



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 320 315**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01202811 .4**
96 Fecha de presentación : **07.02.1995**
97 Número de publicación de la solicitud: **1167377**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2002**

54 Título: **Oligonucleótidos inmunoestimuladores.**

30 Prioridad: **15.07.1994 US 276358**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.05.2009

73 Titular/es: **University of Iowa Research Foundation
2660 University Capitol Centre
Iowa City, Iowa 52242-5500, US
United States of America, as represented by the
Secretary, Department of Health and Human
Services y
Coley Pharmaceutical Group, Inc.**

72 Inventor/es: **Krieg, Arthur, M.;
Klinman, Dennis y
Steinberg, Alfred D.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 320 315 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

Oligonucleótidos inmunoestimuladores.

5 **Apoyo gubernamental**

El trabajo que ha producido esta invención fue apoyado en parte por el National Institute of Health Concesión N° R29-AR42556-01. El gobierno de los EE.UU. puede tener por tanto ciertos derechos en la invención.

10 **Fundamento de la invención**

ADN se une a membrana celular y se internaliza

En los años 70, varios investigadores informaron de la unión de ADN de alto peso molecular a membranas celulares (Lerner, R.A., W. Meinke y D.A. Goldstein. 1971. "Membrane-associated DNA in the cytoplasm of diploid human lymphocytes". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68:1212; Agrawal, S.K., R.W. Wagner, P.K. McAllister y B. Rosenberg. 1975. "Cell-surface-associated nucleic acid in tumorigenic cells made visible with platinum-pyrimidine complexes by electron microscopy". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:928). En 1985, Bennett *et al.* presentaron la primera evidencia de que la unión de ADN a linfocitos es similar a una interacción ligando receptor: la unión es saturable, competitiva y conduce a endocitosis y degradación de ADN (Bennett, R.M., G.T. Gabor y M.M. Merritt. 1985. "DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor-mediated association, internalization, and degradation of DNA". *J. Clin. Invest.* 76:2182). Al igual que el ADN, los oligodesoxirribonucleótidos (ODNs) son capaces de entrar en células de una manera saturable, independiente de la secuencia y dependiente de la temperatura y la energía (examinado en Jaroszewski, J.W. y J.S. Cohen. 1991. "Cellular uptake of antisense oligodeoxynucleotides". *Advanced Drug Delivery Reviews* 6:235; Akhtar, S., Y. Shoji y R.L. Juliano. 1992. "Pharmaceutical aspects of the biological stability and membrane transport characteristics of antisense oligonucleotides". En: *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA y DNA*. R.P. Erickson y J.G. Izant, eds. Raven Press Ltd. Nueva York, págs. 133; y Zhao, Q., T. Waldschmidt, E. Fisher, C.J. Herrera y A.M. Krieg, 1994. "Stage specific oligonucleotide uptake in murine bone marrow B cell precursors". *Blood*, 84:3660). No se ha clonado todavía un receptor para absorción de ADN u ODN, y no está claro aún si la unión de ODN y la absorción celular tienen lugar a través del mismo mecanismo o uno diferente del de ADN de alto peso molecular.

Se ha mostrado que la absorción de ODN de linfocitos está regulada por activación celular. Las células del bazo estimuladas con el mitógeno de células B LPS ha aumentado drásticamente la absorción de ODN en la población de células B, mientras que las células del bazo tratadas con el mitógeno de células T Con A mostraron una absorción de ODN aumentada por células T pero no B (Krieg, A.M., F. Gmelig-Meyling, M.F. Gourley, W.J. Kisch, L.A. Chrisey y A.D. Steinberg. 1991. "Uptake of oligodeoxyribonucleotides by lymphoid cells is heterogeneous and inducible". *Antisense Research and Development* 1:161).

40 *Efectos inmunes de ácidos nucleicos*

Se han evaluado extensamente varios polinucleótidos como modificadores de la respuesta biológica. Quizás el mejor ejemplo es poli(I,C), que es un inductor eficaz de la producción de IFN así como un activador de macrófagos e inductor de la actividad de NK (Talmadge, J.E., J. Adams, H. Phillips, M. Collins, B. Lenz, M. Schneider, E. Schlick, R. Ruffmann, R.H. Wiltrout y M.A. Chirigos. 1985. "Immunomodulatory effects in mice of polynosinic-polycytidylic acid complexed with poly-L-lysine and carboxymethylcellulose". *Cancer Res.* 45:1058; Wiltrout, R.H., R.R. Salup, T.A. Twilley y J.E. Talmadge. 1985. "Immunomodulation of natural killer activity by polyribonucleotides". *J. Biol. Resp. Mod.* 4:512; Krown, S.E. 1986. "Interferons and interferon inducers in cancer treatment". *Sem. Oncol.* 13:207; y Ewel, C.H., S.J. Urba, W.C. Kopp, J.W. Smith II, R.G. Steis, J.L. Rossio, D.L. Longo, M.J. Jones, W.G. Alvord, C.M. Pinsky, J.M. Beveridge, K.L. McNitt y S.P. Creekmore. 1992. "Polynosinic-polycytidylic acid complexed with poly-L-lysine and carboxymethylcellulose in combination with interleukin 2 in patients with cancer: clinical and immunological effects". *Canc. Res.* 52:3005). Parece que esta activación de NK de ratón puede ser debida únicamente a inducción de la secreción de IFN β (Ishikawa, R. y C.A. Biron. 1993. "IFN induction and associated changes in splenic leukocyte distribution". *J. Immunol.* 150:3713). Esta activación fue específica para el azúcar ribosa porque la desoxirribosa fue ineficaz. Su eficaz actividad antitumores *in vitro* condujo a varias pruebas clínicas usando poli(I,C) complejo con poli-L-lisina y carboximetilcelulosa (para reducir la degradación por ARNsA) (Talmadge, J.E. *et al.*, 1985, citado antes; Wiltrout, R.H. *et al.*, 1985, citado antes); Krown, S.E., 1986, citado antes); y Ewel, C.H. *et al.*, 1992, citado antes). Desgraciadamente, los efectos secundarios tóxicos han impedido así mucho a poli(I,C) convertirse en un agente terapéutico útil.

Los ribonucleótidos de guanina sustituidos en posición C8 con un grupo bromo o tiol son mitógenos de células B y pueden sustituir a "factores de diferenciación de células B" (Feldbush, T.L. y Z.K. Ballas. 1985. "Lymphokine-like activity of 8-mercaptopguanosine: induction of T and B cell differentiation". *J. Immunol.* 134:3204; y Goodman, M.G. 1986. "Mechanism of synergy between T cell signals and C8-substituted guanine nucleosides in humoral immunity: B lymphotropic cytokines induce responsiveness to 8-mercaptopguanosine". *J. Immunol.* 136:3335). Las 8-mercaptopguanosina y 8-bromoguanosina también pueden sustituir el requisito de citoquina para la generación de CTL restringida por MHC (Feldbush, T.L., 1985, citado antes), aumentar la actividad de NK de ratón (Koo, G.C., M.E. Jewell, C.L. Manyak, N.H. Sigal y L.S. Wicker, 1988. "Activation of murine natural killer cells and macrophages by 8-bromogua-

nosine". *J. Immunol.* 140:3249) y tener sinergia con IL-2 para inducir la generación de LAK de ratón (Thompson, R.A. y Z.K. Ballas. 1990. "Lymphokine-activated killer (LAK) cells. V. 8-Mercaptoguanosine as an IL-2-sparing agent in LAK generation". *J. Immunol.* 145:3524). Las actividades de aumento de NK y LAK de estas guanosinas C8-sustituídas parecen ser debidas a su inducción de IFN (Thompson, R.A. *et al.* 1990, citado antes). Recientemente, se encontró que una timidina 5'-trifosforilada producida por una micobacteria era mitogénica para un subgrupo de células $\gamma\delta$ T humanas (Constant, P., F. Davodeau, M.-A. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Bonneville y J.-J. Fournie. 1994. "Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands" *Science* 264:267). Este informe indicaba la posibilidad de que el sistema inmune pueda tener formas evolucionadas para responder preferentemente a ácidos nucleicos microbianos.

Varias observaciones sugieren que ciertas estructuras de ADN pueden tener también el potencial de activar linfocitos. Por ejemplo, Bell *et al.* informaban de que complejos de proteína-ADN nucleosómicos (pero no ADN desprovisto) en sobrenadantes de células de bazo causaban proliferación de células B y secreción de inmunoglobulina (Bell, D.A., B. Morrison y P. VandenBygaert. 1990. "Immunogenic DNA-related factors". *J. Clin. Invest.* 85:1487). En otros casos, se ha informado de que ADN desprovisto tiene efectos inmunes. Por ejemplo, Messina *et al.* han informado recientemente de que fragmentos de 260 a 800 pb de poli (dG) \cdot (dC) y poli (dG-dC) eran mitogénicos para células B (Messina, J.P., G.S. Gilkeson y D.S. Pisetsky. 1993. "The influence of DNA structure on the *in vitro* stimulation of murine lymphocytes by natural and synthetic polynucleotide antigens". *Cell. Immunol.* 147:148). Tokunaga *et al.* han informado de que dG-dC induce actividad de γ -IFN y NK (Tokunaga, S. Yamamoto y K. Namba. 1988. "A synthetic single-stranded DNA, poly(dG,dC), induces interferon- α/β and - γ , augments natural killer activity, and suppresses tumor growth" *Jpn. J. Cancer Res.* 79:682). Aparte de tales secuencias de homopolímeros artificiales, Pisetsky *et al.* informaban de que ADN de mamífero puro no tiene efectos inmunes detectables, pero que ADN de ciertas bacterias induce activación de células B y secreción de inmunoglobulina (Messina, J.P., G.S. Gilkeson y D.S. Pisetsky. 1991. "Stimulation of *in vitro* murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA". *J. Immunol.* 147:1759). Suponiendo que estos datos no resultan de algún contaminante inusual, estos estudios sugerían que una estructura particular u otra característica de ADN bacteriano lo hace capaz de provocar la activación de células B. Investigaciones de secuencias de ADN micobacteriano han demostrado que ODN que contiene ciertas secuencias palíndromo pueden activar células NK (Yamamoto, S., T. Yamamoto, T. Kataoka, E. Kuramoto, O. Yano y T. Tokunaga. 1992. "Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce INF and augment INF-mediated natural killer activity". *J. Immunol.* 148:4072; Kuramoto, E., O. Yano, Y. Kimura, M. Baba, T. Makino, S. Yamamoto, T. Yamamoto, T. Kataoka y T. Tokunaga. 1992. "Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation". *Jpn. J. Cancer Res.* 83:1128; y documento EP0 468 520 A2).

