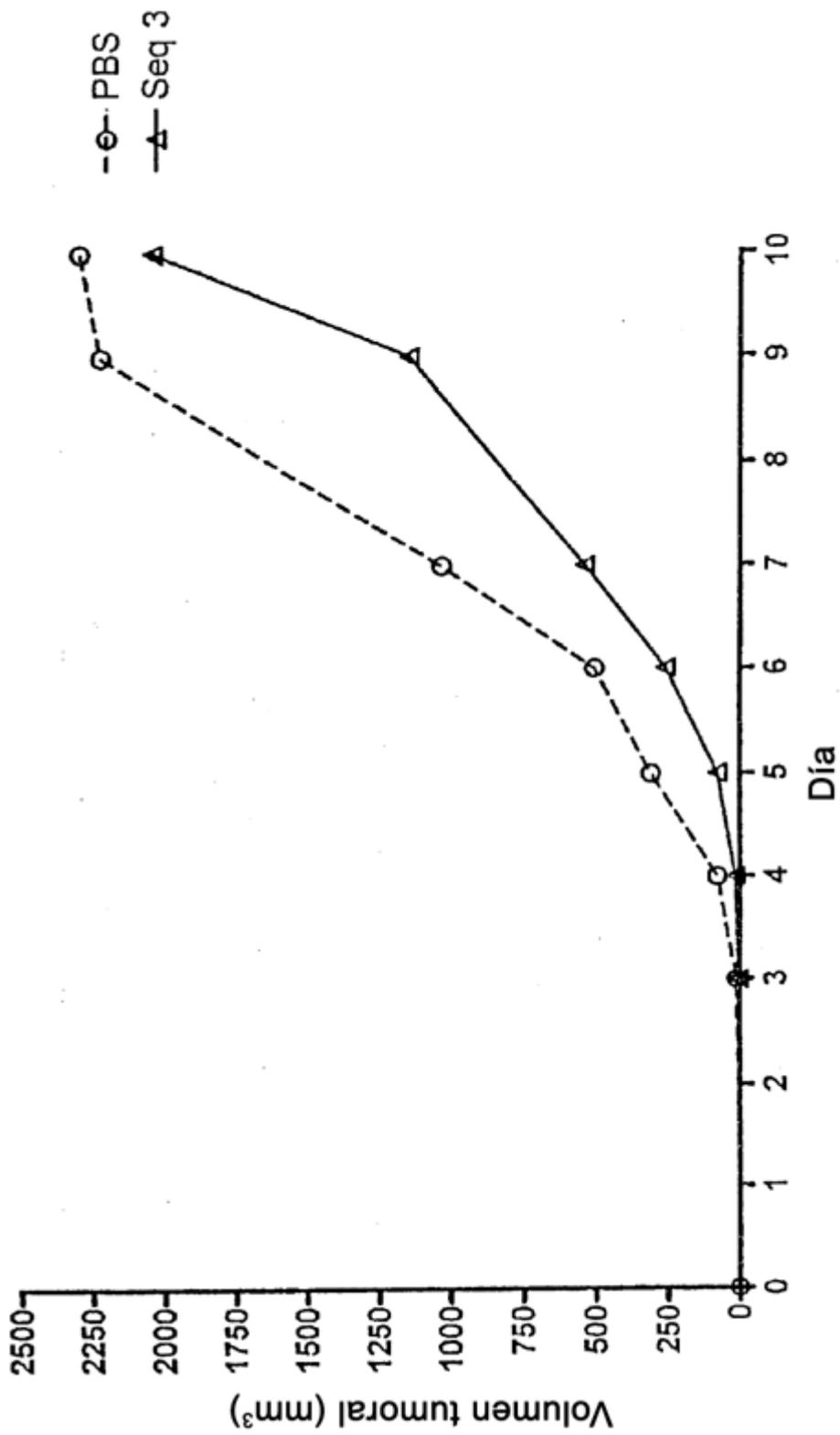


Fig. 6

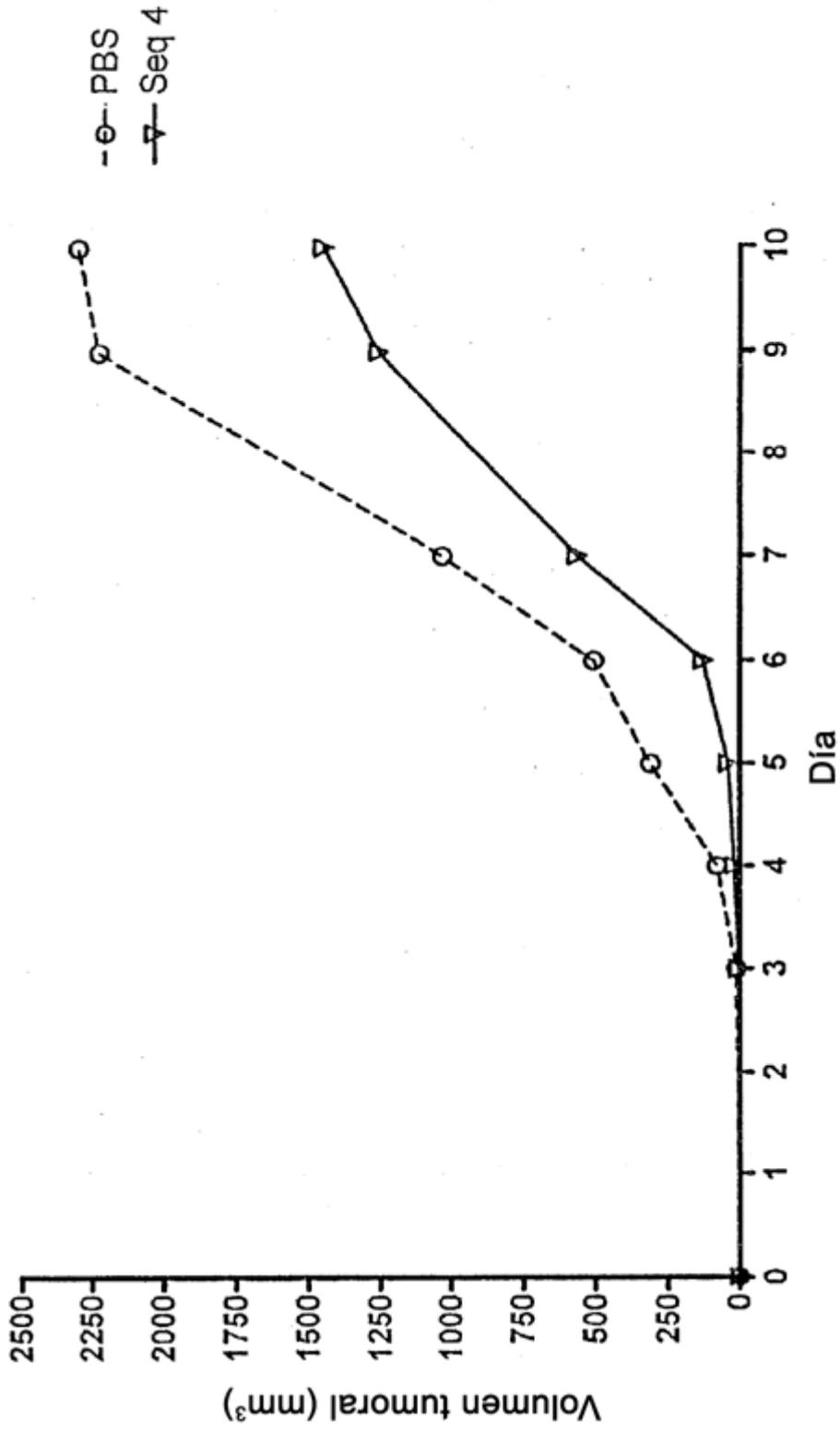


Fig. 7

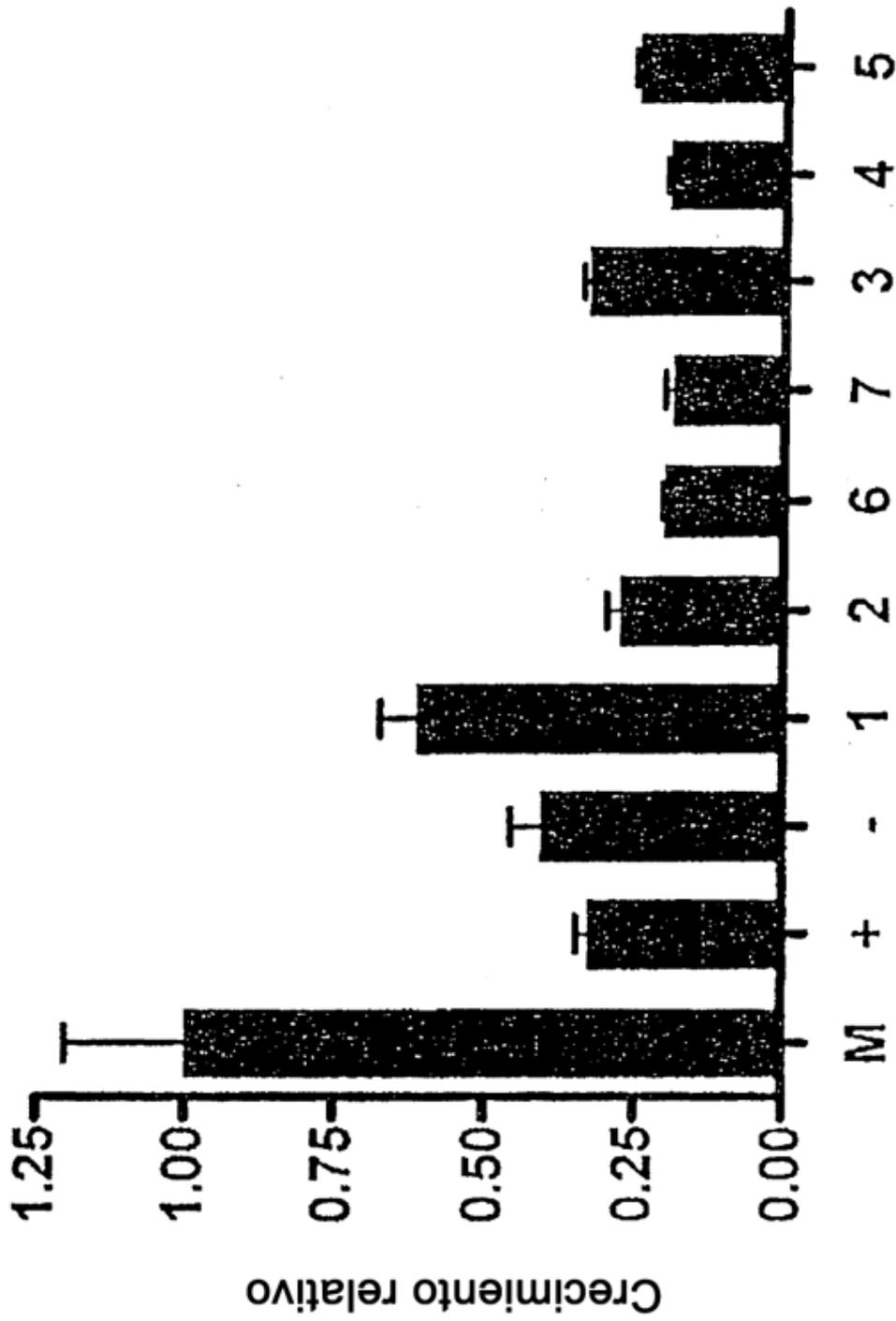


