

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 883**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7125** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61P 35/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2016** **PCT/AU2016/051059**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017** **WO17075670**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2016** **E 16861126 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2023** **EP 3370734**

54 Título: **Oligo antisentido para su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda**

30 Prioridad:

**05.11.2015 AU 2015904547**

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

**17.04.2023**

73 Titular/es:

**CHILDREN'S HOSPITAL LOS ANGELES (50.0%)**  
**4650 Sunset Boulevard**  
**Los Angeles, California 90027, US y**  
**ANTISENSE THERAPEUTICS LTD (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TACHAS, GEORGE y**  
**KIM, YONG-MI**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

### Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 938 883 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

Oligo antisentido para su uso en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda

5 **Campo técnico**

La presente divulgación proporciona métodos para la movilización de células de leucemia. En un ejemplo, la presente divulgación proporciona métodos para la movilización de células de leucemia desde la médula ósea hasta la sangre periférica. La presente divulgación también proporciona métodos de tratamiento de leucemia, por ejemplo, leucemia mieloide aguda (AML). La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

**Antecedentes**

La leucemia es un cáncer de las células que forman la sangre tempranas y, a menudo, se describe como aguda (crecimiento rápido) o crónica (crecimiento lento). La leucemia aguda es una expansión clonal de células tumorales en la médula ósea, la sangre u otros tejidos. Las leucemias agudas se clasifican como mieloides o linfoides según el linaje de las células blásticas (Camos et al., Clinical Translational Oncology 8 (8):550-9, 2006). La leucemia linfoblástica aguda (ALL) es un trastorno hematológico con una tasa de supervivencia del 40% en adultos y del 80-90% en niños (Hunger et al., New England Journal of Medicine 15;373(16):1541-52, 2015). La AML también es un trastorno hematológico, con una supervivencia global deficiente a los cinco años (menos del 30%), debido a una alta tasa de recaída Schlenk et al. New England Journal of Medicine 2008; 358:1909-1918; Döhner et al., New England Journal of Medicine 15 Septiembre 2015 17;373(12):1136-52). Hay alrededor de 54.270 casos de leucemia al año en los Estados Unidos, con alrededor de 6.250 casos de ALL, 20.830 casos de AML, 14.620 casos de CLL, 6.660 casos de CML y 5.910 casos de otras leucemias al año (Cancer.org: American Cancer Society 2014). Se ha demostrado que el microentorno de la médula ósea (MO) que incluye el nicho endóstico, vascular y estromal es el sitio más frecuente de recaída de la leucemia (Gaynon et al. Cancer 1998; 82:1387-1395).

El tratamiento está dominado por agentes quimioterapéuticos genéricos, predominantemente citarabina y daunorrubicina (What's new in acute myeloid leukemia research and treatment? American Cancer Society (2014)). La terapia para la AML incluye inducción de la remisión seguido de quimioterapia de posremisión para la mayoría de los pacientes. Para algunos, esto es seguido por un trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT). Las recomendaciones de tratamiento para la AML varían, teniendo en cuenta la edad del paciente, la citogenética y los factores de pronóstico.

Hay un fuerte enfoque sobre la introducción de la terapia dirigida, con una amplia variedad de nuevos objetivos específicos para la AML, el crecimiento y la progresión en desarrollo. Estos son predominantemente inhibidores de molécula pequeña (SM) de serina treonina proteína quinasas, agentes inmunológicos contra antígenos/genes asociados a tumores y antagonistas contra receptores de la superficie celular.

Claramente son necesarias nuevas estrategias para maximizar las tasas de remisión en respuesta al tratamiento y para prolongar la duración de la remisión.

La WO 00/39292 A2 divulga el uso de un oligonucleótido antisentido para inhibir la expresión de antígeno 4 muy grande (VLA-4).

Kronenwett R et al. divulga análisis funcionales de la regulación por disminución mediada por oligonucleótidos antisentido de la integrina VLA-4 en células hematopoyéticas leucémicas y normales.

La WO 2012/034194 divulga métodos para movilizar células madre y/o progenitoras que son positivas para VLA-4 a la sangre periférica de un sujeto desde un tejido.

**Sumario**

Por consiguiente, en una realización, la presente divulgación proporciona un método para movilizar células de leucemia que son positivas para la  $\alpha 4$  integrina en la sangre periférica de un sujeto humano. En una realización, el método comprende administrar al sujeto humano un compuesto antisentido de  $\alpha 4$  integrina. En algunas realizaciones, las células de leucemia se movilizan desde la médula ósea.

El compuesto antisentido es un oligonucleótido antisentido completamente complementario sobre la totalidad de dicho oligonucleótido con un ácido nucleico que codifica  $\alpha 4$  integrina humana, en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o inmunooncolíticos para su uso en un método para tratar la leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto humano, el método comprende el paso de administrar al sujeto humano una cantidad de dicho oligonucleótido antisentido en donde el oligonucleótido consiste en una región de 2' desoxinucleótido flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con uno o más ribonucleótidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo), uno o más fosforotioatos, y una o más 5-metilcitosinas y en donde el oligonucleótido antisentido consiste en la secuencia

de nucleobases de la SEQ ID NO: 1, y en donde el oligonucleótido antisentido es:

5'-MeC<sup>Me</sup>UG AGT<sup>Me</sup>CTG TTT<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>A<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>U-3'

en donde,

- 5 a) cada uno de los 19 enlaces internucleotídicos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato O,O-enlazado;
- b) los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);
- 10 c) los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 desde el extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;
- d) los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y
- 15 e) todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C),
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 Los compuestos antisentido se describen por la secuencia en la SEQ ID NO: 1 (secuencia antisentido de  $\alpha$ 4 integrina humana). Con propósitos de ilustración solamente se divulga la SEQ ID NO: 2 (secuencia antisentido de  $\alpha$ 4 integrina de ratón).

La presente descripción permite un método para movilizar células de leucemia a la sangre periférica de un sujeto, el método comprendiendo administrar al sujeto una cantidad eficaz de compuesto antisentido:

25 5'-MeC<sup>Me</sup>UG AGT<sup>Me</sup>CTG TTT<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>A<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>U-3'

en donde,

- a) cada uno de los 19 enlaces internucleotídicos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato O,O-enlazado;
- 30 b) los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);
- c) los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 desde el extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;
- 35 d) los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y
- e) todas las citosinas son 5-metilcitosinas (MeC),
- 40 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, las células de leucemia se movilizan desde la médula ósea.

En una realización, las células de leucemia son células CD34+ y/o CD33+.

45 En otra realización, la leucemia es AML.

En una realización, las células de leucemia son CD123+, CD34+ y CD38-.

50 En una realización, los métodos descritos anteriormente comprenden además administrar un antagonista de  $\alpha$ 4 integrina adicional antes, después o al mismo tiempo que el compuesto antisentido.

En una realización, los métodos descritos anteriormente comprenden además administrar un agente terapéutico antes, después o al mismo tiempo que el compuesto antisentido.

55 En una realización, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico o un agente inmunooncolítico.

En una realización, el agente terapéutico se administra aproximadamente 24 horas después de la administración del compuesto antisentido.

60 En una realización, el método comprende además monitorizar el número de células de leucemia en la sangre periférica antes de administrar el agente terapéutico. En una realización, las células de leucemia se monitorizan mediante citometría de flujo. En la técnica se conocen otros enfoques.

65 En una realización, las células de leucemia se monitorizan para determinar la expresión de uno o más

determinantes antigénicos de la superficie celular.

En una realización, las células de leucemia se monitorizan para la expresión de uno o más determinantes antigénicos de la superficie celular seleccionados de CD33, CD123, CD34 y CD38.

En otro enfoque, la presente descripción permite un método para el tratamiento de la leucemia en un sujeto humano, dicho método comprendiendo administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto antisentido para la  $\alpha 4$  integrina.

En una realización, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de compuesto antisentido, en donde el compuesto antisentido consiste en una región de desoxinucleótido 2' flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con uno o más ribonucleótidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo), uno o más fosforotioatos, y una o más 5-metilcitosinas y en donde el oligonucleótido antisentido consiste en la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1, y en donde el compuesto antisentido tiene la estructura:

5'-MeC<sup>Me</sup>UG AGT<sup>Me</sup>CTG TTT<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C A<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>U-3'

en donde,

- a) cada uno de los 19 enlaces internucleotídicos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato O,O-enlazado;
- b) los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);
- c) los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 desde el extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;
- d) los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y
- e) todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el compuesto antisentido inhibe la expresión de  $\alpha 4$  integrina.

En otro enfoque más, la presente memoria descriptiva contempla un método para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda en un sujeto humano, dicho método comprendiendo;

- (i) administrar al sujeto una cantidad eficaz de un oligonucleótido antisentido para la  $\alpha 4$  integrina; y
- (ii) administrar al sujeto un agente terapéutico antes, después o al mismo tiempo que el oligonucleótido antisentido.

En algunas realizaciones, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de oligonucleótido antisentido completamente complementario sobre la totalidad de dicho oligonucleótido para un ácido nucleico que codifica  $\alpha 4$  integrina humana, en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o inmunooncolíticos, en donde el oligonucleótido consiste en una región de desoxinucleótido 2' flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con uno o más ribonucleótidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo), uno o más fosforotioatos, y una o más 5-metilcitosinas y en donde el oligonucleótido antisentido consiste en la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1, y en donde el oligonucleótido antisentido tiene la estructura:

5'-MeC<sup>Me</sup>UG AGT<sup>Me</sup>CTG TTT<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C A<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>U-3'

en donde,

- a) cada uno de los 19 enlaces internucleotídicos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato O,O-enlazado;
- b) los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);
- c) los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 desde el extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;
- d) los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y
- e) todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

En una realización, el método comprende además monitorizar el número de células de leucemia en la sangre periférica antes de administrar el agente terapéutico.

5 En una realización, las células de leucemia se monitorizan para la expresión de uno o más determinantes antigénicos de la superficie celular seleccionados de CD33, CD123, CD34 y CD38.

En una realización, el método comprende además administrar un antagonista de  $\alpha 4$  integrina adicional antes, después o concurrentemente con el compuesto antisentido.

10 En una realización, el método comprende además administrar un agente terapéutico antes, después o al mismo tiempo que el compuesto antisentido.

En una realización, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico.

15 En una realización no limitativa, el agente terapéutico se administra aproximadamente 24 horas después de la administración del compuesto antisentido.

20 En una realización, el método comprende además monitorizar el número de células de leucemia en la sangre periférica antes de administrar el agente terapéutico.

En una realización, las células de leucemia se monitorizan mediante citometría de flujo.

25 En una realización, las células de leucemia se monitorizan para la expresión de uno o más determinantes antigénicos de la superficie celular, seleccionados de CD123, CD34 y CD38.

30 En otro enfoque, la presente divulgación permite el uso de un oligonucleótido antisentido completamente complementario sobre la totalidad de dicho oligonucleótido para un ácido nucleico que codifica  $\alpha 4$  integrina humana, en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o inmunooncolíticos, en un método de tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto humano, el método comprendiendo el paso de administrar al sujeto humano una cantidad de dicho oligonucleótido antisentido en donde el oligonucleótido consiste en una región de desoxinucleótido 2' flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con uno o más ribonucleótidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo), uno o más fosforotioatos, y una o más 5-metilcitosinas y en donde el oligonucleótido antisentido consiste en la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1, y en donde el oligonucleótido antisentido es de la siguiente manera:

35 5'-MeC<sup>Me</sup>UG AGT<sup>Me</sup>CTG TTT MeU<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C A<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U MeC<sup>Me</sup>U-3'  
en donde,

40 a) cada uno de los 19 enlaces internucleotídicos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato O,O-enlazado;

b) los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);

45 c) los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 desde el extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

d) los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y

50 e) todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 Por tanto, la memoria descriptiva proporciona un oligonucleótido antisentido completamente complementario sobre la totalidad de dicho oligonucleótido para un ácido nucleico que codifica  $\alpha 4$  integrina humana para su uso en un método para tratar la leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto humano, el método comprendiendo el paso de administrar al sujeto humano una cantidad de dicho oligonucleótido antisentido en donde el oligonucleótido consiste en una región de desoxinucleótido 2' flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con uno o más ribonucleótidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo), uno o más fosforotioatos, y una o más 5-metilcitosinas y en donde el oligonucleótido antisentido consiste en la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1, y en donde el oligonucleótido antisentido es:

60 5'-MeC<sup>Me</sup>UG AGT<sup>Me</sup>CTG TTT MeU<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C A<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U MeC<sup>Me</sup>U-3'  
en donde,

65 a) cada uno de los 19 enlaces internucleotídicos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato O,O-enlazado;

b) los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);

c) los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 desde el extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

d) los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y

e) todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro enfoque, la presente descripción permite el uso de un oligonucleótido antisentido completamente complementario sobre la totalidad de dicho oligonucleótido para un ácido nucleico que codifica α4 integrina humana, en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o inmunooncolíticos en un método para tratar la leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto humano, el método comprendiendo el paso de administrar al sujeto humano una cantidad de dicho oligonucleótido antisentido en donde el oligonucleótido consiste en una región de desoxinucleótido 2' flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con uno o más ribonucleótidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo), uno o más fosforotioatos, y una o más 5-metilcitosinas y en donde el oligonucleótido antisentido consiste en la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1, y en donde el oligonucleótido antisentido es:

5'-<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>UG AGT<sup>Me</sup>CTG TTT <sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C A<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U <sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>U-3'  
en donde,

a) cada uno de los 19 enlaces internucleotídicos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato O,O-enlazado;

b) los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);

c) los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 desde el extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

d) los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y

e) todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Por tanto, la memoria descriptiva proporciona un oligonucleótido antisentido completamente complementario sobre la totalidad de dicho oligonucleótido para un ácido nucleico que codifica α4 integrina humana, en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o inmunooncolíticos, en donde el oligonucleótido consiste en una región de desoxinucleótido 2' flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con uno o más ribonucleótidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo), uno o más fosforotioatos, y una o más 5-metilcitosinas y en donde el oligonucleótido antisentido consiste en la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1, y en donde el oligonucleótido antisentido es:

5'-<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>UG AGT<sup>Me</sup>CTG TTT <sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C A<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U <sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>U-3'  
en donde,

a) cada uno de los 19 enlaces internucleotídicos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato O,O-enlazado;

b) los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);

c) los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 desde el extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;

d) los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y

e) todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

para su uso en un método de tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML) o cuando se usa en el tratamiento de la AML en un sujeto humano, el método comprende el paso de administrar al sujeto humano una cantidad de dicho oligonucleótido antisentido.

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia que no entre dentro del alcance de las reivindicaciones se proporciona únicamente con propósitos de información.

## Breve descripción de los dibujos

**Figura 1. ATL1102 aumenta las células AML (HL60) en la sangre periférica.** Se inyectaron células HL-60 (AML;  $5 \times 10^6$ /por ratón) a través de la vena de la cola en ratones hembra NSG irradiados de manera subletal. La presencia de células humanas (hCD45) se determinó semanalmente mediante citometría de flujo de glóbulos blancos aislados de sangre periférica. 23 días después de la inyección de leucemia, los ratones se dividen aleatoriamente en 3 grupos tratados con control antisentido (CTRL) (150 mg/kg, n=3), ATL1102 (50 mg/kg, n=4) o ATL1102 (150 mg/kg, n=3). Se extrajo sangre periférica antes y 2 y 24 horas después del tratamiento con ATL1102 y se aislaron glóbulos blancos y se tiñeron para CD45 murino (m), CD45 humano (h) y hCD33. ATL1102 indujo una fuerte movilización de células de AML a la sangre periférica de ratones receptores de leucemia en comparación con los ratones tratados con antisentido de control ( $52,8\% \pm 45,4\%$  frente a  $9,8\% \pm 15,9\%$  a las 24 h después del tratamiento con 50 mg/kg de ATL1102, n = 3).

**Figura 2. ATL1102 regula por disminución CD49d in vitro.** La expresión de CD49d se determinó por citometría de flujo después de 24, 48 y 72 horas de nucleoporación de células HL60 con ATL1102 (1, 3 y 10  $\mu$ M) o control revuelto (30  $\mu$ M). (A) Se mide el porcentaje de células positivas para CD49d con expresión superficial de CD49d. (B) Se mide la media PE de fluorescencia.

**Figura 3. Efecto de ATL1102 sobre la línea celular HL-60 de AML.** Se nucleofectaron células HL-60 ( $3 \times 10^6$ ) con un antisentido de control (30  $\mu$ M) o ATL1102 (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 30  $\mu$ M) usando Amaxa Nucleofector Kit V (Lonza). (A) La expresión de CD49d se evalúa mediante citometría de flujo cada 24 horas después del tratamiento durante 72 horas. (B) Se miden el número de células positivas para CD49d y la media de fluorescencia de PE. (C) Proporción de expresión de CD49d en comparación con el control. (D) Proporción de la media de fluorescencia de las células positivas para CD49d en comparación con el control. El análisis FACS reveló una disminución significativa de la expresión superficial de CD49d de manera dependiente de la dosis ( $57,8\% \pm 7,2$  ATL1102 (10  $\mu$ M) frente a  $99,7\% \pm 0,1$  para el control antisentido (30  $\mu$ M),  $P < 0,001$ , n=3, 72 h después tratamiento ATL1102). La expresión de CD49d sobre el nivel de ARNm disminuyó significativamente por el tratamiento con ATL1102 antisentido de  $\alpha 4$  integrina en la línea celular de AML humana HL-60 ( $85,2\% \pm 15,4$  de inhibición de expresión usando ATL1102 1  $\mu$ M después de 24 h en comparación con el control,  $p < 0,001$ ) según se evalúa por RT-PCR.