Se ha informado de que varios ODN modificados con fósforotioato inducen estimulación de células B *in vitro* o *in vivo* (Tanaka, T., C.C. Chu y W.E. Paul. 1992. "An antisense oligonucleotide complementary to a sequence in Iy2b increases γ 2b germline transcripts, stimulates B cell DNA synthesis, and inhibits immunoglobulin secretion". *J. Exp. Med.* 175:597; Branda, R.F., A.L. Moore, L. Mathews, J.J. McCormack y G. Zon. 1993. "Immune stimulation by an antisense oligomer complementary to the rev gene of HIV-1". *Biochem. Pharmacol.* 45:2037; McIntyre, K.W., K. Lombard-Gillooly, J.R. Perez, C. Kunsch, U.M. Sarmiento, J.D. Larigan, K.T. Landreth y R. Narayanan. 1993. "A sense phosphorothioate oligonucleotide directed to the inhibition codon of transcription factor NF- κ β T65 causes sequence-specific immune stimulation". *Antisense Res. Develop.* 3:309; y Pisetsky, D.S. y C.F. Reich. 1993. "Stimulation of murine lymphocyte proliferation by a phosphorothioate oligonucleotide with antisense activity for herpes simplex virus". *Life Sciences* 54:101). Estos informes no sugieren un motivo estructural común o elemento de secuencia en estos ODN que puedan explicar sus efectos.

Se han demostrado los efectos beneficiosos de fósforotioato o modificaciones fósforotioato-fosfodiéster o metilfosfonato-fosfodiéster terminales en la unión y absorción superficial de células de bazo de ratón usando oligonucleótidos conjugados a fluoresceína (FITC) (Zhao *et al.* 1993 "Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester phosphorothioate and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides" *Antisense Res. Dev.* 3:53-66).

La familia CREB/ATF de factores de transcripción y su papel en replicación

La proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (CREB) y el factor de transcripción activante (ATF) o familia CREB/ATF de factores de transcripción es una clase que se expresa omnipresente de factores de transcripción de los que se han clonado hasta ahora 11 miembros (examinado en de Groot, R.P. y P. Sassone-Corsi: "Hormonal control of gene expression: Multiplicity and versatility of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive nuclear regulators", *Mol. Endocrin.* 7:145, 1993; Lee, K.A.W. y N. Masson: "Transcriptional regulation by CREB and its relatives". *Biochim., Biophys. Acta* 1174:221, 1993). Todos pertenecen a la clase de proteínas de región básica/cremallera de leucina (bZip). Todas las células parecen expresar una o más proteínas CREB/ATF, pero los miembros expresados y la regulación del empalme de mRNA parecen ser específicos para tejidos. El empalme diferencial de dominios de activación puede determinar si una proteína CREB/ATF particular será un inhibidor o activador de transcripción. Muchas proteínas CREB/ATF activan transcripción vírica, pero algunas variantes de empalme que carecen del dominio de activación son inhibitoras. Las proteínas CREB/ATF pueden unirse a ADN como homo- o heterodímeros a través del elemento de respuesta de cAMP, el CRE, la forma de consenso de la que es la secuencia no metilada TGACGTC (se suprime la unión si el CpG está metilado) (Iguchi-Ariga, S.M.M. y W. Schaffner: "CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation". *Genes & Develop.* 3:612, 1989).

La activación transcripcional del CRE aumenta durante la activación de células B (Xie, H., T.C. Chiles y T.L. Rothstein: "Induction of CREB activity via the surface Ig receptor of B cells". *J. Immunol.* 151:880, 1993). Las proteínas CREB/ATF parecen regular la expresión de múltiples genes a través del CRE, incluyendo genes importantes inmunológicamente tales como fos, jun B, Rb-1, IL-6, IL-1 (Tsukada, J., K. Saito, W.R. Waterman, A.C. Webb y P.E. Auron: "Transcription factors NF-IL6 and CREB recognize a common essential site in the human prointerleukin 1 β gene". *Mol. Cell. Biol.* 14:7285, 1994; Gray, G.D., O.M. Hernandez, D. Hebel, M. Root, J.M. Pow-Sang y E. Wickstrom: "Antisense DNA inhibition of tumor growth induced by c-Ha-ras oncogene in nude mice". *Cancer Res.* 53:577, 1993), IFN- β (Du, W. y T. Maniatis: "An ATF/CREB binding site protein is required for virus induction of the human interferon B gene". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2150, 1992), TGF- β 1 (Asiedu, C.K., L. Scott, R.K. Assoian, M. Ehrlich: "Binding of AP-1/CREB proteins and of MDBP to contiguous sites downstream of the human TGF- β 1 gene". *Biochim. Biophys. Acta* 1219:55, 1994). TGF- β 2, MHC clase II (Cox, P.M. y C.R. Goding: "An ATF/CREB binding motif is required for aberrant constitutive expression of the MHC class II DR α promoter and activation by SV40 T-antigen". *Nucl. Acids Res.* 20:4881, 1992). E-selectina, GM-CSF, CD-8 α , el gen de la región constante del linaje germinal I α , el gen de TCR V β y el antígeno nuclear de células proliferantes (Huang, D., P.M. Shipman-Appasamy, D.J. Orten, S.H. Hinrichs y M.B. Prystowsky: "Promoter activity of the proliferating-cell nuclear antigen gene is associated with inducible CRE-binding proteins in interleukin 2-stimulated T lymphocytes". *Mol. Cell Biol.* 14:4233, 1994). Además de la activación a través del trayecto de cAMP, CREB puede mediar también en respuestas transcripcionales a cambios en la concentración de Ca⁺⁺ intracelular (Sheng, M., G. McFadden y M.E. Greenberg: "Membrane depolarization and calcium induce c-fos transcription via phosphorylation of transcription factor CREB". *Neuron* 4:571, 1990).

El papel de interacciones proteína-proteína en activación transcripcional por proteínas CREB/ATF parece ser extremadamente importante. La activación de CREB a través del trayecto de AMP cíclico requiere proteína quinasa A (PKA), que fosforila CREB³⁴¹ en ser¹³³ y le permite unirse a una proteína clonada recientemente, CBP (Kwok, R.P.S., J.R. Lundblad, J.C. Chrivia, J.P. Richards, H.P. Bachinger, R.G. Brennan, S.G.E. Roberts, M.R. Green y R.H. Goodman: "Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB". *Nature* 370:223, 1994; Arias, J., A.S. Alberts, P. Brindle, F.X. Claret, T. Smea, M. Karin, J. Feramisco y M. Montminy: "Activation of cAMP and mitogen responsive genes relies on a common nuclear factor". *Nature* 370:226, 1994; CBP interactúa a su vez con el factor de transcripción basal TFIIB causando transcripción aumentada. También se ha informado de que CREB interactúa con dTAFII 110, un factor asociado a proteína de unión de TATA cuya unión puede regular transcripción (Ferreri, K. G. Gill y M. Montminy: "The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1210, 1994). Además de estas interacciones, las proteínas CREB/ATF pueden unirse específicamente a otros múltiples factores nucleares (Hoeffler, J.P., J.W. Lustbader y C.-Y. Chen: "Identification of multiple nuclear factors that interact with cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-binding protein and activating transcription factor-2 by protein-protein interactions". *Mol. Endocrinol.* 5:256, 1991), pero el significado biológico de muchas de estas interacciones es desconocido. Se piensa normalmente que CREB se une a ADN como un homodímero o como un heterodímero con otras varias proteínas. Sorprendentemente, monómeros de CREB activan constitutivamente la transcripción (Krajewski, W. y K.A.W. Lee: "A monomeric derivative of the cellular transcription factor CREB functions as a constitutive activator". *Mol. Cell. Biol.* 14:7204, 1994).

Aparte de su papel crítico para regular la transcripción celular, se ha mostrado recientemente que proteínas CREB/ATF son subvertidas por algunos virus y retrovirus infecciosos, que las requieren para replicación vírica. Por ejemplo, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus, uno de los promotores de mamífero conocidos más fuertes, contiene once copias del CRE que son esenciales para la función de promotor (Chang, Y.-N., S. Crawford, J. Stall, D.R. Rawlins, K.-T. Jeang y G.S. Hayward: "The palindromic series I repeats in the simian cytomegalovirus major immediate.early-promoter behave as both strong basal enhancers and cyclic AMP response elements". *J. Virol.* 64:264, 1990). Al menos algunos de los efectos activantes transcripcionales de la proteína E1A de adenovirus, que induce muchos promotores, son debidos a su unión al dominio de unión de ADN de la proteína CREB/ATF, ATF-2, que media en la activación de la transcripción inducible por E1A (Liu, F. y M.R. Green: "Promoter targeting by adenovirus E1a through interaction with different cellular DNA-binding domains". *Nature* 368:520, 1994). Se ha sugerido también que E1A se une a la proteína de unión a CREB, CBP (Arany, Z., W.R. Sellers, D.M. Livingston y R. Eckner: "E1A-associated p300 and CREB-associated CBP belong to a conserved family of coactivators". *Cell* 77:799, 1994). El virus-I linfotrópico T humano (HTLV-1), el retrovirus que causa leucemia de células T humanas y paresis espástica tropical, requiere también proteínas CREB/ATF para replicación. En este caso, el retrovirus produce una proteína, Tax, que se une a proteínas CREB/ATF y las dirige desde sus lugares de unión celular normales a diferentes secuencias de ADN (flanqueadas por secuencias ricas en G y C) presentes dentro del aumentador transcripcional de HTLV (Pacac-Uccaralarkum, S., L.-J. Zhao, N. Adya, J.V. Cross, B.R. Cullen, I.M. Boros y C.-Z. Giam: "In vitro selection of DNA elements highly responsive to the human T-cell lymphotropic virus type I transcriptional activator, Tax". *Mol. Cell. Biol.* 14:456, 1994; Adya, N., L.-J. Zhao, W. Huang, I. Boros y C.-Z. Giam: "Expansion of CREB's DNA recognition specificity by Tax results from interaction with Ala-Ala-Arg at positions 282-284 near the conserved DNA-binding domain of CREB". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5642, 1994).

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo de que ciertos oligonucleótidos que contienen dinucleótidos de citosina-guanina (CpG) no metilados activan linfocitos como se evidencia por datos *in vitro* e *in vivo*. En base a este hallazgo, la invención presenta, en un aspecto, nuevas composiciones de oligonucleótidos inmunoestimuladores.

ES 2 320 315 T3

La presente invención proporciona un oligonucleótido inmunoestimulador sintético, de uso como medicamento, que contiene al menos un dinucleótido CpG no metilado, en el que el oligonucleótido es un fosfodiéster, no contiene un palíndromo de seis bases e incluye más de ocho pero no más de 100 nucleótidos.

5 En unas realizaciones, un *oligonucleótido inmunoestimulador* es sintético, tiene un tamaño entre 2 y 100 pares de bases y contiene un motivo CpG mitogénico de consenso representado por la fórmula



10

en la que C y G son no metilados, X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son nucleótidos y no está presente una secuencia de trinucleótido GCG en o cerca de los términos 5' y 3'.

15

Para facilitar la absorción en células, los oligonucleótidos inmunoestimuladores que contienen CpG están preferiblemente en el intervalo de 8 a 40 pares de bases de tamaño. Puede obtenerse una inmunoestimulación prolongada usando oligonucleótidos estabilizados, particularmente oligonucleótidos estabilizados con fósforotioato. Se ha observado una actividad inmunoestimuladora aumentada cuando X_1X_2 es el dinucleótido GpA y/o X_3X_4 es el dinucleótido es más preferiblemente TpC o también TpT. Se ha observado una actividad inmunoestimuladora aumentada adicional cuando el motivo de consenso $X_1X_2CGX_3X_4$ está precedido en el extremo 5' por un T.