Fig. 8

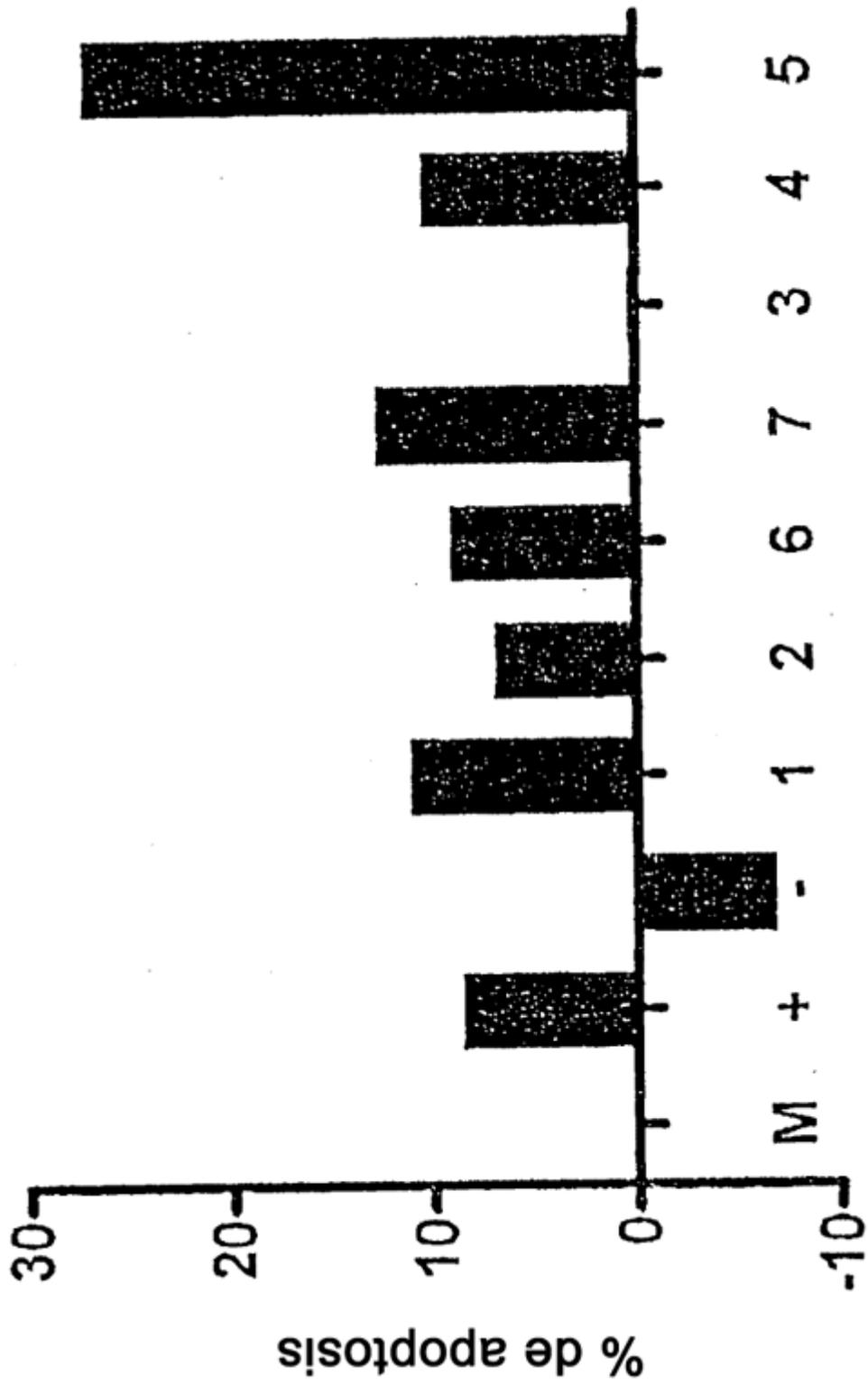


Fig. 9

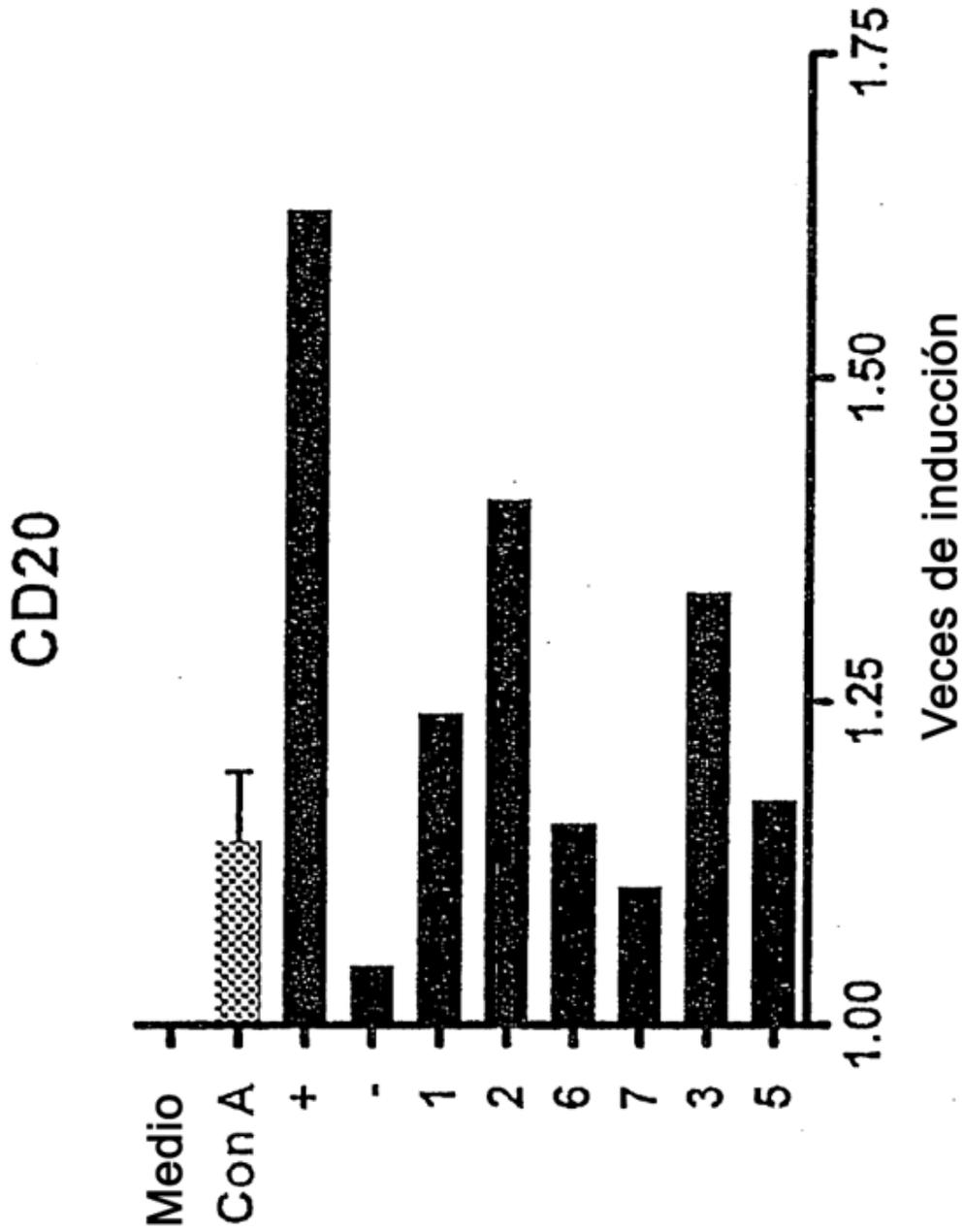


Fig. 10a

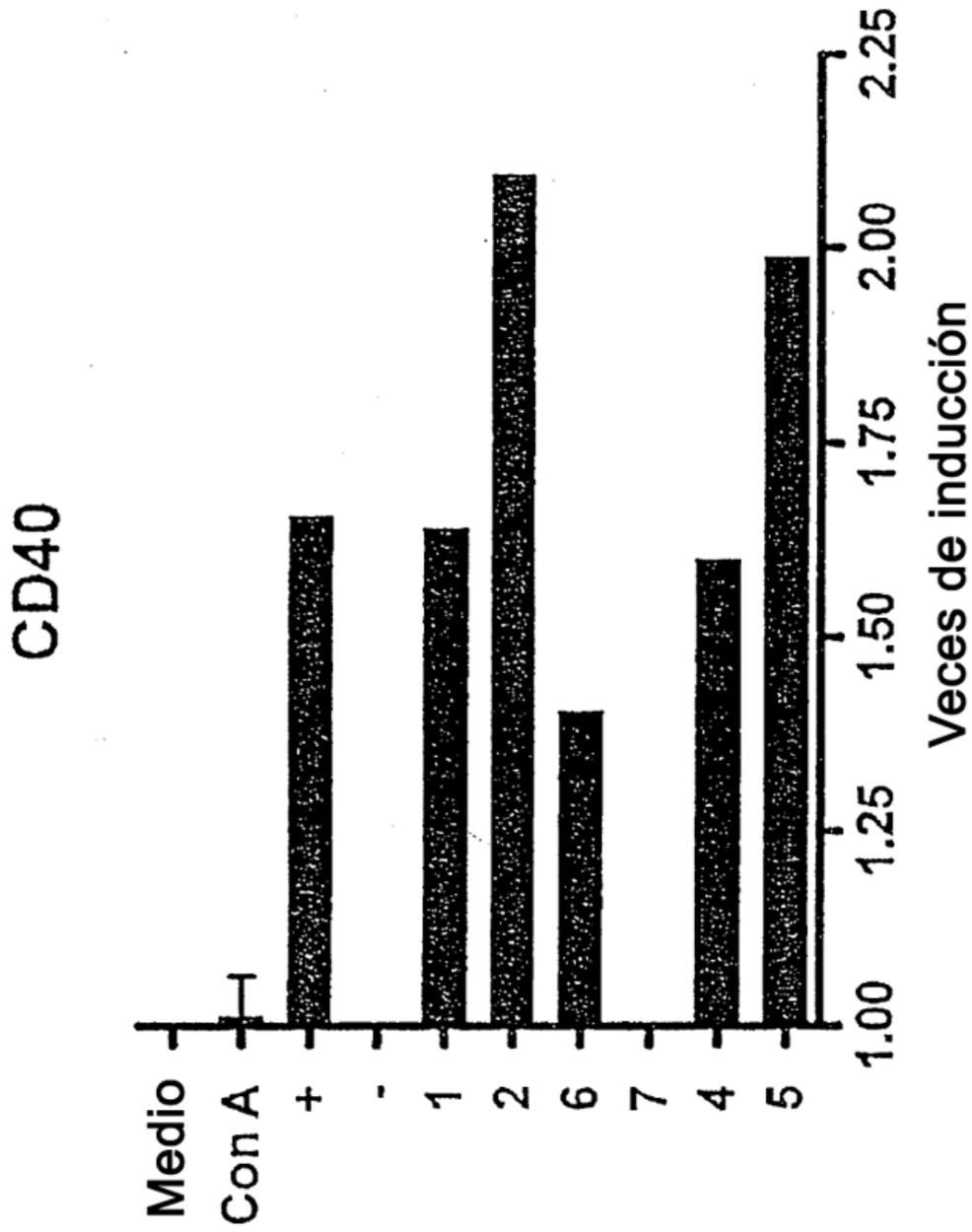