**Figura 4 Efecto de ATL1102 sobre la línea celular HL-60 de AML.** Las células HL-60 se nucleofectaron con un antisentido de control (30  $\mu$ M) o ATL1102 (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 30  $\mu$ M) usando Amaxa Nucleofector Kit V (Lonza). El ensayo de apoptosis se realizó usando tinción doble con Anexina V (PE)/DAPI y se evaluó mediante citometría de flujo cada 24 horas después del tratamiento durante 72 horas. Se observó un efecto sobre la apoptosis de las células HL60 después del tratamiento con ATL1102 por encima de 10  $\mu$ M.

**Figura 5. Efecto de ATL1102 sobre la línea celular HL-60 de AML.** Se nucleofectaron células HL-60 ( $3 \times 10^6$ ) con un antisentido de control (30  $\mu$ M) o ATL1102 (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M y 30  $\mu$ M) usando Amaxa Nucleofector Kit V (Lonza). (A) El efecto de ATL1102 se evaluó mediante tinción BrdU/7-AAD y se reveló por citometría de flujo a las 48 horas después del tratamiento. (B) Se muestran ejemplos de las puertas de citometría de flujo usadas para el análisis del ciclo celular para 1  $\mu$ M y 30  $\mu$ M de ATL1102. Se observó el efecto sobre el ciclo celular de las células HL60 después del tratamiento con ATL1102 por encima de 10  $\mu$ M.

**Figura 6. Diseño de ensayo de movilización.** Se inyectaron células HL-60 ( $5 \times 10^6$ /por ratón) a través de la vena de la cola en ratones NSG irradiados de manera subletal. La presencia de células humanas (hCD45) se determinó semanalmente mediante citometría de flujo de glóbulos blancos aislados de sangre periférica (PB). 23 días después de la inyección de leucemia, los ratones se trataron con control antisentido (CTRL) (150 mg/kg, n=3) o ATL1102 (50 mg/kg, n=4). Se extrajeron PB antes y 24 horas después del tratamiento con ATL1102. Los ratones se muestrearon el día 0 y se trataron con ATL1102 o control 24 horas después. Sangre periférica para analizar la movilización de células mCD45/hCD45/hCD33 mediante citometría de flujo. Si se moviliza, se sacrifican la mayoría de los ratones (los 4 primeros grupos) y se recogen los órganos (sangre periférica, bazo y médula ósea). Todos los ratones se teñirán para un estudio de injerto (mCD45/hCD45/hCD33), para la expresión de hCD49d y hCD29 y para una apoptosis (Anexina V/7AAD) y se contará el número de células (mediante la exclusión de células muertas con azul de Trypan) con el objetivo de determinar si las células movilizadas regresan a la médula ósea, se trasladan a otro órgano o mueren en la sangre (especialmente en el experimento "a largo plazo"). También se realizará un recuento sanguíneo completo usando un Hemavet5/Hemalyzer.

**Figura 7 Transducción de HL-60 con vector de expresión de luciferasa.** Se transdujeron células HL-60 con luciferasa de luciérnaga lentiviral (Hsieh et al. Blood 121 (70): 1814-1818, 2013).

## Clave para el listado de secuencias

**SEQ ID NO: 1** Compuesto antisentido de  $\alpha 4$  integrina humana (ATL1102).

**SEQ ID NO: 2** Compuesto antisentido de  $\alpha 4$  integrina murina (ISIS348574); proporcionado únicamente con

propósitos ilustrativos.

## Descripción de las realizaciones

### 5 *Técnicas generales y definiciones seleccionadas*

A menos que se defina específicamente lo contrario, se considerará que todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por los expertos en la técnica (por ejemplo, en cultivo celular, genética molecular, inmunología, inmunohistoquímica, química de proteínas y bioquímica).

A menos que se indique lo contrario, la proteína recombinante, el cultivo celular y las técnicas inmunológicas utilizadas en la presente divulgación son procedimientos estándar, bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales técnicas se describen y explican a lo largo de la bibliografía en fuentes como Perbal, B. V. (1984). *A Practical Guide to Molecular Cloning*. Nueva York: Wiley; Sambrook, J., & Green, M. R. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Fourth Edition). Nueva York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; Brown, T. A. (Ed.). (1991). *Essential Molecular Biology: A Practical Approach* (Vol. 1 y 2). Oxford: IRL Press at Oxford University Press; Glover, M., & Hames, B. D. (Eds.). (1995 and 1996). *DNA Cloning: A Practical Approach* (Vols. 1-4); Ausubel, F. M. (Ed.). (1987 incluyendo todas las actualizaciones hasta ahora). *Current Protocols in Molecular Biology*. Nueva York: John Wiley & Sons; Harlow, E., & Lane, D. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., & Strober, W. (Eds.). (1991 incluyendo todas las actualizaciones hasta ahora). *Current Protocols in Immunology*. Nueva York: John Wiley & Sons.

Se entenderá que el término "y/o", por ejemplo, "X y/o Y" significa "X e Y" o "X o Y" y se interpretará como un apoyo explícito para ambos significados o para cualquiera de los dos significados.

Como se usa en la presente, "alrededor de" o "aproximadamente" significará generalmente dentro del 20%, más preferiblemente dentro del 10%, e incluso más preferiblemente dentro del 5%, de un valor o intervalo dado.

A lo largo de esta memoria descriptiva se entenderá que la palabra "comprender", o variaciones como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos indicados, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos.

A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que se indique específicamente lo contrario o el contexto requiera lo contrario, la referencia a un solo paso, composición de la materia, grupo de pasos o grupo de composiciones de la materia se considerará que abarca uno y una pluralidad (es decir, uno o más) de esos pasos, composiciones de materia, grupos de pasos o grupo de composiciones de materia.

El término "leucemia", como se usa en la presente, se refiere a un grupo de cánceres que habitualmente comienzan en la médula ósea y dan como resultado un alto número de glóbulos blancos anormales. El término incluye una o más de las siguientes leucemias, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia aguda con marcadores de células B (BALL), leucemia aguda con marcadores de células T (TALL) y leucemia monocítica aguda (AMoL) otras leucemias agudas y leucemia mieloide crónica (CML), leucemia linfoblástica crónica (CLL) y otras leucemias crónicas. Este término incluye todos los subtipos de las leucemias.

El término "leucemia mieloide aguda (AML)", como se usa en la presente, se refiere a un trastorno hematopoyético clonal que puede derivarse de una célula madre hematopoyética o una célula progenitora específica de linaje o una célula diferenciada. La AML se caracteriza típicamente tanto por un predominio de formas inmaduras (con maduración variable, pero incompleta) como por la pérdida de la hematopoyesis normal. Los linajes hematopoyéticos únicos o múltiples pueden comprender el clon leucémico. El porcentaje requerido de blastos/equivalentes de blastos es típicamente del  $\geq 20\%$  en la sangre periférica y la médula ósea; un porcentaje más bajo es aceptable en casos con translocaciones definitorias de AML, la AML con anomalías genéticas recurrentes t(15;17), t(8;21), inv(16) o t(16;16) y algunos casos de eritroleucemia. El porcentaje de blastos se deriva del recuento de todas las células nucleadas para el diagnóstico de AML, con la excepción de las leucemias eritroides agudas en las que el porcentaje de blastos se basa en células no eritroides. En sitios extramedulares, un diagnóstico de sarcoma mieloide es equivalente a AML. Los blastos, los equivalentes de blastos y otras células hematopoyéticas inmaduras pueden identificarse y distinguirse de varios parecidos a blastos en base a características morfológicas, citoquímicas o inmunofenotipo. Para el diagnóstico de AML, los blastos incluyen mieloblastos, monoblastos y megacarioblastos, mientras que los promonocitos son equivalentes de blastos en todos los tipos de AML y los promielocitos son equivalentes de blastos exclusivamente en la leucemia promielocítica aguda.

El término "célula de leucemia", como se usa en la presente, se refiere a una célula que en muchos aspectos se asemeja a una célula madre. Las células madre son células clonogénicas capaces tanto de

autorrenovación como de diferenciación multilínea. Las células del sistema hematopoyético se generan continuamente a partir de progenitores autorrenovables en la médula ósea llamados células madre hematopoyéticas (HSC). Las HSC pueden dividirse en un subconjunto a largo plazo, capaz de autorrenovarse indefinidamente, y un subconjunto a corto plazo que se autorrenueva durante un intervalo definido. Las HSC dan lugar a progenitores de oligolínaje que no se autorrenuevan, que a su vez dan lugar a una progenie que está más restringida en su potencial de diferenciación y, finalmente, a células funcionalmente maduras. Las células madre normales y las células de leucemia comparten la capacidad de autorrenovarse. La leucemia puede surgir de mutaciones que se acumulan en las HSC. Alternativamente, o además, la leucemia puede resultar de la proliferación de células progenitoras comprometidas o incluso de células diferenciadas que han vuelto a adquirir las características de las células madre, principalmente la capacidad de autorrenovación. Las células de leucemia comúnmente tienen una o más de capacidad de proliferación aumentada, capacidad de autorrenovación aumentada, inestabilidad genómica y diferenciación alterada, lo que da como resultado una supervivencia celular aumentada. En una realización, las células de leucemia son CD34-.

El término "cantidad eficaz", como se usa en la presente, se refiere a cualquier dosis del compuesto antisentido suficiente para efectuar la movilización de células de leucemia en las condiciones de administración. En una realización, una cantidad eficaz es además o alternativamente cualquier dosis del compuesto antisentido suficiente para efectuar la detención de células de leucemia o la muerte de células de leucemia (mediante, por ejemplo, apoptosis), o la inhibición de la proliferación de células de leucemia, en las condiciones de administración.

El término "movilización", como se usa en la presente, se refiere al movimiento de células de leucemia desde cualquier fuente de tejido, por ejemplo, médula ósea, a la sangre periférica y da como resultado un aumento en la población de células de leucemia o subpoblaciones específicas de células en la sangre periférica.

El término "muerte celular" se refiere a un proceso que impide que una célula lleve a cabo sus funciones metabólicas normales. La muerte celular abarca tanto la apoptosis como la necrosis.

El término "apoptosis", como se usa en la presente, se refiere a una forma de muerte celular que incluye la contracción progresiva del volumen celular con la conservación de la integridad de los orgánulos citoplásmicos; condensación de cromatina (es decir, condensación nuclear), como se observa mediante microscopía óptica o electrónica; y/o escisión del ADN en fragmentos del tamaño de nucleosomas, según se determina mediante ensayos de sedimentación centrífuga. La muerte celular se produce cuando se pierde la integridad de la membrana de la célula (por ejemplo, ampollas en la membrana) con la engullición de fragmentos celulares intactos ("cuerpos apoptóticos") por células fagocíticas. La apoptosis puede determinarse fácilmente mediante microscopía electrónica, el ensayo TUNEL, citometría de flujo, inmunquímica de bioimagenología y transferencia Western usando tintes de ADN como yoduro de propidio, 7-aminoactinomicina D, BrdU Hoechst 33342 y DAPI; anticuerpos contra las ciclinas, retinoblastoma e histona H3 fosforilada, tintes de proliferación celular para láseres violeta y azul para rastrear la división celular a través de múltiples generaciones. Como saben los expertos en la técnica, un enfoque conveniente es monitorizar la inducción de la unión de anexina con respecto a los niveles de control en un ensayo de unión de anexina. Otro ensayo conveniente emplea anticuerpos para detectar la escisión de caspasa 3.

"Necrosis" (también conocida como muerte celular "accidental") se refiere al proceso patológico que se produce cuando las células se exponen a una lesión física o química grave. La necrosis se produce cuando las células se exponen a una variación extrema de las condiciones fisiológicas (por ejemplo, hipotermia, hipoxia) que pueden dar como resultado daños en la membrana plasmática. La necrosis comienza con un deterioro de la capacidad de la célula para mantener la homeostasis, lo que da lugar a una entrada de agua e iones extracelulares. Los orgánulos intracelulares, sobre todo las mitocondrias, y toda la célula se hinchan y se rompen (lisis celular).

El término "detención del ciclo celular", como se usa en la presente, se refiere a un punto de parada en el ciclo celular. Las fases del ciclo celular comienzan con G1, cuando una célula se prepara para duplicarse. Durante la fase S, copia activamente su material genético (ADN), y en G2 tiene la oportunidad de reparar el daño antes de M, la mitosis. Después de la mitosis, las células pueden volver a entrar en G1 o entrar en G0, donde descansan. En cada una de estas fases, un punto de control detiene temporalmente el ciclo celular para permitir que la célula decida si debe continuar. A veces, la detención del ciclo celular procede de la apoptosis, muerte celular.

El término "proliferación", como se usa en la presente, se refiere al proceso de replicación, crecimiento y división del ADN, que lleva a un aumento en el número total de células. La proliferación o inhibición de la proliferación puede determinarse fácilmente, por ejemplo, mediante recuento celular, incluso en comparación con una población de células en las que no se ha inhibido la proliferación, o mediante la detección de marcadores celulares específicos de proliferación, por ejemplo, el marcador específico de proliferación PCNA. Inhibir la proliferación o la inhibición de la proliferación de una célula incluye hacer que la célula sea incapaz de replicar el ADN, crecer o dividirse, o sea incapaz de replicar correctamente el ADN, crecer o dividirse, o reducir o retardar la replicación del ADN, el crecimiento o la división celular, además de inducir la muerte celular por apoptosis u otros mecanismos de muerte celular.

El término "compuesto antisentido", como se usa en la presente, se refiere a un compuesto oligomérico que se hibrida con una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena de  $\alpha 4$  integrina de VLA-4 y/o la  $\alpha 4\beta 7$  integrina para efectuar la movilización de células de leucemia. La cadena de  $\alpha 4$  integrina en humanos es CD49d. El compuesto antisentido interfiere con la expresión de CD49d.

El término "molécula de ácido nucleico que codifica la  $\alpha 4$  integrina" como se usa en la presente es intercambiable con "ácido nucleico objeto" y abarca el ADN que codifica la cadena de  $\alpha 4$  integrina de VLA-4 o  $\alpha 4\beta 7$  integrina, el ARN (incluyendo el pre-ARNm y el ARNm o porciones del mismo) transcrito a partir de dicho ADN, y además, ADNc derivado de dicho ARN.

El término "VLA-4", como se usa en la presente, se refiere a un heterodímero de una  $\alpha 4$  integrina y una  $\beta 1$  integrina. VLA-4 se expresa a niveles sustanciales en células B y T de sangre periférica, timocitos, monocitos y otras células, así como en células progenitoras y madre hematopoyéticas. Los ligandos para VLA-4 incluyen la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) y CS-1, un dominio cortao y empalmado alternativamente dentro de la región Hep II de la fibronectina.

El término " $\alpha 4\beta 7$  integrina", como se usa en la presente, se refiere a un heterodímero de una  $\alpha 4$  integrina y una  $\beta 7$  integrina. La  $\alpha 4\beta 7$  integrina identifica un subconjunto de células T de memoria con tropismo por el tracto intestinal.  $\alpha 4\beta 7$  integrina y también se expresa en un subconjunto de mastocitos, linfocitos y células progenitoras NK. La  $\alpha 4\beta 7$  integrina se expresa en algunas células madre y progenitoras. Los ligandos para la  $\alpha 4\beta 7$  integrina incluyen MAdCam-1 y VCAM-1.

#### ***Compuestos antisentido a la $\alpha 4$ integrina***

Los métodos de la presente divulgación se basan en el uso de un compuesto antisentido para la  $\alpha 4$  integrina para la movilización de células de leucemia. Tales compuestos antisentido están dirigidos a ácidos nucleicos que codifican la cadena de  $\alpha 4$  integrina de VLA-4 o  $\alpha 4\beta 7$ .

El compuesto antisentido es un oligonucleótido. Sin embargo, se contemplan otros compuestos oligoméricos antisentido, incluyendo pero no limitados a, miméticos de oligonucleótidos.

A la hibridación de un compuesto antisentido con su ácido nucleico objetivo se hace referencia generalmente como "antisentido". La hibridación del compuesto antisentido con su ácido nucleico objetivo inhibe la función del ácido nucleico objetivo. Tal "inhibición antisentido" se basa típicamente en la hibridación basada en enlaces de hidrógeno del compuesto antisentido con el ácido nucleico objetivo de tal manera que el ácido nucleico objetivo se escinde, degrada o se vuelve inoperable de otro modo. Las funciones del ADN objetivo con las que se interfiere pueden incluir la replicación y la transcripción. La replicación y la transcripción, por ejemplo, pueden ser a partir de una plantilla celular endógena, un vector, un constructo de plásmido o de otra manera. Las funciones del ARN que se van a interferir pueden incluir funciones como la translocación del ARN a un sitio de traducción de proteínas, translocación del ARN a sitios dentro de la célula que son distantes del sitio de la síntesis del ARN, translación de proteína del ARN, corte y empalme del ARN para proporciona una o más especies de ARN, y actividad catalítica o formación de complejos que implican al ARN que pueden acoplarse con o facilitarse por el ARN.

"Hibridación", como se usa en la presente, significa el emparejamiento de bases complementarias del oligonucleótido y el ácido nucleico objetivo. El emparejamiento de bases típicamente implica enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inverso, entre bases de nucleósidos o nucleótidos complementarias (nucleobases). La guanina (G) y la citosina (C) son ejemplos de nucleobases complementarias que se emparejan mediante la formación de 3 enlaces de hidrógeno. La adenina (A) y la timina (T) son ejemplos de nucleobases complementarias que se emparejan mediante la formación de 2 enlaces de hidrógeno. La hibridación puede producirse bajo circunstancias variables.