20

25

En un segundo aspecto, la invención presenta métodos útiles, que se basan en la actividad inmunoestimuladora de los oligonucleótidos. Por ejemplo, pueden obtenerse linfocitos de un sujeto y estimularse *ex vivo* por contacto con un oligonucleótido apropiado; o un oligonucleótido que contenga CpG no metilado puede administrarse a un sujeto para facilitar activación *in vivo* de linfocitos de un sujeto. Los linfocitos activados, estimulados por los métodos descritos aquí (por ejemplo, *ex vivo* o *in vivo*), pueden aumentar la respuesta inmune de un sujeto. Los oligonucleótidos inmunoestimuladores pueden usarse por tanto para tratar, prevenir o mejorar una deficiencia del sistema inmune (por ejemplo, un tumor o cáncer o una infección vírica, fúngica, bacteriana o parasitaria en un sujeto). Además, pueden administrarse también oligonucleótidos inmunoestimuladores como coadyuvante de vacuna, para estimular la respuesta de un sujeto a una vacuna. Además, la capacidad de células inmunoestimuladoras para inducir células leucémicas a entrar en el ciclo de células, sugiere una utilidad para tratar leucemia aumentando la sensibilidad de células de leucemia crónica y administrando después quimioterapia ablativa convencional.

30

35

Esta revelación se refiere también a *oligonucleótidos neutros* (es decir, oligonucleótido que no contiene un CpG no metilado o que contiene un dinucleótido CpG metilado). Un oligonucleótido neutralizante puede ser complementario de una secuencia inmunoestimuladora, pero contiene una secuencia de dinucleótido CpG metilado en lugar de no metilado y puede competir por tanto por la unión con oligonucleótidos que contienen CpG no metilado. La metilación puede tener lugar en uno o más de los cuatro carbonos y dos nitrógenos que comprenden el anillo de seis miembros de citosina o en uno o más de los cinco carbonos y cuatro nitrógenos que comprenden el doble anillo de nueve miembros de guanina. 5' metil citosina es un CpG metilado.

40

45

Esta revelación se refiere también a métodos que usan los oligonucleótidos neutros. Por ejemplo, la administración *in vivo* de oligonucleótidos neutros resultaría útil para tratar enfermedades tales como lupus eritematoso sistémico, sepsis y enfermedades autoinmunes, que se causan o exacerban por la presencia de dímeros CpG no metilados en un sujeto. Además, los oligonucleótidos o sondas de oligonucleótidos antisentido que contienen CpG de metilación no iniciarían una reacción inmune cuando se administraran a un sujeto *in vivo*, y serían por tanto más seguros que los correspondientes oligonucleótidos no metilados.

50

Esta revelación se refiere también a *oligonucleótidos inmunoinhibidores*, que son capaces de interferir con la actividad de factores de transcripción víricos o celulares. Los oligonucleótidos inmunoinhibidores puede tener de 2 a 100 pares de bases de tamaño y contener un motivo CpG inmunoinhibidor de consenso representado por la fórmula:



55

en la que X = un nucleótido y n = en el intervalo 0-50. X puede ser una pirimidina.

60

Para facilitar la absorción en células, los oligonucleótidos inmunoinhibidores pueden estar en el intervalo de 8 a 40 pares de bases de tamaño. Pueden obtenerse efectos biológicos prolongados usando oligonucleótidos estabilizados, particularmente oligonucleótidos estabilizados con fósforotioato.

65

Esta revelación se refiere también a usos para oligonucleótidos inmunoinhibidores. Los oligonucleótidos inmunoinhibidores tienen actividad antivírica, independiente de cualquier efecto antisentido debido a complementariedad entre el oligonucleótido y la secuencia vírica fijada como objetivo.

Otros aspectos y ventajas de la invención se harán más evidentes a partir de las siguientes descripción detallada y reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención**Definiciones**

5 Según se usan aquí, los siguientes términos y frases tendrán los significados indicados a continuación:

Un “oligonucleótido” u “oligo” significará nucleótidos múltiples (es decir, moléculas que comprenden un azúcar (por ejemplo, ribosa o desoxirribosa) enlazado a un grupo fosfato y a una base orgánica intercambiable, que es una pirimidina sustituida (por ejemplo, citosina (C), timina (T) o uracilo (U)) o una purina sustituida (por ejemplo, adenina (A) o guanina (G)). El término “oligonucleótido” según se usa aquí se refiere a oligorribonucleótidos (ORNs) y oligodesoxirribonucleótidos (ODNs). El término “oligonucleótido” incluirá también oligonucleósidos (es decir, un oligonucleótido menos el fosfato) y cualquier otra base orgánica que contenga polímero. Pueden obtenerse oligonucleótidos de fuentes de ácidos nucleicos existentes (por ejemplo, genómicas o cADN), pero son preferiblemente sintéticos (por ejemplo, producidos por síntesis de oligonucleótidos).

Un “oligonucleótido estabilizado” significará un oligonucleótido que sea relativamente resistente a degradación *in vivo* (por ejemplo, mediante una exo- o endo-nucleasa). Los oligonucleótidos estabilizados preferidos de la presente invención tienen una cadena principal de fosfato modificada. Los oligonucleótidos especialmente preferidos tienen una cadena principal de fosfato modificada con fósforotioato (es decir, al menos uno de los oxígenos de fosfato está sustituido por azufre). Otros oligonucleótidos estabilizados incluyen: análogos de ADN no iónicos, tales como alquil y aril-fosfonatos (en los que el oxígeno de fosfonato cargado está sustituido con un grupo alquilo o arilo), fosfodiéster y alquilfosfotriésteres, en los que el resto de oxígeno cargado está alquildo. Se ha mostrado también que oligonucleótidos que contienen un diol, tal como tetraetilenglicol o hexaetilenglicol, en alguno o ambos términos son sustancialmente resistentes a degradación por nucleasa.

Un “oligonucleótido inmunoestimulador”, “oligonucleótido que contiene CpG inmunoestimulador” o “CpG ODN” se refiere a un oligonucleótido que contiene una secuencia de dinucleótido de citosina, guanina y estimula (por ejemplo, tiene un efecto mitogénico) en linfocitos de vertebrados. Algunos oligonucleótidos inmunoestimuladores preferidos tienen un tamaño de 2 a 100 pares de bases y contienen un motivo CpG mitogénico de consenso representado por la fórmula:



35 en la que C y G son no metilados, X_1 , X_2 , X_3 y X_4 son nucleótidos y no está presente una secuencia de trinucleótido GCG en o cerca de los términos 5' y 3'.

Preferiblemente, los oligonucleótidos inmunoestimuladores varían de tamaño entre 8 y 40 pares de bases. Además, los oligonucleótidos inmunoestimuladores son preferiblemente oligonucleótidos estabilizados, son particularmente preferidos oligonucleótidos estabilizados con fósforotioato. En una realización preferida, X_1X_2 es el dinucleótido GpA. En otra realización preferida, X_3X_4 es preferiblemente el dinucleótido TpC o también TpT. En una realización particularmente preferida, el motivo de consenso $X_1X_2CGX_3X_4$ está precedido en el extremo 5' por un T. Son secuencias de consenso particularmente preferidas TGACGTT o TGACGTC.

45 Un “oligonucleótido neutro” se refiere a un oligonucleótido que no contiene un CpG no metilado o un oligonucleótido que contiene un dinucleótido CpG metilado. Un oligonucleótido neutralizante puede ser complementario de una secuencia inmunoestimuladora, pero contiene una secuencia de dinucleótido CpG metilado en lugar de no metilado y puede competir por tanto por la unión con oligonucleótidos que contienen CpG no metilado. La metilación puede tener lugar en uno o más de los cuatro carbonos y dos nitrógenos que comprenden el anillo de seis miembros de citosina o en uno o más de los cinco carbonos y cuatro nitrógenos que comprenden el doble anillo de nueve miembros de guanina. 5' metil citosina es un CpG metilado.

Un “oligonucleótido inmunoinhibidor” u “oligonucleótido que contiene CpG inmunoinhibidor” es un oligonucleótido que es capaz de interferir con la actividad de factores de transcripción vírica o celular (apoyo en sumario de la invención, página 9). Los oligonucleótidos inmunoinhibidores pueden tener entre 2 y 100 pares de bases de tamaño y pueden estar representados por la fórmula:



60 en la que X = un nucleótido y n = en el intervalo 0-50. X puede ser una pirimidina.

Para facilitar la absorción en células, los oligonucleótidos inmunoinhibidores pueden estar en el intervalo de 8 a 40 pares de bases de tamaño. Puede obtenerse inmunoestimulación prolongada usando oligonucleótidos estabilizados, particularmente estabilizados con fósforotioato.

ES 2 320 315 T3

Una “secuencia palindrómica” significará una repetición invertida (es decir, una secuencia tal como ABCDEED’C’ B’A’, en la que A y A’ son bases capaces de formar los pares de bases de Watson-Crick usuales). *In vivo*, tales secuencias pueden formar estructuras de doble cadena.

5 Un “complejo de entrega de oligonucleótido” significará un oligonucleótido asociado con (por ejemplo, unido iónica o covalentemente a; o encapsulado dentro de) un medio de fijación de objetivo (por ejemplo, una molécula que produce unión de mayor afinidad a las superficies de una célula objetivo (por ejemplo, una célula B y una célula destructora natural (NK)) y/o absorción celular aumentada por células objetivo). Los ejemplos de complejos de entrega de oligonucleótidos incluyen oligonucleótidos asociados con: un esteroide (por ejemplo, colesterol), un lípido
10 (por ejemplo, un lípido catiónico, virosoma o liposoma), o un agente de unión específico para una célula objetivo (por ejemplo, un ligando reconocido por un receptor específico de la célula objetivo). Los complejos preferidos deben ser suficientemente estables *in vivo* para impedir desacoplamiento significativo antes de internalización por la célula objetivo. No obstante, el complejo debe ser divisible en condiciones apropiadas dentro de la célula de manera que se libere el oligonucleótido en forma funcional.

15 Una “deficiencia del sistema inmune” significará una enfermedad o trastorno en el que el sistema inmune del sujeto no funciona a capacidad normal o en el que sería útil aumentar la respuesta inmune de un sujeto, por ejemplo, para eliminar un tumor o cáncer (por ejemplo, tumores del cerebro, pulmón (por ejemplo, célula pequeña y célula no pequeña), ovario, pecho, próstata, colon, así como otros carcinomas y sarcomas) o una infección vírica (por ejemplo, HIV, herpes), fúngica (por ejemplo, *Candida sp.*), bacteriana o parasitaria (por ejemplo, Leishmania, Toxoplasma) en un sujeto.

Una “enfermedad asociada con activación del sistema inmune” significará una enfermedad o estado causado o exacerbado por activación del sistema inmune del sujeto. Los ejemplos incluyen lupus eritematoso sistémico, sepsis y
20 enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide y esclerosis múltiple.

Un “sujeto” significará un ser humano o animal vertebrado, incluyendo un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pollo, mono, rata, ratón, etc.