Fig. 10b

CD54

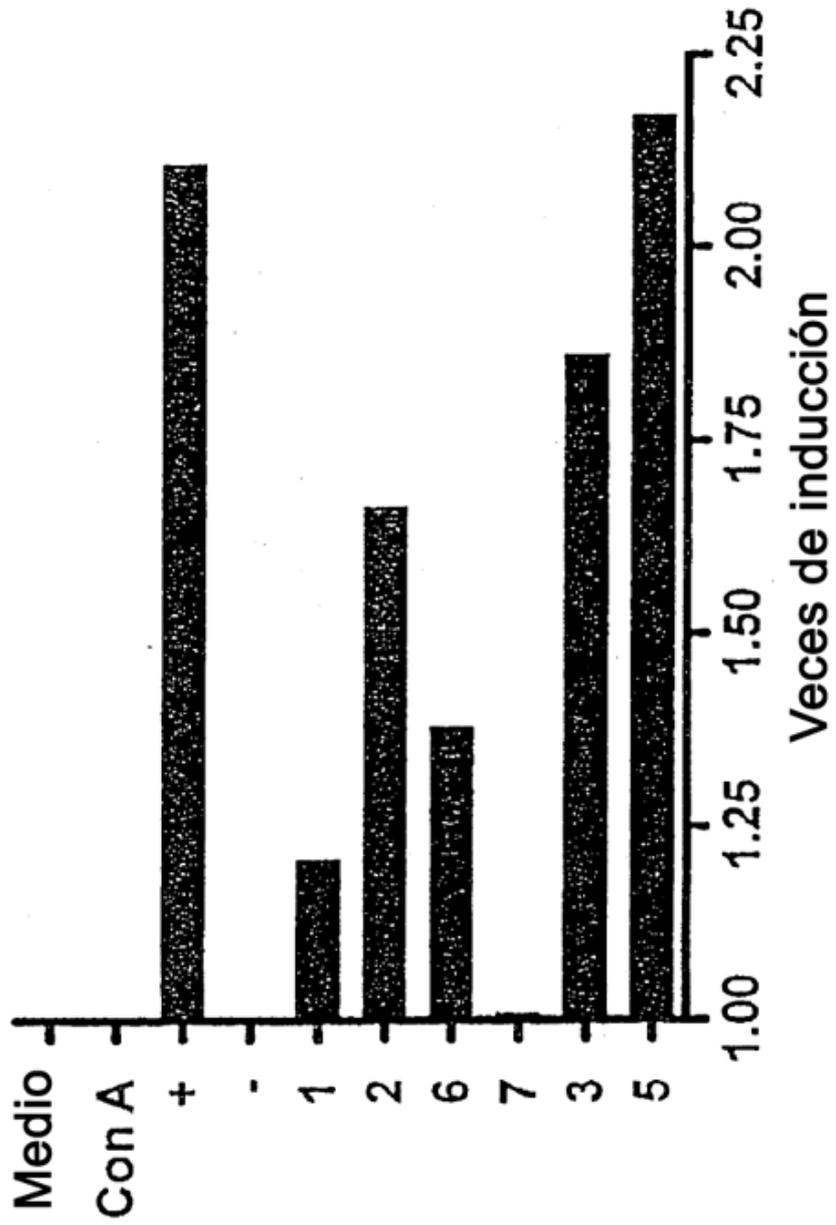


Fig. 10c

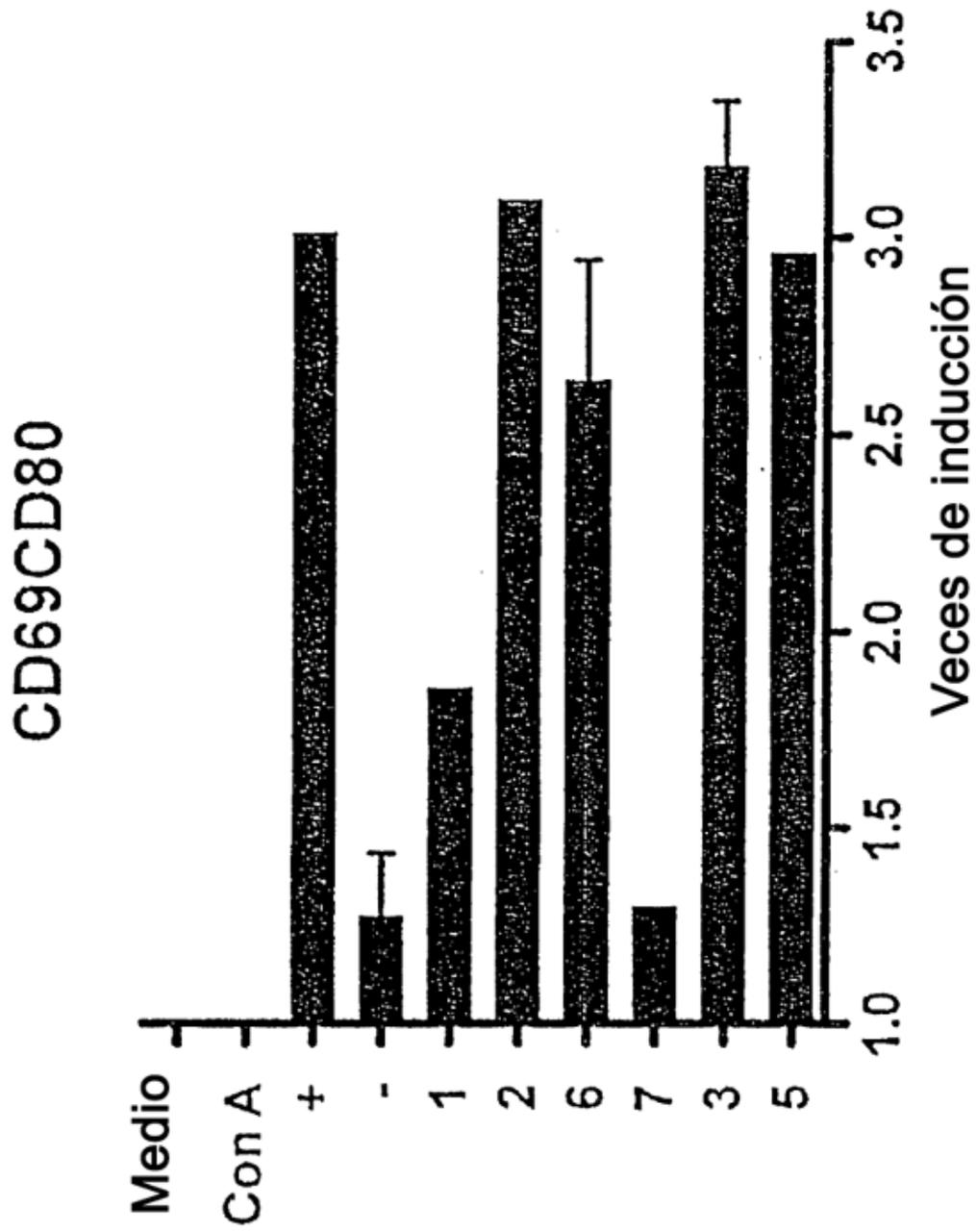


Fig. 11a

CD69CD86