Un "nucleósido" es una combinación de base-azúcar. La parte de base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica. Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los "nucleótidos" son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato enlazado covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar enlazado a la fracción de hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar.

"Específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad de tal manera que se produzca una unión estable y específica entre el compuesto antisentido y el ácido nucleico objetivo. Se entiende que el compuesto antisentido no necesita ser 100% complementario con su secuencia de ácidos nucleicos objetivo para ser específicamente hibridable. Un compuesto antisentido es específicamente hibridable cuando la unión del compuesto antisentido con el ácido nucleico objetivo interfiere con la función normal de la molécula objetivo para provocar una pérdida de actividad, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto antisentido con secuencias no objetivo en

condiciones en las que se desea una unión específica, por ejemplo, bajo condiciones fisiológicas en el caso de tratamiento terapéutico.

"Condiciones de hibridación estrictas" o "condiciones estrictas" son términos que se usan para referirse a las condiciones en las que el compuesto antisentido hibridará con su secuencia objetivo, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. La condición estricta bajo la cual el compuesto antisentido hibrida con una secuencia objetivo está determinada por la naturaleza y composición del compuesto antisentido y los ensayos en los que se está investigando.

"Complementario", como se usa en la presente, se refiere a la capacidad de emparejamiento preciso entre una nucleobase del compuesto antisentido y el ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, si una nucleobase en cierta posición del compuesto antisentido es capaz de formar enlaces de hidrógeno con una nucleobase en cierta posición del ácido nucleico objetivo, entonces se considera que la posición del enlace de hidrógeno entre el compuesto antisentido y el ácido nucleico objetivo es una posición complementaria. El compuesto antisentido puede hibridar sobre uno o más segmentos, de tal manera que los segmentos intermedios o adyacentes no estén implicados en el evento de hibridación (por ejemplo, una estructura de giro o una estructura de horquilla). En una realización, el compuesto antisentido comprende por lo menos un 70% de complementariedad de secuencia con una región objetivo dentro del ácido nucleico objetivo. Por ejemplo, un compuesto antisentido en el que 18 de 20 nucleobases son complementarias con una región objetivo dentro del ácido nucleico objetivo y, por lo tanto, hibridarían específicamente, representaría un 90% de complementariedad. En este ejemplo, las nucleobases no complementarias restantes pueden agruparse o intercalarse con nucleobases complementarias y no es necesario que sean contiguas entre sí o con nucleobases complementarias. Como tal, un compuesto antisentido que tiene 18 nucleobases de longitud que tiene 4 nucleobases no complementarias que están flanqueadas por 2 regiones de complementariedad completa con el ácido nucleico objetivo tendría una complementariedad general del 77,8% con el ácido nucleico objetivo y, por lo tanto, estaría dentro de la alcance de la presente divulgación. El porcentaje de complementariedad de un compuesto antisentido con un región de un ácido nucleico objetivo puede determinarse rutinariamente usando programas BLAST (herramientas de búsquedas de alineación local básicas) y programas PowerBLAST conocidos en la técnica (Altschul *et al.*, 1990; Zhang and Madden, 1997).

### **Oligonucleótidos antisentido**

La presente divulgación proporciona oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión de la  $\alpha 4$  integrina y/o VLA-4 y/o  $\alpha 4\beta 7$  integrina. Tales oligonucleótidos antisentido están dirigidos a ácidos nucleicos que codifican la cadena de  $\alpha 4$  integrina de VLA-4 o  $\alpha 4\beta 7$ .

El término "inhibición de la expresión de  $\alpha 4$  integrina" como se usa en la presente significa cualquier disminución medible (por ejemplo, 10%, 20%, 50%, 90% o 100%) en la expresión de la  $\alpha 4$  integrina, VLA-4 o  $\alpha 4\beta 7$  integrina.

Como se usa en la presente, el término "oligonucleótido" se refiere a un oligómero o polímero de ARN o ADN o miméticos, quimeras, análogos y homólogos de los mismos. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes (estructura principal) de origen natural, así como oligonucleótidos que tienen porciones no naturales que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos a menudo se prefieren sobre las formas nativas debido a propiedades deseables como, por ejemplo, captación celular mejorada, afinidad mejorada por el ácido nucleico objetivo y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato enlazan covalentemente los nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez, los extremos respectivos de este compuesto polimérico lineal pueden unirse para formar un compuesto circular; sin embargo, generalmente se prefieren los compuestos lineales. Además, los compuestos lineales pueden tener complementariedad interna de nucleobases y, por lo tanto, pueden plegarse de manera que produzcan un compuesto total o parcialmente de cadena doble. Con respecto a los oligonucleótidos, suele hacer referencia a los grupos fosfato como formadores de la estructura principal internucleosídica del oligonucleótido. El enlace o estructura principal normal del ARN y el ADN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'.

Los oligonucleótidos antisentido de la divulgación incluyen, por ejemplo, ribozimas, ARNip, oligonucleótidos de secuencia guía externa (EGS), empalmadores alternativos, cebadores, sondas y otros oligonucleótidos que hibridan con por lo menos una parte del ácido nucleico objetivo.

Los oligonucleótidos antisentido de la divulgación pueden administrarse en forma de cadena sencilla, cadena doble, circular o de horquilla y pueden contener elementos estructurales como protuberancias o giros internos o terminales. Una vez administrados, los oligonucleótidos antisentido pueden provocar la acción de una o más enzimas o proteínas estructurales para efectuar la modificación del ácido nucleico objetivo.

Un ejemplo no limitativo de dicha enzima es la RNasa H, una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. Se sabe en la técnica que los compuestos antisentido de cadena sencilla que son "similares al ADN" provocan la RNasa H. Por lo tanto, la activación de la RNasa H da como resultado la escisión del objetivo de ARN, lo que mejora en gran medida la eficacia de la inhibición de la expresión génica mediada por oligonucleótidos. Se han postulado funciones similares para otras ribonucleasas, como las de la familia de enzimas RNasa III y ribonucleasa L.

Se ha demostrado que la introducción de moléculas de ARN de cadena doble (ARNdc) induce una reducción mediada por antisentido potente y específica de la función de un gen o sus productos génicos asociados. Este fenómeno se produce tanto en plantas como en animales y se cree que tiene una conexión evolutiva con la defensa viral y el silenciamiento de transposones.

La primera evidencia de que el ARNdc podría llevar al silenciamiento génico en animales se obtuvo en 1995 a partir del trabajo en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Guo y Kempheus, 1995). Montgomery et al. (1998) han demostrado que los efectos de interferencia primarios del ARNdc son postranscripcionales. El mecanismo antisentido postranscripcional definido en *Caenorhabditis elegans* como resultado de la exposición a ARN de doble cadena (ARNdc) se ha designado desde entonces ARN interferente (ARNi). Este término se ha generalizado para referirse al silenciamiento génico mediado por antisentido que implica la introducción de ARNdc que lleva a la reducción específica de secuencia de los niveles endógenos de ARNm objetivo (Fire et al., 1998). Recientemente, se ha demostrado que son, de hecho, los oligómeros de ARN de cadena sencilla de polaridad antisentido de los ARNdc los que son los potentes inductores de ARNAi (Tijsterman et al., 2002).

Una persona con conocimientos ordinarios en la técnica podría, sin experimentación indebida, identificar oligonucleótidos antisentido útiles en los métodos de la presente divulgación.

#### ***Enlaces internucleosídicos modificados (estructuras principales)***

Los compuestos antisentido de la presente divulgación incluyen oligonucleótidos que tienen estructuras principales modificadas o enlaces internucleosídicos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen estructuras principales modificadas incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en la estructura principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la estructura principal.

Las estructuras principales de oligonucleótidos modificadas que contienen un átomo de fósforo incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo, incluyendo 3'-alquilenfosfonatos, 5'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos, incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos 2'-5' enlazados de estos y aquellos que tienen polaridad invertida en donde uno o más enlaces internucleotídicos son un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'.

Los oligonucleótidos que tienen polaridad invertida comprenden un único enlace 3' a 3' en el enlace internucleotídico más 3', es decir, un único residuo de nucleósido invertido que puede ser abásico (falta la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los enlaces que contienen fósforo anteriores incluyen, pero no se limitan a, US 3,687,808, US 4,469,863, US 4,476,301, US 5,023,243, US 5,177,196, US 5,188,897, US 5,264,423, US 5,276,019, US 5,278,302, US 5,286,717, US 5,321,131, US 5,399,676, US 5,405,939, US 5,453,496, US 5,455,233, US 5,466,677, US 5,476,925, US 5,519,126, US 5,536,821, US 5,541,306, US 5,550,111, US 5,563,253, US 5,571,799, US 5,587,361, US 5,194,599, US 5,565,555, US 5,527,899, US 5,721,218, US 5,672,697 y US 5,625,050.

Las estructuras principales de oligonucleótidos modificados que no incluyen en las mismas un átomo de fósforo incluyen, por ejemplo, estructuras principales formadas por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleosídicos mixtos de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); estructuras principales de siloxano; estructuras principales de sulfuro, sulfoxido y sulfona; estructuras principales de formacetilo y tioformacetilo; estructuras principales de metileno formacetilo y tioformacetilo; estructuras principales de riboacetilo; estructuras principales que contienen alquenos; estructuras principales de sulfamato; estructuras principales de metilenoimino y metilenoimidazino; estructuras principales de sulfonato y sulfonamida; estructuras principales de amida; y otros que tengan componentes mixtos de N, O, S y CH<sub>2</sub>.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los oligonucleótidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, US 5,034,506, US 5,166,315, US 5,185,444, US 5,214,134, US 5,216,141,

US 5,235,033, US 5,264,562, US 5,264,564, US 5,405,938, US 5,434,257, US 5,466,677, US 5,470,967, US 5,489,677, US 5,541,307, US 5,561,225, US 5,596,086, US 5,602,240, US 5,610,289, US 5,602,240, US 5,608,046, US 5,610,289, US 5,618,704, US 5,623,070, US 5,663,312, US 5,633,360, US 5,677,437, US 5,792,608, US 5,646,269 y US 5,677,439.

5

### **Azúcares modificados**

Los compuestos antisentido de la presente divulgación incluyen oligonucleótidos que tienen una o más fracciones de azúcar sustituidas.

10

Los ejemplos incluyen oligonucleótidos que comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueno y alquino pueden estar sustituidos o no sustituidos alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> o alqueno C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> y alquino.

15

En una realización, el oligonucleótido comprende uno de los siguientes en la posición 2': O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, y O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10.

20

Ejemplos adicionales de oligonucleótidos modificados incluyen oligonucleótidos que comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>, alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares.

25

En una realización, la modificación incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> (también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., 1995), es decir, un grupo alcoxialcoxi. En una realización adicional, la modificación incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (también conocido como 2'-DMAOE), o 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetil-amino-etoxi-etilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

30

Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxi (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2'-alilo (2'-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 2'-O-alilo (2'-O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación 2' puede estar en la posición arabino (arriba) o en la posición ribo (abajo). En una realización, una modificación de 2'-arabino es 2'-F.

35

También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'.

40

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, US 4,981,957, US 5,118,800, US 5,319,080, US 5,359,044, US 5,393,878, US 5,446,137, US 5,466,786, US 5,514,785, US 5,519,134, US 5,567,811, US 5,576,427, US 5,591,722, US 5,597,909, US 5,610,300, US 5,627,053, US 5,639,873, US 5,646,265, US 5,658,873, US 5,670,633, US 5,792,747, y US 5,700,920.

45

### **Nucleobases naturales y modificadas**

Los compuestos antisentido de la presente divulgación incluyen oligonucleótidos que tienen modificaciones o sustituciones de nucleobases. Como se usa en la presente, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U).

50

Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales como, por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C≡C-CH<sub>3</sub>) uracilo y citosina y otros derivados alquínílicos de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

60

Nucleobases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas, como fenoxazina citidina (1H-pirirrido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirirrido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas G como, por ejemplo, una citidina de fenoxazina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirirrido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirirrido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-

65

pirido [3',2':4,5]pirrolo [2,3-d] pirimidin-2-ona).

Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo, 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Nucleobases adicionales incluyen las divulgadas en la US 3,687,808, las divulgadas en J.I. Kroschwitz (editor), The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, pages 858-859, John Wiley and Sons (1990), las divulgadas por Englisch et al. (1991), y las divulgadas por Y.S. Sanghvi, Capítulo 15: Antisense Research and Applications, páginas 289-302, S.T. Crooke, B. Lebleu (editores), CRC Press, 1993.

Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión del oligonucleótido. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2° C. En una realización, estas sustituciones de nucleobases se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

Las patentes de estados Unidos representativas que enseñan la preparación de algunas de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente, así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, US 3,687,808, US 4,845,205, US 5,130,302, US 5,134,066, US 5,175,273, US 5,367,066, US 5,432,272, US 5,457,187, US 5,459,255, US 5,484,908, US 5,502,177, US 5,525,711, US 5,552,540, US 5,587,469, US 5,594,121, US 5,596,091, US 5,614,617, US 5,645,985, US 5,830,653, US 5,763,588, US 6,005,096, US 5,681,941 y US 5,750,692.

### **Conjugados**

Los compuestos antisentido de la presente divulgación pueden conjugarse con una o más fracciones o grupos que mejoran la actividad, la distribución celular o la captación celular del compuesto antisentido.

Estas fracciones o grupos pueden unirse covalentemente a grupos funcionales como grupos hidroxilo primarios o secundarios.

Las fracciones o grupos ejemplares incluyen intercaladores, moléculas informadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes.

Las fracciones o grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas incluyen aquellos que mejoran la captación, mejoran la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico objetivo.

Las fracciones o grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas incluyen aquellos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción de los compuestos de la presente divulgación.

Las fracciones o grupos representativos se divulgan en la WO/1993/007883 y la US 6,287,860.

Las fracciones o grupos incluyen, pero no se limitan a, fracciones lipídicas, como una fracción de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido acético de adamantano, una fracción de palmitilo, o una fracción de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicoolesterol.

Los compuestos antisentido de la presente divulgación también pueden conjugarse con sustancias farmacéuticas activas.

Los conjugados de oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la US 6,656,730.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos conjugados incluyen, pero no se limitan a, US 4,828,979, US 4,948,882, US 5,218,105, US 5,525,465, US 5,541,313, US 5,545,730, US 5,552,538, US 5,578,717, US 5,580,731, US 5,580,731, US 5,591,584, US 5,109,124, US 5,118,802, US 5,138,045, US 5,414,077, US 5,486,603, US 5,512,439, US 5,578,718, US 5,608,046, US 4,587,044, US 4,605,735, US 4,667,025, US 4,762,779, US 4,789,737, US 4,824,941, US 4,835,263, US 4,876,335, US 4,904,582, US 4,958,013, US 5,082,830, US 5,112,963, US 5,214,136, US 5,082,830, US 5,112,963, US 5,214,136, US 5,245,022, US 5,254,469, US 5,258,506, US 5,262,536, US 5,272,250, US 5,292,873, US 5,317,098, US 5,371,241, US 5,391,723, US 5,416,203, US 5,451,463, US 5,510,475, US 5,512,667, US 5,514,785, US 5,565,552, US 5,567,810, US 5,574,142, US 5,585,481, US 5,587,371, US 5,595,726, US 5,597,696, US 5,599,923, US 5,599,928 y

US 5,688,941.

### Compuestos quiméricos

5 Como apreciarán los expertos en la técnica, no es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado se modifiquen uniformemente y, de hecho, puede incorporarse más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente en un solo oligonucleótido o incluso en un solo nucleósido dentro de un oligonucleótido.

Los compuestos antisentido de la divulgación incluyen oligonucleótidos quiméricos. Los "oligonucleótidos quiméricos" contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta por al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleotídico. Estos oligonucleótidos contienen típicamente por lo menos una región en la que el oligonucleótido está modificado para conferir al oligonucleótido una resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, una captación celular mejorada, una estabilidad aumentada y/o una afinidad de unión aumentada por el ácido nucleico objetivo. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. La activación de la RNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión del objetivo de ARN, mejorando en gran medida de este modo la eficacia de la inhibición mediada por oligonucleótidos de la expresión génica. La escisión de los híbridos de ARN:ARN puede, de la misma manera, realizarse a través de las acciones de las endorribonucleasas, como ARNsaL, que escinde tanto el ARN celular como el viral. La escisión del objetivo de ARN puede detectarse rutinariamente mediante electroforesis en gel y, si es necesario, mediante técnicas de hibridación de ácidos nucleicos asociadas conocidas en la técnica.

25 Los compuestos antisentido quiméricos de la divulgación pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados y/o miméticos de oligonucleótidos. Tales compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gapmers.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, US 5,013,830, US 5,149,797, US 5,220,007, US 5,256,775, US 5,366,878, US 5,403,711, US 5,491,133, US 5,565,350, US 5,623,065, US 5,652,355, US 5,652,356, y US 5,700,922.

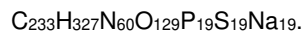
**Compuesto antisentido ejemplar**

En una realización, el compuesto antisentido es un gapmer de oligonucleótido quimérico modificado con 2'-MOE de estructura principal de fosforotioato de segunda generación diseñado para hibridar con la región 3' no traducida del ARNm de VLA-4. El oligonucleótido inhibe selectivamente la expresión de VLA-4 tanto en células humanas primarias como en varias líneas celulares humanas mediante la hibridación con el ARN que codifica CD49d, que es la subunidad de la  $\alpha 4$  integrina de la VLA-4 y  $\alpha 4\beta 7$  integrina.