30 *Ciertos oligos que contienen CpG no metilado tienen actividad estimuladora de células B como se muestra in vitro e in vivo*

En el transcurso de la investigación de los efectos estimuladores de linfocitos de dos oligonucleótidos antisentido específicos para secuencias retrovíricas endógenas, usando métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2 adjuntos, se
35 encontró sorprendentemente que dos de veinticuatro “testigos” (incluyendo diversos testigos mezclados, sentido y desadaptados para un panel de ODN “antisentido”) mediaban también en la activación de células B y secreción de IgM, mientras que los otros “testigos” no tenían efecto.

Dos observaciones sugirieron que el mecanismo de esta activación de células B por el ODN “testigo” puede no implicar efectos antisentido, 1) una comparación de secuencias de ADN de vertebrados listadas en GenBank no mostraba mayor homología que la observada con ODN no estimulador y 2) los dos testigos no mostraban hibridación a manchas de Northern con 10 μ g de poli A+ARN de bazo. La resíntesis de estos ODN en un sintetizador diferente o la purificación extensiva por electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida a alta presión dieron estimulación idéntica, eliminando la posibilidad de una impureza. Se vio una estimulación similar usando células B de ratones
40 C3H/HeJ, eliminando la posibilidad de que pudiera contar en los resultados la contaminación por lipopolisacárido (LPS).

El hecho de que dos ODN “testigo” causaran activación de células B similar a la de los dos ODN “antisentido” aumentó la posibilidad de que los cuatro ODN fueran estimulantes de células B a través de algún mecanismo no-antisentido que implicara un motivo de secuencia que estuviera ausente en los otros ODN testigo no estimuladores. Comparando estas secuencias, se descubrió que los cuatro ODN estimuladores contenían dinucleótidos de ODN que
50 estaban en un contexto de secuencia diferente del testigo no estimulador.

Para determinar si el motivo CpG presente en el ODN estimulador era responsable de la estimulación observada, se sintetizaron más de 300 ODN de longitud variable de 5 a 42 bases que contenían o no dinucleótidos CpG metilados o sin metilar en diversos contextos de secuencia. Estos ODNs, incluyendo los dos “testigos” originales (ODN 1 y 2) y dos sintetizados originalmente como “antisentido” (ODN 3D y 3M); Krieg, A.M. *J. Immunol.* 143:2448 (1989)), se examinaron después por los efectos *in vitro* en células de bazo (se listan secuencias representativas en la Tabla 1). Varios ODN que contenían dinucleótidos CpG indujeron activación de células B y secreción de IgM; la magnitud de esta estimulación podía aumentarse típicamente añadiendo más dinucleótidos CpG (Tabla 1; compárese ODN 2 a 2a o 3D a 3Da y 3Db). La estimulación no parecía resultar de un mecanismo antisentido o impureza. El ODN no ocasionaba activación detectable de $\gamma\delta$ u otras poblaciones de células T.

Las secuencias de ODN mitogénicas se hicieron uniformemente no estimuladoras si se mutaba el dinucleótido CpG (Tabla 1; compárese ODN1 a 1a; 3D a 3Dc; 3M a 3Ma; y 4 a 4a) o si se sustituía la citosina del dinucleótido CpG por 5-metilcitosina (Tabla 1; ODN 1b, 2b, 2c, 3Dd y 3Mb). Como contraste, la metilación de otras citosinas no redujo la actividad de ODN (ODN 1c, 2d, 3De y 3Mc). Estos datos confirmaron que un motivo CpG es el elemento esencial presente en ODN que activa células B.

ES 2 320 315 T3

5 En el transcurso de estos estudios, resultó claro que las bases que flanquean el dinucleótido CpG jugaban un papel importante para determinar la activación de células B inducidas por un ODN. Se determinó que el motivo estimulador óptimo consistía en un CpG flanqueado por dos purinas 5' (preferiblemente un dinucleótido GpA) y dos pirimidinas 3' (preferiblemente un dinucleótido TpT o TpC). Las mutaciones de ODN para llevar el motivo CpG más próximo a este ideal mejoraron la estimulación (por ejemplo, compárese ODN 2 a 2e; 3M a 3Md), mientras que mutaciones que alteraban el motivo reducían la estimulación (por ejemplo, compárese ODN 3D a 3Df; 4 a 4b, 4c y 4d). Por otra parte, mutaciones fuera del motivo CpG no reducían la estimulación (por ejemplo, compárese ODN 1 a 1d; 3D a 3Dg; 3M a 3Me).

10 De los ensayados, los ODNs más cortos de 8 bases eran no estimuladores (por ejemplo, ODN 4e). Entre los cuarenta y ocho ODN de 8 bases ensayados, la secuencia más estimuladora identificada fue TCAACGTT (ODN 4) que contiene el "palíndrome" autocomplementario AACGTT. Para optimizar adicionalmente este motivo, se encontró que ODN que contiene Gs en ambos extremos mostraba una estimulación acrecentada, particularmente si el ODN se hacía resistente a nucleasa por modificación con fósforotioato de los enlaces internucleótidos terminales. El ODN 15 1585 (5' GGGGTCAACGTTTCAGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 1)), en el que los dos primeros y los cinco últimos enlaces internucleótidos están modificados con fósforotioato causaron una media de aumento de 25,4 veces en proliferación de células de bazo de ratón, en comparación con una media de aumento de 3,2 veces en la proliferación inducida por ODN 1638, que tenía la misma secuencia que ODN 1585 excepto que los 10 Gs en los dos extremos están sustituidos por 10 As. El efecto de los extremos ricos en G es *cis*; la adición a las células de un ODN con extremos poli G pero 20 no motivo CpG junto con 1638 no dio proliferación aumentada.

Otro ODN octámero que contenía un palíndrome de 6 bases con un dinucleótido TpC en el extremo 5' también era activo si estaba próximo al motivo óptimo (por ejemplo, ODN 4b, 4c). Otros dinucleótidos en el extremo 5' dieron estimulación reducida (por ejemplo, ODN 4f; se ensayaron los dieciséis dinucleótidos posibles). La presencia de un 25 dinucleótido 3' era insuficiente para compensar la falta de un dinucleótido 5' (por ejemplo, ODN 4 g). La rotura del palíndrome eliminó la estimulación en el ODN octámero (por ejemplo, ODN 4 h), pero no se requerían palíndromes en ODN más largos.

30

(Tabla pasa a página siguiente)

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 320 315 T3

TABLA 1

Estimulación por oligonucleótidos de células B

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

ODN	Secuencia (5' a 3')	Índice de estimulación	
		³ H uridina	Producción de IgM
1 (SEQ ID NO: 2)	ACTGACCTTCGCTTC	6,1 ± 0,8	17,9 ± 3,6
1a (SEQ ID NO: 3)T.....	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,5
1b (SEQ ID NO: 4)S.....	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,0
1c (SEQ ID NO: 5)S..	10,3 ± 4,4	9,5 ± 1,8
1d (SEQ ID NO: 6)	..AT.....GAC..	13,0 ± 2,3	18,3 ± 7,5
2 (SEQ ID NO: 7)	ATGAGAGCTTCGCTTC	2,9 ± 0,2	13,6 ± 2,0
2a (SEQ ID NO: 8)	..G..CTC..A.....	7,7 ± 0,8	24,2 ± 3,2
2b (SEQ ID NO: 9)	..S..CTC..M..S.....	1,6 ± 0,5	2,8 ± 2,2
2c (SEQ ID NO: 10)	..S..CTC..A.....	3,1 ± 0,6	7,3 ± 1,4
2d (SEQ ID NO: 11)	..G..CTC..A.....S..	7,4 ± 1,4	27,7 ± 5,4
2e (SEQ ID NO: 12)A.....	5,6 ± 2,0	ND
3D (SEQ ID NO: 13)	GAGACCTTCGCTTC	4,9 ± 0,5	19,9 ± 3,6
3Da (SEQ ID NO: 14)G.....	6,6 ± 1,5	33,9 ± 6,8
3Db (SEQ ID NO: 15)G.....A..	10,1 ± 2,8	25,4 ± 0,8
3Dc (SEQ ID NO: 16)	..C.A.....	1,0 ± 0,1	1,2 ± 0,5
3Dd (SEQ ID NO: 17)S.....	1,2 ± 0,2	1,0 ± 0,4
3De (SEQ ID NO: 18)S.....	4,4 ± 1,2	18,8 ± 4,4
3Df (SEQ ID NO: 19)A.....	1,6 ± 0,1	7,7 ± 0,4
3Dg (SEQ ID NO: 20)CC.G.ACT..	6,1 ± 1,5	18,6 ± 1,5
3M (SEQ ID NO: 21)	TGCTTCGCTTCGCTTC	4,1 ± 0,2	23,2 ± 4,9
3Ma (SEQ ID NO: 22)CT.....	0,9 ± 0,1	1,8 ± 0,5
3Mb (SEQ ID NO: 23)S.....	1,3 ± 0,3	1,5 ± 0,6
3Mc (SEQ ID NO: 24)S.....	5,4 ± 1,5	8,5 ± 2,6
3Md (SEQ ID NO: 25)A..T.....	17,2 ± 9,4	ND
3Me (SEQ ID NO: 26)C..A..	3,6 ± 0,2	14,2 ± 5,2

ES 2 320 315 T3

4	<u>SCAAGGT</u>	6,1 ± 1,4	19,2 ± 5,2	
4a	... <u>GC</u> ..	1,1 ± 0,2	1,5 ± 1,1	
4b	... <u>GC</u> ..	4,5 ± 0,2	9,6 ± 3,4	
5	4c	... <u>GC</u> ..	2,7 ± 1,0	ND
4d	... <u>GC</u> ..	1,3 ± 0,2	ND	
4e	... <u>GC</u> ..	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,5	
10	4f	... <u>GC</u> ..	3,9 ± 1,4	ND
4g	... <u>GC</u> ..	1,4 ± 0,3	ND	
4h	... <u>GC</u> ..	1,2 ± 0,2	ND	
15	LPS	7,8 ± 2,5	4,8 ± 1,0	

* Los índices de estimulación son las medias y desviaciones típicas derivadas de al menos 3 experimentos separados, y se comparan con pocillos cultivados sin ODN añadido. ND = no hecho. Los dinucleótidos CpG están subrayados. Los puntos indican identidad; Las rayas indican supresiones. Z indica 5 metil citosina).

Se investigó la cinética de activación de linfocitos usando células de bazo de ratón. Cuando se impulsaron las células al mismo tiempo como adición de ODN y se cosechan justo cuatro horas más tarde, había ya un aumento de dos veces en la incorporación de ³H uridina. La estimulación alcanzó un pico a las 12-48 horas y disminuyó después. Después de 24 horas, no se detectó ODN intacto, quizás justificando la subsiguiente caída de estimulación cuando se cultivaron células B con o sin anti-IgM (en una dosis submitogénica) con CpG ODN, se encontró que aumentaban sinérgicamente las proliferaciones aproximadamente 10 veces por los dos mitógenos en combinación después de 48 horas. La magnitud de la estimulación era dependiente de la concentración y superaba constantemente la de LPS en condiciones óptimas para ambos. Los oligonucleótidos que contenían una cadena principal de fósforotioato resistente a nucleasa eran aproximadamente doscientas veces más eficaces que oligonucleótidos no modificados.