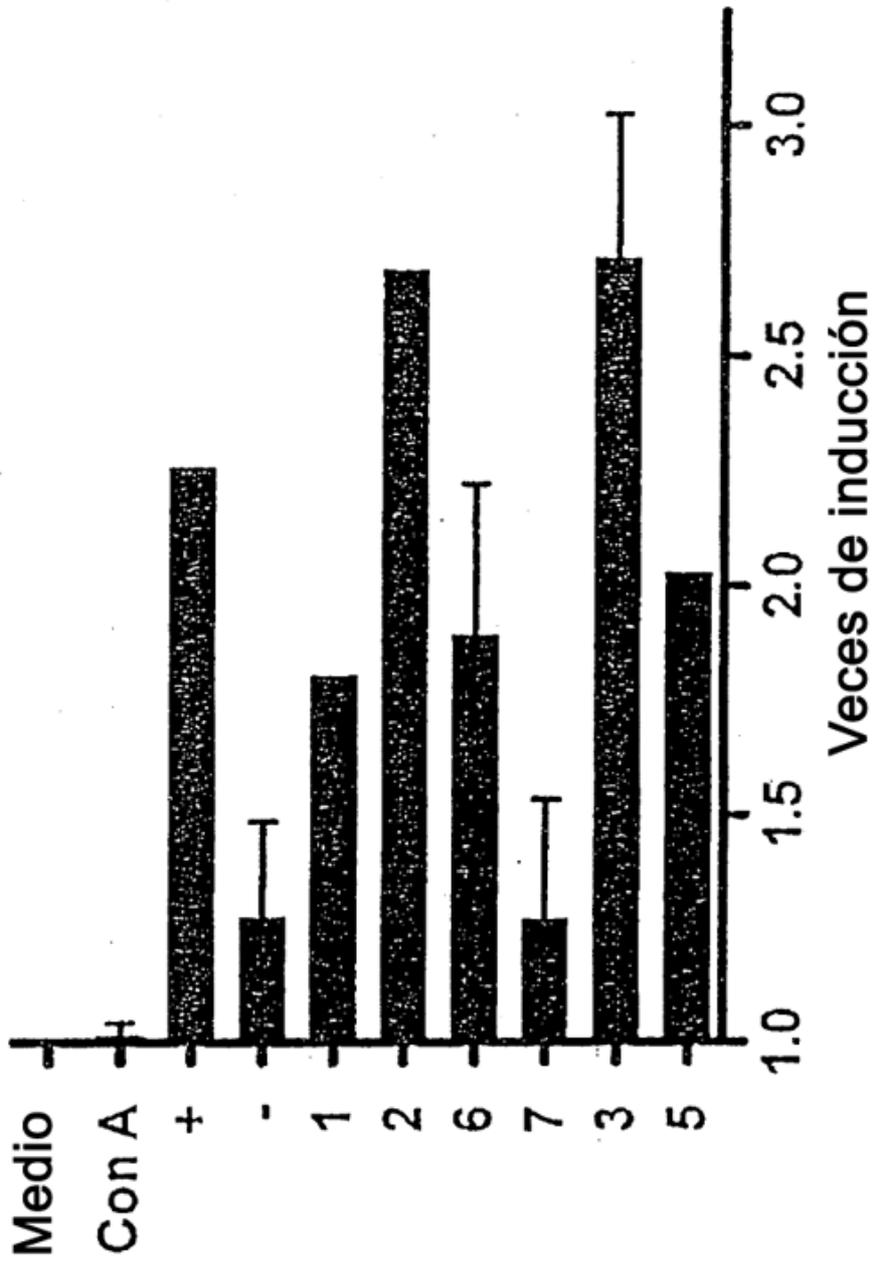


Fig. 11b

CD95

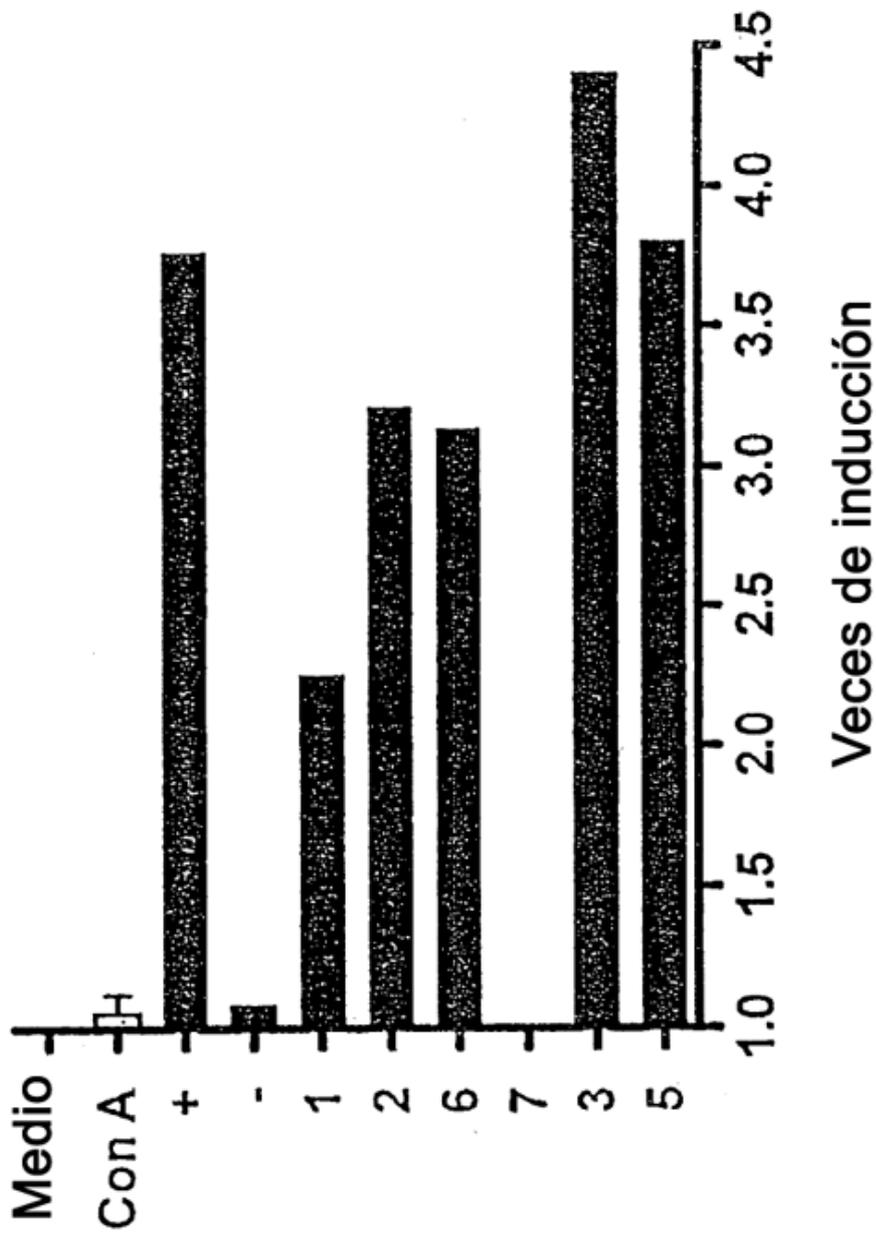


Fig. 12

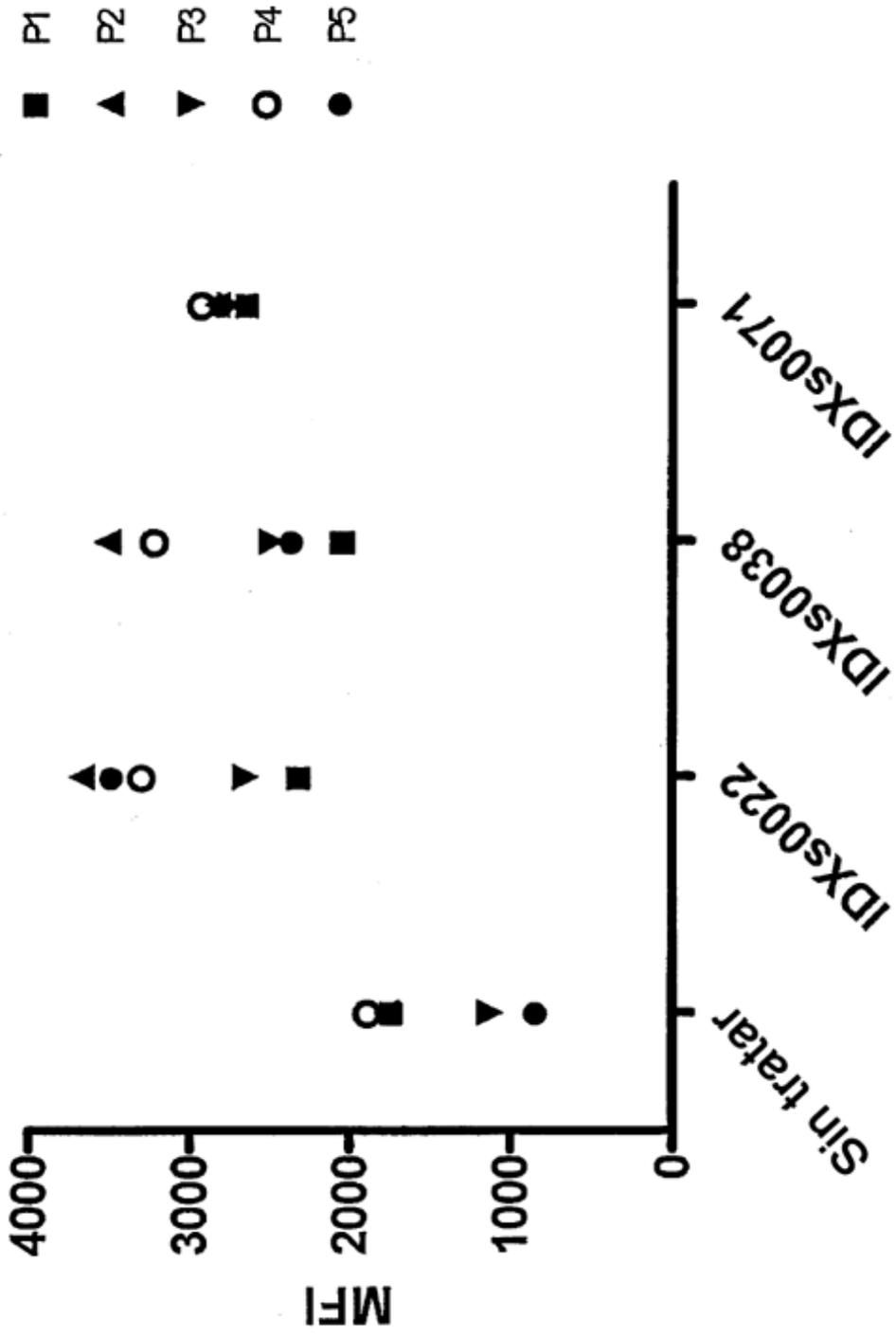