El oligonucleótido es la sal 19-sódica de un oligonucleótido de fosforotioato 3'→5' 20mer también conocido como gapmer 3-9-8 MOE que tiene un peso molecular de 7230 Daltons, en el que los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 del extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo) (2'MOE) (2'-O-(2-metoxietil ribosa); los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 del extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos de los cuales todas las citosinas son 5-metilcitosinas; los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo).

La secuencia del oligonucleótido es:  
5'-Me<sup>C</sup>Me<sup>U</sup>UG AGT Me<sup>C</sup>CTG TTT Me<sup>U</sup>Me<sup>C</sup>Me<sup>C</sup> A Me<sup>U</sup>Me<sup>U</sup> Me<sup>C</sup>Me<sup>U</sup>-3'.

50 La fórmula empírica del oligonucleótido es:



55 Todos los uracilos son 5-metiluracilos (<sup>Me</sup>U). Típicamente, el oligonucleótido se sintetiza usando timidinas modificadas con 2-metoxietilo, no 5-metiluracilos.  
Todas las pirimidinas están metiladas en C5 (es decir, U, T, C están metiladas en C5).

## Nomenclatura

60 La secuencia del oligonucleótido puede ser nombrada por nomenclatura de oligonucleótidos aceptada, que muestra cada enlace internucleotídico de fosforitoato O-O enlazado:  
 2'-O-metoxietil-5-metilcitolidil-(3'→5' O, O-fosfortioil)-2'-O-memoxietil-5-metiluridilil-(3'→5' O, O-fosfortioil)-2'-O-metoxietilguanosilil-(3'→5' O, O-fosfortioil)-2'-O-desoxiadenosilil-(3'→5' O, O-fosfortioil)-2'-O-desoxiguanosilil-(3'→5' O, O-fosfortioil)-timidilil-(3'→5' O, O-fosfortioil)-2'-desoxi-5-metilcitidilil-(3'→5' O, O-fosfortioil)-timidilil-

65 (3'→5' O, O-fosfortioil)-2'-desoxiguanosilil-(3'→5' O, O-fosfortioil)-timidilil-(3'→5' O, O-fosfortioil)-timidilil-(3'→5' O, O-fosfortioil)-timidilil-(3'→5' O,

O-fosforotioil)-timidilil-(3'→5' O, O-fosforotioil)-2'-O-memoxietil-5-metiluridilil-(3'→5' O, O-fosforotioil)-2'-metoxietil-5-metilcitidilil-(3'→5' O, O-fosforotioil)-2'-metoxietil-5-metilcitidilil-(3'→5' O, O-fosforotioil)-2'-O-metoxietil-5-adenosilil-(3'→5' O, O-fosforotioil)-2'-O-metoxietil-5-metiluridilil-(3'→5' O, O-fosforotioil)-2'-O-metoxietil-5-metiluridilil-(3'→5' O, O-fosforotioil)-2'-O-metoxietil-5-metilcitosina, (3'→5' O, O-fosforotioil)-2'-O-metoxietil-5-metiluridilil-19 sal de sodio.

5

### **Síntesis**

El oligonucleótido puede sintetizarse mediante un proceso de múltiples pasos que puede dividirse en dos operaciones distintas: síntesis en fase sólida y procesamiento descendente. En la primera operación, la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido se ensambla a través de un sintetizador de fase sólida controlado por ordenador. El procesamiento descendente posterior incluye pasos de desprotección, purificación cromatográfica en fase inversa preparativa, aislamiento y secado para proporcionar la sustancia farmacéutica de oligonucleótidos. La síntesis química del oligonucleótido utiliza química de acoplamiento de fosforamidita seguido de sulfuración oxidativa e implica el acoplamiento secuencial de monómeros activados a un oligómero de elongación, cuyo extremo 3'-terminal está unido covalentemente al soporte sólido.

#### Destritilación (reacción a).

Cada ciclo de la síntesis en fase sólida comienza con la eliminación del grupo protector 5'-O-4, 4'-dimetoxitritilo (DMT) lábil en ácidos del nucleósido 5' terminal del oligonucleótido unido al soporte. Esto se logra mediante el tratamiento con una solución de ácido (por ejemplo, ácido dicloroacético (DCA) en tolueno). Después de la destritilación, el exceso de reactivo se elimina del soporte lavando con acetonitrilo en preparación para la siguiente reacción.

#### Acoplamiento (reacción b)

El alargamiento de la cadena se logra mediante la reacción del grupo 5'-hidroxilo del oligonucleótido unido al soporte con una solución de la fosforamidita correspondiente a esa posición de base particular (por ejemplo, para base2: MOE-<sup>Me</sup>C amidita) en presencia de un activador (por ejemplo, 1H-tetrazol). Esto da como resultado la formación de un enlace triéster de fosfito entre el sintón de nucleótido entrante y la cadena de oligonucleótidos unida al soporte. Después de la reacción de acoplamiento, el exceso de reactivo se elimina del soporte lavando con acetonitrilo en preparación para la siguiente reacción.

#### Sulfuración (reacción c)

El enlace triéster de fosfito recién formado se convierte en el correspondiente triéster de fosforotioato de [O, O, O)-trialquilo mediante el tratamiento con una solución de un reactivo de transferencia de azufre (por ejemplo, disulfuro de fenilacetilo). Después de la sulfuración, el exceso de reactivo se elimina del soporte lavando con acetonitrilo como preparación para la siguiente reacción.

#### Protección (reacción d)

Una pequeña proporción de los grupos 5'-hidroxilo disponibles en cualquier ciclo dado no se extiende. El acoplamiento de estos grupos en cualquiera de los ciclos posteriores daría como resultado la formación de impurezas relacionadas con el proceso ("DMT-on (nl)-mers") que son difíciles de separar del producto deseado. Para evitar la formación de estas impurezas y facilitar la purificación, se introduce un "reactivo de protección" (por ejemplo, anhídrido acético y N-metilimidazol/acetonitrilo/piridina) en el recipiente del reactor para dar secuencias protegidas. Las secuencias fallidas resultantes ("DMT-off shortmers") se separan del producto deseado mediante purificación por HPLC de fase inversa. Después de la reacción de protección, el exceso de reactivo se elimina del soporte lavando con acetonitrilo para preparar la siguiente reacción.

La reiteración de este ciclo básico de cuatro pasos usando la fosforamidita de nucleósido protegida adecuada permite el ensamblaje de la secuencia de oligonucleótidos protegida completa.

#### Desprotección de la estructura principal (reacción e)

Después de la finalización de la parte de ensamblaje del proceso, los grupos cianoetilo que protegen los enlaces internucleotídicos de triéster de fosforotioato de (O, O, O)-trialquilo se eliminan mediante tratamiento con una solución de trietilamina (TEA) en acetonitrilo. El reactivo y el acrilonitrilo generados durante este paso se eliminan lavando la columna con acetonitrilo.

#### Escisión del soporte y desprotección de la base (reacción f)

La desprotección de los grupos amino exocíclicos y la escisión del producto bruto del soporte se logra mediante incubación con hidróxido de amonio acuoso (reacción f). La purificación del producto bruto protegido con

5'-O-DMT se lleva a cabo mediante HPLC de fase inversa. El paso de HPLC de fase inversa elimina las secuencias fallidas de DMT-off. El perfil de elución se monitoriza mediante espectroscopia de absorción UV. Las fracciones que contienen producto de oligonucleótido DMT-on se recogen y analizan.

## 5 Desprotección ácida (reacción g)

Se agrupan las fracciones de HPLC de fase inversa que contienen oligonucleótido protegido con 5'-O-DMT y se transfieren a un tanque de precipitación. En esta etapa del proceso los productos obtenidos de la purificación de varias síntesis se combinan. El oligonucleótido DMT-on purificado se trata con ácido (por ejemplo, ácido acético) para eliminar el grupo DMT unido al extremo 5'-terminal. Después de la exposición al ácido durante el tiempo prescrito y la neutralización, se aísla y se seca la sustancia farmacéutica de oligonucleótidos.

Después del paso final de desprotección ácida, la solución se neutraliza mediante la adición de hidróxido de sodio acuoso y la sustancia farmacéutica de oligonucleótidos se precipita de la solución mediante la adición de etanol. El material precipitado se deja sedimentar en el fondo del recipiente de reacción y se decanta el sobrenadante etanólico. El material precipitado se vuelve a disolver en agua purificada y el pH de la solución se ajusta entre pH 7,2 y 7,3. Se repite el paso de precipitación. El material precipitado se disuelve en agua y la solución se filtra a través de un filtro de 0,45 micras y se transfiere a bandejas desechables de polipropileno que luego se cargan en un liofilizador. La solución se enfría a -50° C. El secado primario se lleva a cabo a 25° C durante 37 horas. La temperatura se aumenta a 300° C y se realiza un paso de secado secundario durante 5,5 horas. Después de la finalización del proceso de liofilización, la sustancia farmacéutica se transfiere a botellas de polietileno de alta densidad y se almacena a -200° C.

## Ácido nucleico objetivo

"Dirigir" un compuesto antisentido a un ácido nucleico particular puede ser un proceso de varios pasos. El proceso habitualmente comienza con la identificación de un ácido nucleico objetivo cuya función se va a modular. En la presente divulgación, el ácido nucleico objetivo codifica la cadena de  $\alpha 4$  integrina de VLA-4 o  $\alpha 4\beta 7$  integrina.

El proceso de direccionamiento habitualmente también incluye la determinación de por lo menos una región, segmento o sitio objetivo dentro del ácido nucleico objetivo para que se produzca la interacción antisentido de tal manera que dé como resultado el efecto deseado, por ejemplo, la inhibición de la expresión. El término "región", como se usa en la presente, se define como una parte del ácido nucleico objetivo que tiene por lo menos una estructura, función o característica identificable. Dentro de las regiones de los ácidos nucleicos objetivo hay segmentos. Los "segmentos" se definen como subporciones o porciones más pequeñas de regiones dentro de un ácido nucleico objetivo. "Sitios", como se usa en la presente, significa posiciones dentro del ácido nucleico objetivo.

Como el "codón de inicio de la traducción" es típicamente 5'-AUG (en moléculas de ARNm transcritas; 5'-ATG en la molécula de ADN correspondiente), al codón de inicio de la traducción también se hace referencia como "codón AUG", el "codón de inicio" o el "codón de inicio AUG". Una minoría de genes tiene un codón de inicio de la traducción que tiene la secuencia de ARN 5'-GUG, 5'-UUG o 5'-CUG, y se ha demostrado que 5'-AUA, 5'-ACG y 5'-CUG funcionan in vivo. Por tanto, los términos "codón de inicio de la traducción" y "codón de inicio" pueden abarcar muchas secuencias de codones aunque el aminoácido iniciador en cada caso sea típicamente metionina (en eucariotas) o formilmetionina (en procariotas). También se sabe en la técnica que los genes eucariotas y procariotas pueden tener dos o más codones de inicio alternativos, cualquiera de los cuales puede utilizarse preferencialmente para el inicio de la traducción en un tipo de célula o tejido particular, o bajo un conjunto particular de condiciones. Los términos "codón de inicio" y "codón de inicio de la traducción", como se usan en la presente, se refieren al codón o codones que se usan in vivo para iniciar la traducción de un ARNm transcrito a partir de un gen que codifica, por ejemplo, la cadena de  $\alpha 4$  integrina de VLA-4 o  $\alpha 4\beta 7$  integrina, independientemente de la secuencia o secuencias de dichos codones.

Un "codón de terminación de la traducción", también denominado "codón de terminación", puede tener de una de tres secuencias de ARN: 5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA (5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA, respectivamente en la molécula de ADN correspondiente). Los términos "codón de terminación de la traducción" y "codón de terminación" como se usan en la presente se refieren al codón o codones que se usan in vivo para terminar la traducción de un ARNm transcrito a partir de un gen que codifica la cadena de  $\alpha 4$  integrina de VLA-4 o  $\alpha 4\beta 7$  integrina, independientemente de la secuencia o secuencias de dichos codones.

Los términos "región del codón de inicio" y "región del codón de inicio de la traducción" se refieren a una porción del ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde el codón de inicio de la traducción. De manera similar, los términos y "región del codón de terminación" y "región del codón de terminación de la traducción" se refieren a una porción del ARNm o gen que abarca de aproximadamente 25 a aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde el codón de terminación de la traducción. Por consiguiente, la "región del codón de inicio" o la "región del codón de inicio de la traducción" y la "región del codón de parada" o la "región del codón de

terminación de la traducción" son todas regiones que pueden dirigirse eficazmente con los compuestos antisentido de la presente divulgación.

El "marco de lectura abierto" (ORF) o "región de codificación", que se conoce en la técnica para referirse a la región entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción, también es una región a la que puede dirigirse con eficacia. En una realización, se dirige a la región intragénica que abarca el codón de inicio o terminación de la traducción del ORF de un gen.

Otras regiones objetivo incluyen la región 5' no traducida (5'UTR), conocida en la técnica por referirse a la porción del ARNm en la dirección 5' desde el codón de inicio de la traducción y, por tanto, incluye nucleótidos entre el sitio de la caperuza 5' y el codón de inicio de la traducción del ARNm (o los nucleótidos correspondientes en el gen), y la región no traducida 3' (3'UTR), conocida en la técnica para referirse a la porción del ARNm en la dirección 3' del codón de terminación de la traducción y, por tanto, incluye nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' del ARNm (o los nucleótidos correspondientes en el gen). El sitio de caperuza 5' de un ARNm comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al residuo más 5' del ARNm a través de un enlace trifosfato 5'-5'. Se considera que la región de caperuza 5' de un ARNm incluye la propia estructura de caperuza 5', así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al sitio de la caperuza. En una realización, se apunta a la región de caperuza 5'.

Aunque algunas transcripciones de ARNm eucariota se traducen directamente, muchas contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que se eliminan de una transcripción antes de que se traduzca. Las regiones restantes (y por lo tanto traducidas) se conocen como "exones" y se cortan y empalman para formar una secuencia de ARNm continua. Las transcripciones de ARNm producidas a través del proceso de corte y empalme de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como "transcripciones de fusión". En una realización, se apunta a los intrones, o sitios de corte y empalme, es decir, uniones intrón-exón o uniones exón-intrón, o uniones de fusión aberrantes debido a reorganizaciones o delecciones.

Pueden producirse transcripciones de ARN alternativas a partir de la misma región genómica de ADN. Estas transcripciones alternativas se conocen generalmente como "variantes".

Las "variantes de pre-ARNm" son transcripciones producidas a partir del mismo ADN genómico que difieren de otras transcripciones producidas a partir del mismo ADN genómico en su posición inicial o final y contienen secuencias tanto intrónicas como exónicas. Tras la escisión de una o más regiones de intrones o exones, o porciones de las mismas durante el corte y empalme, las variantes de pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. Por consiguiente, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante de pre-ARNm única siempre debe producir una variante de ARNm única como resultado del corte y empalme. Estas variantes de ARNm también se conocen como "variantes de corte y empalme alternativas". Si no se produce corte y empalme de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

Las variantes pueden producirse mediante el uso de señales alternativas para iniciar o detener la transcripción, es decir, mediante el uso de un codón de inicio o codón de parada alternativo. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que usan codones de inicio alternativos se conocen como "variantes de inicio alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Aquellas transcripciones que usan un codón de parada alternativo se conocen como "variantes de parada alternativas" de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante de parada alternativa es la "variante poliA" en la que las múltiples transcripciones producidas resultan de la selección alternativa de una de las "señales de parada poliA" por la maquinaria de transcripción, produciendo de este modo transcripciones que terminan en sitios poliA únicos. En una realización, se apunta las variantes de pre-ARNm o ARNm.

A la localización en el ácido nucleico objetivo con la que hibrida el compuesto antisentido se hace referencia como "segmento objetivo". Como se usa en la presente, el término "segmento objetivo" se define como por lo menos una porción de 8 nucleobases de una región objetivo a la que se dirige un compuesto antisentido. Aunque no se desea estar limitado por ninguna teoría, actualmente se cree que estos segmentos objetivo representan porciones del ácido nucleico objetivo que son accesibles para la hibridación.

Una vez que se han identificado una o más regiones, segmentos o sitios objetivo, se eligen compuestos antisentido que sean lo suficientemente complementarios a un segmento objetivo, es decir, compuestos antisentido que hibridan lo suficientemente bien y con suficiente especificidad para dar el efecto deseado.

En una realización adicional, el segmento objetivo identificado en la presente puede emplearse en una selección de compuestos adicionales que modulan la expresión del gen de la  $\alpha 4$  integrina (y, por tanto, la expresión de  $\alpha 4$  integrina, VLA-4 y/o  $\alpha 4\beta 7$  integrina). "Moduladores" son aquellos compuestos que disminuyen o aumentan la expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena de  $\alpha 4$  integrina de VLA-4 o  $\alpha 4\beta 7$  integrina y que comprenden por lo menos una porción de 8 nucleobases que es complementaria a un segmento objetivo preferido.