Se usó análisis del ciclo de células para determinar la proporción de células B activadas por CpG-ODN. El CpG-ODN indujo ciclación en más del 95% de células B (Tabla 2). Linfocitos B esplénicos clasificados por citometría de flujo en subpoblaciones CD23- (zona marginal) y CD23+ (folicular) eran igualmente sensibles a la estimulación inducida por ODN, como lo fueron poblaciones en reposo y activadas de células B aisladas por fraccionamiento en gradientes de Percoll. Estos estudios demuestran que CpG-ODN induce esencialmente todas las células B para entrar en el ciclo de células.

TABLA 2
Análisis de ciclo de células con CpG ODN

Tratamiento	Porcentaje de células en		
	G0	G1	SA+G2+M
Medio	97,6	2,4	0,02
ODN 1a	95,2	4,8	0,04
ODN 1d	2,7	74,4	22,9
ODN 3Db	3,5	76,4	20,1
LPS (30 µg/ml)	17,3	70,5	12,2

Los efectos mitogénicos de CpG ODN en células humanas se ensayaron en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) obtenidas de dos pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL) como se describe en el Ejemplo 1. Un ODN testigo que no contenía secuencia de dinucleótido CpG no mostró efecto en la proliferación basal de 442 cpm y 874 cpm (proliferación medida por incorporación de ³H timidina) de las células humanas. Sin embargo, un CpG ODN modificado con fósforotioato 3 Md (SEQ ID NO: 25) indujo proliferación aumentada de 7.210 y 86.795 cpm respectivamente en los dos pacientes con una concentración de sólo 1 µM. Puesto que estas células se habían

congelado, pueden haber sido menos sensibles a los oligos que células recientes *in vivo*. Además, las células de pacientes con CLL son típicamente no proliferantes, que es por lo que la quimioterapia tradicional no es eficaz.

Ciertos linajes de células B tales como WEHI-231 son inducidos a experimentar detención del crecimiento y/o apoptosis en respuesta a reticulación de su receptor antígeno por anti-IgM (Jakway, J.P. *et al.*, "Growth regulation of the B lymphoma cell line WEHI-231 by anti-immunoglobulin, lipopolysaccharide and other bacterial products" *J. Immunol.* 137:2225 (1986); Tsubata, T., J. Wu y T. Honjo: B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40". *Nature* 364:645 (1993)). Las células WEHI-231 se rescatan de esta detención del crecimiento por ciertos estímulos tales como LPS y por el ligando CD40. Se encontró también que ODN que contenía el motivo CpG protege WEHI-231 de la detención del crecimiento inducida por anti-IgM, indicando que no se requieren para el efecto poblaciones de células accesorias.

Para entender mejor los efectos inmunes de CpG ODN no metilado, se midieron los niveles de citoquinas y prostaglandinas *in vitro* e *in vivo*. A diferencia de LPS, no se encontró que CpG ODN induzca macrófagos purificados para producir prostaglandina PGE2. De hecho, no se detectó efecto directo evidente de CpG ODN en macrófagos o células T. No se detectó en las primeras seis horas, *in vivo* o en células de bazo completas, un aumento significativo de las siguientes interleuquinas: IL-2, IL-3, IL-4 o IL-10. Sin embargo, el nivel de IL-6 aumentó notablemente en 2 horas en el suero de ratones inyectados con CpG ODN. Se detectó también en las primeras dos horas una expresión aumentada de IL-12 e interferón gamma (IFN- γ) por células del bazo.

Para determinar si CpG ODN puede causar estimulación inmune *in vivo*, se inyectaron ratones DBA/2 una vez intraperitonealmente con PBS o fósforotioato CpG o no-CpG ODN con una dosis de 33 mg/kg (aproximadamente 500 μ g/ratón). Los estudios de farmacocinética en ratones indican que esta dosis de fósforotioato da niveles de aproximadamente 10 μ g/g en tejido de bazo (dentro del intervalo de concentración eficaz determinado a partir de los estudios *in vitro* descritos aquí) durante más de veinticuatro horas (Agrawal, S. *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7595). Se examinó en células de bazo de ratones veinticuatro horas después de inyección de ODN la expresión de marcadores de activación de la superficie de células B Ly6A/E, Bla-1 y MHC clase II usando citometría de flujo de tres colores y su proliferación espontánea usando 3 H timidina. La expresión de los tres marcadores de activación aumentó significativamente en células B de ratones inyectados con CpG ODN, pero no de ratones inyectados con PBS u ODN no-CpG. La incorporación espontánea de 3 H timidina aumentó en 2-6 veces en células de bazo de ratones inyectados con el ODN estimulador en comparación con PBS o ratones inyectados con ODN no-CpG. Después de 4 días, los niveles de IgM del suero en ratones inyectados con CpG ODN *in vivo* aumentaron en aproximadamente 3 veces en comparación con los testigos. Consecuente con la incapacidad de estos agentes para activar células T, hubo un cambio mínimo en la expresión de células T de las IL-2R o CD-44.

La degradación de fosfodiéster ODN en suero es mediada principalmente por exonucleasas 3', mientras que la degradación intracelular de ODN es más compleja, implicando exonucleasas y endonucleasas 5' y 3'. Usando un panel de ODN que lleva la secuencia 3D con números variables de enlaces modificados por fósforotioato en los extremos 5' y 3', se determinó empíricamente que se requieren dos enlaces modificados 5' y cinco 3' para proporcionar estimulación óptima con este CpG ODN.

Oligos que contienen CpG no metilado tienen actividad estimuladora de células NK

Como se describe con mayor detalle en el Ejemplo 4, se realizaron experimentos para determinar si oligonucleótidos que contienen CpG estimulaban la actividad de células destructoras naturales (NK) además de células B. Como se muestra en la Tabla 3, se observó una inducción destacada de actividad de NK entre células del bazo cultivadas con CpG ODN 1 y 3Dd. Como contraste, no había relativamente inducción en efectores que se habían tratado con ODN testigo sin CpG.

TABLA 3

Inducción de actividad de NK por CpG oligodesoxinucleótidos (ODN)

	% de lisis* específica de YAC-1		% de lisis específica de 2C11	
	Efactor:	Objetivo	Efactor:	Objetivo
ODN	50:1	100:1	50:1	100,1
Ninguno	-1,1	1,4	15,3	16,6
1	16,1	24,5	38,7	47,2
3Dd	17,1	27,0	37,0	40,0
ODN sin CpG	-1,6	-1,7	14,8	15,4

Actividad neutralizante de oligos que contienen CpG metilado

Se ensayó como se describe en el Ejemplo 1 la mitogenicidad de células B de ODN en el que las citosinas en motivos CpG o en cualquier parte se sustituyeron por 5-metilcitosina. Como se muestra en la anterior Tabla 1, los ODN que contenían motivos CpG metilados eran no mitogénicos (Tabla 1; ODN 1c, 2f, 3De y 3Mc). Sin embargo, la metilación de citosinas distintas que en un dinucleótido CpG conservaban sus propiedades estimuladoras (Tabla 1, ODN 1d, 2d, 3Df y 3Md).

Actividad inmunoinhibidora de oligos que contienen una secuencia de trinucleótido GCG en o cerca de ambos términos

En algunos casos, se encontró que ODN que contienen dinucleótidos CpG que no están en el motivo estimulador descrito antes bloquean el efecto estimulador de otros CpG ODN mitogénicos. Específicamente, la adición de un motivo CpG atípico consistente en un GCG cerca de o en el extremo 5' y/o 3' de CpG ODN inhibía realmente la estimulación de proliferación por otros motivos CpG. La metilación o sustitución de la citosina en un motivo CpG invierte este efecto. Por sí mismo, un motivo GCG en un ODN tiene un efecto mitogénico modesto, aunque bastante más bajo que el que se ve con el motivo CpG preferido.

Mecanismos de acción propuestos de oligonucleótidos immunoestimuladores, neutralizantes e inmunoinhibidores

A diferencia de antígenos que provocan células B a través de su receptor de Ig superficial, CpG-ODN no indujo ningún flujo de Ca²⁺ detectable, cambios en la fosforilación de proteína tirosina o generación de IP 3. La citometría de flujo con ODN conjugado a FITC con o sin un motivo CpG se realizó como se describe en Zhao, Q. *et al.* (*Antisense Research and Development* 3:53-66 (1993)), y mostró una unión a membrana, absorción celular, emanación y localización intracelular equivalentes. Esto sugiere que puede no haber proteínas de membrana de células específicas para CpG ODN. En lugar de actuar a través de la membrana celular, esos datos sugieren que oligonucleótidos que contienen CpG no metilado requieren para su actividad absorción celular: ODN enlazado covalentemente a un soporte sólido de Teflon era no estimulador, al igual que ODN biotinado inmovilizado en perlas de avidina o placas petri revestidas de avidina. CpG ODN conjugado a FITC o biotina conservaba propiedades mitogénicas completas, indicando que no había impedimento estérico.

El motivo CpG óptimo (TGACGTT/C) es idéntico al CRE (elemento de respuesta de AMP cíclico). Al igual que los efectos mitogénicos de CpG ODN, la unión de CREB al CRE se suprime si el CpG central está metilado. Su usaron los ensayos de cambio de movilidad electroforética para determinar si los CpG ODN, que son de cadena sencilla, podían competir con la unión de proteínas CREB/ATF de células B a su lugar de unión normal, el CRE de doble cadena. Los ensayos de competición demostraron que ODN de cadena sencilla que contenía motivos CpG podía competir completamente con la CREB a su lugar de unión, mientras que ODN sin motivos CpG no podía. Estos datos apoyan la conclusión de que CpG ODN ejercen sus efectos mitogénicos interactuando con una o más proteínas CREB/ATF de células B de alguna manera. A la inversa, la presencia de secuencias GCG u otros motivos CPG atípicos cerca de los extremos 5' y/o 3' de ODN interactúa con proteínas CREB/ATF de una forma que no causa activación y puede incluso impedirla.

El motivo CpG estimulador es común en ADN genómico microbiano, pero bastante raro en ADN de vertebrados. Además, se ha informado de que ADN bacteriano induce proliferación de células B y producción de inmunoglobulina (Ig), mientras que el ADN de mamífero no (Messina, J.P. *et al.*, *J. Immunol.* 147:1759 (1991)). Los experimentos descritos adicionalmente en el Ejemplo 3, en los que se encontró que la metilación de ADN bacteriano con CpG metilasa suprime mitogenicidad, demuestran que la diferencia del estado de CpG es la causa de la estimulación de células B por ADN bacteriano. Este dato soporta la siguiente conclusión: los dinucleótidos CpG no metilados presentes dentro de ADN bacteriano son responsables de los efectos estimuladores de ADN bacteriano.