Fig. 13

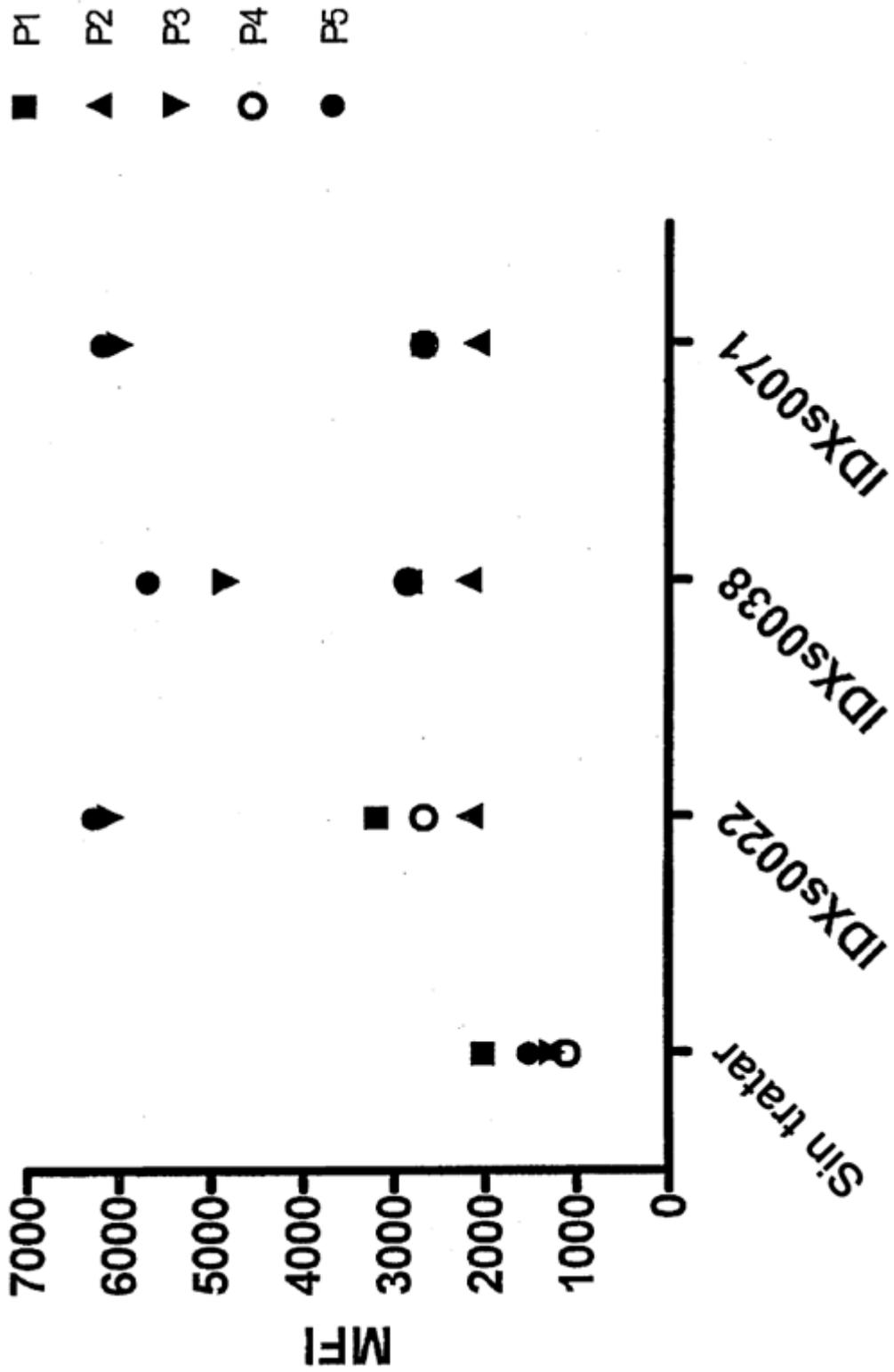


Fig. 14

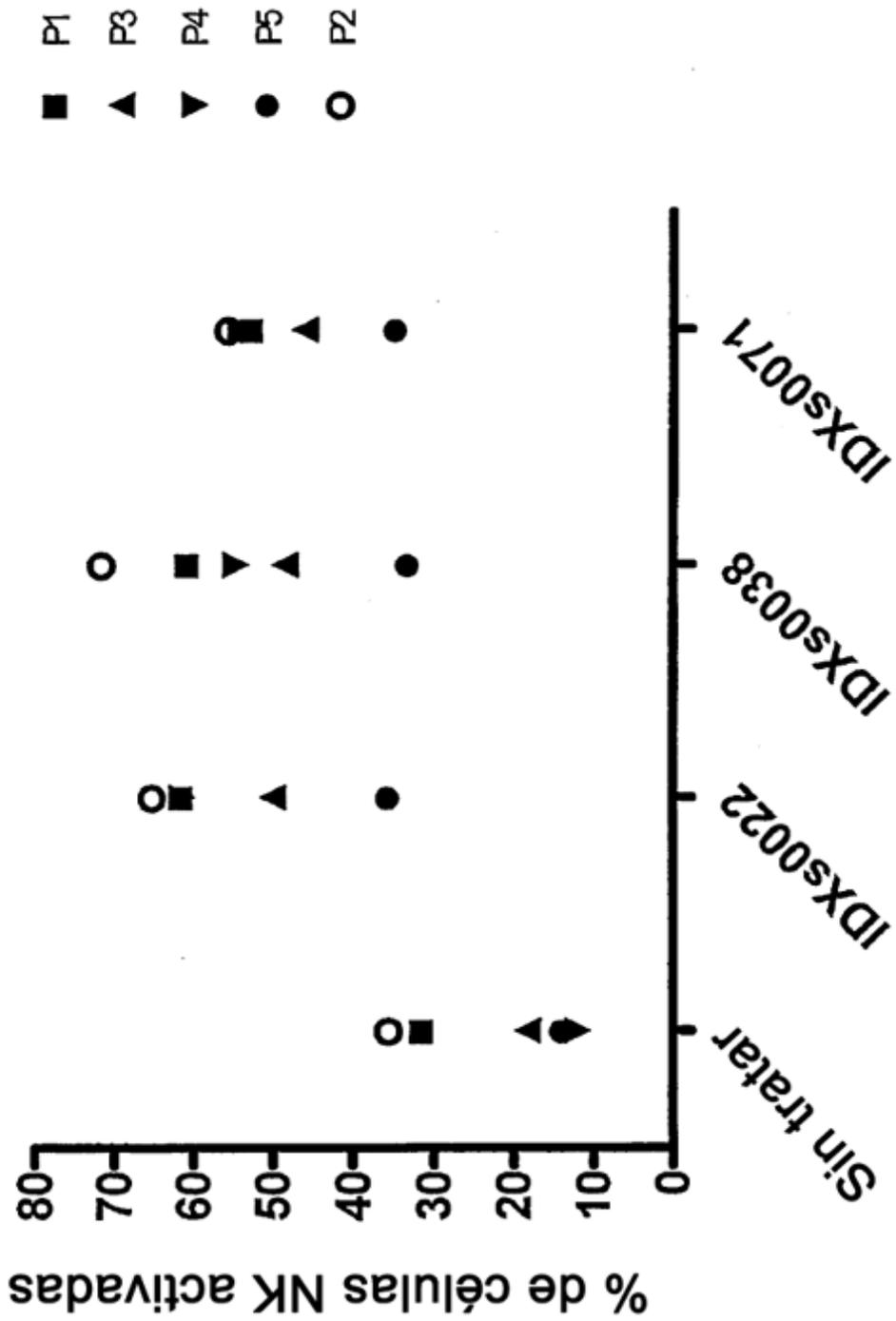


Fig. 15

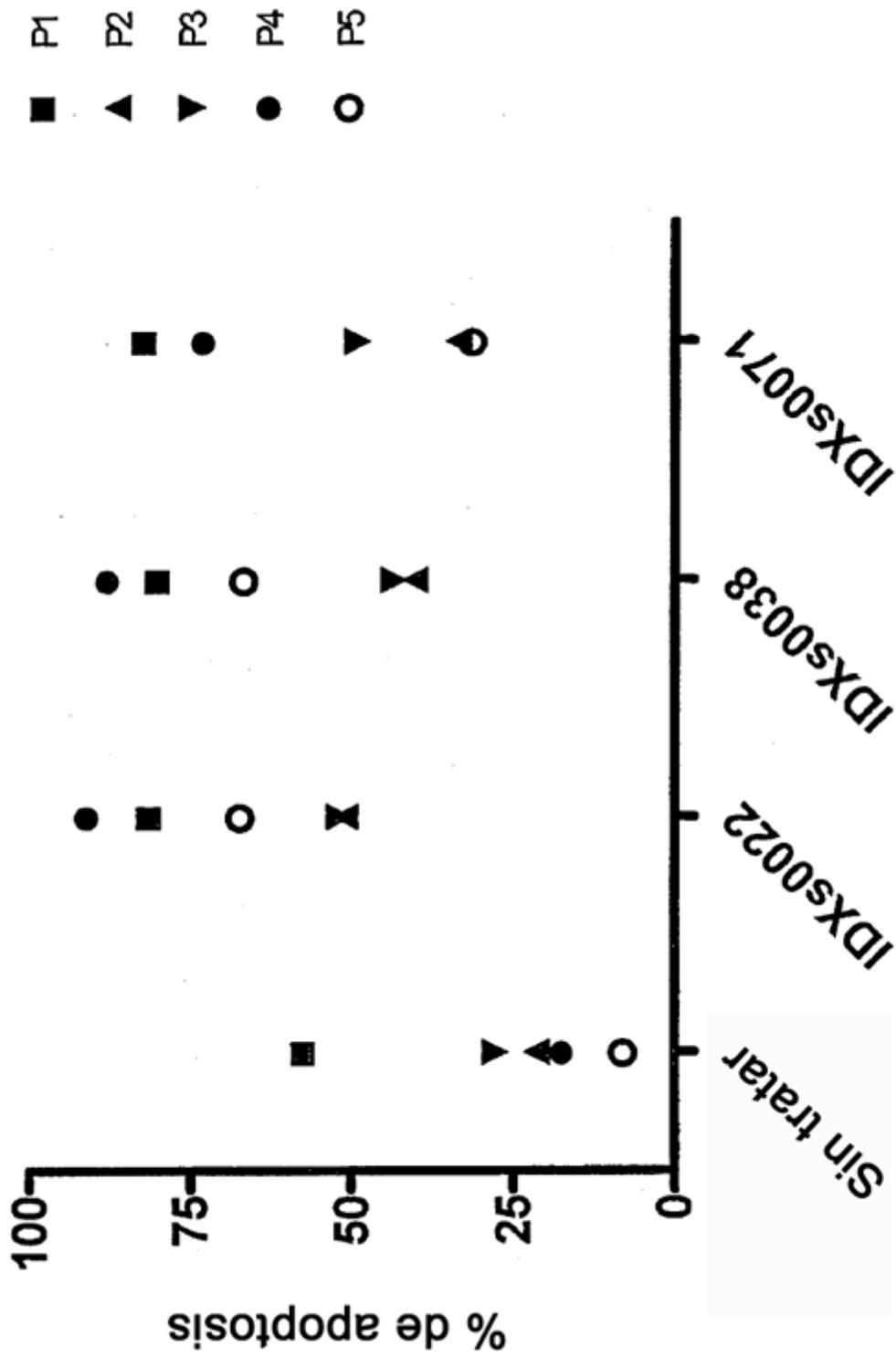