El método de selección comprende los pasos de poner en contacto un segmento objetivo del ácido nucleico que codifica la cadena de  $\alpha 4$  integrina de VLA-4 o  $\alpha 4\beta 7$  integrina con uno o más moduladores candidatos, y seleccionar uno o más moduladores candidatos que disminuyan o aumenten la expresión de un ácido nucleico que codifica la cadena de  $\alpha 4$  integrina de VLA-4 o  $\alpha 4\beta 7$  integrina. Una vez que se ha demostrado que el modulador o los moduladores candidatos son capaces de modular (por ejemplo, disminuir o aumentar) la expresión de un ácido nucleico que codifica la cadena de  $\alpha 4$  integrina de la VLA-4 o  $\alpha 4\beta 7$  integrina, el modulador puede emplearse en estudios de investigación adicionales de la función de VLA-4 o  $\alpha 4\beta 7$  integrina, o para su uso como agente de investigación, diagnóstico o terapéutico.

El segmento objetivo también puede combinarse con su compuesto antisentido complementario respectivo para formar oligonucleótidos de cadena doble (dúplex) estabilizados.

Se ha demostrado en la técnica que tales fracciones de oligonucleótidos de cadena doble modulan la expresión objetivo y regulan la traducción, así como el procesamiento del ARN a través de un mecanismo antisentido. Además, las fracciones de cadena doble pueden estar sujetas a modificaciones químicas (Fire *et al.*, 1998; Timmons and Fire, 1998; Timmons *et al.*, 2001; Tabara *et al.*, 1998; Montgomery *et al.*, 1998; Tuschl *et al.*, 1999; Elbashir *et al.*, 2001a; Elbashir *et al.*, 2001b). Por ejemplo, se ha demostrado que tales fracciones de doble cadena inhiben el objetivo mediante la hibridación clásica de la cadena antisentido del dúplex con el objetivo, desencadenando de este modo la degradación enzimática del objetivo (Tijsterman *et al.*, 2002).

### Composiciones

Los compuestos antisentido de la divulgación pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras de moléculas o mezclas de compuestos, dando como resultado, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptores, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones que ayudan a la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, US 5,108,921, US 5,354,844, US 5,416,016, US 5,459,127, US 5,521,291, US 5,543,158, US 5,547,932, US 5,583,020, US 5,591,721, US 4,426,330, US 4,534,899, US 5,013,556, US 5,108,921, US 5,213,804, US 5,227,170, US 5,264,221, US 5,356,633, US 5,395,619, US 5,416,016, US 5,417,978, US 5,462,854, US 5,469,854, US 5,512,295, US 5,527,528, US 5,534,259, US 5,543,152, US 5,556,948, US 5,580,575, y US 5,595,756.

Los compuestos antisentido de la divulgación pueden administrarse en un portador farmacéuticamente aceptable. El término "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares que no producen una reacción alérgica, tóxica o adversa de otro modo cuando se administran a un sujeto, particularmente a un mamífero, y más particularmente a un humano. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser sólido o líquido. Los ejemplos útiles de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, diluyentes, solventes, surfactantes, excipientes, agentes de suspensión, agentes tampón, agentes lubricantes, adyuvantes, vehículos, emulsionantes, absorbentes, medios de dispersión, recubrimientos, estabilizadores, coloides protectores, adhesivos, espesantes, agentes tixotrópicos, agentes de penetración, agentes secuestrantes, isotónicos y retardadores de la absorción que no afectan a la actividad de los agentes activos de la divulgación.

Los compuestos antisentido de la divulgación pueden ser sales, ésteres o sales de ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo.

El término "sales farmacéuticamente aceptables", como se usa en la presente, se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido que retienen las actividades biológicas deseadas de los compuestos originales y no imparten efectos toxicológicos no deseados tras la administración. Los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables y sus usos se describen adicionalmente en la US 6,287,860.

Los compuestos antisentido de la divulgación pueden ser profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los profármacos u otros bioequivalentes.

El término "profármacos" como se usa en la presente se refiere a agentes terapéuticos que se preparan en una forma inactiva que se convierte en una forma activa (es decir, un fármaco) tras la administración mediante la acción de enzimas endógenas u otros productos químicos y/o condiciones. En particular, las formas de profármacos de los compuestos antisentido de la divulgación se preparan como derivados de SATE [(S-acetil-2-tioetil)fosfato] de acuerdo con los métodos divulgados en la WO 93/24510, la WO 94/26764 y la US 5,770,713.

### Administración

Los presentes inventores han descubierto que las células de leucemia pueden movilizarse a la sangre

periférica usando un compuesto antisentido que inhibe la expresión de la  $\alpha 4$  integrina y/o la expresión de VLA-4 y/o  $\alpha 4\beta 7$  integrina. El desprendimiento de células de leucemia de la médula ósea solo o en combinación con terapia farmacéutica (por ejemplo, quimioterapia) puede usarse para mejorar el resultado de la terapia para la leucemia.

El desprendimiento de células de AML de la médula ósea solo o en combinación con una terapia farmacéutica (por ejemplo, quimioterapia) puede usarse para mejorar el resultado de la terapia para la AML.

Los compuestos antisentido de la divulgación se administran sistémicamente. Como se usa en la presente, "administración sistémica" es una vía de administración que es enteral o parenteral.

Como se usa en la presente, "enteral" se refiere a cualquier forma de administración que implica cualquier parte del tracto gastrointestinal e incluye la administración oral de, por ejemplo, el oligonucleótido antisentido en forma de comprimido, cápsula o gota; sonda de alimentación gástrica, sonda de alimentación duodenal o gastrostomía; y administración rectal de, por ejemplo, el compuesto antisentido en forma de supositorio o enema.

Como se usa en la presente, "parenteral" incluye la administración por inyección o infusión. Los ejemplos incluyen, intravenosa (en una vena), bolo intravenoso, intraarterial (en una arteria), intramuscular (en un músculo), subcutánea (debajo de la piel), infusión intraósea (en la médula ósea), intradérmica, (en la propia piel), intraperitoneal (infusión o inyección en el peritoneo), transdérmica (difusión a través de la piel intacta), transmucosal (difusión a través de una membrana de mucosa), inhalatoria. Se prefieren las vías subcutánea, intraperitoneal y en bolo intravenoso, prefiriéndose particularmente la vía en bolo intravenoso.

El compuesto antisentido puede administrarse como una dosis individual o como dosis repetidas en un período, por ejemplo, diariamente, semanalmente o mensualmente.

La cantidad y la frecuencia de administración pueden ser determinadas por un médico o veterinario tratante. A modo de ejemplo, puede administrarse a un sujeto una dosis de 50-1600 mg de compuesto antisentido. Se contempla particularmente una dosis de 150-450 mg para humanos. También se contempla particularmente una dosis de 2-6 mg/Kg. En una realización, el compuesto antisentido se administra una vez al día o dos veces al día durante una semana.

En una realización, el compuesto antisentido se dosifica a 50 mg, o 100 mg, o 200 mg, o 300 mg, o 400 mg o 500 mg con una frecuencia de una vez a la semana, una vez cada quince días, o una vez cada tres semanas, o una vez cada 28 días.

En otra realización, el compuesto antisentido se dosifica a 50 mg, o 100 mg, o 200 mg, o 300 mg, dos o más días a la semana para efectuar la movilización de las células de leucemia.

En otra realización, el compuesto antisentido se dosifica a 300 mg cada dos días para efectuar la detención de las células de leucemia, o la muerte de las células de leucemia (mediante, por ejemplo, apoptosis), o la inhibición de la proliferación de células de leucemia.

### ***Terapia de combinación***

Los compuestos antisentido de la divulgación pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos para tratar la leucemia, por ejemplo, AML.

En una realización, los niveles de expresión de CD49d se usan como un biomarcador de respuesta predictiva potencial para el tratamiento del sujeto.

Como se usa en la presente, el término "tratar" o "tratamiento" incluye anular, inhibir, ralentizar o revertir la progresión de una enfermedad o afección, o mejorar o prevenir un síntoma clínico de la enfermedad o afección.

Los agentes terapéuticos ejemplares incluyen agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos, fármacos como una antraciclina, agentes inmunooncológicos, como los que inducen una ADCC e inmunconjugados. Los inmunconjugados ilustrativos incluyen un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo dirigido a células de leucemia y conjugados con uno o más agentes citotóxicos, quimioterapéuticos, inhibidores del crecimiento o un isótopo radiactivo. En una realización, un inmunconjugado es un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) en donde el anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo se conjuga con un fármaco, como un maitansinoide, una auristatina, una dolastatina, una caliqueamicina, una antraciclina, antracenodiona, citarabina, metotrexato, vindesina, un taxano, un tricoteceno, etc.

La terapia quimioterapéutica puede comprender la inducción a la remisión seguido de quimioterapia posterior a la remisión. La terapia de inducción se administra con el objetivo de disminuir la cantidad de células de leucemia a un nivel indetectable y restaurar la producción de células sanguíneas normales.

En una realización, el agente quimioterapéutico es citarabina. La citarabina puede administrarse de manera continua durante siete días a través de una línea intravenosa (IV). Típicamente, también puede administrarse un fármaco de antraciclina, como daunorrubicina, idarrubicina o mitoxantrona, en una única dosis IV durante los primeros tres días de tratamiento. Esto a veces se conoce como el régimen "7+3". Por lo general, el régimen 7+3 comprende administrar 100 mg/m<sup>2</sup> de citarabina durante 7 días más una antraciclina o antracenodiona (más a menudo daunorrubicina, 45 mg/m<sup>2</sup> en adultos mayores, 90 mg/m<sup>2</sup> en adultos jóvenes, pero otras opciones incluyen 12 mg/m<sup>2</sup> de idarubicina o mitoxantrona) durante 3 días.

Comúnmente, una biopsia de médula ósea se repetirá 2 semanas después del inicio de la terapia, para evaluar la aplasia de la médula. Si se detecta leucemia residual, los pacientes son tratados con otro curso de quimioterapia, denominado reinducción.

La quimioterapia posterior a la remisión tiene como objetivo erradicar cualquier enfermedad residual en un intento de curación. La quimioterapia posterior a la remisión puede comprender dosis altas de citarabina (Ara-C; HiDAC). Típicamente, el régimen HiDAC comprende administrar de 1.000 a 3.000 mg/m<sup>2</sup> de citarabina IV durante de 1 a 3 horas cada 12 horas durante de 6 a 12 dosis.

En una realización, la quimioterapia comprenderá un tratamiento con dosis altas de citarabina (Ara-C). En una realización, se administran 3 g/m<sup>2</sup>/día de Ara-C por vía intravenosa durante 3 horas, en los días 2- a pacientes ≤60 años y se administran 1,5 g/m<sup>2</sup>/día Ara-C por vía intravenosa durante 3 horas, en los días 2-6 a pacientes >60 años. La biopsia y aspiración de la médula ósea se realiza el día 30 (± 2 días). En los pacientes que no muestren una recuperación suficiente de la médula ósea para el día 30 (en ausencia de células de leucemia), la biopsia y la aspiración de la médula ósea se repetirán 1-2 semanas después. Pueden realizarse aspiraciones de médula ósea adicionales a discreción del médico tratante para evaluar la respuesta. Los pacientes que tienen enfermedad persistente después del primer ciclo pueden recibir reinducción con las dosis completas del compuesto antisentido/Ara-C. Los pacientes que alcanzan la remisión completa (CR), la remisión completa excepto por la recuperación de los recuentos de plaquetas (CRp) o la respuesta parcial (PR), después del primer ciclo de terapia recibirán un ciclo adicional de compuesto antisentido/Ara-C con la dosis completa del compuesto antisentido y una reducción del 25% de las dosis de Ara-C. La evaluación de la respuesta será después de dos ciclos de terapia. Los pacientes que logran CR, CRp o PR después de dos ciclos de terapia pueden continuar con consolidación o mantenimiento según el criterio del médico tratante, sin compuesto antisentido. La dosis completa en el hombre se establece típicamente durante los ensayos de aumento de dosis de Fase 1 para determinar la dosis terapéutica mínima. La administración puede proporcionarse a dosis de aproximadamente 150-450 mg en el hombre. También se contempla particularmente una dosis de 2-6 mg/Kg para sujetos humanos. En una realización, el compuesto antisentido se administra una vez al día o dos veces al día durante una semana. En una realización, el compuesto antisentido se dosifica a 50 mg, o 100 mg, o 200 mg, o 300 mg, o 400 mg, o 500 mg con una frecuencia de una vez a la semana, una vez cada quince días, una vez cada tres semanas o una vez cada 28 días. En una realización, el compuesto antisentido se dosifica a 50 mg, o 100 mg, o 200 mg o 300 mg dos o más días a la semana para efectuar la movilización de las células leucocitarias. En una realización, el compuesto antisentido se dosifica a 300 mg dos o más días a la semana para efectuar la detención de células de leucemia, o muerte de células de leucemia (mediante, por ejemplo, apoptosis), o inhibición de la proliferación de células de leucemia.

Otros tratamientos de quimioterapia incluyen dosis altas de Ara-C/Mitoxantrona, 2-Idarubicina/Flag (o Flag solo si no se puede administrar más antraciclina) (Flag: fludarabina + citarabina en dosis alta + G-CSF), y 3-CLO/VP16 (etopósido)/CTX (o Clo/Ara-C).

El agente terapéutico puede administrarse antes, después o al mismo tiempo que el compuesto antisentido. En una realización, el agente terapéutico se administrará después de la administración del compuesto antisentido, cuando se espera la máxima movilización de células de leucemia a la sangre periférica, por ejemplo, 24-36 horas después de la primera dosis del compuesto antisentido. En una realización preferida, el compuesto antisentido de hasta 450 mg o 6 mg/kg se administra iv el día 1, se administran 3 g/m<sup>2</sup>/día de Ara-C por vía intravenosa durante 3 horas, los días 2-6 a pacientes ≤60 años y se administran 1,5 g/m<sup>2</sup>/día de Ara-C por vía intravenosa durante 3 horas, en los días 2-6 a pacientes >60 años.

En una realización, el agente terapéutico se administra primero cuando hay >20% de blastos de leucemia en la sangre periférica (es decir, una carga alta de leucemia). CR, CRp y PR son términos entendidos por los expertos en la técnica.

Pueden usarse análisis hematológicos, morfológicos, citoquímicos o inmunofenotípicos para determinar el nivel de células de leucemia en la sangre periférica antes, después o durante el tratamiento con un agente terapéutico.

Los frotis de sangre o de médula ósea pueden examinarse morfológicamente usando una tinción de May-Grunwald-Gimsa o de Wright-Gimsa. Típicamente, se cuentan por lo menos 200 leucocitos en frotis de sangre y 500 células nucleadas en frotis de médula, y los últimos conteniendo espículas. Los mieloblastos, monoblastos y

megacarioblastos se incluyen en el recuento de blastos. En la AML con diferenciación monocítica o mielomonocítica, se cuentan los monoblastos y promonocitos, pero no los monocitos anormales, como equivalentes de blastos. Los eritroblastos no se cuentan como blastos excepto en el raro caso de leucemia eritroide pura.

La citología usando tinciones de mieloperoxidasa (MPO) o negro de Sudán B (SBB) y esterasa no específica (NSE) pueden usarse para identificar la participación del linaje. La detección de MPO (si está presente en  $\geq 3\%$  de los blastos) indica típicamente diferenciación mieloide, pero su ausencia no excluye un linaje mieloide porque los mieloblastos y monoblastos tempranos pueden carecer de MPO. La tinción de SBB es paralela a la MPO pero es menos específica. Las tinciones con NSE muestran actividad citoplasmática difusa en monoblastos (habitualmente  $> 80\%$  positivos) y monocitos (habitualmente  $> 20\%$  positivos). En la leucemia eritroide aguda, una tinción de ácido peryódico de Schiff (PAS) puede mostrar glóbulos grandes de positividad para PAS. Las tinciones de hierro pueden permitir la detección de depósitos de hierro, sideroblastos normales y sideroblastos en anillo.

Alternativamente, o además de la citología, puede usarse inmunofenotipificación para determinar la participación del linaje. Suele requerirse la cuantificación de los patrones de expresión de varios antígenos citoplasmáticos y de superficie para la asignación de linaje.

Los marcadores de etapa precursora incluyen, por ejemplo, CD34, CD38, CD117, CD133 y HLA-DR. Los marcadores granulocíticos incluyen, por ejemplo, CD13, CD15, CD16, CD33, CD65 y mieloperoxidasa citoplasmática (cMPO). Los marcadores monocíticos incluyen, por ejemplo, esterasa no específica (NSE), CD11c, CD14, CD64, lisozima, CD4, CD11b, CD36 y homólogo de NG2. Los marcadores de megacariocitos incluyen, por ejemplo, CD41 (glucoproteína IIb/IIIa), CD61 (glucoproteína IIIa) y CD42 (glucoproteína 1b). Los marcadores eritroides incluyen, por ejemplo, CD235a (glicoforina A). Los marcadores de linaje mieloide incluyen, por ejemplo, MPO o evidencia de diferenciación monocítica (por lo menos dos de NSE, CD11c, CD14, CD64 y lisozima). Los marcadores del linaje B incluyen CD19 (fuerte) con por lo menos uno de los siguientes: CD79a, CD22, CD10 o CD19 (débil) con por lo menos dos de los siguientes CD79a, cCD22, CD10. Los marcadores de linaje T incluyen, por ejemplo, cCD3 o CD3 de superficie. En una realización, el número de células CD123+, CD34+ y CD38- se analiza, por ejemplo, mediante citometría de flujo.

Típicamente, una leucemia aguda se considera positiva para un marcador si  $\geq 20\%$  de las células de leucemia expresan el marcador. Para algunos marcadores (por ejemplo, CD3 citoplasmático, MPO, TdT, CD34, CD 117) puede aplicarse un límite inferior del 10%.