Teleológicamente, parece probable que la activación de linfocitos por el motivo CpG representa un mecanismo de defensa inmune que puede distinguir por ello ADN bacteriano de hospedante. El ADN de hospedante induciría pequeña o nula activación de linfocitos debido a su supresión y metilación de CpG. El ADN bacteriano causaría una activación de linfocitos selectiva en tejidos infectados. Puesto que la trayectoria de CpG actúa sinérgicamente con la activación de células B a través del receptor de antígeno, las células B que llevan receptor de antígeno específico para antígenos bacterianos recibirían una señal de activación a través de Ig de la membrana celular y una segunda señal de ADN bacteriano, y tenderían por tanto a activarse preferentemente. La interrelación de esta trayectoria con otras trayectorias de activación de células B proporciona un mecanismo fisiológico que emplea un antígeno policlonal para inducir respuestas específicas para el antígeno.

Método para fabricar oligos immunoestimuladores

Para su uso en la presente invención, pueden sintetizarse oligonucleótidos de novo usando cualquiera de un cierto número de procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el método de β -cianoetil fósforoamidita (S.L. Beaucage y M.H. Caruthers, (1981) *Tet. Let.* 22:1859); el método de nucleósido H-fosfonato (Garegg *et al.*, (1986) *Tet. Let.* 27: 4051-4054; Froehler *et al.*, (1988) *Nucl. Acid. Res.* 14: 5399-5407; Garegg *et al.*, (1986) *Tet. Let.* 27: 4055-4058, Gaffney *et al.*, (1988) *Tet. Let.* 29: 2619-2622). Estas químicas pueden realizarse mediante una variedad de sintetizadores de oligonucleótidos automatizados disponibles en el mercado. Alternativamente, pueden prepararse

ES 2 320 315 T3

oligonucleótidos a partir de secuencias de ácidos nucleicos existentes (por ejemplo, genómicos o cADN) usando técnicas conocidas, tales como las que emplean enzimas de restricción, exonucleasas o endonucleasas.

5 Para su uso *in vivo*, los oligonucleótidos son preferiblemente resistentes relativamente a degradación (por ejemplo, mediante endo- y exo-nucleasas). La estabilización de oligonucleótidos puede conseguirse mediante modificaciones de la cadena principal de fosfato. Un oligonucleótido estabilizado preferido tiene una cadena principal modificada con fósforotioato. La farmacocinética de ODN con fósforotioato muestra que tienen una vida media sistémica de cuarenta y ocho horas en roedores y sugiere que pueden ser útiles para aplicaciones *in vivo* (Agrawal, S. *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7595). Pueden sintetizarse fósforotioatos usando técnicas automatizadas que emplean 10 químicas de fósforamidato o H fosfonato. Pueden fabricarse aril- y alquil-fosfonatos, por ejemplo (como se describe en la Patente de los EE.UU. N° 4.469.863); y pueden prepararse alquifosfotriésteres (en los que el resto de oxígeno cargado se alquila como se describe en la Patente de los EE.UU. N° 5.023.243 y en la Patente Europea N° 092.574) mediante síntesis en fase sólida automatizada usando reactivos disponibles comercialmente. Se han descrito métodos para fabricar otras modificaciones y sustituciones de cadena principal de ADN (Uhlmann, E. y Peyman, A. (1990) 15 *Chem. Rev.* 90:544; Goodchild, J. (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:165).

Para administración *in vivo*, pueden asociarse oligonucleótidos con una molécula que produzca una unión de mayor afinidad a las superficies de una célula objetivo (por ejemplo, una célula B y una célula destructora natural (NK)) y/o una absorción celular aumentada por células objetivo para formar un “complejo de entrega de oligonucleótido”. 20 Los oligonucleótidos pueden asociarse iónica o covalentemente con moléculas apropiadas usando métodos que son muy conocidos en la técnica. Puede usarse una variedad de agentes de acoplamiento o reticulación, por ejemplo, proteína A, carbodiimida y N-succinimidil-3-(2-piridiltio)propionato (SPDP). Alternativamente, pueden encapsularse oligonucleótidos en liposomas o virosomas usando técnicas muy conocidas.

25 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes Ejemplos, que no deben considerarse en modo alguno como limitación adicional.

Usos terapéuticos de oligos inmunoestimuladores

30 En base a sus propiedades inmunoestimuladoras, pueden administrarse oligonucleótidos que contienen al menos un dinucleótido CpG no metilado a un sujeto *in vivo* para tratar una “deficiencia del sistema inmune”. Alternativamente, pueden ponerse en contacto oligonucleótidos que contienen al menos un dinucleótido CpG no metilado con linfocitos (por ejemplo, células B o células NK) obtenidos de un sujeto que tenga una deficiencia del sistema inmune *ex vivo*, y reimplantarse después en el sujeto linfocitos activados. 35

Pueden administrarse también oligonucleótidos inmunoestimuladores a un sujeto conjuntamente con la vacuna, como coadyuvante, para estimular el sistema inmune de un sujeto para efectuar una respuesta mejor de la vacuna. Preferiblemente, el dinucleótido CpG no metilado se administra ligeramente antes o al mismo tiempo que la vacuna.

40 La quimioterapia precedente con un oligonucleótido inmunoestimulador debe resultar útil para aumentar la capacidad de respuesta de las células malignas a quimioterapia subsiguiente. CpG ODN aumentó también la actividad de células destructoras naturales en células humanas y de ratón. La inducción de la actividad de NK puede igualmente ser beneficiosa en inmunoterapia de cáncer.

Usos terapéuticos para oligonucleótidos neutros

Pueden sintetizarse y administrarse a un sujeto *in vivo* oligonucleótidos que son complementarios de ciertas secuencias objetivo. Por ejemplo, oligonucleótidos antisentido se hibridan con mARN complementario, impidiendo por 50 ello la expresión de un gen objetivo específico. Los efectos específicos de la secuencia de oligonucleótidos antisentido los han hecho herramientas de investigación útiles para la investigación de función de proteínas. Están haciéndose ahora pruebas de fases I/II humanas de terapia antisentido sistémica para leucemia mielógena aguda y HIV.

Además, pueden administrarse a un sujeto sondas de oligonucleótidos (es decir, oligonucleótidos con una marca detectable) para detectar la presencia de una secuencia complementaria basada en la detección de marca unida. La 55 administración *in vivo* y la detección de sondas de oligonucleótidos pueden ser útiles para diagnosticar ciertas enfermedades que son causadas o exacerbadas por ciertas secuencias de ADN (por ejemplo, lupus eritematoso sistémico, sepsis y enfermedades autoinmunes).

Oligonucleótidos o sondas de oligonucleótidos antisentido en los que cualquiera o todos los dinucleótidos CpG 60 están metilados, no producirían una reacción inmune cuando se administran a un sujeto *in vivo* y serían por tanto más seguros que el correspondiente oligonucleótido que contiene CpG no metilado.

Para su uso en terapia, una cantidad eficaz de un oligonucleótido apropiado solo o formulado como un complejo de entrega de oligonucleótido puede administrarse a un sujeto por cualquier modo que permita al oligonucleótido ser 65 absorbido por las células objetivo apropiadas (por ejemplo, células B y células NK). Las vías preferidas de administración incluyen oral y transdérmica (por ejemplo, mediante un parche). Los ejemplos de otras vías de administración incluyen inyección (subcutánea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intratecal, etc.). La inyección puede ser en un bolus o una infusión continua.

Un oligonucleótido solo o como un complejo de entrega de oligonucleótido puede administrarse conjuntamente con un excipiente aceptable farmacéuticamente. Según se usa aquí, la frase “excipiente aceptable farmacéuticamente” se pretende que incluya sustancias que pueden coadministrarse con un oligonucleótido o un complejo de entrega de oligonucleótido y permita al oligonucleótido realizar su función pretendida. Los ejemplos de tales excipientes incluyen soluciones, disolventes, medios de dispersión, agentes de retardo, emulsiones y similares. El uso de tales medios para sustancias activas farmacéuticamente es muy conocido en la técnica. Cualquier otro excipiente convencional adecuado para su uso con el oligonucleótido está dentro del alcance de la presente invención.

La expresión “cantidad eficaz” de un oligonucleótido se refiere a la cantidad necesaria o suficiente para realizar un efecto biológico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un oligonucleótido que contenga al menos un CpG metilado para tratar una deficiencia del sistema inmune podría ser la cantidad necesaria para eliminar un tumor, cáncer o infección bacteriana, vírica o fúngica. Una cantidad eficaz para uso como coadyuvante de vacuna podría ser la cantidad útil para aumentar la respuesta inmune de un sujeto a una vacuna. Una “cantidad eficaz” de un oligonucleótido que carezca de un CpG no metilado para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con activación del sistema inmune, podría ser la cantidad necesaria para eliminar por competencia secuencias de nucleótidos que contengan CpG no metilado. La cantidad eficaz para cualquier aplicación particular puede variar dependiendo de factores tales como la enfermedad o estado a tratar, el oligonucleótido particular administrado, el tamaño del sujeto o la gravedad de la enfermedad o estado. Un experto ordinario en la técnica puede determinar empíricamente la cantidad eficaz de un oligonucleótido particular sin necesitar una experimentación indebida.

Los estudios señalados antes indican que oligonucleótidos que contienen CpG no metilado son directamente mitogénicos para linfocitos (por ejemplo, células B y células NK). Junto con la presencia de estas secuencias en ADN bacteriano, estos resultados sugieren que la infrarrepresentación de dinucleótidos CpG en genomas de animales, y la metilación extensiva de citosinas presentes en tales dinucleótidos, pueden explicarse por la existencia de un mecanismo de defensa inmune que puede distinguir ADN bacteriano del de hospedante. El ADN del hospedante estaría presente comúnmente en muchas regiones anatómicas y áreas de inflamación debido a apoptosis (muerte de células), pero generalmente induce poca o nula activación de linfocitos. Sin embargo, la presencia de ADN bacteriano que contenga motivos CpG no metilados puede causar activación de linfocitos precisamente en regiones anatómicas infectadas, donde sea beneficioso. Esta nueva trayectoria de activación proporciona una alternativa rápida a activación de células B específica para antígeno dependiente de células T. Sin embargo, es probable que la activación de células B no fuera totalmente no específica. Las células B que llevan receptores de antígeno específicos para productos bacterianos podrían recibir una señal de activación a través de Ig de la membrana celular, y una segunda de ADN bacteriano, provocando por ello más vigorosamente respuestas inmunes específicas para el antígeno.

Como con otros mecanismos de defensa inmune, la respuesta a ADN bacteriano podría tener consecuencias indeseables en algunas composiciones. Por ejemplo, respuestas autoinmunes a auto antígenos tenderían también a ser provocadas preferentemente por infecciones bacterianas, porque autoantígenos podrían proporcionar una segunda señal de activación a células B autorreactivas provocada por ADN bacteriano. Realmente, la inducción de autoinmunidad por infecciones bacterianas es una observación clínica común. Por ejemplo, la enfermedad autoinmune lupus eritematoso sistémico, que: i) se caracteriza por la producción de anticuerpos anti-ADN; ii) es inducida por fármacos que inhiben metiltransferasa de ADN (Cornacchia, E.J. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 92:38 (1993)); y iii) está asociada con metilación de ADN reducida (Richardson, B., L. *et al.*, *Arth. Rheum* 35:647 (1992)), es provocada probablemente al menos en parte por activación de células B específicas en ADN mediante señales estimuladoras proporcionadas por motivos CpG, así como por unión de ADN bacteriano a receptores de antígenos.