Fig. 16

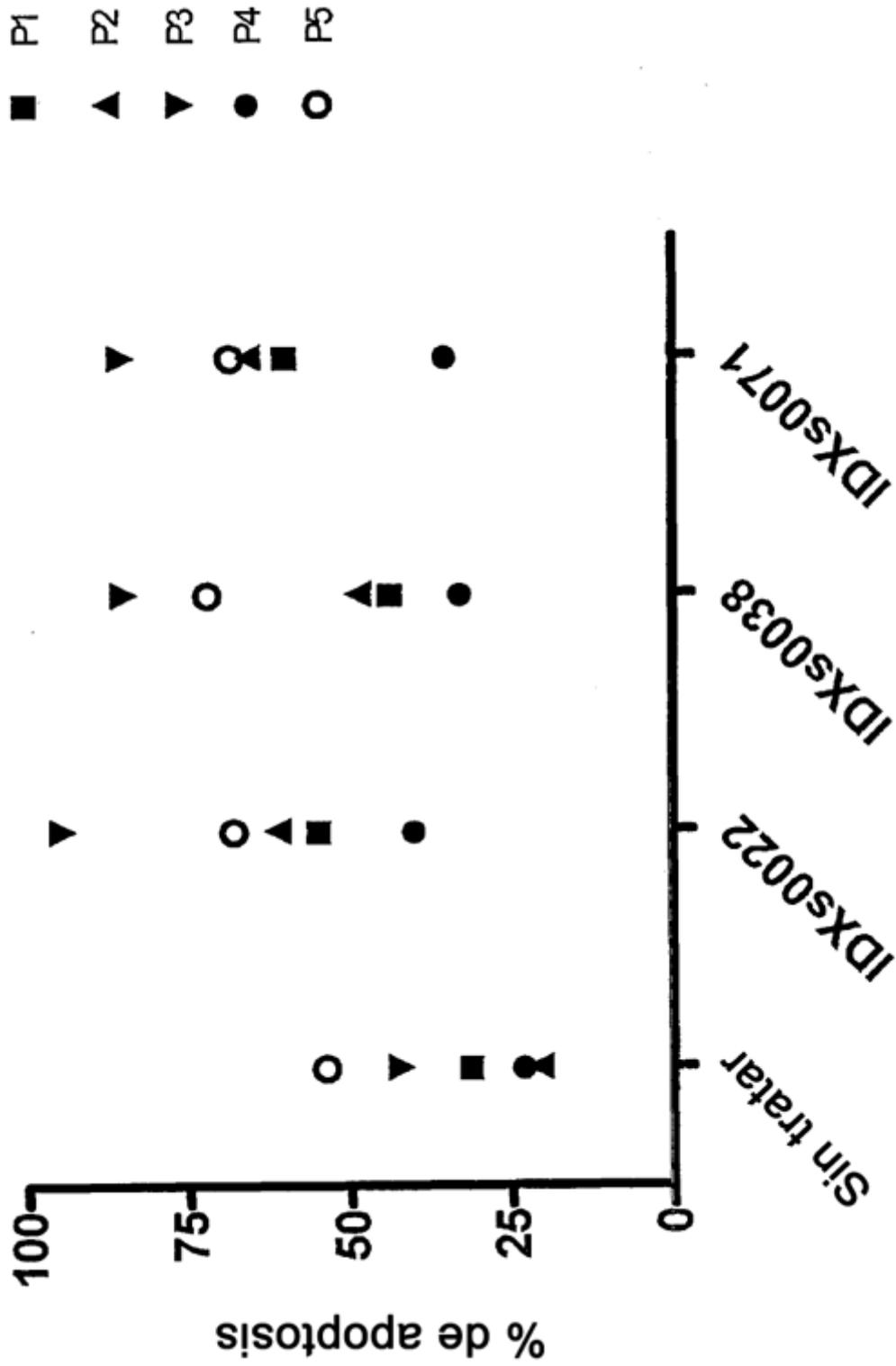


Fig. 17

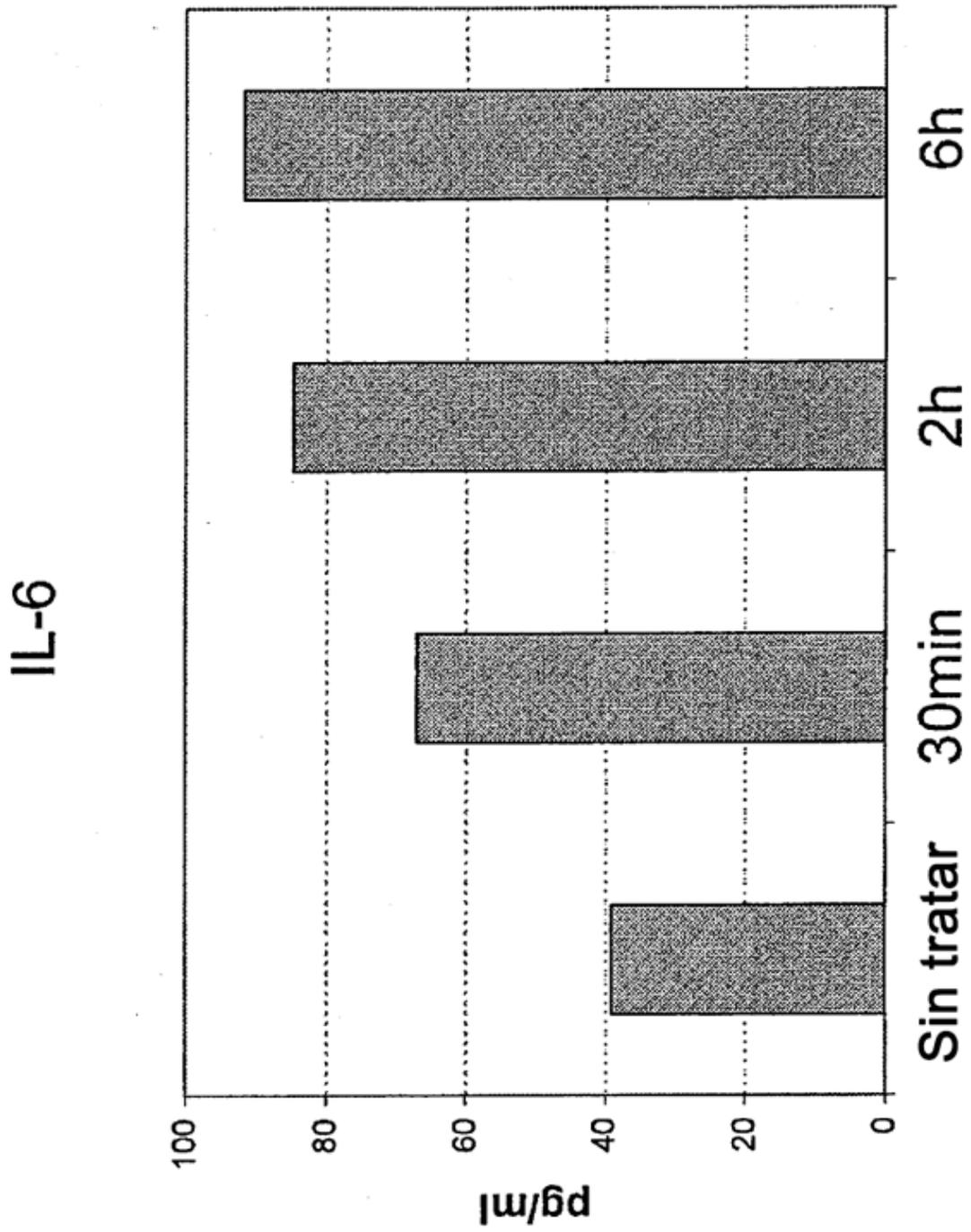


Fig. 18

IL-10

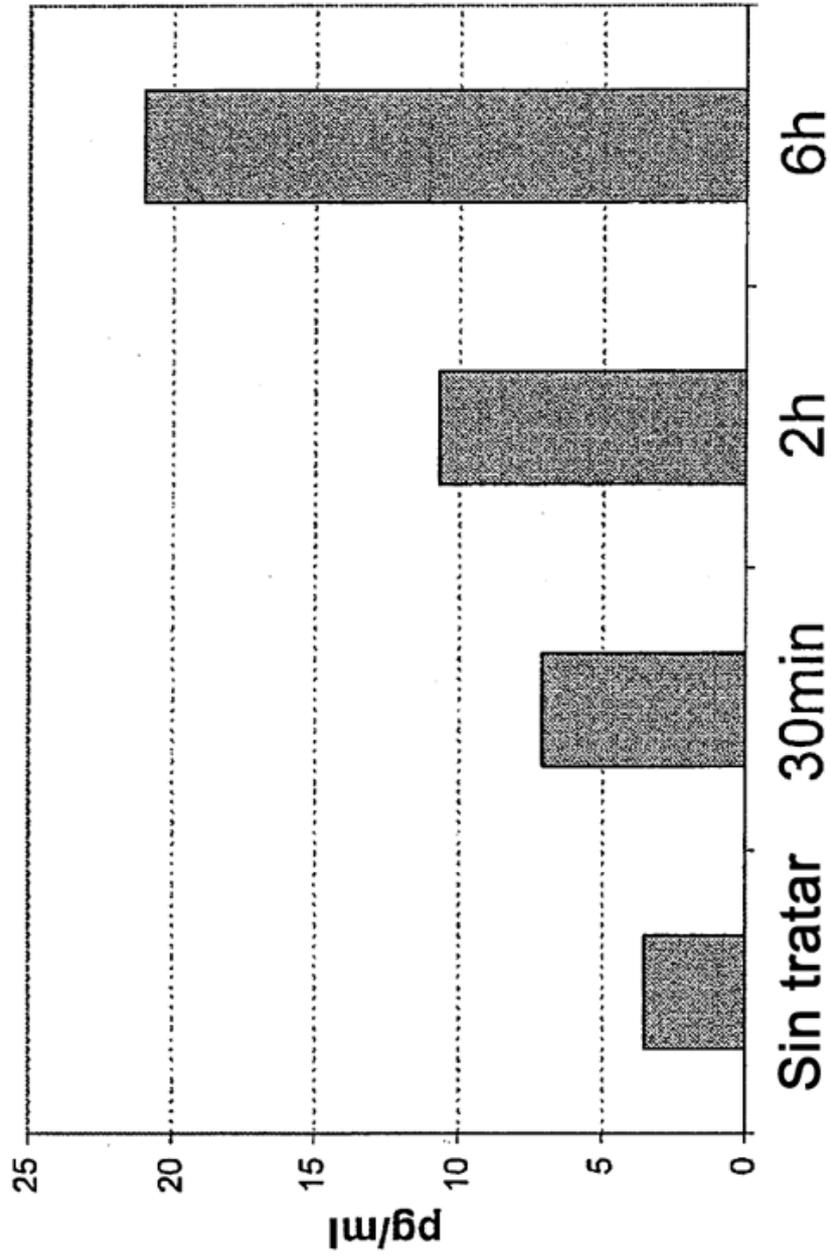