Las anomalías cromosómicas se detectan en las leucemias. Se considera típicamente necesario un mínimo de 20 células en metafase analizadas de médula ósea establecer el diagnóstico de un cariotipo normal, y se recomienda para definir un cariotipo anormal. Los cariotipos anormales pueden diagnosticarse a partir de muestras de sangre.

La hibridación fluorescente in situ (FISH) es una opción para detectar reordenamientos génicos, como las fusiones de los genes RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11, MLL y EVI1, o la pérdida de material cromosómico 5q y 7q. FISH es frecuentemente necesario para identificar socios de fusión MLL en translocaciones 11q23.

El diagnóstico molecular mediante la reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para las fusiones de genes recurrentes, como RUNX1-RUNX1T1, CBFB-MYH11, MLLT3-MLL, DEK-NUP214, puede ser útil en ciertas circunstancias.

## Ejemplo 1

### Métodos

**ATL1102.** ATL1102 tiene 20 bases de longitud, con un peso molecular de 7230 Da. Es la sal 19-sódica de un oligonucleótido de fosforotioato 3'→5' 20-mer con un diseño gapmer 3-9-8,2'-O-(2-metoxietilo) para respaldar un mecanismo de acción antisentido de RNasa H. La secuencia ATL1102 es 5'-MeC<sup>Me</sup>UG AGT<sup>Me</sup>CTG TTT<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>A<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>U-3', con las 3 primeras y las últimas 8 bases 2'-O-(2-metoxietilo) modificadas y las bases de citosina y uracilo 5' metiladas (Me).

**ATL1102 in vitro.** Las células de AML (HL60) se nucleoporaron usando el kit V de Nucleofector de la línea celular Amaxa (Lonza) y se trataron con varias concentraciones de ATL1102 o control mezclado.

**Movilización de células de AML usando ATL1102 in vivo.** Para determinar el efecto de movilización, se inyectaron células HL60 en ratones NSG (1,3-5x10<sup>6</sup> células/ratón; n=/grupo). Los ratones se trataron con una dosis individual de ATL1102 o control mezclado el día 23 después de la inyección de leucemia. Los glóbulos blancos de fémur, bazo y sangre periférica se analizaron en varios puntos temporales después del tratamiento antisentido y se tiñeron con anticuerpos humanos CD19 y CD45 para distinguir las células de ALL pre-B humanas de las células receptoras de ratón.

**Muestras de leucemia.** Se obtuvo HL60 de la Dra. Nora Heisterkamp., CHLA. Las muestras de médula ósea y sangre periférica de pacientes con AML fueron proporcionadas por la USC (Los Ángeles, USA), de conformidad con las normas de la Junta de Revisión Institucional de cada institución. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los sujetos humanos.

**Modelo de xenoinjerto de leucemia primaria.** Bajo los protocolos aprobados por IACUC, se acondicionaron ratones NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) de 5-7 semanas de edad on una dosis subletal individual de 250 cGy de irradiación corporal total (250 cGy), seguido de inyección intravenosa de 1,3-5x10<sup>6</sup> células HL60 por ratón. Matsunaga et al. Nature Medicine 2003; 9: 1158-1165. Se monitorizó el cambio de peso y la presencia de señalización bioluminiscente en los ratones mediante bioimagenología y la expresión de células CD45<sup>+</sup> humanas en la sangre periférica mediante citometría de flujo. Luego se aislaron glóbulos blancos (WBC) de sangre periférica, bazo y médula ósea.

**Imagenología in vivo.** Se marcaron células de ALL primarias con luciferasa mediante transducción con sobrenadante viral pCCL-MNDU3-LUC. La monitorización de la progresión de la leucemia mediante la determinación del desarrollo de la señal de bioluminiscencia en ratones se realizó como se ha descrito anteriormente. Parque et al. Blood (2011) 118:2191-2199.

**Tratamiento in vivo con quimioterapia.** En un modelo de xenoinjerto de AML, los ratones NSG se tratan con 1,5 mg/kg de doxorubicina durante 3 días, 50 mg/kg de Ara-C durante 5 días mediante la coadministración intravenosa de ambos fármacos (Wunderlich et al. Blood (2013) 121: e90-e97).

**Aislamiento de glóbulos blancos de órganos de ratón.** Para los ensayos de movilización, se recogieron fémures y bazo en sangre periférica PBS fría y sangre periférica mediante sangrado de la vena de la cola. El aislamiento de glóbulos blancos de fémur, bazo y sangre periférica se obtuvo mediante lisis de glóbulos rojos usando cloruro de amonio. La suspensión de células individuales resultante se mantuvo en medio IMDM frío, más FBS al 20% para su análisis adicional.

**Recuentos de CBC.** Se extrajo sangre periférica a través de la vena de la cola para el análisis de CBC de los ratones cuando se sacrificaron. Las muestras de sangre (~100 µl/muestra) se recogieron en tubos BD microtainer con EDTA (BD Biosciences) y se analizaron en un analizador hematológico, contador de células Hemavet VetScan HM5 (Abaxis, Union City, CA).

**Citometría de flujo.** Se obtuvieron anticuerpos anti-CD45-FITC humano (HI30) y anti-CD45-PE de ratón (30-F11), así como controles de isotipo respectivos (clones MOPC-21 y A95-1) y anexina V, PI y 7-AAD para apoptosis y BrdU para los análisis del ciclo celular de BD Biosciences (San José, CA).

**PCR cuantitativa en tiempo real.** Las muestras de ARN se aislaron usando RNeasy Plus MiniKits (Qiagen, Hilden, Alemania), con la síntesis posterior de ADNc. La PCR cuantitativa en tiempo real se realizó mezclando muestras de ADNc con SYBR GreenER (Invitrogen). Las muestras se cargaron en una placa de reacción óptica de 96 pocillos (Applied Biosystems, Foster City, CA) y se analizaron mediante el sistema de PCR en tiempo real ABI7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA).

## Ejemplo 2

### ATL1102 moviliza células AML en la sangre periférica de ratones NOD/SCID Il2R gamma -/- y α4 integrina regulada por disminución

ATL1 102 puede movilizar células AML en un modelo de xenoinjerto de células HL60 humanas después de 24 horas de administración iv a la sangre periférica (Figura 1). Las células HL-60 (AML; 5x10<sup>6</sup>/por ratón) se inyectaron a través de la vena de la cola en ratones hembra NSG irradiados subletalmente. La presencia de células humanas (hCD45) se determinó semanalmente mediante citometría de flujo de glóbulos blancos aislados de sangre periférica. 23 días después de la inyección de leucemia, los ratones se dividen aleatoriamente en 3 grupos tratados con control antisentido (CTRL) (150 mg/kg, n=3), ATL1102 (50 mg/kg, n=4) o ATL1102 (150 mg/kg, n=3). Se extrajo sangre periférica antes y 2 y 24 horas después del tratamiento con ATL-1102 y se aislaron glóbulos blancos y se tiñeron para CD45 murino (m), CD45 humano (h) y hCD33. ATL1102 indujo una fuerte movilización de células AML a la sangre periférica de ratones receptores de leucemia en comparación con ratones tratados con antisentido de control (52,8% ± 45,4% frente a 9,8% ± 15,9% a las 24 h después del tratamiento usando 50 mg/kg de ATL1102, n=3).

Se midieron el número de células positivas para CD49d y la media de fluorescencia de PE. Las células movilizadas mostraron una marcada disminución de la expresión superficial de CD49d (16,8%±9,2% frente a 32,8%±16,7%, n=3). El microambiente in vivo puede permitir la captación de ATL1102 en células de AML.

En algunas realizaciones, las células de AML se movilizan desde la médula ósea. Después de 33 horas, las

células de AML en la sangre periférica disminuyen. En algunas realizaciones, esto se debe a la disminución de la viabilidad o la capacidad proliferativa.

### Ejemplo 3

#### Expresión in vitro de CD49d en células HL-60: ATL1102 regula por disminución CD49d

Los efectos in vitro con ATL1102 pueden observarse después de la nucleoporación de células de AML. La expresión de CD49d se determinó por citometría de flujo después de 24, 48 y 72 horas de nucleoporación de células HL60 con ATL1102 (1, 3 y 10  $\mu\text{M}$ ) o control mezclado (30  $\mu\text{M}$ ). CD49d está notablemente regulado por disminución en comparación con el control mezclado después de 48 horas y 72 horas de manera dependiente de la dosis (Figura 2). Se incluyeron células GFP+ como control (no se tiñeron para CD49d). La intensidad de fluorescencia media también se ve afectada. Se nucleofectaron células HL-60 ( $3 \times 10^6$ ) con un control antisentido (30  $\mu\text{M}$ ) o ATL1102 (1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ ) usando el Amaxa Nucleofector Kit V (Lonza). (A) La expresión de CD49d se evalúa mediante citometría de flujo cada 24 horas después del tratamiento durante 72 horas. (B) Se miden el número de células positivas para CD49d y la media de fluorescencia de PE. (C) Proporción de expresión de CD49d en comparación con Ctrl. (D) Proporción de la media de fluorescencia de células positivas para CD49d en comparación con Ctrl. El análisis FACS reveló una disminución significativa de la expresión superficial de CD49d de manera dependiente de la dosis ( $57,8\% \pm 7,2$  ATL1102 (10  $\mu\text{M}$ ) frente a  $99,7\% \pm 0,1$  para el control antisentido (30  $\mu\text{M}$ ),  $P < 0,001$ ,  $n=3$ , 72 h después tratamiento con ATL1102). La expresión de CD49d en el nivel de ARNm disminuyó significativamente con el tratamiento con ATL1102 antisentido de  $\alpha 4$  integrina en la línea celular de AML humana HL-60 ( $85,2 \pm 15,4$  de inhibición de la expresión usando ATL1102 1  $\mu\text{M}$  después de 24 h en comparación con el control,  $p < 0,001$ ) según se evalúa por RT-PCR. Consultar la Figura 3.

### Ejemplo 4

#### Ensayo de apoptosis in vitro en células HL-60 nucleofectadas. Efecto de ATL1102

Las células HL-60 se nucleofectaron con un antisentido de control (30  $\mu\text{M}$ ) o ATL1102 (1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ ) usando el Amaxa Nucleofector Kit V (Lonza). El ensayo de apoptosis se realizó usando tinción doble con Anexina V (PE)/DAPI y se evaluó mediante citometría de flujo cada 24 horas después del tratamiento durante 72 horas. Se observó un efecto sobre la apoptosis de las células HL60 después de dosis más altas de tratamiento con ATL1102. Consultar la Figura 4.

### Ejemplo 5

#### Ensayo de ciclo celular in vitro en células HL-60 nucleofectadas. Efecto de ATL1102

Se nucleofectaron células HL-60 ( $3 \times 10^6$ ) con un control antisentido (30  $\mu\text{M}$ ) o ATL1102 (1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ ) usando Amaxa Nucleofector Kit V (Lonza). (A) El efecto de ATL1102 se evaluó mediante tinción con BrdU/7-AAD y se reveló mediante citometría de flujo 48 horas después del tratamiento. (B) Se muestran ejemplos de puertas de citometría de flujo usadas para el análisis del ciclo celular para 1  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$  de ATL1102. Se observaron algunos efectos sobre el ciclo celular de las células HL60 después de dosis más altas de tratamiento con ATL1102. Consultar la Figura 5.

### Ejemplo 6

#### Diseño de ensayo de movilización

Se inyectaron células HL-60 ( $5 \times 10^6$ /por ratón) a través de la vena de la cola en ratones NSG irradiados de manera subletal. La presencia de células humanas (hCD45) se determinó semanalmente mediante citometría de flujo de glóbulos blancos aislados de sangre periférica (PB). 23 días después de la inyección de leucemia, los ratones se trataron con control antisentido (CTRL) (150 mg/kg,  $n=3$ ) o ATL1102 (50 mg/kg,  $n=4$ ). Se extrajo PB antes y 24 horas después del tratamiento con ATL1102. Se tomaron muestras de ratones el día 0 y se trataron con ATL1102 o control 24 horas más tarde. Sangre periférica para analizar la movilización de células mCD45/hCD45/hCD33 mediante citometría de flujo. Si se moviliza, se sacrifica la mayoría de los ratones (los 4 primeros grupos) y se recogen los órganos (sangre periférica, bazo y médula ósea). Todos los ratones se tiñen para un estudio de injerto (mCD45/hCD45/hCD33), para la expresión de hCD49d y hCD29 y para una apoptosis (Anexina V/7AAD) y el número de células (por exclusión de Trypanblue de células muertas) se contará con el objetivo de determinar si las células movilizadas regresan a la médula ósea, se mueven a otro órgano o mueren en la sangre (especialmente en el experimento "a largo plazo"). También se realizará un recuento sanguíneo completo usando un Hemavet5/Analizador hematológico. Consultar la Figura 6.

**Ejemplo 7****Transducción de HL-60 con vector de expresión de luciferasa**

Las células HL 60 se transdujeron con luciferasa de luciérnaga lentiviral (Hsieh et al. Blood 121 (10):1814-1818, 2013). Consultar la Figura 7.

**Ejemplo 8****Resultados:**

ATL1102 puede disminuir de manera eficiente la expresión de CD49d en la línea celular de AML in vitro e in vivo, y ATL1102 lleva a la movilización de células de AML a la sangre periférica.

Se nucleoporaron células HL-60 con ATL1102 o antisentido de control. La expresión de ARNm de CD49d se redujo significativamente con las células de tratamiento ATL1102 ( $85,2 \pm 15,4$  de inhibición de la expresión usando ATL1102  $1\mu\text{M}$  después de 24 horas en comparación con el control,  $p < 0,001$ ) según se evalúa por RT-PCR. El análisis FACS 72 horas después del tratamiento reveló una disminución significativa de la expresión superficial de CD49d de manera dependiente de la dosis ( $99\% \pm 0,4$  ( $1\mu\text{M}$ , \*),  $87,9\% \pm 8,7$  ( $3\mu\text{M}$ ) y  $57,8\% \pm 7,2$  ATL1102 ( $10\mu\text{M}$ , \*\*),  $55,9\% \pm 13,5$  ( $30\mu\text{M}$ , \*\*) frente a  $99,7\% \pm 0,1$  para antisentido de control ( $30\mu\text{M}$ ),  $P < 0,001$ ,  $n = 3$ ). No se observó ningún efecto significativo sobre la apoptosis o el ciclo celular después del tratamiento con ATL1102, aunque se observaron efectos sobre la apoptosis por encima de  $10\mu\text{M}$ .

El efecto in vivo de ATL-1102 sobre la movilización de células de leucemia se evaluó en un experimento piloto. Para este propósito, se inyectaron células HL-60 ( $5 \times 10^6$ /por ratón) a través de la vena de la cola en ratones NSG irradiados de manera subletal. La presencia de células de ALL humana (hCD45) se determinó semanalmente mediante citometría de flujo de glóbulos blancos aislados de sangre periférica (PB). 23 días después de la inyección de leucemia, los ratones se trataron con control antisentido (CTRL) ( $n = 3$ ), ATL1102 ( $50\text{ mg/kg}$ ,  $n = 2$ ). Se extrajo sangre periférica antes y 24 horas después del tratamiento con ATL1102. ATL1102 indujo una fuerte movilización de células AML a la PB de ratones receptores de leucemia en comparación con ratones tratados con antisentido de control ( $69,1\%$  y  $87,7\%$  frente a  $1,1\%$ ,  $0,2\%$  y  $28,1\%$  para ATL1102 ( $50\text{ mg/ml}$ ) y ratones tratados con CTRL respectivamente. Las células movilizadas muestran una disminución de la expresión superficial de CD49d ( $16,8\% \pm 9,2\%$  frente a  $32,8\% \pm 16,7\%$ ).