Además, la sepsis, que se caracteriza por alta morbilidad y mortalidad debidas a activación masiva y no específica del sistema inmune, puede iniciarse por ADN bacteriano y otros productos liberados desde bacterias moribundas que alcanzan concentraciones suficientes para activar directamente muchos linfocitos.

El lupus, la sepsis y otras “enfermedades asociadas con activación del sistema inmune” pueden tratarse, prevenirse o mejorarse administrando a un sujeto oligonucleótidos carentes de un dinucleótido CpG no metilado (por ejemplo, oligonucleótidos que no incluyen un motivo CpG u oligonucleótidos en los que el motivo CpG está metilado) para bloquear la unión de secuencias de ácidos nucleicos que contienen CpG no metilado. Los oligonucleótidos carentes de un motivo CpG no metilado pueden administrarse solos o conjuntamente con composiciones que bloquean una respuesta de células inmune a otros productos bacterianos mitogénicos (por ejemplo, LPS).

Lo siguiente sirve para ilustrar mecánicamente cómo oligonucleótidos que contienen un dinucleótido CpG no metilado pueden tratar, prevenir o mejorar la enfermedad lupus. Se piensa comúnmente que el lupus es provocado por infecciones bacterianas o víricas. Se ha informado de que tales infecciones estimulan la producción de anticuerpos no patógenos para ADN de cadena sencilla. Estos anticuerpos reconocen probablemente secuencias bacterianas principalmente que incluyen CpGs no metilados. A medida que se desarrolla la enfermedad en lupus, los anticuerpos anti-ADN cambian a anticuerpos patógenos que son específicos para ADN de doble cadena. Estos anticuerpos tendrían unión aumentada para secuencias de CpG metilado y su producción resultaría de un fallo de tolerancia en lupus. Alternativamente, puede resultar lupus cuando un ADN de paciente se hace hipometilado, permitiendo así a anticuerpos anti-ADN específicos para CpGs no metilados unirse a ADN propio y provocar autoinmunidad más extensamente a través del procedimiento a que se hace referencia como “extensión de epítopes”.

ES 2 320 315 T3

En cualquier caso, puede ser posible restaurar tolerancia en pacientes con lupus acoplado oligonucleótidos anti-génicos a un excipiente de proteína tal como gamma globulina (IgG). Se ha informado de que ADN de timo de becerro acomplejado con gamma globulina reduce la formación de anticuerpos anti-ADN.

5 Usos terapéuticos de oligos que contienen secuencias de trinucleótidos GCG en o cerca de ambos términos

En base a su interacción con CREB/ATF, los oligonucleótidos que contienen secuencias de trinucleótidos GCG en o cerca de ambos términos tienen actividad antivírica, independiente de cualquier efecto antisentido debido a complementariedad entre el oligonucleótido y la secuencia vírica fijada como objetivo. En base a esta actividad, una cantidad eficaz de oligonucleótidos inhibidores puede administrarse a un sujeto para tratar o prevenir una infección vírica.

Ejemplos

15 Ejemplo 1

Efectos de ODNs en síntesis de ARN total de células B y ciclo de células

20 Se purificaron células B de bazo obtenidos de ratones DBA/2 o BXSB exentos de patógenos específicos de 6-12 semanas de edad (criados en la instalación de cuidado de animales de la Universidad de Iowa; no se notaron diferencias de raza sustanciales) que se agotaron de células T con anti-Thy-1.2 y complemento y centrifugación sobre linfolito M (Cedarlane Laboratories, Hornby, Ontario, Canadá) ("células B"). Las células B contenían menos del 1% de células CD4⁺ o CD8⁺. Se repartieron 8 x 10⁴ células B por triplicado en placas de microtitulación de 96 pocillos en 100 µl de RPMI que contenía 10% de FBS (inactivado por calor a 65°C durante 30 min), 2-mercaptoetanol 50 µM, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y L-glutamato 2 mM. Se añadió ODN 20 µM al comienzo del cultivo durante 20 h a 37°C, se impulsaron las células con 1 µCi de ³H uridina y se cosecharon y contaron 4 h más tarde. Se enumeraron células B secretoras de Ig usando el ensayo de manchas ELISA después de cultivar células de bazo completas con ODN a 20 µM durante 48 h. Los datos, indicados en la Tabla 1, representan el índice de estimulación comparado con células cultivadas sin ODN. Las células cultivadas sin ODN dieron 687 cpm, mientras que las células cultivadas con 20 µg/ml de LPS (determinado por titulación ser la concentración óptima) dieron 99.699 cpm en este experimento. Los ensayos de incorporación de ³H timidina mostraron resultados similares, pero con alguna inhibición no específica por timidina liberada de ODN degradado (Matson S. y A.M. Krieg (1992) Nonspecific suppression of ³H-thymidine incorporation by control oligonucleotides. *Antisense Research and Development* 2:325).

35 Para análisis de ciclo de células, se cultivaron 2 x 10⁶ células B durante 48 h en 2 ml de medio de cultivo de tejidos solo, o con 30 µg/ml de LPS o con el ODN modificado con fósforotioato indicado a 1 µM. El análisis del ciclo de células se realizó como se describe en (Darzynkiewicz, Z. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:2881 (1981)).

40 Para ensayar los efectos mitogénicos de CpG ODN en células humanas, se obtuvieron células monocitos de sangre periférica (PBMCs) de dos pacientes con leucemia linfocítica crónica (CLL), una enfermedad en la que las células circulantes son células B malignas. Se cultivaron las células durante 48 h y impulsaron durante 4 horas con timidina tritiada como se ha descrito antes.

45 Ejemplo 2

Efectos de ODN en la producción de IgM de células B

50 Se trataron suspensiones de células simples de los bazo de ratones recién sacrificados con anti-Thy1, anti-CD4 y anti-CD8 y complemento por el método de Leibson *et al.*, *J. Exp. Med.* 154:1681 (1981)). Las células B restantes (< 0,02% de contaminación de células T) se aislaron de la banda del 63-70% de un gradiente de Percoll discontinuo por el procedimiento de DeFranco *et al.*, *J. Exp. Med.* 155:1523 (1982). Éstas se cultivaron como se ha descrito antes en ODN 30 µM o 20 µg/ml de LPS durante 48 h. El número de células B que segregaban activamente IgM fue máximo en este momento, como se determinó por ensayo de ELImanchas (Klinman, D.M. *et al.*, *J. Immunol.* 144:506 (1990)). En ese ensayo, se incubaron células B durante 6 h en placas de microtitulación revestidas de anti-Ig. La Ig que produjeron (> 99% de IgM) se detectó usando anti-Ig marcada con fosfatasa (Southern Biotechnology Associated, Birmingham, AL). Los anticuerpos producidos por células B individuales se visualizaron por adición de BCIP (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) que forma un precipitado azul insoluble en presencia de fosfatasa. Se usó la dilución de células que producen 20-40 manchas/pocillo para determinar el número total de células B secretoras de anticuerpos/muestra. 60 Todos los ensayos se realizaron por triplicado. En algunos experimentos, se ensayó IgM por ELISA en sobrenadantes de cultivo, y mostraron aumentos similares en respuesta a CpG-ODN.

65

ES 2 320 315 T3

Ejemplo 3

Estimulación de células B por ADN bacteriano

5 Se cultivaron células de DBA/2 B sin ADN o con 50 $\mu\text{g/ml}$ de a) *Micrococcus lysodeikticus*; b) bazo de ratones NZB/N; y c) ADNs genómicos de bazo de ratones NFS/N durante 48 h, y se impulsaron después con ^3H timidina durante 4 horas antes de cosechar células. Se digirieron muestras de ADN duplicadas con DNasa I durante 30 minutos a 37°C antes de añadirse a cultivos de células. ADN de *E. coli* indujo también un aumento de 8,8 veces en el número de células B secretoras de IgM en 48 horas usando el ensayo de manchas de ELISA.

10 Se cultivaron células DBA/2 sin aditivo, con 50 $\mu\text{g/ml}$ de LPS o el ODN 1; 1a; 4 o 4a a razón de 20 μM . Se cultivaron células y se cosecharon a las 4, 8, 24 y 48 horas. Se cultivaron células BXSB como en el Ejemplo 1 con 5, 10, 20, 40 u 80 μM de ODN 1; 1a; 4 o 4a o LPS. En este experimento, pocillos sin ODN tenían 3833 cpm. Cada experimento se realizó al menos tres veces con resultados similares. Las desviaciones típicas de los pocillos triplicados fueron < 5%.

Ejemplo 4

Efectos de ODN en la actividad destructora natural (NK)

20 Se cultivaron 10×10^6 células de bazo C57BL/6 en dos ml de RPMI (suplementado como se ha descrito para el Ejemplo 1) con o sin CpG 40 μM o sin CpG ODN durante cuarenta y ocho horas. Se lavaron células y se usaron después como células efectoras en un ensayo de liberación de ^{51}Cr a corto plazo con YAC-1 y 2C11, dos linajes celulares objetivo sensibles a NK (Ballas, Z.K. *et al.* (1993) *J. Immunol.* 150:17). Se añadieron células efectoras en
25 diversas concentraciones a 10^4 células objetivo marcadas con ^{51}Cr en placas de microtitulación de fondo en V en 0,2 ml, y se incubaron en 5% de CO_2 durante 4 h a 37°C. Se centrifugaron después las placas y se contó la radioactividad de una parte alícuota del sobrenadante. El porcentaje de lisis específica se determinó calculando la relación del ^{51}Cr liberado en presencia de células efectoras menos el ^{51}Cr liberado cuando se cultivan solas las células objetivo, sobre las cuentas totales liberadas después de la lisis de células en ácido acético al 2% menos las cpm de ^{51}Cr liberadas
30 cuando las células se cultivan solas.

Ejemplo 5

Estudios in vivo con CpG fósforotioato ODN

35 Se pesaron e inyectaron IP ratones con 0,25 ml de PBS estéril o el fósforotioato ODN indicado disuelto en PBS. Venticuatro horas más tarde, se cosecharon células de bazo, lavaron y colorearon para citometría de flujo usando 6B2 conjugado a ficoeritrina para entrada en células B conjuntamente con anti Ly-6A/E o anti-Iad (Pharmingen, San Diego, CA) o anti.Bla-1 (Hardy, R.R. *et al.*, *J. Exp. Med.* 159:1169 (1984)) conjugado a biotina. Se estudiaron dos ratones
40 para cada condición y se analizaron individualmente.

Ejemplo 6

Titulación de fósforotioato ODN para estimulación de células B

45 Se cultivaron células B con fósforotioato ODN con la secuencia de ODN 1a testigo o el CpG ODN 1d y 3Db y se impulsaron después de 20 h con ^3H uridina o después de 44 h con ^3H timidina antes de cosechar y determinar las cpm.