Fig. 19

IP-10

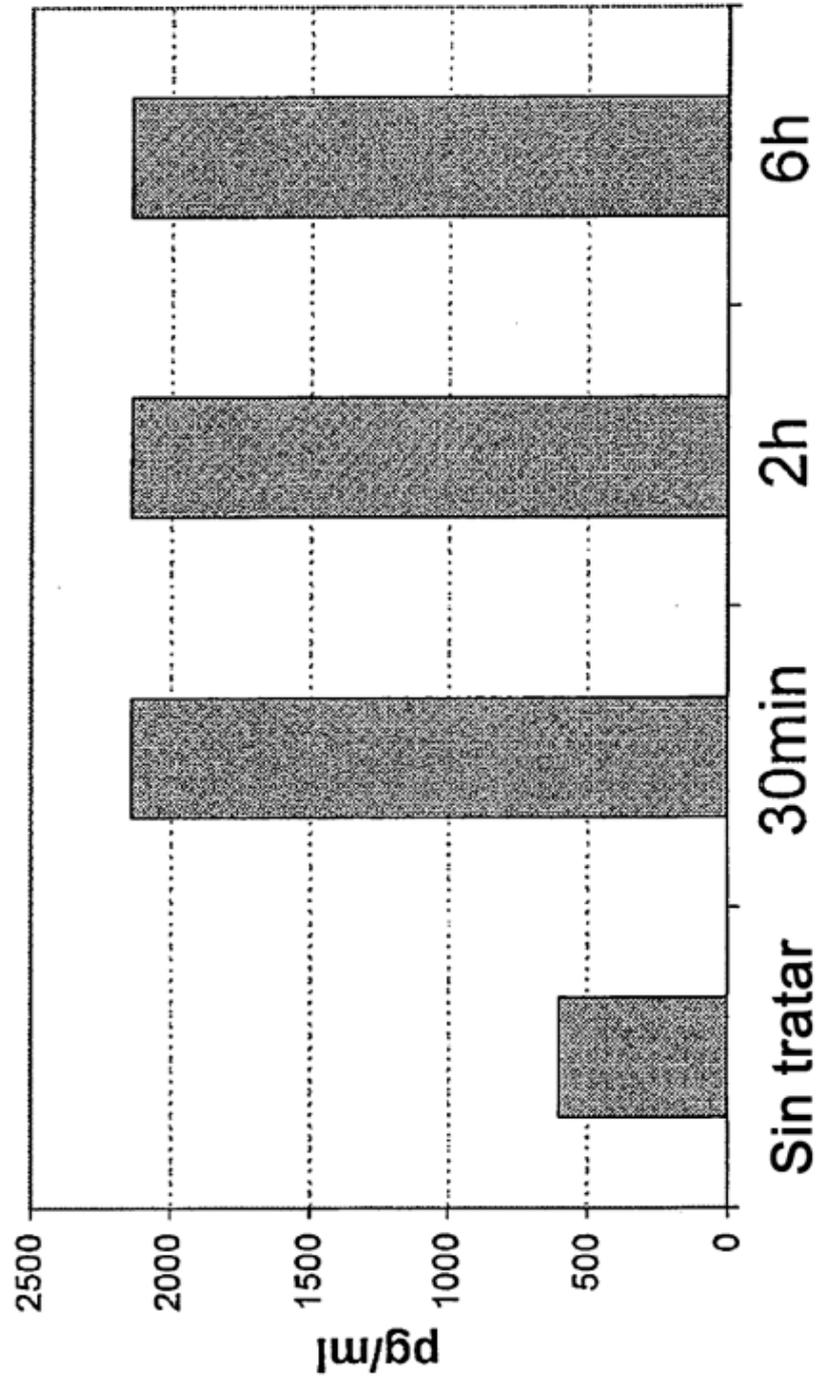


Fig. 20

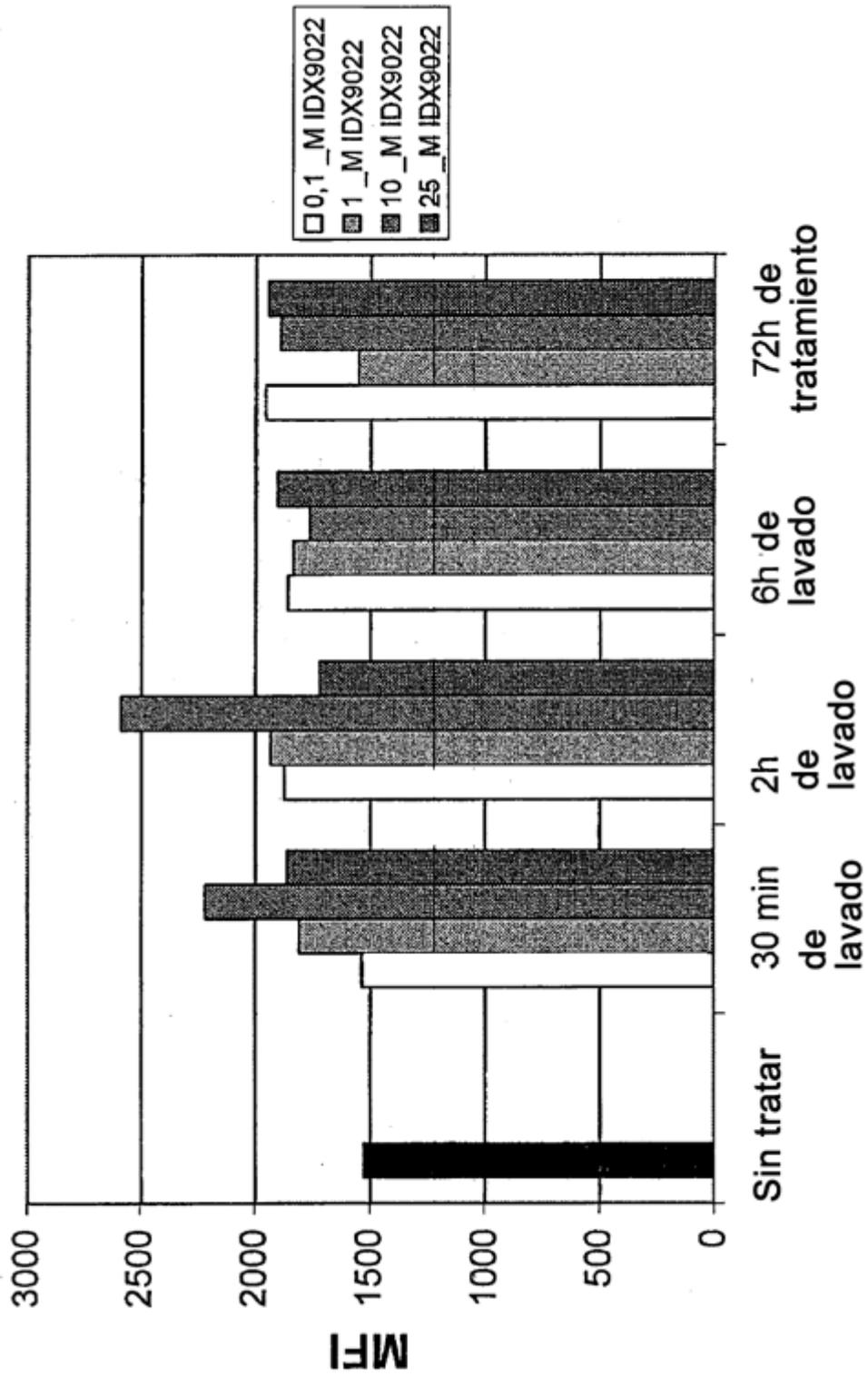


Fig. 21