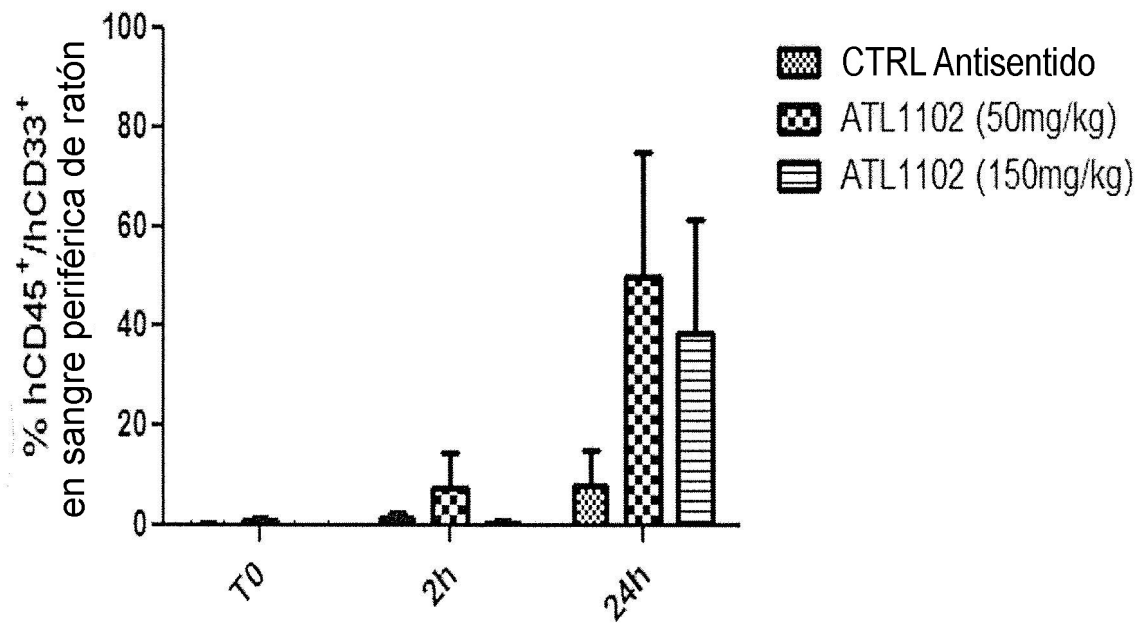
**Referencias**

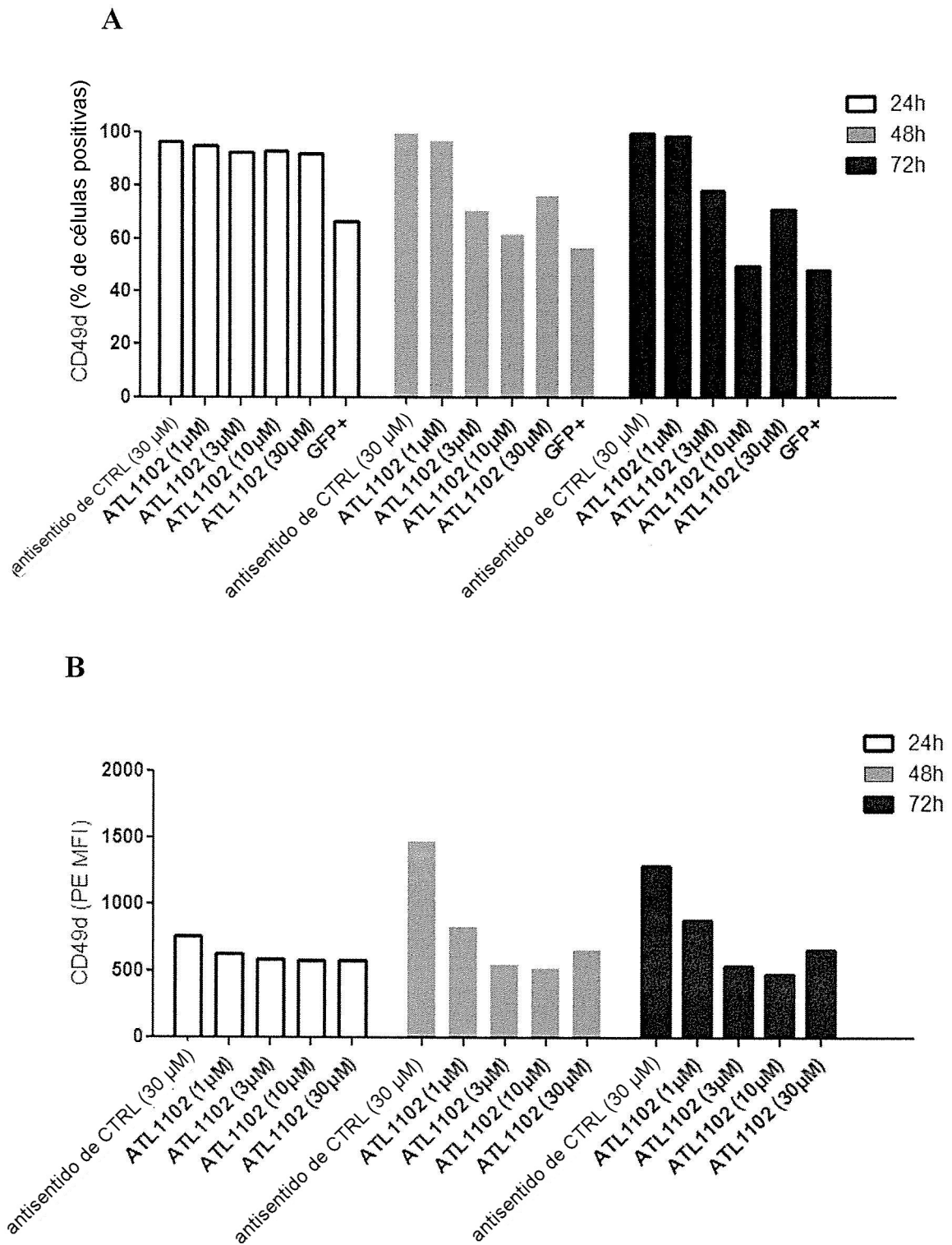
- Altschul et al., J. Mol. Biol. (1990) 215:403-410  
 Camos et al., Clin. Transl. Oncol. 8 (8):550-9, 2006  
 Döhner et al., New England Journal of Medicine 15 Sep 2015 17;373(12):1136-52  
 Elbashir et al., Nature (2001a) 411:494-498  
 Elbashir et al., Genes Dev. (2001b) 15:188-200  
 Englisch et al., Angewandte Chemie, Edición Internacional (1991) 30:613  
 Fire et al., Nature (1998) 391:806-811  
 Gaynon et al. Cancer 1998; 82:1387-1395  
 Guo and Kempheus, Cell (1995) 81:611-620  
 Hsieh et al. Blood 2013; 121:1814-1818  
 Hunger et al., New England Journal of Medicine 15;373(16):1541-52, 2015  
 Matsunaga et al. Nature Medicine 2003; 9:1158-1165  
 Montgomery et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1998) 95:15502-15507  
 Nielsen et al., Science (1991) 254, 1497-1500  
 Park et al., Blood (2011) 118:2191-2199  
 Schlenk et al. N. Engl. J. Med. 2008; 358:1909-1918  
 Tabara et al., Science (1998) 282:430-431  
 Tijsterman et al., Science (2002) 295:694-697  
 Timmons and Fire, Nature (1998) 395:854  
 Tuschl et al., Genes Dev. (1999) 13:3191-3197  
 Zhang and Madden, Genome Res. (1997) 7:649-656  
 Wunderlich et al. Blood (2013) 121:e90-e97.

## REIVINDICACIONES

1. Un oligonucleótido antisentido completamente complementario sobre la totalidad de dicho oligonucleótido con un ácido nucleico que codifica  $\alpha 4$  integrina humana, en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos o inmunooncolíticos para su uso en un método para tratar la leucemia mieloide aguda (AML) en un sujeto humano, el método comprende el paso de administrar al sujeto humano una cantidad de dicho oligonucleótido antisentido en donde el oligonucleótido consiste en una región de 2' desoxinucleótido flanqueada en ambos extremos 5' y 3' con uno o más ribonucleótidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo), uno o más fosforotioatos, y una o más 5-metilcitosinas y en donde el oligonucleótido antisentido consiste en la secuencia de nucleobases de la SEQ ID NO: 1, y en donde el oligonucleótido antisentido es:
- 5'-<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>UG AGT<sup>Me</sup>CTG TTT <sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>C A<sup>Me</sup>U<sup>Me</sup>U <sup>Me</sup>C<sup>Me</sup>U-3'
- en donde,
- a) cada uno de los 19 enlaces internucleotídicos del oligonucleótido es un diéster de fosforotioato O,O-enlazado;
  - b) los nucleótidos en las posiciones 1 a 3 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo);
  - c) los nucleótidos en las posiciones 4 a 12 desde el extremo 5' son 2'-desoxirribonucleósidos;
  - d) los nucleótidos en las posiciones 13 a 20 desde el extremo 5' son ribonucleósidos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); y
  - e) todas las citosinas son 5-metilcitosinas (<sup>Me</sup>C),
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. El oligonucleótido antisentido para el uso de la reivindicación 1, en donde el tratamiento comprende además administrar un antagonista de  $\alpha 4$  integrina adicional antes de, después de o al mismo tiempo que el oligonucleótido antisentido.
3. El oligonucleótido antisentido para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde el uno o más agentes quimioterapéuticos o inmunooncolíticos se administra por lo menos aproximadamente 24 horas después de la administración del oligonucleótido antisentido.
4. El oligonucleótido antisentido para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además determinar el número de células de AML positivas para  $\alpha 4$  integrina en la sangre periférica antes de administrar el agente.
5. El oligonucleótido antisentido para el uso de la reivindicación 4, en donde el método comprende además analizar las células de AML positivas para  $\alpha 4$  integrina para la expresión de uno o más determinantes antigénicos de la superficie celular, seleccionado de CD123, CD33, CD34 y CD38.
6. El oligonucleótido antisentido para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el agente quimioterapéutico es citarabina.

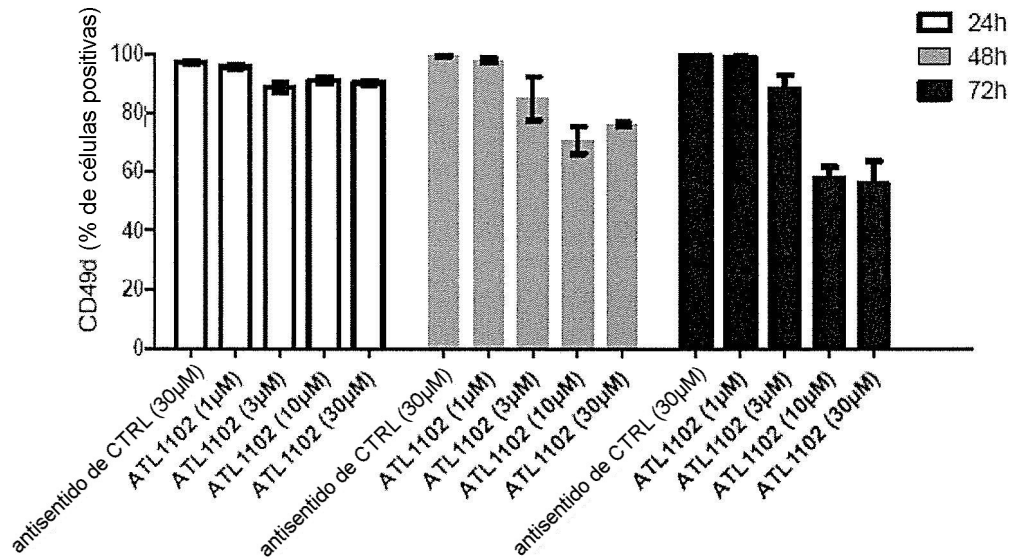
## 2015-07-07 Ensayo de movilización de ATL1102