Ejemplo 7

Rescate de células B de apoptosis

55 Se cultivaron células WEHI-231 (5×10^4 /pocillo) durante 1 h a 37°C en presencia o ausencia de LPS o el ODN testigo 1a o el CpG ODN 1d y 3D antes de añadir anti-IgM (1 $\mu\text{g/ml}$). Se cultivaron células durante 20 h más antes de un impulso de 4 h con 2 $\mu\text{Ci/pocillo}$ de ^3H timidina. En este experimento, células sin ODN o con anti-IgM dieron $90,4 \times 10^3$ mediante adición de anti-IgM. El fósfodiéster ODN mostrado en la Tabla I dio protección similar, aunque con alguna supresión no específica debida a degradación de ODN. Cada experimento se repitió al menos 3 veces con resultados similares.

Ejemplo 8

Inducción in vivo de IL-6

65 Se inyectaron IP ratones hembras DBA/2 (2 meses de edad) con 500 μg de CpG o fósforotioato ODN testigo. En diversos momentos después de la inyección, se sangraron los ratones. Se estudiaron dos ratones para cada punto de tiempo. Se midió IL-6 por ELISA, y se calculó la concentración de IL-6 por comparación con una curva estándar generada usando IL-6 recombinante. La sensibilidad del ensayo fue 10 pg/ml. Eran indetectables niveles después de 8 h.

ES 2 320 315 T3

Ejemplo 9

Unión de CREB/ATF de células B a una sonda de CRE de doble cadena radiomarcada (CREB)

- 5 Extractos de células completas de células CH12.LX B mostraron 2 bandas retardadas cuando se analizaron por EMSA con la sonda de CRE (la sonda libre está fuera de la parte inferior de la figura). La(s) proteína(s) de CREB/ATF que se une(n) al CRE se hizo (hicieron) competir por la cantidad indicada de CRE frío, y por CpG ODN de cadena sencilla, pero no por no-CpG ODN.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un oligonucleótido inmunoestimulador sintético, de uso como medicamento, que contiene al menos un dinucleótido CpG no metilado, en el que el oligonucleótido es un fosfodiéster, no contiene un palíndromo de seis bases e incluye más de ocho pero no más de 100 nucleótidos.

2. Un oligonucleótido inmunoestimulador según la reivindicación 1ª, que incluye no más de 40 nucleótidos.

10 3. Un oligonucleótido inmunoestimulador según la reivindicación 1ª o la reivindicación 2ª, en el que el oligonucleótido tiene un efecto mitogénico en linfocitos de vertebrados.

4. Un oligonucleótido inmunoestimulador según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que contiene una secuencia representada por la siguiente fórmula:



20 en la que C y G son no metilados, X₁, X₂, X₃ y X₄ son nucleótidos y no está presente una secuencia de trinucleótido GCG en o cerca de los términos 5' y 3'.

5. Un oligonucleótido inmunoestimulador según la reivindicación 4ª, en el que X₁X₂ es un dinucleótido GpA.

25 6. Un oligonucleótido inmunoestimulador según la reivindicación 4ª, en el que X₃X₄ es un dinucleótido TpC o TpT.

7. Un oligonucleótido inmunoestimulador según las reivindicaciones 4ª, 5ª o 6ª, en el que la secuencia está representada por la siguiente fórmula:



en la que C y G son no metilados y X₁, X₂, X₃ y X₄ son nucleótidos.

35 8. Un oligonucleótido inmunoestimulador según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª-7ª, que incluye una pluralidad de dinucleótidos CpG no metilados.

9. Una composición, de uso como medicamento, que comprende un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª-8ª, en la que dicho oligonucleótido está en forma de un complejo de entrega del oligonucleótido.

40 10. Una composición según la reivindicación 9ª, en la que el oligonucleótido está asociado con un esteroles, un lípido o un agente de unión específico para una célula objetivo.

45 11. Una composición según la reivindicación 10ª, en la que el oligonucleótido está asociado con colesterol, un lípido catiónico, un virosoma, un liposoma o un ligando reconocido por un receptor específico de la célula objetivo.

12. Una composición según la reivindicación 10ª, en la que el agente de unión específico para una célula objetivo es específico para una célula B o una célula destructora natural.

50 13. Una composición, de uso como medicamento, que comprende un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª-8ª, o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 9ª-12ª, y un excipiente aceptable farmacéuticamente.

55 14. Un oligonucleótido inmunoestimulador según una cualquiera de las reivindicaciones 1ª-8ª, o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 9ª-13ª, de uso en un método para tratar, prevenir o mejorar una deficiencia del sistema inmune.

15. Un oligonucleótido inmunoestimulador o una composición según la reivindicación 14ª, en los que dicha enfermedad o trastorno es un tumor o cáncer, o una infección vírica, fúngica, bacteriana o parasitaria.

60 16. Un oligonucleótido inmunoestimulador o una composición según las reivindicaciones 14ª o 15ª, para activar células B de un sujeto.

65 17. Un oligonucleótido inmunoestimulador o una composición según las reivindicaciones 14ª o 15ª, para activar células destructoras naturales de un sujeto.

18. Un oligonucleótido inmunoestimulador o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14ª-17ª, en los que, en dicho método

ES 2 320 315 T3

a) han de ponerse en contacto linfocitos obtenidos del sujeto con un oligonucleótido inmunoestimulador como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1^a a 8^a o una composición como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 9^a-17^a, *ex vivo*, para producir por ello linfocitos activados; y

5 b) los linfocitos activados obtenidos en la etapa a) han de re-administrarse al sujeto.

19. Un oligonucleótido inmunoestimulador o una composición según la reivindicación 15^a, de uso para tratar, prevenir o mejorar leucemia.

10 20. Un oligonucleótido inmunoestimulador o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14^a-19^a, de uso en un método de quimioterapia.

15 21. Un oligonucleótido inmunoestimulador o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14^a-20^a, formulados para administración oral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, parenteral, intraperitoneal o intratecal.

22. Un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1^a-8^a, o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 9^a-13^a, de uso para tratar:

20 (a) un sujeto humano; o,

(b) un animal vertebrado no humano, opcionalmente, un perro, gato, caballo, vaca, cerdo, oveja, cabra, pollo, mono, rata o ratón.

25 23. El uso de un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1^a-8^a, o una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 9^a-13^a, para la fabricación de un medicamento de uso en un método definido en una cualquiera de las reivindicaciones 14^a-22^a.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 320 315 T3

	<400> 4	
	gctagangtt agcgt	15
5	<210> 5	
	<211> 15	
	<212> ADN	
10	<213> Sintético	
	<220>	
	<221> aspecto_misc	
15	<222> (13)..(13)	
	<223> n indica 5 metil citosina	
	<400> 5	
20	gctagacgtt agngt	15
	<210> 6	
25	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
30	<400> 6	
	gcatgacgtt gagct	15
35	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> ADN	
40	<213> Sintético	
	<400> 7	
45	atggaaggtc cagcgttctc	20
	<210> 8	
	<211> 20	
50	<212> ADN	
	<213> Sintético	
	<400> 8	
55	atcgactctc gagcgttctc	20
	<210> 9	
60	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
65	<220>	
	<221> aspecto_misc	
	<222> (3)..(14)	

ES 2 320 315 T3

	<223> n indica 5 metil citosina	
	<400> 9	
5	atngactctn gagngttctc	20
	<210> 10	
10	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
15	<220>	
	<221> aspecto_misc	
	<222> (3)..(3)	
	<223> n indica 5 metil citosina	
20	<400> 10	
	atngactctc gagcgttctc	20
25	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> ADN	
30	<213> Sintético	
	<220>	
	<221> aspecto_misc	
35	<222> (18)..(18)	
	<223> n indica 5 metil citosina	
40	<400> 11	
	atcgactctc gagcgttntc	20
45	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Sintético	
50	<400> 12	
	atggaaqgtc caacgttctc	20
55	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
60	<213> Sintético	
	<400> 13	
65	gagaacgctg gaccttccat	20
	<210> 14	

ES 2 320 315 T3

	<p><211> 20</p>	
	<p><212> ADN</p>	
	<p><213> Sintético</p>	
5	<p><400> 14</p>	
	<p style="padding-left: 40px;">gagaacgctc gaccttccat</p>	20
10	<p><210> 15</p>	
	<p><211> 20</p>	
	<p><212> ADN</p>	
15	<p><213> Sintético</p>	
	<p><400> 15</p>	
20	<p style="padding-left: 40px;">gagaacgctc gaccttcgat</p>	20
	<p><210> 16</p>	
	<p><211> 20</p>	
25	<p><212> ADN</p>	
	<p><213> Sintético</p>	
	<p><400> 16</p>	
30	<p style="padding-left: 40px;">gagcaagctg gaccttccat</p>	20
	<p><210> 17</p>	
35	<p><211> 20</p>	
	<p><212> ADN</p>	
	<p><213> Sintético</p>	
40	<p><220></p>	
	<p><221> aspecto_misc</p>	
	<p><222> (6)..(6)</p>	
45	<p><223> n indica 5 metil citosina</p>	
	<p><400> 17</p>	
50	<p style="padding-left: 40px;">gagaangctg gaccttccat</p>	20
	<p><210> 18</p>	
	<p><211> 20</p>	
55	<p><212> ADN</p>	
	<p><213> Sintético</p>	
	<p><220></p>	
60	<p><221> aspecto_misc</p>	
	<p><222> (14)..(14)</p>	
	<p><223> n indica 5 metil citosina</p>	
65	<p><400> 18</p>	
	<p style="padding-left: 40px;">gagaacgctg gacnttccat</p>	20

ES 2 320 315 T3

	<code><210> 19</code>		
	<code><211> 20</code>		
	<code><212> ADN</code>		
5	<code><213> Sintético</code>		
	<code><400> 19</code>		
10	<code>gagaacgatg gacctccat</code>		20
	<code><210> 20</code>		
	<code><211> 20</code>		
15	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Sintético</code>		
	<code><400> 20</code>		
20	<code>gagaacgctc cagcactgat</code>		20
	<code><210> 21</code>		
25	<code><211> 20</code>		
	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Sintético</code>		
30	<code><400> 21</code>		
	<code>tccatgctgg tcctgatgct</code>		20
35	<code><210> 22</code>		
	<code><211> 20</code>		
	<code><212> ADN</code>		
40	<code><213> Sintético</code>		
	<code><400> 22</code>		
45	<code>tccatgctgg tcctgatgct</code>		20
	<code><210> 23</code>		
	<code><211> 20</code>		
50	<code><212> ADN</code>		
	<code><213> Sintético</code>		
	<code><220></code>		
55	<code><221> aspecto_misc</code>		
	<code><222> (8)..(8)</code>		
	<code><223> n indica 5 metil citosina</code>		
60	<code><400> 23</code>		
	<code>tccatgtnng tcctgatgct</code>		20
65	<code><210> 24</code>		
	<code><211> 20</code>		
	<code><212> ADN</code>		

ES 2 320 315 T3

<213> Sintético

<220>

5 <221> aspecto_misc
<222> (12)..(12)
<223> n indica 5 metil citosina

10 <400> 24

tccatgtcgg tncatgatgct 20

15 <210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Sintético

20 <400> 25

tccatgacgt tctgatgct 20

25 <210> 26
<211> 20
<212> ADN

30 <213> Sintético

<400> 26

35 tccatgtcgg tctgctgat 20

<210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Sintético

40 <400> 27

45 ggggtcaagt ctgagggggg 20

50

55

60

65