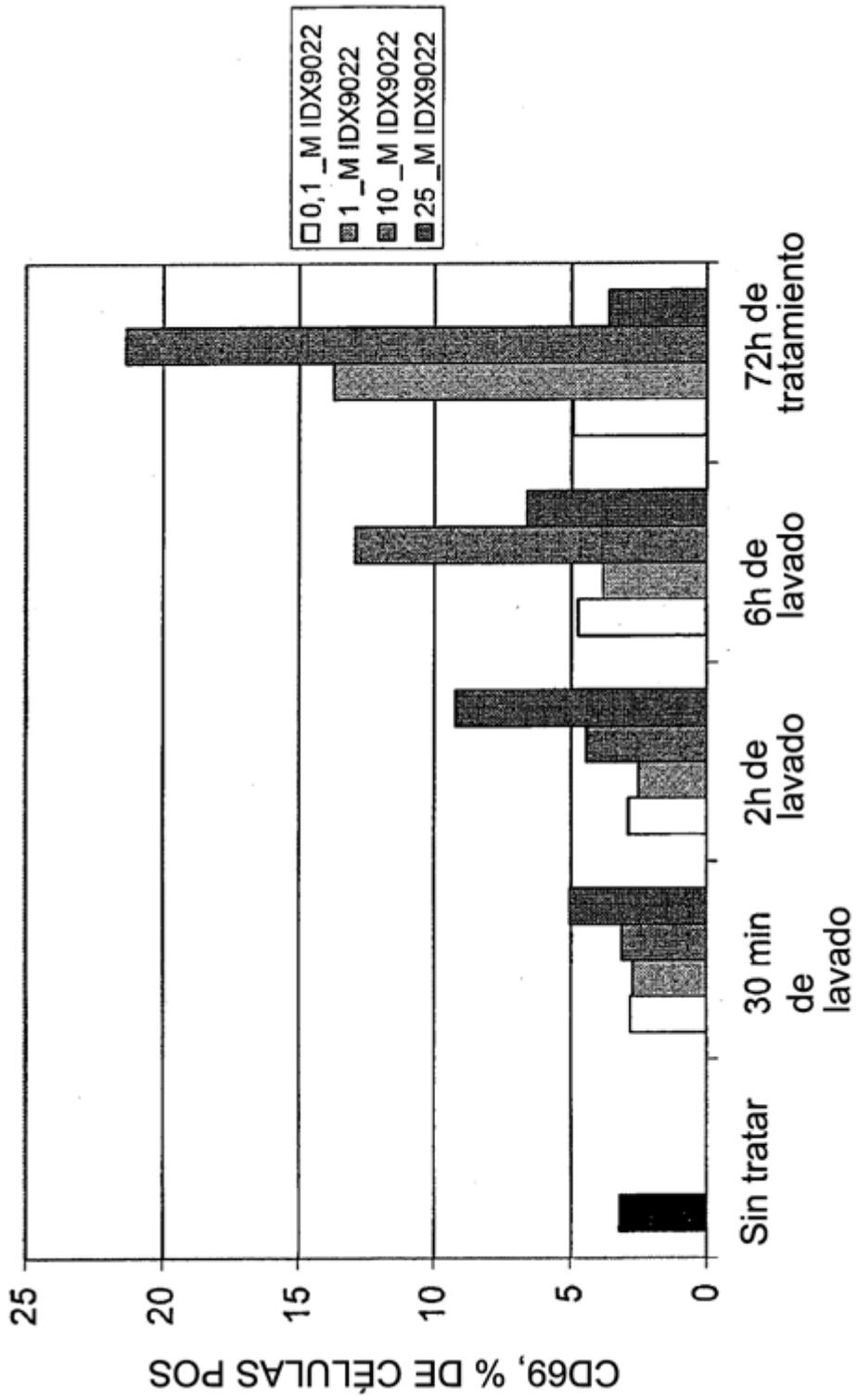


Fig. 22

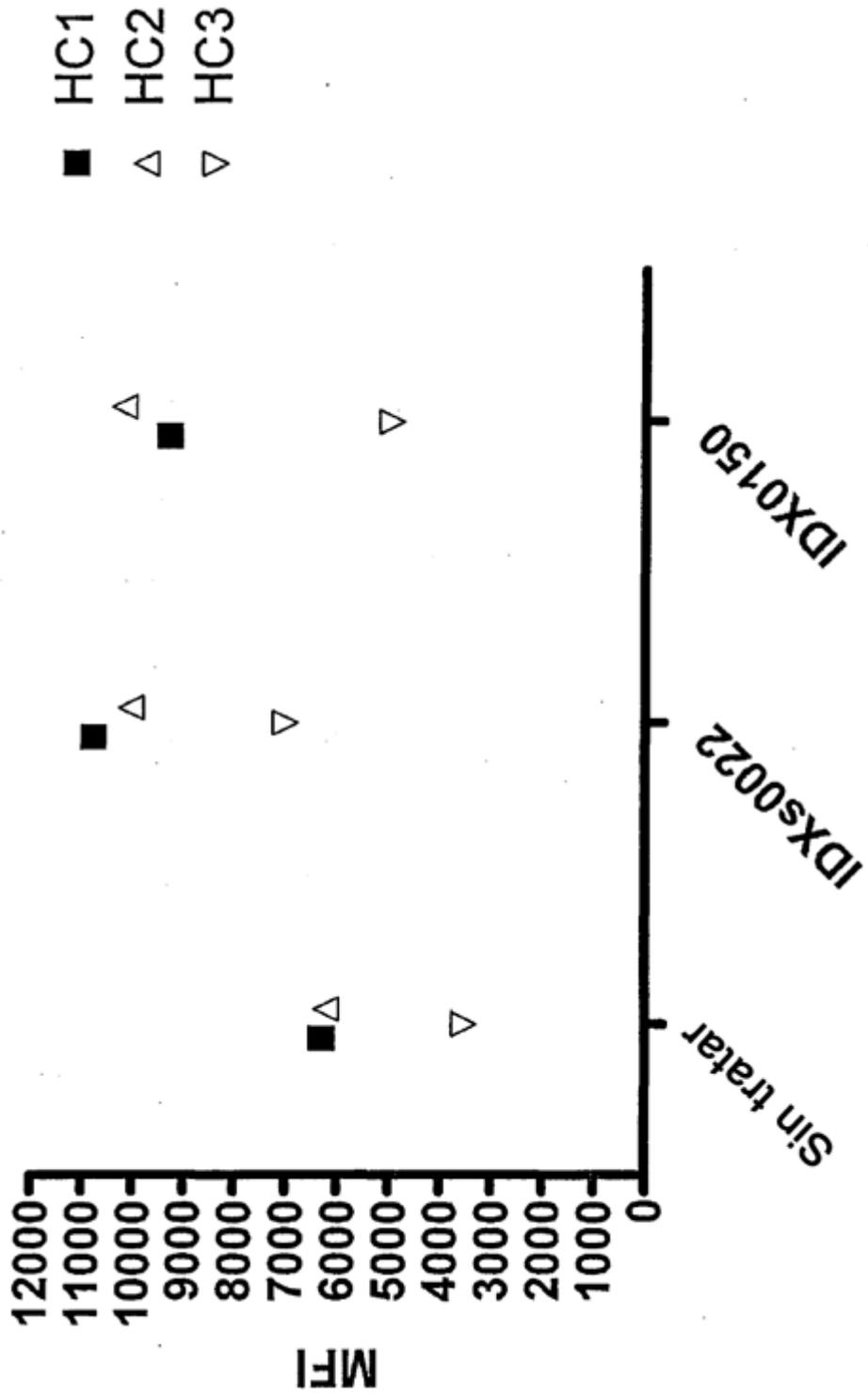


Fig. 23

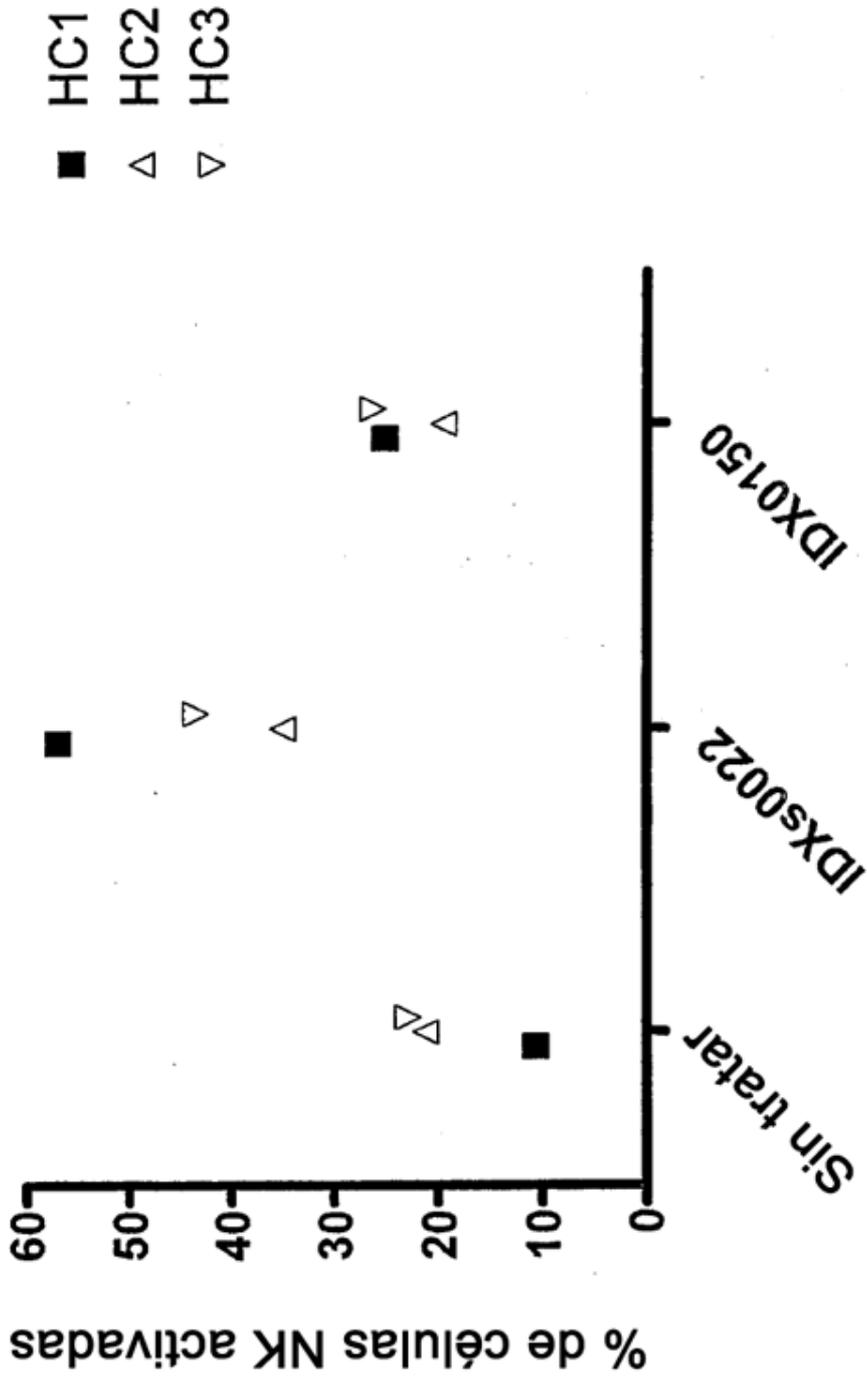


Fig. 24