**Figura 1**

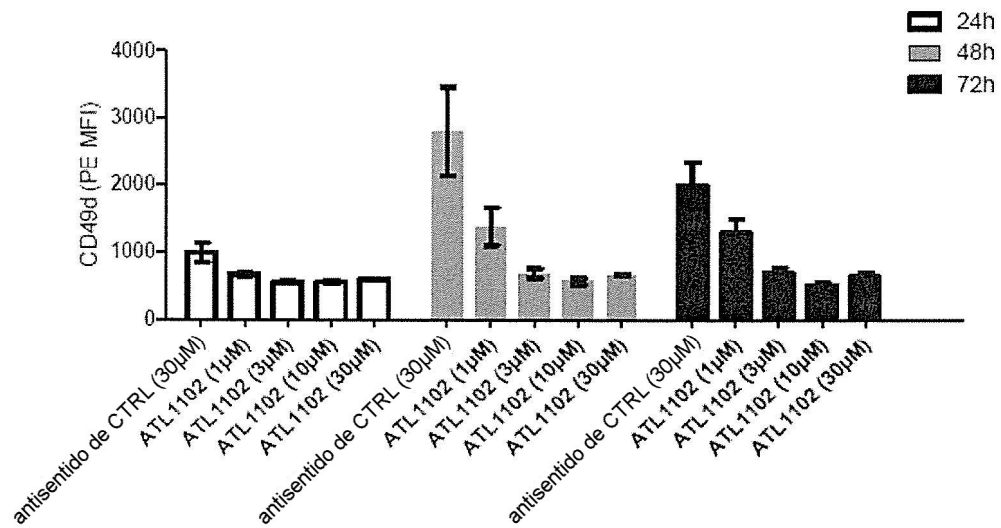


**Figura 2**

**A**

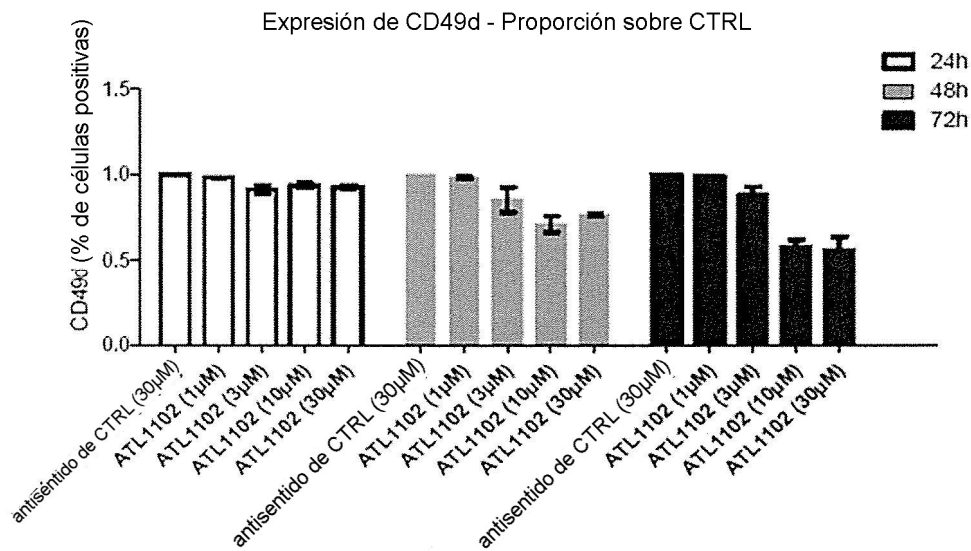


**B**

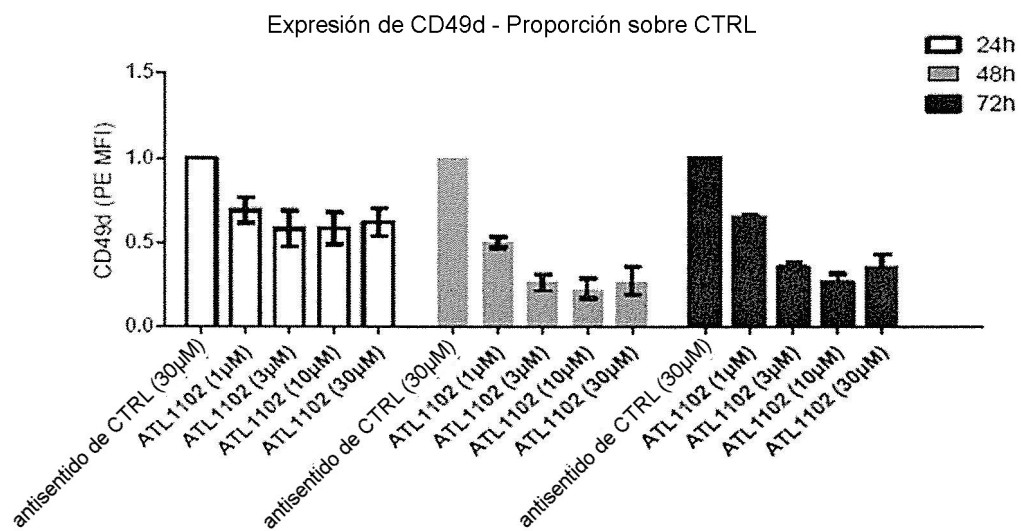


**Figura 3**

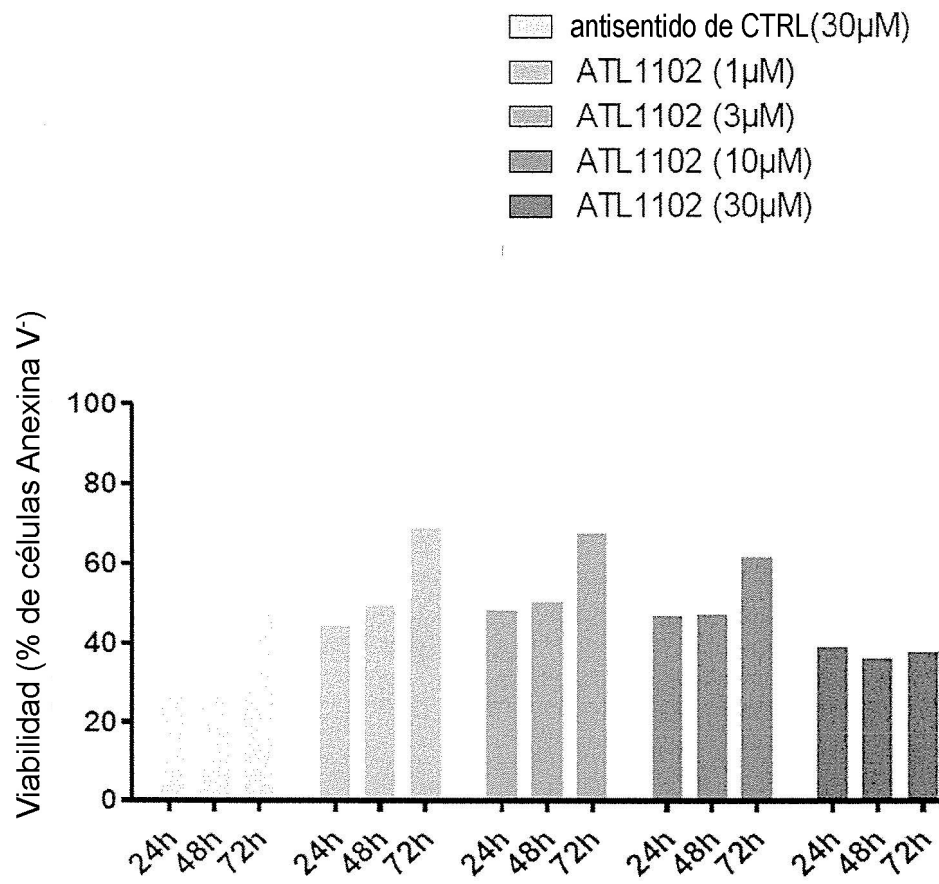
C



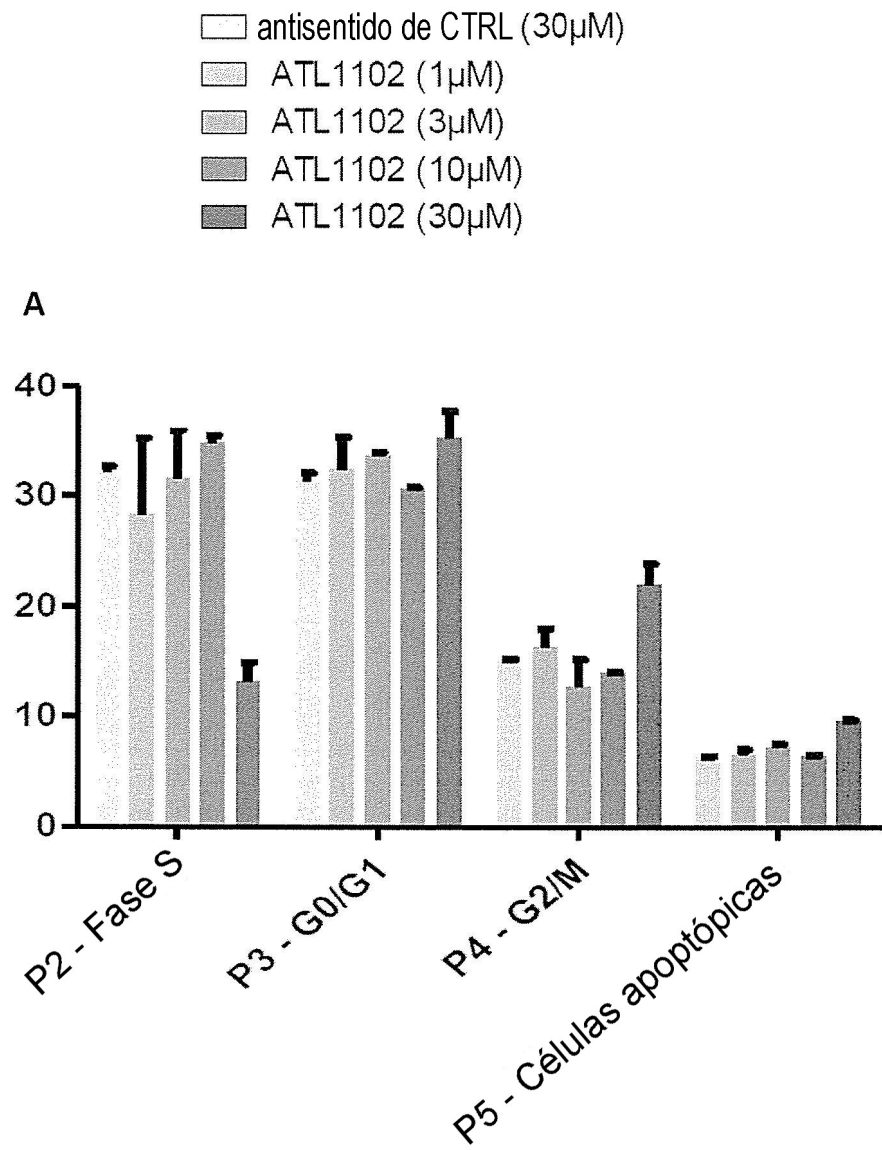
D



**Figura 3 continuación**

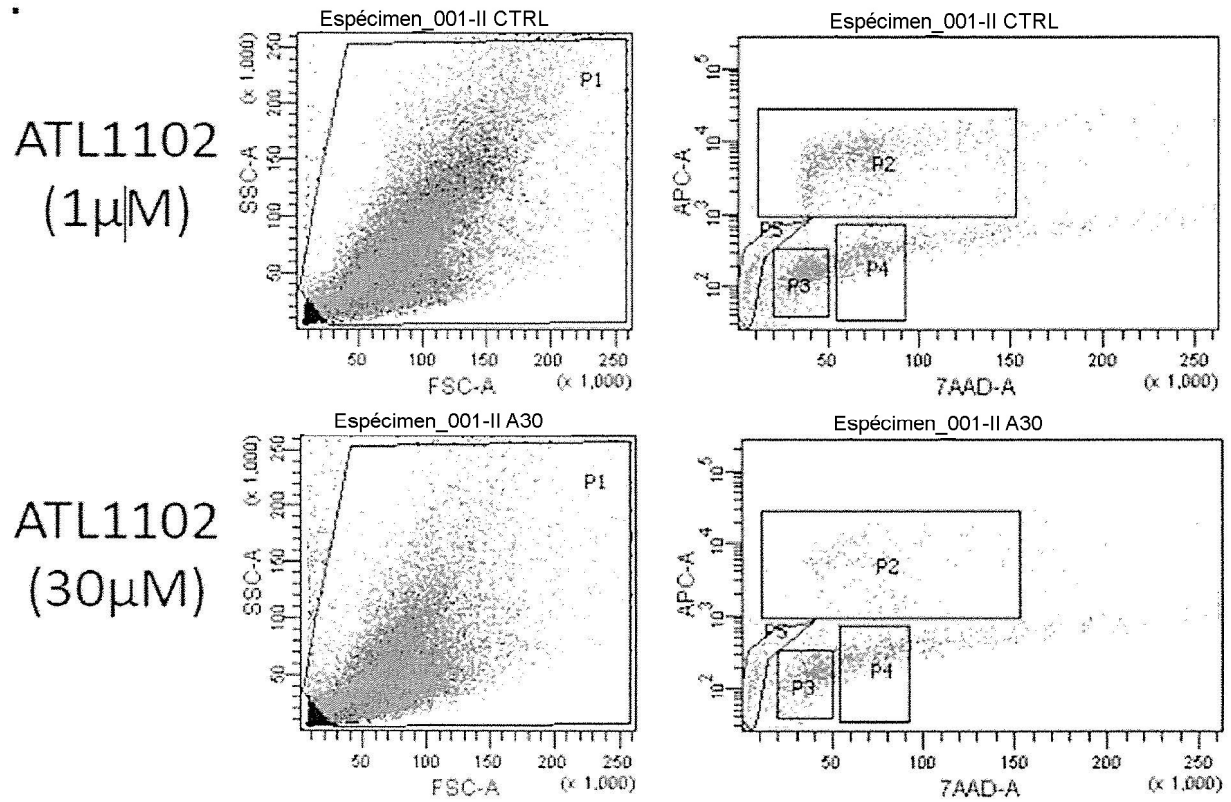


**Figura 4**

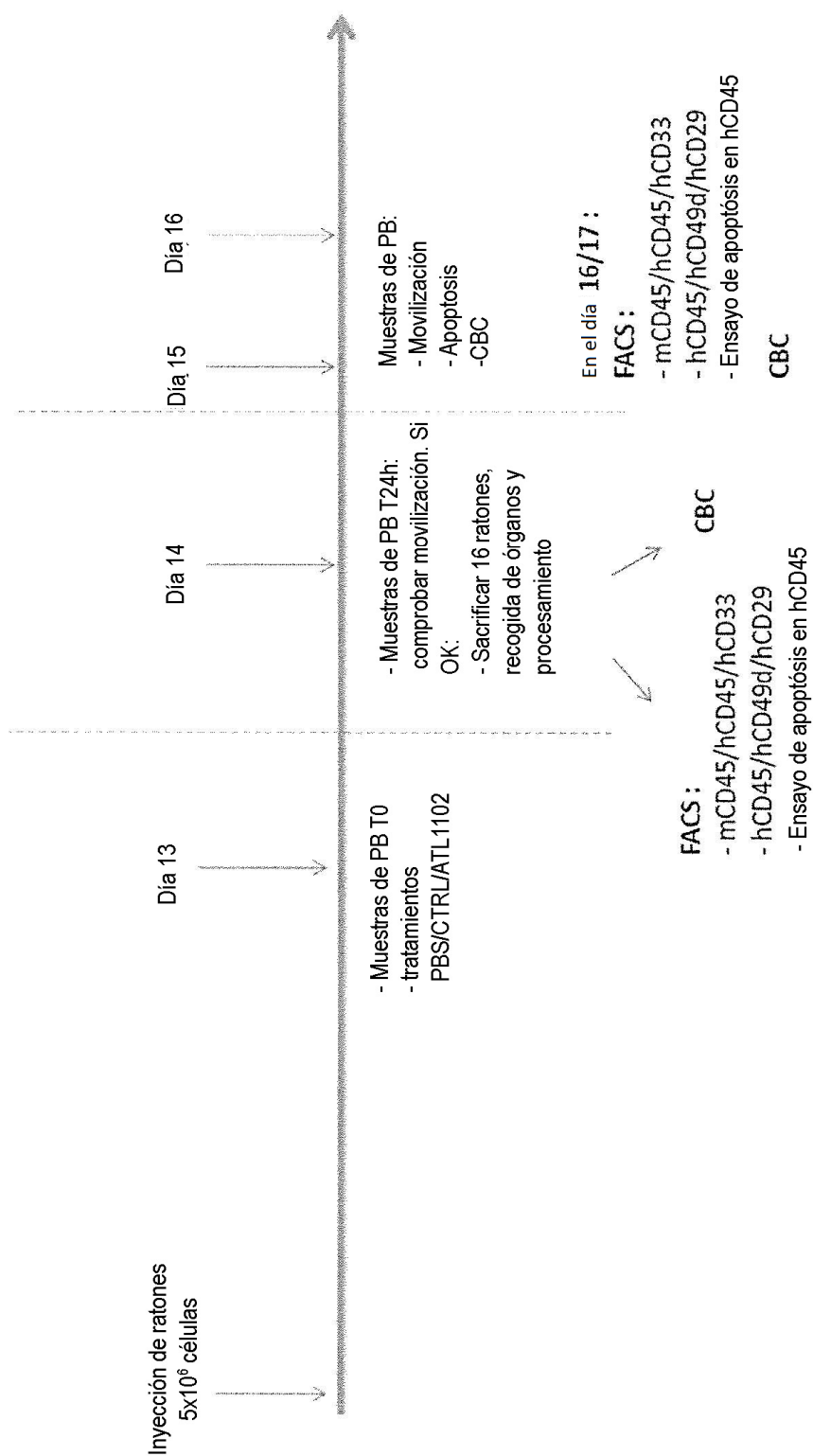


**Figura 5**

**B**

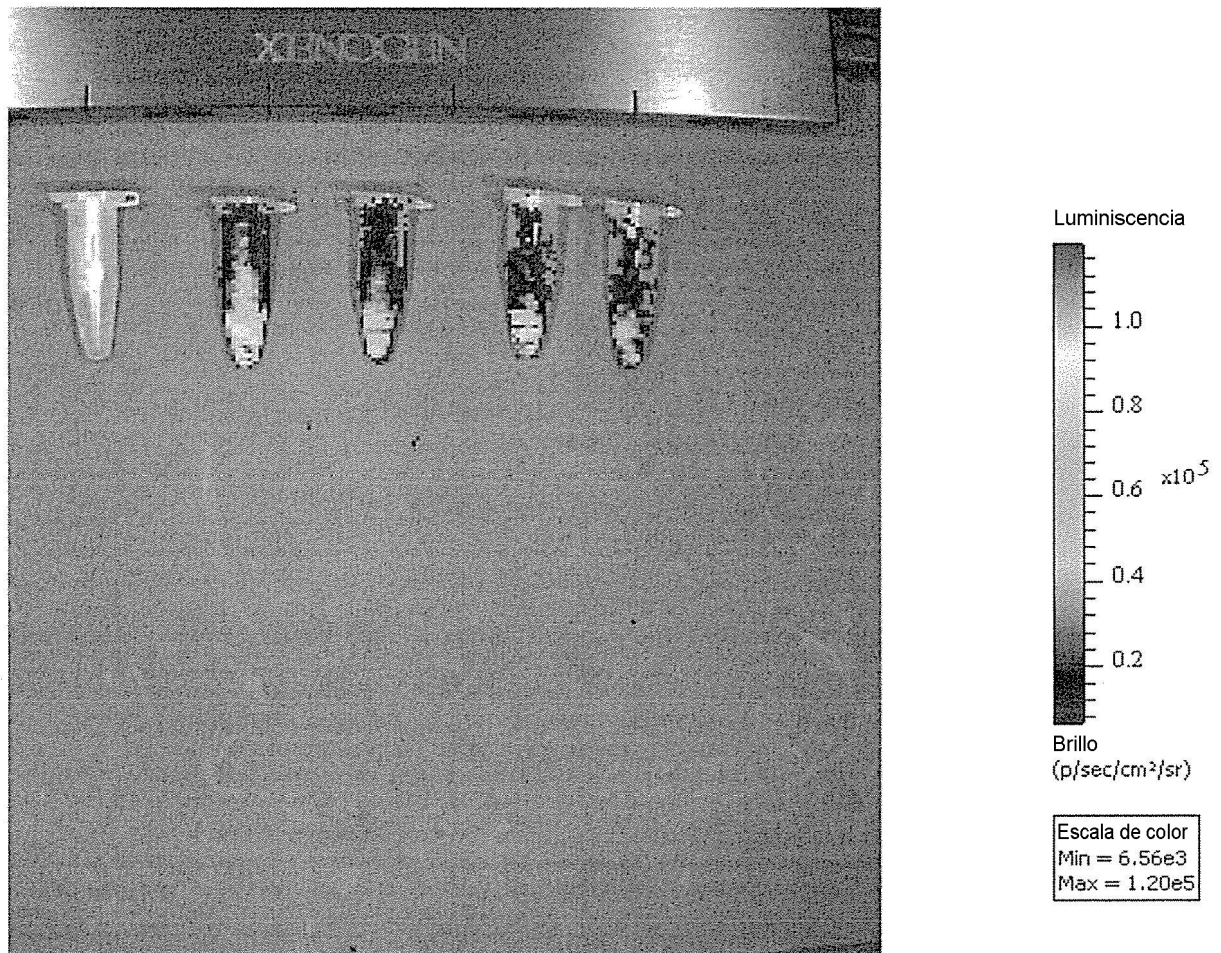


**Figura 5 continuación**



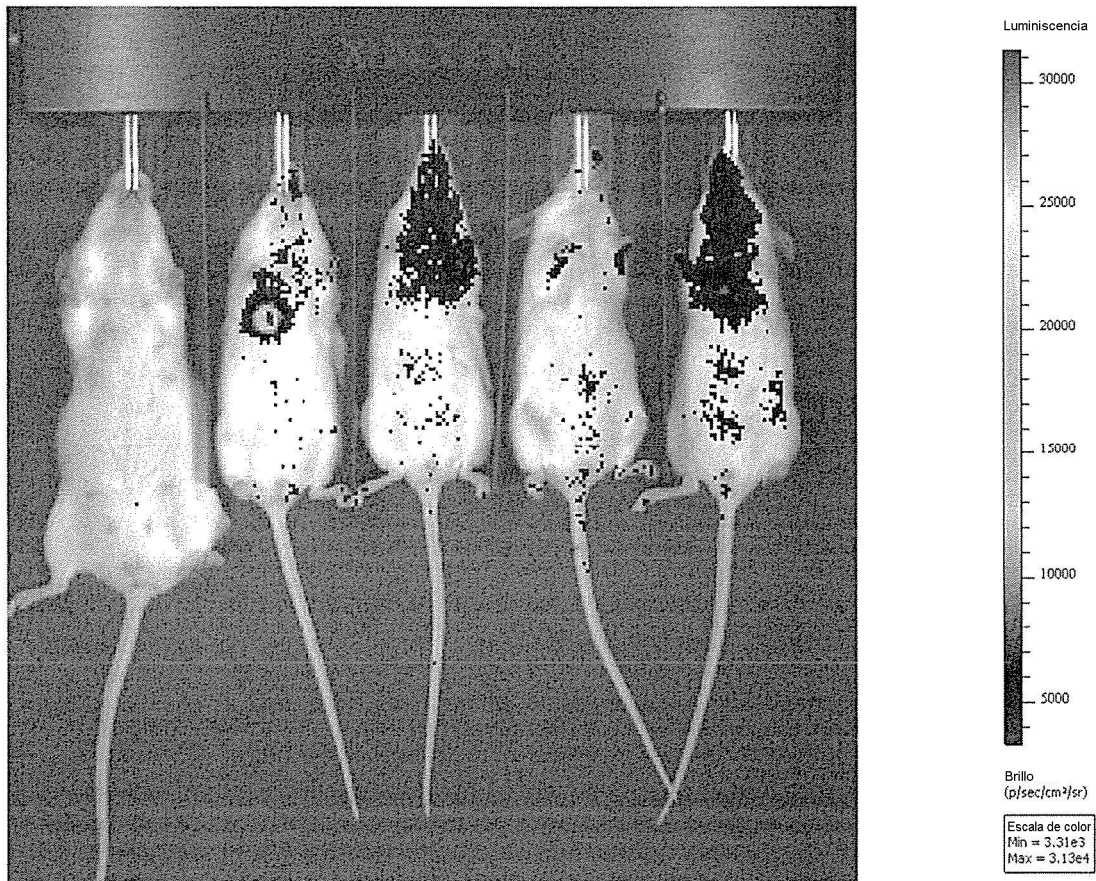
**Figura 6**

A



**Figura 7**

B



**Figura 7 continuación**